



Estudio del papel del ácido abscísico como señal reguladora del proceso de Micorrización

José Ángel Martín Rodríguez

Granada, 2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: José Ángel Martín Rodríguez
D.L.: GR 1705-2013
ISBN: 978-84-9028-574-9

Universidad de Granada
Facultad de Ciencias
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

TESIS DOCTORAL

**Estudio del papel del ácido abscísico como
señal reguladora del proceso de
Micorrización**

Memoria presentada por D. José Ángel Martín Rodríguez,
Licenciado en biología, para optar al grado de Doctor

Fdo.: **José Ángel Martín Rodríguez**

VºBº del director de la Tesis Doctoral

Fdo.:
Dº José Manuel García Garrido
Doctor en Ciencias, sección Biológicas
Investigador Científico del CSIC

Universidad de Granada
Febrero, 201

Financiación y publicaciones

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos (Grupo de investigación “Microorganismos Rizosféricos Promotores del Crecimiento Vegetal”)trabajo, de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC).

Para la realización del siguiente trabajo, el Ldo. José Ángel Martín Rodríguez fue financiado por las siguientes fuentes:

- Beca predoctoral del Programa Nacional de Formación de Profesorado Univesirsitario (FPU) del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), disfrutada desde el 1 de Septiembre de 2008 hasta el 31 de Agosto de 2012.
- Proyectos de Investigación del Plan Nacional del MICINN (AGL2008-00742/AGR) y de la Junta de Andalucía (Grupo de Investigación BIO 260).
- Beca de movilidad FPU para estancias breves del MICINN, disfrutada en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de Valencia (Departamento de Regulación Hormonal de la Fructificación y el Desarrollo del Fruto), bajo la supervisión del Dr. José Luis García Martínez. Realizada del 1 de Septiembre al 30 de Octubre de 2010.

Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral se han publicado en revistas internacionales o están en vías de publicación:

- ❖ **Martín-Rodríguez JA, León-Morcillo RJ, Vierheilig H, Ocampo-Bote JA, Ludwig-Müller J, García-Garrido JM. 2010.** Mycorrhization of the *notabilis* and *sitiens* tomato mutants in relation to abscisic acid and ethylene contents. *Journal of Plant Physiology* **167**: 606-613.
- ❖ **Martín-Rodríguez JA, León-Morcillo RJ, Vierheilig H, Ocampo-Bote JA, Ludwig-Müller J, García-Garrido JM. 2011.** Ethylene-dependent/ethylene-independent ABA regulation of tomato plants colonized by arbuscular mycorrhiza fungi. *New Phytologist* **190**: 193-205.
- ❖ **Martín-Rodríguez JA, León-Morcillo RJ, Ocampo-Bote JA, Ludwig-Müller J, García-Garrido JM. 2013.** Antagonistic interaction between ABA and gibberellins during arbuscular mycorrhiza formation in tomato. *Plant physiology*. En trámite.

Asimismo, parte de los resultados obtenidos durante esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos y reuniones científicas:

- ❖ Plant Microbial Interactions (Cracovia – Polonia, Julio de 2008). Tipo de participación: Póster.
- ❖ IX Reunión de Biología Molecular de Plantas (Santiago de Compostela, Julio de 2008). Tipo de participación: Póster.
- ❖ Frontiers of plant research 2nd EMBO Conference on Plant Molecular Biology (Cadiz, Mayo de 2009). Tipo de participación: Póster.
- ❖ XX International conference on Plant Growth Substances (Tarragona, Junio de 2010). Tipo de participación: Póster.
- ❖ X Reunión de Biología Molecular de Plantas (Valencia, Julio de 2010). Tipo de participación: Póster.
- ❖ XI Reunión de Biología Molecular de Plantas (Segovia, Junio de 2012). Tipo de participación: Póster.

AGRADECIMIENTOS:

En unas breves palabras me gustaría agradecer a todas las personas que han hecho posible el final de esta investigación y realización de esta Memoria de Tesis Doctoral.

Al Dr. José Manuel García Garrido, director de esta Tesis Doctoral, por brindarme la oportunidad de trabajar con él, y así poder aprender mucho sobre el trabajo de investigación.

Al Dr. Juan Antonio Ocampo, jefe de grupo, por acogerme en su grupo de Investigación, por su apoyo continuo durante la realización de la Tesis y por aportar sabiduría en mi vida.

Gracias a Nuria y Maribel, tanto por enseñarme todo sobre el laboratorio como en su apoyo tanto en lo laboral como en lo personal. Como no a Julia, que hace que el laboratorio sea más cálido y familiar; a la Dra. Inmaculada García, siempre interesada en ayudar en todo lo que le pidas; a las Dras. Inmaculada Sampedro y Elizabet Aranda, por estar siempre ahí, ayudándome y aconsejándome en todos los obstáculos que aparecían durante la tesis; a M^a Ángeles y Patricia, por ser tan buenas compañeras de trabajo.

Gracias al Dr. Horst Vierheilig, el alemán que nos dejó durante este camino, y que era una persona agradable que siempre te aconsejaba y ayudaba en todo lo que podía.

Importante han sido durante los largos días en el laboratorio, mis compañeros de laboratorio que han pasado durante todo este tiempo. A Rafa, que entramos juntos, y que hemos pasado muy buenos momentos trabajando. A Merche y Rosario, ahora ya doctoras. A la Dr. Vilma, ahora en México. A José Siles y Rocío, que llegaron con una beca de iniciación a la investigación, y se quedaron después de ver el buen ambiente que se respiraba en este grupo. También a Sergio Saia, que vino para unos pocos meses, y ha dejado una gran huella en toda la EEZ. Y por último, a Rodolfo y Antonio, por su amistad y por toda la ayuda prestada en el laboratorio.

No me quiero olvidar de los grandes amigos que encontré durante el doctorado, como son Miguel (que también fue mi compañero de piso), Ana, Bine, Iván, Ainhoa, Eli, Álvaro, Bea, Javi, y varios más como Patricia, que también nos dejó durante el camino. Gracias a todos, ya que

hicieron que mi estancia en Granada, durante más de cuatro años, se me hiciera más amena y agradable.

Gracias a Eulogio por el cromatógrafo de gases, un aparato imprescindible para la realización de mi trabajo.

Gracias también a José María Arias que fue quien me presentó a este grupo de trabajo, y a Carmen Lluch Plá por aceptarme en su Máster de Biología Agraria y Acuicultura, y así poder realizar este trabajo de Tesis Doctoral, y también al resto de profesores del Máster.

Gracias a todas las personas que trabajan en la Estación Experimental del Zaidín, que siempre intentan hacer tu trabajo más ameno.

Gracias a todas las personas que me acogieron en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de Valencia. Empezando por el Dr. José Luis García Martínez, que me acogió en su laboratorio, al Dr. Omar Ruíz, que me guio y ayudó en todo mi trabajo que realicé en Valencia, y a la Dr. Esther, Teresa y Liliam, que hicieron sentirme cómodo en el laboratorio y en Valencia.

A mis padres por el apoyo desde pequeño que he recibido por parte de ellos, y por todos los valores que me han transmitido.

A mi hermano Ladislao por estar siempre ahí, cuando lo he necesitado.

A mi novia Marisel, por su cariño durante todo este tiempo. Teniendo la paciencia, debido tanto a la carga de no estar con ella durante la realización de la Tesis, como por aguantar mis malos momentos cuando las cosas no me iban del todo bien.

I.	INTERÉS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO	1
II.	INTRODUCCIÓN	5
II.1.	MICORRIZAS	5
II.1.1	Clasificación de las Micorrizas	6
II.2.	MICORRIZAS ARBUSCULARES.....	9
II.2.1	Clasificación de los hongos formadores de la Micorriza Arbuscular	16
II.2.2	Formación y morfología de la simbiosis Micorriza Arbuscular	18
II.2.2.1	Fase presimbiótica	20
II.2.2.2	Fase simbiótica	25
II.2.3	Fisiología de la simbiosis Micorriza Arbuscular.....	31
II.2.3.1	Nutrición Fosforada	32
II.2.3.2	Nutrición Nitrogenada	34
II.2.3.3	Metabolismo carbonado en plantas micorrizadas	36
II.3.	PARTICIPACIÓN HORMONAL EN LA REGULACIÓN DE LA SIMBIOSIS MICORRIZA ARBUSCULAR.....	38
II.3.1	Auxinas	39
II.3.2	Citoquininas	41
II.3.3	Ácido jasmónico.....	42
II.3.4	Etileno	45
II.3.5	Ácido salicílico.....	47
II.3.6	Estrigolactonas	49
II.4.	EL ÁCIDO ABCSÍCSICO Y SU PARTICIPACIÓN EN LA MICORRIZACIÓN	51
II.4.1	Estructura química y actividad biológica	51
II.4.2	Localización y movimiento del ABA.....	52
II.4.3	Biosíntesis del ABA	52
II.4.4	Genes que codifican los enzimas implicados en la ruta del metabolismo de ABA.....	55
II.4.5	Catabolismo de ABA	56
II.4.6	Hidroxilación de ABA	56
II.4.7	Conjugación de ABA	58
II.4.8	Transportadores de ABA.....	59
II.4.9	Percepción del ABA.....	60
II.4.10	Cascadas de señalización del ABA	61
II.4.11	Importancia del ABA en la interacción planta-microorganismos.....	63
II.4.12	Importancia del ABA en procesos de nodulación	63
II.4.13	Importancia del ABA en la formación de la simbiosis Micorriza Arbuscular.....	64
II.5.	EL ÁCIDO GIBERELEICO Y SU PARTICIPACIÓN EN LA MICORRIZACIÓN.....	65
II.5.1	Estructura química y actividad biológica	65
II.5.2	Biosíntesis de GAs	67
II.5.3	Desactivación de GAs	68
II.5.4	Genes que codifican los enzimas implicados en el metabolismo de GAs	70
II.5.5	Genes que codifican ciclasas.....	70
II.5.6	Genes que codifican monooxigenasas dependientes de citocromo P450	71
II.5.7	Genes que codifican dioxigenasas.....	71
II.5.8	Receptor de GAs y proteínas DELLA.....	73
II.5.9	Regulación de la ruta de biosíntesis de GAs por retroalimentación	74
II.5.10	Importancia de las GAs en interacciones planta-microorganismo.....	75

II.5.11	Importancia de las GAs en el proceso de nodulación	76
II.5.12	Importancia de las GAs en la formación de la simbiosis Micorriza Arbuscular	77
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	79
III.1.	MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	79
III.1.1	Variedades de plantas	79
III.1.2	Cultivo de plantas y germinación de semillas	80
III.1.3	Sustrato de cultivo y condiciones de cultivo de plantas	81
III.1.4	Tratamientos y requerimientos específicos de los cultivos.....	82
III.2.	CULTIVO CON EL HONGO MICORRÍFICO.....	85
III.2.1	Inóculo de <i>Glomus irregulare</i>	85
III.2.2	Inóculo de <i>Glomus mosseae</i>	86
III.3.	TINCIÓN Y DETERMINACIÓN DEL HONGO MICORRÍFICO EN LA RAÍZ.....	87
III.3.1	Tinción con azul tripán.....	87
III.3.2	Tinción de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (tinción ALP).....	88
III.3.3	Cuantificación del porcentaje de raíz micorrizada	89
III.3.4	Determinación de la frecuencia e intensidad de micorrización y del porcentaje de arbusculos en la raíz micorrizada.	90
III.3.5	Determinación del estado de desarrollo de los arbusculos	92
III.4.	DETERMINACIÓN DE NIVELES HORMONALES EN RAÍCES.....	93
III.4.1	Extracción y cuantificación de la producción de etileno en raíces	93
III.4.2	Extracción y cuantificación de la producción de ácido abscísico en raíces	94
III.4.3	Extracción y cuantificación de la producción de ácido abscísico y sus catabolitos en raíces.....	95
III.5.	DETERMINACIONES DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	97
III.5.1	Extracción de ARN de raíces.....	97
III.5.2	Tratamiento con desoxiribonucleasa (DNAsa I)	98
III.5.3	Cuantificación del ARN	99
III.5.4	Transcripción inversa de ARNm (RT)	99
III.5.5	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	100
III.5.6	PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).....	100
III.5.7	Cebadores utilizados y diseño de los mismos.....	103
III.5.8	Electroforesis en gel de agarosa	104
III.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	106
IV.	RESULTADOS	108
IV.1.	IMPORTANCIA DEL ÁCIDO ABCÍFICO (ABA) EN EL PROCESO DE FORMACIÓN DE LA SIMBIOSIS MICORRIZA ARBUSCULAR	109
IV.1.1	Análisis de la micorrización en diferentes mutantes de tomate deficientes en la biosíntesis de ABA	111
IV.1.2	Análisis de la micorrización en plantas de tomate tratadas con un inhibidor de la biosíntesis de ABA	117
IV.1.3	Análisis de la micorrización en plantas de <i>Medicago truncatula</i> tratadas con un inhibidor de la biosíntesis de ABA	120
IV.1.4	Efecto de la simbiosis Micorriza Arbuscular sobre el contenido en ABA y sus derivados en raíz	121

IV.2. REGULACIÓN POR ABA DEL PROCESO DE LA SIMBIOSIS MICORRIZA ARBUSCULAR EN PLANTAS DE TOMATE, DEPENDIENTE E INDEPENDIENTE DE LA ACCIÓN DE ETILENO.....	127
IV.2.1 Funciones distintas para etileno y el ABA durante la formación de la simbiosis Micorrización Arbuscular.....	127
IV.2.2 La sensibilidad de las plantas a etileno media el grado de colonización fúngica, tras inhibición de la biosíntesis de ABA.....	135
IV.2.3 El doble mecanismo: deficiencia de ABA e incremento de etileno causa una micorrización defectuosa en plantas mutantes <i>Sitiens</i> deficientes en ABA e inoculadas con <i>G. irregulare</i>	140
IV.2.4 El doble mecanismo: deficiencia de ABA e incremento de etileno causa una micorrización defectuosa en plantas mutantes <i>Sitiens</i> deficientes en ABA e inoculadas con <i>G. mosseae</i>	144
IV.3. IMPORTANCIA DEL ÁCIDO GIBERELEICO EN EL PROCESO DE FORMACIÓN DE LA SIMBIOSIS MICORRIZA ARBUSCULAR EN TOMATE.....	149
IV.3.1 Activación de genes del metabolismo de GAs durante el proceso de formación de la simbiosis Micorriza Arbuscular.....	149
IV.3.2 Análisis de la micorrización en plantas de tomates tratadas con diferentes concentraciones de GA ₃	156
IV.3.3 Análisis de la micorrización en plantas de tomate tratadas con diferentes inhibidores de GAs.....	160
IV.3.4 Afectación de la simbiosis Micorriza Arbuscular en plantas de tomate con activación constitutiva de la síntesis de GAs.....	167
IV.3.5 Afectación de la simbiosis Micorriza Arbuscular en plantas de tomate con una respuesta constitutiva a GAs.....	171
IV.4. INTERACCIÓN ENTRE EL ÁCIDO ABCSÍICO Y LAS GIBERELINAS DURANTE EL PROCESO DE FORMACIÓN DE ARBÚSCULOS EN LA SIMBIOSIS MICORRIZA ARBUSCULAR EN TOMATE.....	177
IV.4.1 Relación del ABA y las GAs durante la formación de la Micorrización Arbuscular.....	177
IV.4.2 Efecto del ABA en la micorrización de plantas mutantes <i>Procera</i> que exhiben una respuesta constitutiva a GAs.....	182
IV.4.3 Participación de las GAs en la simbiosis Micorriza Arbuscular defectuosa en plantas mutantes <i>Sitiens</i> deficientes en ABA.....	187
V. DISCUSIÓN.....	199
V.1. IMPORTANCIA DEL ÁCIDO ABCSÍICO (ABA) EN EL PROCESO DE FORMACIÓN DE LA MICORRIZA ARBUSCULAR: MECANISMO DEPENDIENTE E INDEPENDIENTE DE LA ACCIÓN DE ETILENO.....	199
V.2. IMPORTANCIA DE LAS GIBERELINAS EN EL PROCESO DE FORMACIÓN DE LA SIMBIOSIS MICORRIZA ARBUSCULAR Y SU INTERACCIÓN CON EL ÁCIDO ABCSÍICO.....	210
VI. CONCLUSIONES.....	222
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	225

I. INTERÉS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

La vida moderna conlleva una sobreexplotación acelerada de los recursos naturales, como suelo, aire, agua, flora, fauna; todos ellos de elevada fragilidad a la contaminación y a los sistemas de producción que perturban el balance ecológico. La agricultura actualmente en nuestros campos es de tipo intensivo, y utiliza grandes cantidades de fertilizantes y pesticidas. El uso abusivo de fertilizantes, en mayor cantidad de la que pueden absorber los cultivos, o cuando se eliminan por acción del agua o del viento de la superficie del suelo antes de que puedan ser absorbidos, afectan al equilibrio tanto de los ecosistemas de los que forman parte, como de ecosistemas alejados. Esto es debido principalmente a que los excesos de nitrógeno y fosfatos pueden infiltrarse en las aguas subterráneas o ser arrastrados a cursos de agua. Esta sobrecarga de nutrientes provoca la eutrofización de lagos, embalses y estanques y da lugar a una explosión de algas que suprimen otras plantas y animales acuáticos. Para evitar esto, surge entonces el concepto de nuevas prácticas ecológicas, cuya fundamentación se basa en aprovechar y mantener la fertilidad natural del suelo mediante rotación y asociación en policultivos, aporte de residuos orgánicos, recuperación del equilibrio de los minerales del suelo y la potenciación de microorganismos beneficiosos del suelo. Nuestro estudio se basa en los fertilizantes microbianos, los cuales tienen varios beneficios potenciales, ya que su aplicación es más fácil y menos nociva que los fertilizantes químicos, incrementa la calidad de la cosecha actual y de la siguiente, reduce los efectos nocivos de la fertilización química, y además facilita la absorción de nutrientes por las plantas, haciéndolas más competitivas respecto a otras plantas oportunistas e incrementando su resistencia a enfermedades o a estreses abióticos y bióticos.

En este sentido, los hongos formadores de micorriza arbuscular (MA) tienen un interés máximo, puesto que forman simbiosis mutualistas con un amplio abanico de plantas de interés agronómico. El establecimiento de la simbiosis MA repercute directamente en una mejor nutrición de la planta, principalmente por una mayor capacidad de captación de nutrientes minerales (esencialmente fósforo). Pero además de su potencialidad como agentes biofertilizantes, la formación de MA incrementa la resistencia de las plantas a situaciones de estrés, tanto abiótico (sequía, salinidad, etc.) como biótico, siendo los hongos de la micorriza arbuscular microorganismos con potencialidad demostrada en procesos de biocontrol.

Las señales, mecanismos y procesos moleculares que tienen lugar durante el establecimiento de la interacción son aún bastante desconocidos, si bien el resultado es una interacción compatible y mutualista. Una de las señales vegetales que participan de manera más activa en la compatibilidad y funcionamiento de la micorriza arbuscular son las hormonas vegetales, y son muchas las publicaciones científicas que apuntan a que los cambios en la homeostasis hormonal pueden ser un factor clave en la formación y funcionamiento de la simbiosis MA. Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados al respecto están basados en medidas de concentración hormonal o en medidas del efecto sobre la micorrización ocasionado por el aporte exógeno de la hormona en cuestión, existiendo pocos datos sobre la función real de cada hormona y la importancia de cada una de ellas en las distintas etapas de la formación de la MA.

Investigaciones recientes, tanto en nuestro grupo de investigación como en otros grupos, han revelado la importancia tanto del ácido salicílico, como del ácido jasmónico en el proceso de micorrización, así como la posible implicación de estos mecanismos de regulación hormonal en el fenómeno de bioprotección frente a hongos fitopatógenos en plantas micorrizadas. Resultados recientes han puesto de manifiesto una clara funcionalidad del ácido abscísico (ABA) en el proceso de micorrización, siendo esencial para una correcta formación de los arbusculos y un desarrollo normal de la colonización fúngica. Estos resultados, unido al hecho de su posible acción antagónica con etileno en el proceso de micorrización, avalan la necesidad de profundizar en el estudio del ABA como modulador del proceso de formación de la MA.

Es sabido de la importancia del ABA en procesos de crecimiento y desarrollo vegetal, ambos afectados por la micorrización, y existe un interés creciente en el estudio de este compuesto como regulador de procesos de respuesta defensiva de la planta frente al ataque de patógenos, respuesta también alterada durante la micorrización. Además, y según resultados anteriores, el ABA es fundamental en la formación de arbusculos y susceptibilidad a la micorrización. Dadas estas premisas, el objetivo general de la investigación presentada en esta tesis está enfocado en el estudio de la participación del ABA como compuesto regulador de la micorrización arbuscular, siendo esta investigación de máximo interés dentro del contexto general del estudio de mecanismos y procesos moleculares que tienen lugar durante el establecimiento de la interacción MA. El conocimiento de estos mecanismos básicos de compatibilidad y funcionamiento en beneficio mutuo de la asociación nos permitirá conocer su funcionamiento básico, y en consecuencia aplicar metodologías de mejora en el rendimiento de la simbiosis que en definitiva

repercutirá en un mayor rendimiento de los cultivos. Por otro lado, la interacción del ABA con otras moléculas “señal”, tales como el etileno, el ácido jasmónico o las giberelinas es un hecho demostrado, tanto en procesos de desarrollo de la planta como de interacción de la misma con microorganismos patógenos, siendo además estas moléculas parte importante del puzle que supone la regulación molecular de la micorrización. Por tanto, resulta de máximo interés conocer si la función del ABA durante la formación de la MA es dependiente o independiente de la acción de estas otras moléculas.

Con el fin de conseguir este objetivo general se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- Determinar el papel del ABA en el proceso de micorrización.
- Determinar efector coordinados y dependientes en la actuación de ABA y etileno durante el proceso de micorrización.
- Determinar efectos coordinados y dependientes en la actuación de ABA y giberelinas durante el proceso de micorrización.

I. INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

II.1. MICORRIZAS

La zona adyacente a la raíz de las plantas se denomina rizosfera, y abarca unos pocos milímetros desde la superficie de la raíz, soportando altos niveles de actividad microbiana (Hawkes *et al.*, 2007), y encontrándose en ella tanto microorganismos perjudiciales como beneficiosos para la planta. Los principales beneficios que para las plantas pueden aportar estos microorganismos son: degradación de la materia orgánica, solubilización de compuestos minerales, aporte de nutrientes a las plantas, eliminación de residuos tóxicos (metales pesados, xenobióticos), producción de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal y protección frente a agentes patógenos, tanto inhibiendo su desarrollo como induciendo su resistencia sistémica en plantas (ISR por las siglas de su nombre en inglés, ‘**I**nduced **S**ystemic **R**esistance’) (van Loon *et al.*, 1998). Entre los microorganismos beneficiosos para las plantas presentes en la rizosfera tienen especial importancia los hongos implicados en la asociación simbiótica mutualista denominada micorriza, que se establece entre hongos del suelo y la raíz de la planta. Su relevancia radica tanto en su ubicuidad como en los numerosos beneficios que supone para las plantas establecer asociación micorrízica. El hongo ayuda a la absorción de nutrientes minerales del suelo mediante un sistema ramificado de hifas extraradicales capaz de explorar el suelo más allá de la zona de influencia de la raíz, e incrementa la resistencia de las plantas a estreses bióticos y abióticos. A cambio, la planta proporciona al hongo compuestos carbonados, procedentes de la fotosíntesis, así como un microhábitat protegido, la raíz (Simon *et al.*, 1993; Smith & Read, 1997).

El término "micorriza" (del griego "mikos", hongo, y "rriza", raíz) fue utilizado por vez primera a finales de siglo XIX (Frank, 1885). Sin embargo, no sería hasta mediados del siglo XX cuando se empezara a poner de manifiesto la importancia y el significado de estas asociaciones, así como la universalidad de las mismas. Actualmente se estima que el 90% de las plantas que crecen sobre la Tierra están micorrizadas (Smith & Read, 2008), encontrándose esta asociación en la inmensa mayoría de los hábitats naturales (Barea & Azcon-Aguilar, 1983), incluso en las condiciones más adversas (Mosse *et al.*, 1981; Hayman, 1982). Hoy se sabe que las micorizas son tan antiguas como las propias plantas y que su origen se remonta al Ordovicio (hace 460 millones de años), tal y como se deduce de la observación y datación del primer

registro fósil de micorrizas que se conoce (fósil Rhynie, datado en 370 millones de años) (Redecker *et al.*, 2000), por lo que se propone a los hongos formadores de micorrizas como asistentes de las plantas en la colonización de la tierra (Pirozynski & Malloch, 1975; Simon *et al.*, 1993; Redecker *et al.*, 2000).

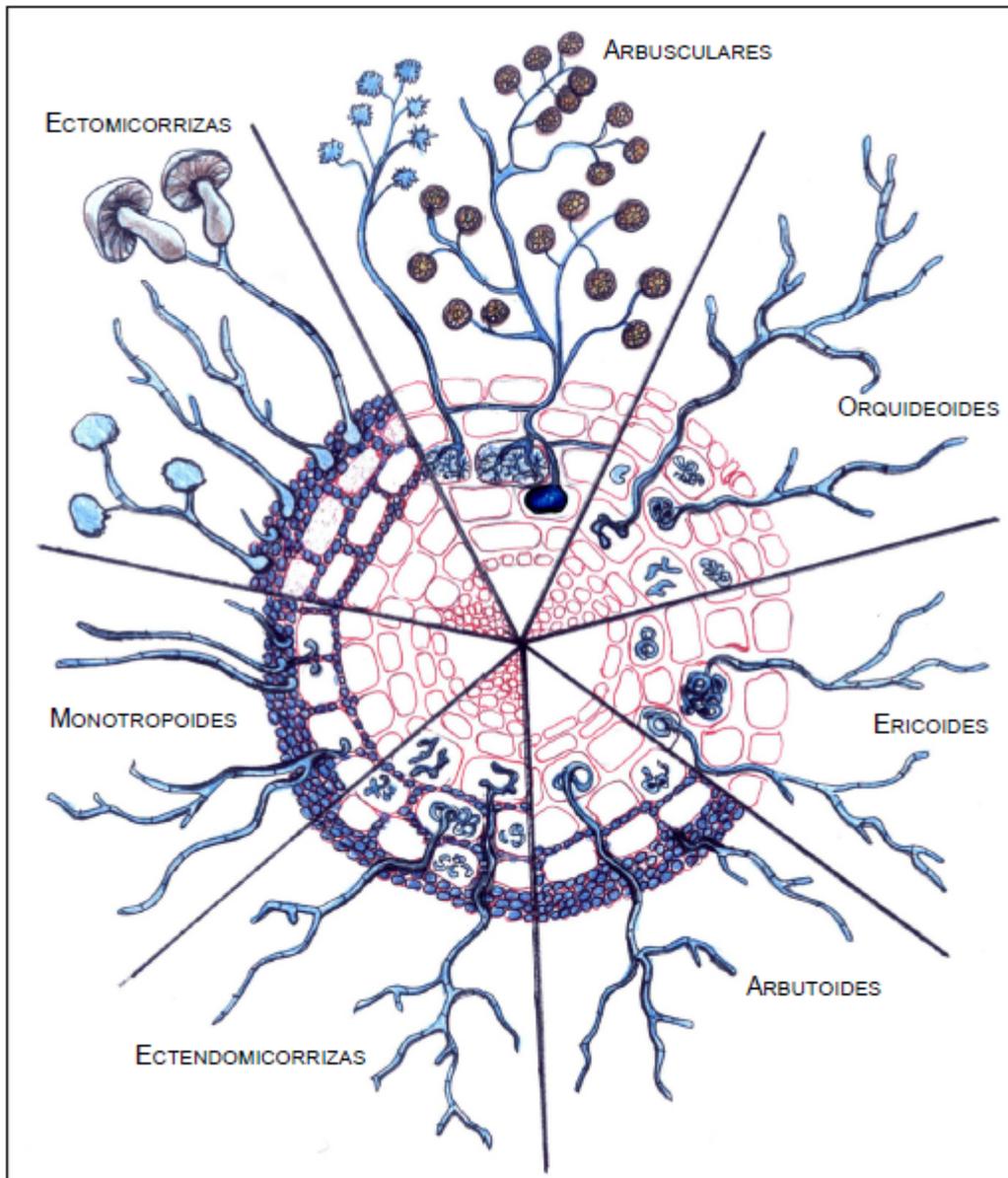


Figura II.1. Esquema de tipos de micorrizas. Por Medina-Villena, M.

II.1.1 Clasificación de las Micorrizas

El término micorriza engloba a muchos y muy diversos tipos de asociaciones entre hongos del suelo y plantas. En un principio se clasificaron a las micorrizas en ectomicorrizas y

endomycorrizas (Smith & Read, 1997), y en la actualidad, y atendiendo a la diversidad estructural de micorrizas, estas se clasifican en siete tipos morfológicos distintos (Figura II.1) (Smith & Read, 2008):

- a. Ectomicorrizas → En esta simbiosis intervienen varias especies de gimnospermas y angiospermas, y muchas de ellas con importancia de interés forestal, como las familias *Fagaceae*, *Belutaceae*, *Pinaceae* entre otras. Se caracteriza este tipo de micorriza porque el hongo forma un manto de hifas que encierra la raíz y ocupa espacios intercelulares del córtex, aunque sin penetrar en las células de la raíz, dando lugar a una estructura característica denominada red de Hartig (Smith & Read, 2008). A partir de esta red de hifas se extienden y expanden las hifas hacia la superficie del suelo formando el micelio extraradical. El desarrollo de la red de Hartig depende de la especie vegetal, y puede llegar a ser leve o ausente, como en el género *Pisonia* (Smith & Read, 2008). Los hongos que forman este tipo de micorrizas pertenecen generalmente al phylum *Basidiomycota*, aunque también algunos están clasificados dentro del phylum *Ascomycota*. Este tipo de micorrizas se caracteriza porque los hongos durante su ciclo de vida forman cuerpos fructíferos, que se desarrollan desde del manto de hifas hacia la superficie, en donde se producen las esporas, formando las denominadas setas, entre las cuales existen algunas de gran interés culinario como la apreciada trufa negra (*Tuber melanosporum*).
- b. Ectendomycorrizas → Esta simbiosis la forman algunos hongos *Ascomycota* y *Basidiomycota* y algunas angiospermas y gimnospermas de los géneros *Pinus* y *Larix* (Danielson, 1984; Yu *et al.*, 2001). En este caso, las hifas del hongo forman también la red de Hartig, pero a diferencias de las ectomicorrizas, el manto en este caso está reducido o ausente y algunas hifas penetran dentro de las células de la planta. Se ha comprobado que ciertas especies de hongos pueden formar ectomicorrizas en unas especies de plantas y ectendomycorrizas en otras (Smith & Read, 2008).
- c. Micorrizas arbutoides → Las plantas que dan lugar a esta asociación pertenecen a las familias *Ericaceae* y *Pyrolaceae* del orden Ericales, y los hongos son del orden *Basidiomycota*, prácticamente los mismos que los formadores de ectomicorrizas. Las micorrizas arbutoides nos recuerdan mucho a las ectendomycorrizas, ya que poseen una vaina, hifa externa y usualmente una bien desarrollada red de Hartig. Sin embargo, se engloban en un grupo aparte porque tiene un extensivo desarrollo intracelular de hifas en forma de bobinas en las células de la planta (Peterson *et al.*, 2004).
- d. Micorrizas monotropoides → Se forman entre varios géneros de plantas pertenecientes a la familia *Monotropaceae* y hongos de la división *Basidiomycota*. Son parecidas a los tres tipos

de micorrizas anteriores al tener una vaina fúngica bien desarrollada y red de Hartig, pero difieren con las anteriores porque la forman plantas heterotróficas que son totalmente aclorófilas para la totalidad o parte de su vida, y además se forma una estructura altamente especializada tipo haustorio que penetra en las células epidérmicas y forman una estructura llamada gancho fúngico (Duddridge & Read, 1982). El hongo también forma ectomicorrizas en plantas autotróficas vecinas y se piensa que el carbono orgánico se transfiere a la planta *Monotropaceae*, y por esta razón se ha sugerido llamar a esta asociación mico-heterotrófica (Leake, 1994; Smith & Read, 2008).

- e. Micorrizas orquideoides → En este caso, la micorriza la forman plantas de la familia *Orchidaceae*, que son parcial o completamente aclorófilas para alguna parte de su vida, y que se asocian con hongos *Basidiomycota* de diversas afinidades. Como característica morfológicas del hongo cabe resaltar que tras penetrar en las células de la raíz forma ovillos de hifas dentro de la célula hospedadora, previa invaginación de la membrana plasmática, así como agregados poco organizados de hifas que liberan los nutrientes cuando degeneran (Peterson *et al.*, 1998; Rasmussen, 2002). La división entre las orquídeas que son de color verde para parte de su vida y las que son totalmente aclorófilas se refleja en las identidades de sus hongos asociados, ya que los hongos simbioses de orquídeas verdes son saprófitos que pertenecen a la forma del género *Rhizoctonia*, y los de orquídeas aclorófilas suelen ser hongos formadores de ectomicorrizas en las plantas autotróficas (Smith & Read, 2008).
- f. Micorrizas ericoides → En esta simbiosis participan muchos miembros de la familia *Ericaceae* (plantas de brezo) y familias relacionadas, todas ellas con la peculiaridad de formar pelos radicales que se caracterizan por la falta de crecimiento secundario y por estar compuestas la raíz por tan solo el haz vascular, una o dos capas de células corticales y una capa más de células epidérmicas. Los hongos que forman este tipo de micorrizas son todos de la división *Ascomycota*, y envuelven a las raíces en una trama extensa de hifas extraradicales y también penetran intracelularmente, aunque solo en las células epidérmicas, formando un complejo de hifas ramificadas. Muchas de estas plantas crecen en hábitats donde la mayor parte de los nutrientes en el suelo están en forma orgánica y parece claro que los hongos tienen un papel considerable en la movilización de estos nutrientes para ponerlos a disposición de la planta (Smith & Read, 2008).
- g. Micorrizas arbusculares → Es la asociación de mayor distribución entre las plantas, encontrándose en angiospermas, gimnospermas, helechos y briofitos. La forman hongos de la división *Glomeromycota* (Schüßler *et al.*, 2001). Tradicionalmente esta simbiosis se conocía como micorrizas vesículo-arbusculares por la capacidad de ciertos hongos de formar tanto

II. INTRODUCCIÓN

arbusculos como vesículas en el interior de la raíz (Taylor *et al.*, 1995). Actualmente se conocen genéricamente como micorrizas arbusculares y su estructura y función se tratarán con mayor detalle en el siguiente apartado.

En la tabla II.1 se muestra de forma general las características más importantes de cada tipo de micorriza:

Tabla II.1. Características más importantes de los tipos de micorrizas.

Tipo de micorriza	a	b	c	d	e	f	g
Hongo septado	+	+	+	+	+	+	-
Colonización intracelular	-	+	+	+	+	+	+
Manto fúngico	+	+ o -	+ o -	+	-	-	-
Red de Hartig	+	+	+	+	-	-	-
Aclorófila	-	-	-	+	-	+	-(+)
Taxonomía fúngica	<i>Basidio</i> <i>Asco</i> (<i>Glomero</i>)	<i>Basidio</i> <i>Asco</i>	<i>Basidio</i>	<i>Basidio</i>	<i>Asco</i>	<i>Basidio</i>	<i>Glomero</i>
Taxonomía de la planta	<i>Gymno</i> <i>Angio</i>	<i>Gymno</i> <i>Angio</i>	<i>Ericales</i>	<i>Monotro- poideae</i>	<i>Ericales</i> <i>Bryo</i>	<i>Orchidales</i>	<i>Bryo</i> <i>Pterido</i> <i>Gymno</i> <i>Angio</i>

Las características estructurales están relacionadas con su estado maduro, no en estados de desarrollo o senescencia. Entre paréntesis se indican condiciones raras. Los tipos de micorrizas se corresponden con las siguientes letras: a. Ectomicorrizas, b. Ectendomicorrizas, c. Micorrizas arbutoides, d. Micorrizas monotropoides, e. Micorrizas orquideoides, f. Micorrizas ericoides, g. Micorrizas arbusculares. Los taxones fúngicos son abreviaciones de *Glomeromycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota*; los taxones de plantas son abreviaciones de *Bryophyta*, *Pteridophyta*, *Gymnospermae* y *Angiospermae* (Smith & Read, 2008).

II.2. MICORRIZAS ARBUSCULARES

Las micorrizas arbusculares (MA) son asociaciones de plantas con hongos de la división *Glomeromycota* (Schüßler *et al.*, 2001) y constituyen el grupo de micorrizas más extendidas en el reino vegetal, pues se estima que más del 80% de las plantas terrestres forman este tipo de

asociación, incluyendo especies importantes para la agricultura y la horticultura (Smith & Read, 1997), y encontrándose en angiospermas, gimnospermas, y plantas inferiores como helechos y briofitos. Solo algunas familias, entre ellas las *Chenopodiaceae*, *Cruciferae*, *Fumariaceae*, *Urticaceae* y *Poligonaceae*, poseen especies que habitualmente no forman este tipo de simbiosis (Trappe, 1986; Vierheilig *et al.*, 1996; Smith & Read, 1997).

El nombre “arbuscular” hace referencia a la estructura fúngica intraradical más característica de este tipo de simbiosis, el arbusculo (Gallaud, 1905), aunque en otras muchas ocasiones también es muy característico la presencia de vesículas, que son estructuras fúngicas de almacenamiento formadas entre las células vegetales, por lo que durante mucho tiempo se utilizó el término micorriza vesículo arbuscular (VAM, por sus siglas en inglés “Vesicular Arbuscular Mycorrhiza”) (Smith & Read, 1997) para definir este tipo de asociación. Actualmente el término vesicular no se utiliza, pues no todos los hongos que forman micorriza arbuscular forman vesículas. Además de las estructuras intraradicales, el hongo formador de micorriza arbuscular desarrolla una red de micelio externo a la raíz, que conecta la planta con los microhábitats del suelo, y que es más eficaz que la propia raíz para extraer nutrientes y agua del mismo (Smith & Read, 2008).

La simbiosis MA está considerada como la simbiosis más antigua desde el punto de vista evolutivo (Pirozynski & Malloch, 1975), y prueba de ello es que se han encontrado hifas y arbusculos en fósiles de *Aglaophyton*, evidenciándose la existencia de micorrizas al principio del Devónico (Remy *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1995). Incluso se han encontrado fósiles de esporas de hongos formadores de MA datadas en 460 millones de años de antigüedad, en la época del Ordovicio (Redecker *et al.*, 2000). Los resultados recientes de análisis y comparación de divergencias de las secuencias de nucleótidos del ARN ribosómico (ARNr) 18s de hongos formadores de micorriza arbuscular sugiere que esta micorriza surgió hace 350 – 460 millones de años. Teniendo en cuenta que en este periodo del Ordovícico tuvo lugar la colonización del medio terrestre por las plantas a partir del medio acuático, se postula que la simbiosis fue necesaria para la colonización de ese medio terrestre por parte de las plantas (Pirozynski & Malloch, 1975; Simon *et al.*, 1993; Redecker *et al.*, 2000). Quizá sea esta larga co-evolución conjunta la causa de una de las características principales de este tipo de hongos, su carácter de biotrofos obligados. Este hecho condiciona la necesidad del hongo de encontrar y colonizar una raíz hospedadora para poder continuar su crecimiento y completar su ciclo de vida, con la formación de nuevos propágulos viables (Shachar-Hill *et al.*, 1995; Solaiman & Saito, 1997;

Bago *et al.*, 2000). Esta circunstancia es una de las principales limitantes del estudio de la biología de los hongos MA, así como de los desarrollos biotecnológicos que permitan sus aplicaciones prácticas.

Las MA tienen un alto potencial ecológico, ya que estas asociaciones se han encontrado en las diferentes partes del planeta y en todas las latitudes, desde latitudes altas, como el norte del Círculo Polar Ártico (Newsham *et al.*, 2009) y la Antártida (DeMars & Boerner, 1995), hasta en bosques tropicales (Alexander & Selosse, 2009), y en ecosistemas terrestres de todo el mundo, incluyendo tanto los sistemas naturales como los afectados por la actividad humana (Chaudhary *et al.*, 2008). El hecho de que se encuentre en casi todos los parajes del planeta puede estar en concordancia a su historia evolutiva conjunta con las plantas. En estos distintos ecosistemas, los hongos formadores de MA al igual que los otros tipos de hongos formadores de micorrizas, además de interactuar con las plantas también lo hacen con otros microorganismos, y a esta zona de influencia fúngica donde interactúan micorrizas-plantas-microorganismos se le denomina micorrizosfera, e incluye la zona de la rizosfera más la zona de las hifas extraradicales (Rambelli, 1973).

Por otro lado, y en base a un análisis molecular basado en la secuencia de la subunidad pequeña (SSU, por sus siglas en inglés “Small Subunit Ribosomal”) del ARNr (Krüger *et al.*, 2012) solo se han identificado, hasta el momento, unas 230 especies de hongos formadores de MA, pertenecientes a la división *Glomeromycota*. Si comparamos esta cifra frente a la gran variedad de plantas que son micorrizadas es fácil deducir que cada hongo tiene un amplio rango de hospedadores, no existiendo especificidad. No obstante, y aunque la interacción hongo MA-planta no es específica, la compatibilidad y funcionalidad de la simbiosis no es la misma para todas las posibles interacciones entre las distintas especies de hongos y plantas hospedadoras.

Los hongos formadores de MA desarrollan esporas multinucleadas de resistencia sobre hifas vegetativas (Bécard & Pfeffer, 1993; Hosny *et al.*, 1998). Aunque se acepta que se reproducen asexualmente, análisis transcriptómicos recientes indican que estos hongos disponen de la información genética necesaria para llevar a cabo la meiosis y en consecuencia una reproducción sexual (Tisserant *et al.*, 2012). Existen, además, indicios de variabilidad genética dentro de una misma espora, lo que se manifiesta por la presencia de polimorfismos a nivel de la secuencia de los genes que codifican el ARN ribosómico (Lanfranco *et al.*, 1999; Clapp *et al.*, 2001), así como el número de estos *loci* en un mismo núcleo (Trouvelot *et al.*, 1999). Además los hongos MA

podrían aumentar su patrimonio genético mediante el intercambio de núcleos de unas colonias fúngicas con otras. Las hifas de los hongos MA son cenocíticas, con cientos de núcleos compartiendo un mismo citoplasma, al igual que en las esporas. En repetidas ocasiones se ha puesto de manifiesto la formación de anastomosis entre hifas de la misma especie e incluso entre aislados muy relacionados entre sí (Giovannetti *et al.*, 2001; De La Providencia *et al.*, 2005; Purin & Morton, 2011), permitiendo el intercambio de núcleos (Giovannetti *et al.*, 2001).

En cuanto a las características del genoma de los hongos MA, se ha observado la existencia tanto de secuencias de copia única como de secuencias repetidas, ocupando estas en *G. irregulare* alrededor del 1,6% de su genoma (Hijri & Sanders, 2004). Se han encontrado secuencias con homología con *Long Terminal-Repeats* (LRTs) de retrotransposones (Gollotte *et al.*, 2006). Además el genoma de estos hongos contienen un bajo contenido de GC, entorno al 35% (Martin *et al.*, 2008), con casi el 25% de la citosina metilada, un valor bastante alto para hongos.

La formación de MA aporta unos beneficios a la planta, que podemos recoger de manera resumida en los siguientes siete puntos:

1. Incremento en la absorción de nutrientes desde el suelo, principalmente debido a la captación por las hifas extraradicales fúngicas, que exploran el suelo distante de la raíz donde no hay agotamiento de nutrientes (George, 2000). Las hifas de los hongos formadores de MA, al igual que las raíces secundarias de la planta, son órganos de absorción de nutrientes, pero con la diferencia que las raíces secundarias tienen un diámetro de 5-20 μ m (Wulfsohn & Nyengaard, 1999), y las hifas de 3-7 μ m (Bago *et al.*, 2000), lo que unido a que la densidad de las hifas es de 10 a 100 veces mayor que la de las raíces (Dodd *et al.*, 2000), supone que las hifas del hongo amplían enormemente la superficie efectiva de absorción de nutrientes de la planta más allá de la zona de agotamiento.

Entre los nutrientes aportados por el hongo a la planta destaca el fósforo, nutriente esencial que puede ser limitante para el desarrollo de la planta (Holford, 1997). Las hifas del micelio extraradical incorporan de forma muy rápida (Ezawa *et al.*, 2004) y efectiva el fósforo inorgánico, debido a que contienen transportadores de alta afinidad de fosfato (Harrison & Van Buuren, 1995). El fosfato captado se polimeriza formando cadenas de polifosfatos que se acumulan, sobre todo en las vacuolas, para evitar un incremento de la presión osmótica que dificultaría el funcionamiento normal del hongo (Rasmussen *et al.*, 2000), y así es transportado al micelio intraradical, donde es hidrolizado, liberándose el fosfato mediante la actividad de ciertas fosfatasas presentes en las vacuolas (Gianinazzi-Pearson & Gianinazzi, 1978).

Además del fósforo, los hongos formadores de micorriza arbuscular aportan otros nutrientes a la planta, tales como el nitrógeno. La absorción de nitrógeno por el hongo es sobre todo en forma inorgánica, tanto de amonio, mediante transportadores específicos (Breuninger *et al.*, 2004), como de nitrato, aunque también se ha descrito cierta capacidad de transporte de N orgánico (Hodge *et al.*, 2001), especialmente aminoácidos. La transferencia del N a la planta, facilitada por la enzima nitrato reductasa (Kaldorf *et al.*, 1998), ocurre en un proceso asociado al ciclo de la urea y al transporte de polifosfato (Govindarajulu *et al.*, 2005).

Por último, también el hongo ayuda en la absorción de micronutrientes, y participa tanto en la absorción de estos elementos, como en su biorremediación (almacenamiento y retención) dentro de las estructuras fúngicas, evitando que se concentren en la planta provocando toxicidad (Mohammadi-Goltapeh *et al.*, 2008). Además, se ha descrito que los hongos formadores de micorriza arbuscular incrementan la absorción de hierro debido a la producción de sideróforos (Karimi *et al.*, 2011).

La mayor capacidad de captación de nutrientes en plantas micorrizadas repercute directamente en un mayor crecimiento, siendo este efecto crecimiento uno de los más aparentes beneficios de la micorrización.

2. Incremento de la capacidad de tolerancia frente a estreses abióticos, tales como:

a) Estrés hídrico, como consecuencia de la adquisición de agua y nutrientes en suelos secos, donde estos son menos disponibles y el hongo MA ayuda a su absorción (Porcel & Ruiz-Lozano, 2004; Mohammadi-Goltapeh *et al.*, 2008).

b) Estrés salino, debido al mantenimiento del balance $K^+:Na^+$, por cambios bioquímicos (acumulación de prolina, betainas, poliaminas, carbohidratos y antioxidantes), cambios fisiológicos (eficiencia fotosintética, permeabilidad relativa, acumulación de ABA, incremento de la nodulación y fijación del nitrógeno), cambios moleculares debidos a la regulación de la expresión de genes de adaptación y respuesta al estrés (*PIP*, antitransportadores Na^+/H^+ , *Lsnced*, *Lslea* y *LsPtCS*) y cambios estructurales (Aroca *et al.*, 2007; Evelin *et al.*, 2009; Shekoofeh *et al.*, 2012).

c) Tolerancia al exceso de metales pesados, activando mecanismos que se dan dentro de las células de hongos que implican quelación de iones metálicos, ligándose a polifosfatos y metalotioneínas, compartimentación dentro de las vacuolas y activando genes tales como los de Glutaredoxinas involucradas en la defensa celular a través del estrés oxidativo (Arriagada *et al.*, 2007; Hildebrandt *et al.*, 2007; Regvar *et al.*, 2008; Benabdellah *et al.*, 2009).

3. La formación de micorriza arbuscular incrementa la actividad fotosintética de la planta, y así lo avalan numerosos trabajos de investigación (Wright *et al.*, 1998; Valentine *et al.*, 2001).

4. También existe un efecto beneficioso sobre la mejora la estructura del suelo, aspecto de gran importancia para el desarrollo de las plantas, ya que un suelo con una buena estructura facilita la infiltración de agua, agiliza los ciclos biogeoquímicos de nutrientes, tiene una mayor resistencia a la erosión y contiene un mayor contenido de carbono (Rillig & Steinberg, 2002). Las hifas de los hongos micorrícicos están implicadas en la formación de agregados estables del suelo, un aspecto clave de la calidad del mismo. El micelio extraradical y las propias raíces actúan como nexo de unión de las partículas orgánicas e inorgánicas del suelo (Miller & Jastrow, 2000). Las hifas secretan a la superficie grandes cantidades de glicoproteína glomalina (Rillig *et al.*, 2001), caracterizada como un homólogo putativo de la proteína de choque térmico hsp 60 (hsp, por sus siglas en inglés “heat shock protein”) (Gadkar & Rillig, 2006). La hidrofobicidad de esta molécula permite que las hifas extraradicales se sujeten más fuertemente a la superficie y así incrementar el proceso de enmarañamiento para aumentar la superficie de absorción de la planta (Miller & Jastrow, 2000). Además, la glomalina se ha propuesto para mejorar la estabilidad del suelo, ya que se ha observado que existe una fuerte relación entre la concentración de glomalina y la cantidad de agregados estables al agua (Wright *et al.*, 2007).

5. La formación de MA aumenta la capacidad de competir de la planta, al mejorar por ejemplo el desarrollo de sus semillas (Pietikäinen & Kytöviita, 2007).

6. También la micorrización proporciona efecto protector a la planta frente a diversos patógenos, como hongos (Azcón-Aguilar *et al.*, 2002; Pozo *et al.*, 2002; Xavier & Boyetchko, 2004; St-Arnaud & Vujanovic, 2007; Khaosaad *et al.*, 2007), bacterias (Wu *et al.*, 2011) o nematodos (Vos *et al.*, 2012), tanto a nivel local como sistémico. La bioprotección mediada por micorrización puede deberse a diferentes mecanismos (Vierheilig *et al.*, 2008), entre otros:

a) Competencia directa, bien por sitios de infección (Cordier *et al.*, 1998) o por carbono (Azcón-Aguilar *et al.*, 2002).

b) Incremento de tolerancia y resistencia mediado por alteración en el crecimiento, la nutrición y la morfología de las plantas como consecuencia de la micorrización. Se sugiere, por ejemplo, que los nutrientes que absorbe por el micelio extraradical de la MA podrían compensar la reducción del sistema radicular por el patógeno (Singh *et al.*, 2000). Además con la colonización MA se altera el peso fresco de la raíz, el tamaño total de la raíz, el número de raíces secundarias y el grado de ramificación (Copetta *et al.*, 2006), características estas que podrían estar involucradas en un efecto bioprotector.

c) También se han observado alteraciones bioquímicas y moleculares en plantas micorrizadas que inducen resistencia a patógenos, como la producción de enzimas hidrolíticas, aumento de niveles de proteínas PR-1 (Cordier *et al.*, 1998), acumulación de

fitoalexinas (Larose *et al.*, 2002) y calosa (Cordier *et al.*, 1998), acumulación de ácido salicílico (Herrera Medina *et al.*, 2003) y especies de oxígeno reactivo (Salzer *et al.*, 1999). Estos cambios pueden ser locales y/o sistémicos y pueden ser la base molecular del mecanismo de resistencia inducida por micorrización (MIR) (Pozo & Azcon-Aguilar, 2007).

7. Por último, la micorrización facilita que se produzca una transferencia de nutrientes, ya que en la naturaleza diferentes plantas están micorrizadas por un mismo hongo formando así una red interconectada (Jakobsen, 2004; Smith & Read, 2008). Esta conexión entre plantas por parte de las micorrizas permite que cuando una planta micorrizadas muere se produzca una transferencia de sus nutrientes a otras plantas que compartan su mismo micelio fúngico (Eason *et al.*, 1991), favoreciendo la regeneración de la materia orgánica, y la mejora nutricional del resto de las plantas micorrizadas.

Todos estos beneficios sobre las plantas justifican el interés del estudio de las MA, así como su aplicación en Agricultura, siendo beneficiosas en sistemas de producción sostenible de los cultivos, principalmente porque contribuyen a la reducción de la entrada de fertilizantes químicos y pesticidas (Jeffries & Barea, 2001; Baar, 2008). No obstante, los sistemas agrícolas suelen estar muy perturbados y las propias prácticas de cultivo a menudo dañan a los hongos simbióticos formadores de MA o las plantas hospedadoras (Ellouze *et al.*, 2008), por lo que el máximo potencial de esta simbiosis rara vez se da en los campos cultivados, lo que genera una ineficiencia en la función de estos ecosistemas (Ellouze *et al.*, 2008). Las prácticas que provocan la disminución de la capacidad de esta simbiosis son varias, y por ejemplo un exceso de fertilizantes puede provocar un exceso de P en el suelo lo que conllevaría a elevar su concentración en los tejidos vegetales y así disminuir la colonización de los hongos MA en las plantas (Covacevich *et al.*, 2007), al igual que la labranza del suelo para el control de malezas provoca fragmentación del micelio fúngico (Kabir, 2005; Sheng *et al.*, 2011). También se reduce el potencial de esta asociación MA con el uso de algunos herbicidas (Malty *et al.*, 2006), fungicidas (von Alten *et al.*, 1993) e insecticidas (Wan & Rahe, 1998).

La simbiosis MA también juega un papel importante en la restauración de zonas desérticas (Saito & Marumoto, 2002), ya que ayuda a la planta a adaptarse a esta situación de estrés (Mohammadi-Goltapeh *et al.*, 2008). Además, su uso en la reforestación está cada vez más generalizado, ya que el hongo se considera clave en las primeras etapas del establecimiento de las plantas, en especial en suelos afectados por procesos erosivos, incendios, laboreo excesivo, contaminación, etc., ya que entre otros beneficios incrementa la fertilidad del suelo y la

agregación de las partículas del suelo (Mohammadi-Goltapeh *et al.*, 2008; Fuchs & Haselwandter, 2008).

II.2.1 Clasificación de los hongos formadores de la Micorriza Arbuscular

Tradicionalmente, y hasta hace relativamente pocos años, estos hongos estaban incluidos en la familia *Endoganaceae*, dentro del Filo o División *Zygomycota*, basándose esta clasificación en las similitudes morfológicas de sus esporas con las del género *Endogone* (Gerdemann & Trappe, 1975). Posteriormente, un estudio más profundo de sus características morfológicas hizo que los hongos MA se agruparan en un nuevo orden, *Glomerales*, que contenía seis géneros agrupados en tres familias: los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* dentro de la familia *Gigasporaceae*, los géneros *Glomus* y *Sclerocystis* dentro de la familia *Glomaceae*, y los géneros *Acaulospora* y *Entrophospora* en la familia *Acaulosporaceae*. El orden *Glomerales* se define como un grupo monofilético que contiene hongos para los cuales “el carbono se adquiere obligatoriamente a través de sus plantas hospederas, de manera intraradical por arbusculos que se ramifican dicotómicamente” (Morton & Benny, 1990). Ambas clasificaciones taxonómicas estaban basadas, principalmente, en la morfología y ontogenia de las esporas, ya que las estructuras intraradicales del hongo, como los arbusculos y vesículas, son consideradas irrelevantes taxonómicamente.

Recientemente, el avance y desarrollo de metodologías de análisis molecular basadas en el estudio del grado de divergencia del ADNr (ADN que codifica para ARN ribosomal) aplicadas al estudio de las relaciones filogenéticas de hongos formadores de MA ha permitido establecer una nueva clasificación taxonómica, agrupando a estos hongos en un nuevo Filo denominado *Glomeromycota*, e independiente de la división *Zygomycota* (Schüßler *et al.*, 2001). Diferentes estudios filogenéticos basados en técnicas moleculares colocan a este Filo *Glomeromycota* al mismo nivel que *Basidiomycota* y *Ascomycota* (Tehler *et al.*, 2003; Lutzoni *et al.*, 2004; James *et al.*, 2006), como se muestra en la figura II.2. Este Filo a su vez comprende cuatro órdenes: *Glomerales*, *Diversisporales*, *Paraglomerales* y *Archaesporales*. Es de destacar el hecho de que el género *Glomus*, que presenta características morfológicas y estructurales bien definidas, muestra divergencias filogenéticas importantes, que han implicado su subdivisión en al menos tres grupos, dos de los cuales se incluyen en el orden *Glomerales* (*Glomus* A y B), y el tercero en *Diversisporales* (*Glomus* C) (Schwarzott *et al.*, 2001). Después se incorporó a este Filo la familia *Pacisporaceae* (Walker & Schüßler, 2004), representada por el género *Pacispora* (Oehl *et al.*, 2004).

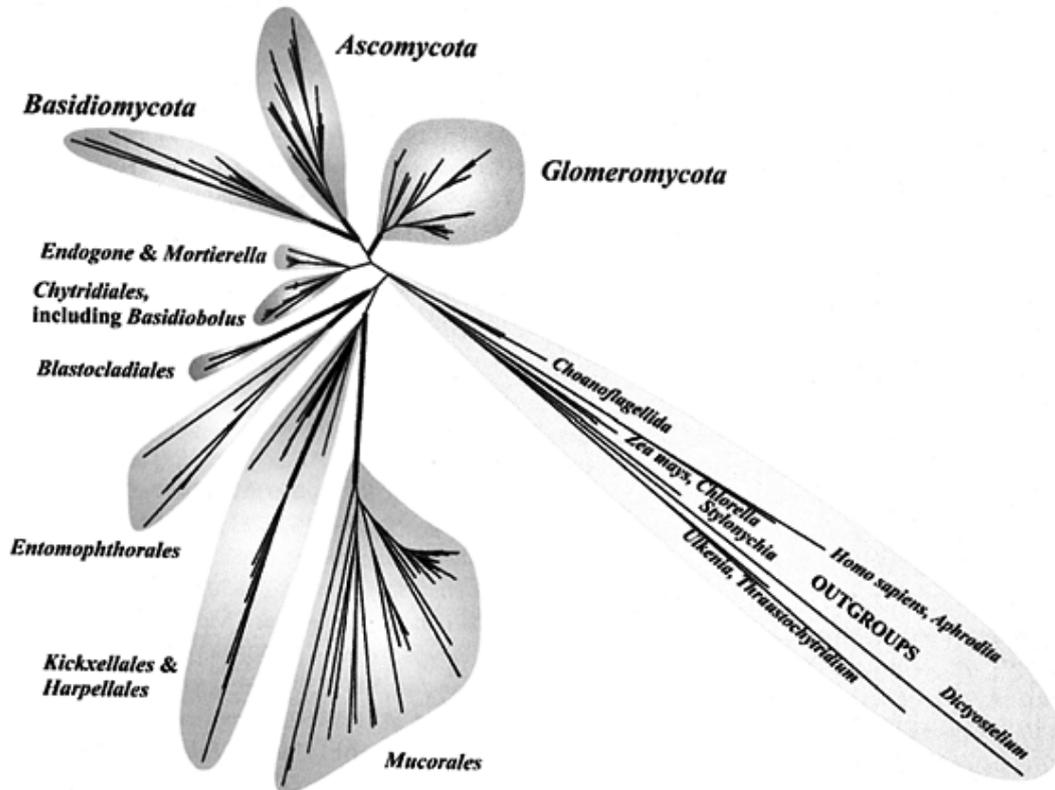


Figura II.2. Árbol filogenético de hongos formadores de MA basado en secuencias de la SSU del ARNr. De Schüßler *et al.* 2001.

La clasificación actual está basada principalmente en el análisis de la región SSU (de las siglas en inglés “Small Sub- Unit ribosomal RNA”). No obstante, el estudio de otras regiones dentro del operón ADN_r, tales como la región ITS (de las siglas en inglés “Internal Transcribed Space ribosomal RNA”) o LSR (de las siglas en inglés “Large Sub- Unit Ribosomal RNA), complementados con el análisis de genes no ribosomales, ha permitido ir estableciendo una mejor filogenia dentro de este Filo *Glomeromycota* (Krüger *et al.*, 2009; Stockinger *et al.*, 2009b; Morton & Msiska, 2010; Stürmer, 2012). Como consecuencia de los primeros análisis moleculares, los hongos formadores de MA se agruparon en la clase *Glomeromycetes*, con los cuatro órdenes mencionados anteriormente y once familias que contienen diecisiete géneros (Schüßler & Walker, 2010). A partir de esta clasificación se han ido añadiendo modificaciones, como se muestra en la tabla II.2, donde se distinguen 3 clases, 5 órdenes, 14 familias y 26 géneros (Oehl *et al.*, 2011a), y aún caben esperar más cambios, sobre todo en los taxones más bajos, ya que las esporas de estos hongos son multinucleadas y con una alta variabilidad genética, incluso dentro de una misma especie (Pawlowska & Taylor, 2004), lo que supone un mayor

grado de divergencia filogenética. Prueba de estos cambios es que en la actualidad se ha transferido la familia *Entrophosporaceae* desde el orden *Diversisporales* al *Glomerales*, junto con *Claroideoglomeraceae*, y se ha propuesto el nuevo género *Albahypha* (Oehl *et al.*, 2011b). Estos mismos autores también erectaron el género monoespecífico *Tricispora* (= *Entrophospora nevadensis*) dentro de la familia *Diversisporaceae* y *Sacculospora* dentro de una familia nueva, *Sacculosporaceae* (Oehl *et al.*, 2011b).

Tabla II.2. Tabla de la Clasificación de *Glomeromycota*. De Oehl *et al.* 2011.

CLASE	ORDEN	FAMILIA	GÉNERO		
<i>Glomeromycetes</i>	<i>Glomerales</i>	<i>Glomeraceae</i>	<i>Glomus</i>		
			<i>Funneliformis</i>		
			<i>Simiglomus</i>		
			<i>Septoglomus</i>		
			<i>Claroideoglomeraceae</i>	<i>Claroideoglomus</i>	
				<i>Viscospora</i>	
			<i>Diversisporales</i>	<i>Diversisporaceae</i>	<i>Diversispora</i>
					<i>Redeckera</i>
					<i>Otospora</i>
					<i>Entrophospora</i>
					<i>Acaulospora</i>
			<i>Gigasporales</i>	<i>Pacisporaceae</i>	<i>Kuklospora</i>
					<i>Pacispora</i>
					<i>Gigaspora</i>
					<i>Scutellospora</i>
<i>Orbispora</i>					
<i>Racocetra</i>					
<i>Cetraspora</i>					
<i>Archacosporales</i>	<i>Archacosporaceae</i>	<i>Dentiscutata</i>			
		<i>Fuscutata</i>			
		<i>Quatunica</i>			
		<i>Archacaspora</i>			
		<i>Intraspora</i>			
<i>Archacosporomycetes</i>	<i>Archacosporales</i>	<i>Ambisporaceae</i>			
		<i>Ambispora</i>			
		<i>Geosiphon</i>			
<i>Paraglomeromycetes</i>	<i>Paraglomerales</i>	<i>Paraglomeraceae</i>	<i>Paraglomus</i>		

II.2.2 Formación y morfología de la simbiosis Micorriza Arbuscular

Como se ha mencionado anteriormente, los hongos formadores de MA son simbiontes biotrofos obligados, por lo que necesitan la raíz de una planta susceptible de ser colonizada para completar su ciclo de vida. Reflejo de ello es el hecho de que si durante los primeros días después de la germinación de la espora las hifas fúngicas no encuentran cerca una raíz, estas detienen su crecimiento y se tabican, además de producirse una migración de los núcleos y orgánulos celulares, lo que provoca que la hifa se retraiga hacia la espora, entrando esta de nuevo en reposo

(Azcon-Aguilar *et al.*, 1998; Bago *et al.*, 1999b), siendo este un mecanismo necesario para que sobreviva el hongo en ausencia del hospedador (Logi *et al.*, 1998).

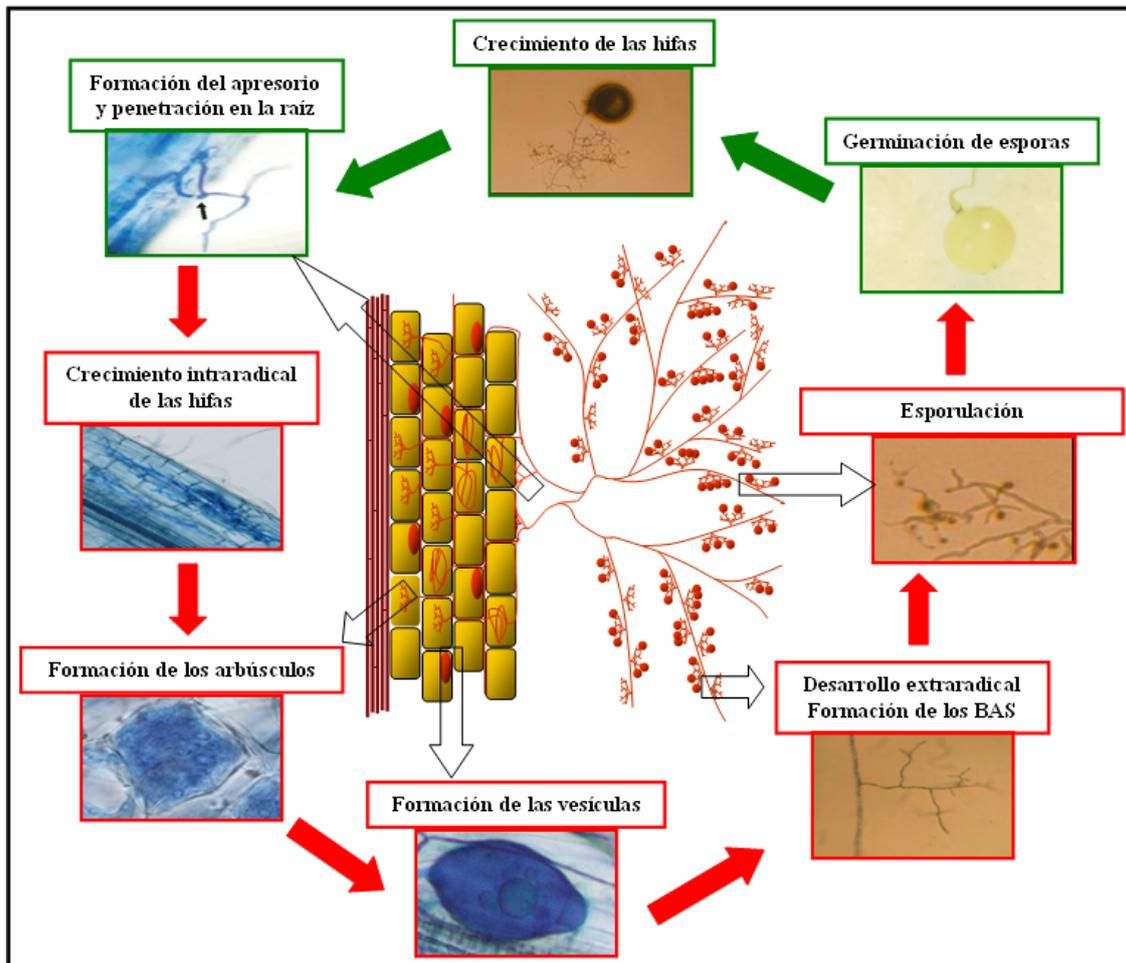


Figura II.3. Ciclo de vida de los hongos micorrízico-arbusculares. Los recuadros y flechas verdes pertenecen a las etapas de la fase presimbiótica, mientras que las rojas pertenecen a la fase simbiótica.

El ciclo de vida de los hongos formadores de MA se inicia a partir de los propágulos infectivos de estos hongos presentes en el suelo, y que son de tres tipos diferentes según su capacidad de supervivencia y potencial infectivo. Estos son, las esporas, que son las formas de resistencia de estos hongos, las redes de micelio, que sobreviven en el suelo provenientes de raíces colonizadas, y los fragmentos de raíz dispersos en el suelo, que contienen micelio en su interior como fuente de infección y colonización.

El proceso de colonización micorrízica comienza con el contacto de la raíz con micelio procedente de las distintas formas de propágulos antes mencionadas. En la naturaleza, la

colonización de una raíz suele ocurrir en distintas zonas y es un proceso continuo y asincrónico. No obstante, a efectos experimentales y didácticos se han establecido dos etapas bien diferenciadas en el proceso de colonización (presimbiótica y simbiótica) y se han identificado distintos acontecimientos claves y característicos dentro de cada una de ellas (Figura II.3). A continuación se describen estos acontecimientos, incluyendo datos relevantes desde el punto de vista morfológico, fisiológico y molecular.

II.2.2.1 Fase presimbiótica

- **Germinación de las esporas**

Dado que las esporas de resistencia son la forma de conservación de los hongos MA en la naturaleza, en el sentido estricto del término, se puede decir que el ciclo de vida del hongo comienza con la germinación de dichas esporas presentes en el suelo. La germinación de las esporas es el único proceso independiente de la planta, ya que estas germinan en presencia o ausencia de la misma. Las esporas de hongos formadores de MA son generalmente de forma redondeada y con una gruesa pared celular cuyo diámetro oscila entre 50-100 μ m, y suelen contener un gran número de núcleos, hasta 2000 por espora (Bécard & Pfeffer, 1993). Se ha propuesto que el principal mecanismo responsable de la formación de las esporas multinucleadas es el flujo masivo de núcleos desde la hifa de sustentación hacia la nueva espora (Jany & Pawlowska, 2010). Existen una serie de factores medioambientales que afectan la germinación de las esporas, aunque probablemente, las complejas interacciones entre los diferentes factores sea el elemento clave para la germinación de las esporas en la naturaleza. Entre estos factores, hay que destacar:

- El pH. Dependiendo de la especie o género existe una mayor o menor dependencia del pH para la germinación de las esporas, así como también existe un rango óptimo de pH dependiendo de cada especie. Por ejemplo, la germinación de las esporas de la especie *Acaulospora laevis* está fuertemente regulada por el pH del suelo, siendo su pH óptimo entre 4 y 5 (Hepper, 1984). Por el contrario, la mayoría de especies del género *Glomus* germinan mejor a pH dentro del rango de 6 a 8 (Douds, 1997).
- La temperatura. Este factor ambiental afecta fuertemente a la germinación, y el rango óptimo de temperatura para la germinación depende mucho de las especies (Tommerup, 1983). La temperatura óptima para la germinación suele estar relacionada con el hábitat al que pertenece cada hongo formador de MA (Giovannetti *et al.*, 2010).
- La humedad del suelo tiene efectos variables sobre la germinación de esporas de diferentes especies, ya que por ejemplo *Gigaspora margarita* germina

independientemente del contenido de humedad del suelo, mientras que esporas de otras especies tales como *G. mosseae*, *G. intrarradices* y *A. longula* inhiben su germinación en potencial matricial entre -0,50 a -2,20 MPa (Douds & Schenck, 1991). Por otra parte, es probable que los ciclos de humedecimiento y secado del suelo sean los factores más importantes que afectan a la supervivencia de las esporas y a su germinación y por tanto a la capacidad de formación de MA, en especial en los climas mediterráneos, donde las esporas de hongos *Glomeromycota* sobreviven los veranos calurosos y secos para colonizar nuevas plantas durante la siguiente estación más húmeda (Braunberger *et al.*, 1996).

- El contenido de nutrientes también es un factor ambiental que afecta la germinación de las esporas, y se ha observado que altos contenidos en fósforo reducen el porcentaje de germinación de esporas de varias especies MA (Giovannetti *et al.*, 2010).
- Los componentes moleculares de los exudados de raíces de plantas hospedadoras, como las estrigolactonas entre otros, afectan generalmente positivamente a la germinación de esporas, en función de la planta y especies de hongos MA (Scervino *et al.*, 2006; Parniske, 2008).
- La microflora rizosférica también puede ser un factor regulador de la germinación de esporas de hongos formadores de MA. En este sentido, y aunque la mayoría de especies de hongos MA germinan en condiciones axénicas, otros aceleran el ritmo de germinación de sus esporas al contactar con algunos exudados de una amplia variedad de hongos y bacterias del suelo (Hildebrandt *et al.*, 2002; Scervino *et al.*, 2008; Pivato *et al.*, 2009).

- **Crecimiento y ramificación de las hifas**

Después de la germinación de la espора, la hifa de germinación suele seguir un crecimiento hacia adelante, de forma lineal, con una fuerte dominancia apical y regular, y ramificaciones laterales en ángulo recto. Estas hifas son de paredes gruesas, aseptadas, con un diámetro de alrededor de 5-10 micras de ancho, y presentan un alto número de núcleos (hasta casi 30000), y una tasa alta de replicación del ADN (Bonfante-Fasolo, 1984; Giovannetti *et al.*, 2010).

En presencia de señales derivadas de la planta las hifas desarrollan cambios dramáticos. Estas señales están presentes en los exudados de la raíz de la planta y se han denominado de forma genérica como factores de ramificación (“Branching Factors”)(Parniske, 2008), atendiendo al principal efecto observado sobre las hifas, el efecto de ramificación. Actualmente se conoce que uno de los componentes exudados por la raíz con mayor capacidad de provocar ramificación y

crecimiento de las hifas son las estrigolactonas (Akiyama *et al.*, 2005; Besserer *et al.*, 2006), definidas como una nueva clase de hormona vegetal derivada de los carotenoides (Matusova *et al.*, 2005), que la raíz exporta al exterior mediante transportadores tipo ABC PDR1 (Kretschmar *et al.*, 2012). La percepción de las estrigolactonas por el hongo induce el llamado estado presimbótico, el cual se caracteriza por un continuo crecimiento de las hifas, con abundante ramificación e incremento en la actividad metabólica (Akiyama *et al.*, 2005).

Estos cambios que se producen tras el reconocimiento entre ambos simbioses conducen a un aumento en la actividad metabólica en el citoplasma de las hifas, que implica cambios bioquímicos esenciales para el paso de un estado metabólicamente inactivo a activo. Se ha observado un aumento de la síntesis de proteínas, ya que se ha comprobado que pueden sintetizar aminoácidos desde reservas endógenas (Breuninger *et al.*, 2004; Gachomo *et al.*, 2009), así como biosíntesis de esteroides (Zocco *et al.*, 2008) y poliaminas (Sannazzaro *et al.*, 2004), además de la activación del metabolismo de carbohidratos (Saito, 1995), e incremento de la actividad mitocondrial (Tamasloukht *et al.*, 2003). Varios análisis han sugerido una activación diferencial y distribución de isoformas de bombas de H⁺ a través de la membrana plasmática (Ayling *et al.*, 2000; Ramos *et al.*, 2008). Se ha observado que en los primeros días de germinación hay un consumo de trehalosa (Bécard *et al.*, 1991), pasando posteriormente a consumir preferentemente la reserva de triglicéridos (Beilby, 1980; Requena *et al.*, 2007). Durante la germinación se inducen otros genes, como por ejemplo, genes involucrados en el metabolismo carbonado (fosfoglicerato kinasa) (Harrier *et al.*, 1998), o genes implicados en el ciclo celular, como homólogos de *TOR2* (Requena *et al.*, 2000) y *GmGIN1* (Requena *et al.*, 2002), genes todos ellos que podrían estar implicados en los procesos de señalización previos al establecimiento de la simbiosis. Todos estos cambios provocan un crecimiento longitudinal de las hifas, pero sobretodo inducen su ramificación, que es importante para la colonización de la raíz (Buee *et al.*, 2000).

De igual forma, la raíz de la planta hospedadora también se prepara para la entrada del hongo. En este sentido, recientemente se ha puesto de manifiesto que el hongo formador de MA *G. intraradices* secreta señales simbióticas que son una mezcla de lipo-quitina-oligosacáridos (LCOs) simples sulfatados y no sulfatados, que estimulan la formación de MA en especies de plantas de diversas familias, y que son activados por señales secretadas por las plantas como las estrigolactonas (Maillet *et al.*, 2011). Por analogía estructural y funcional con el factor Nod de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa se ha denominado “factor Myc” a este tipo de moléculas (Myc-LCOs). Otras moléculas, tales como el factor de transcripción con dominio GRAS, NSP2,

también se han descrito como importantes para la señalización presimbiótica. Se ha observado que mutantes *nsp2*, con menor expresión de NSP2 de *M. truncatula* no responden a las moléculas Myc-LCOs, y son menos susceptibles a la micorrización que las plantas silvestres. Este factor de transcripción NSP2 es regulado por el microARN miR171h, y es sobre-regulado en las zonas de elongación de la raíz durante la colonización y respuesta a Myc-LCOs. En plantas que sobre-expresan miR171h se produce una reducción de la micorrización en raíces, apareciendo un fenotipo similar al de los mutantes *nsp2*. La existencia de factores simbióticos similares en hongos formadores de MA y rizobios sugiere mecanismos similares en la percepción de la planta, de hecho un único receptor tipo quinasa con el motivo LysM media el reconocimiento de ambos, *Rhizobium* y hongos MA, en los pelos radicales de *Parasponia andersonii* (Op den Camp *et al.*, 2011). Entre las potencialidades de estos factores Myc se ha descrito que estas moléculas activan la expresión de genes simbióticos en la planta, tal y como ocurre con el gen *ENOD11*, el cual se ha visto que se activa en plantas de *M. truncatula* en experimentos usando una membrana artificial que evita el contacto directo entre el hongo y las raíces (Kosuta *et al.*, 2003).

- **Formación del apresorio y entrada en la raíz**

Normalmente, las hifas del hongo penetran en raíces secundarias o pelos radicales jóvenes de la planta (Tawaraya *et al.*, 2007), pero antes de entrar, la hifa fúngica se adhiere a la raíz y forma un apresorio sobre la epidermis de la misma, que es la estructura de precolonización. A partir de esta estructura se iniciará la penetración del hongo en la raíz de la planta (Giovannetti *et al.*, 1993; Jolicoeur *et al.*, 1998). Este apresorio es un engrosamiento de la hifa con forma aplanada, multinucleado y contiene abundantes vacuolas (Garriock *et al.*, 1989).

Se sugiere que, tal y como ocurre en la simbiosis de *Rhizobium*, el Ca^{2+} podría actuar como segundo mensajero en la cadena de transducción de señales simbióticas en la planta una vez iniciado el proceso de infección, ya que se ha demostrado que el contacto entre ambos simbioses induce la activación de genes de categorías diferentes, incluyendo varios componentes relacionados con la señalización por Ca^{2+} , donde destacan una ATPasa- Ca^{2+} tipo-P putativa, una Calmodulina y un inactivador Ras inducido por Ca^{2+} (CAPR1) (Breuninger & Requena, 2004; Tirichine *et al.*, 2006; Requena *et al.*, 2007; Kosuta *et al.*, 2008; Chabaud *et al.*, 2011). En este sentido, un trabajo reciente ha propuesto como marcador de la fase presimbiótica de la colonización en arroz el gen *OsCPK18*, que codifica para una proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} que se induce en el córtex radical como respuesta a la inoculación con *G. irregulare* (Campos-Soriano *et al.*, 2011). Varios estudios en diferentes plantas han mostrado que hay una

activación débil y transitoria de varios genes de defensa de la planta durante la formación de este apresorio (Ruiz-Lozano *et al.*, 1999; Blilou *et al.*, 2000a; Bonanomi *et al.*, 2001). También se ha observado la inducción de la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en el metabolismo primario, transducción de señales, síntesis proteica, y de otros genes (Brechenmacher *et al.*, 2004; Weidmann *et al.*, 2004), incluyendo genes que codifican para factores de transcripción de unión a la caja CAAT (CBFs, de sus siglas en inglés “CAAT-binding factor”), designados como *MtCbfl* y *MtCb2* (Hogekamp *et al.*, 2011). Además, en este proceso de infección del hongo es también característico la producción de enzimas de degradación de la pared celular, posiblemente de la planta, ya que varias investigaciones han demostrado que se producen exo y endoglucanasas, celulasas, xiloglucanasas y enzimas pectolíticas incluyendo poligalacturonasas (Garcia-Garrido & Ocampo, 2002).

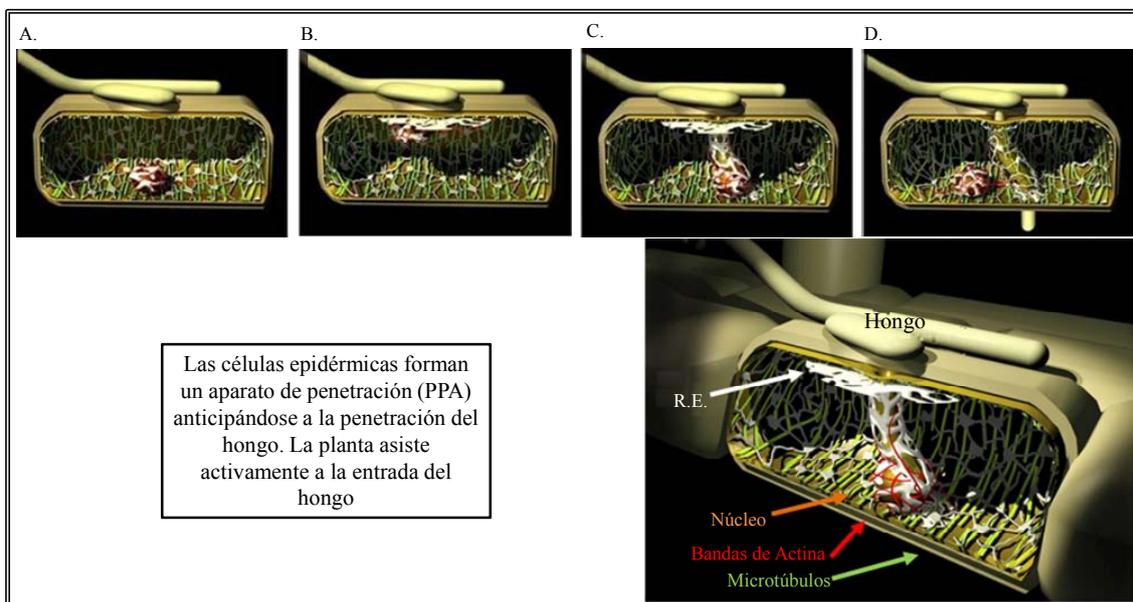


Figura II.4. Pasos de la formación del aparato de penetración (PPA) del hongo micorrízico en células epidérmicas de raíz de *Medicago truncatula* previa a la infección. De Genre *et al.* 2005.

Por tanto, la célula vegetal se prepara activamente para la penetración del hongo, incluyendo cambios subcelulares que determinan el camino de la hifa fúngica a través de la célula epidérmica. Al conjunto de estos cambios se les ha denominado proceso de formación del aparato de pre-penetración (PPA, por las siglas en inglés **prepenetration apparatus**) (Genre *et al.*, 2008). El PPA es una estructura subcelular que se forma 4-5 horas después de la formación del apresorio, y cuya formación viene precedida de una migración de los núcleos de las células vegetales hacia el punto de entrada del hongo (Esquema B, figura II.4). El reposicionamiento del núcleo de la célula vegetal implica que la penetración va acompañada de una reorganización del

citoesqueleto, formándose un canal de microfilamentos, microtúbulos y retículo endoplasmático (R.E.) que conecta el núcleo con el sitio de contacto del apresorio (Esquema C, figura II.4) (Genre *et al.*, 2005; Parniske, 2008). Una vez formado ese “túnel transcelular” la hifa crece hacia el interior de la célula hospedadora donde las membranas del R.E. se posicionan para la síntesis de la membrana perifúngica, que es de origen vegetal (Novero *et al.*, 2002; Parniske, 2008). Se ha detectado una activación de la maquinaria de exocitosis del aparato de Golgi asociado a este proceso de formación de membrana perifúngica (Genre *et al.*, 2012). El estudio con mutantes simbióticos de *M. truncatula* ha mostrado que genes SYM tales como *DMI2* y *DMI3* son requeridos para la inducción del PPA. Finalmente, cuando la hifa ya ha atravesado la célula epidérmica este PPA se deshace (Esquema D, figura II.4) (Genre *et al.*, 2005).

II.2.2.2 Fase simbiótica

- **Crecimiento intercelular de las hifas**

Superadas las primeras capas de células de la raíz, la hifa colonizadora se dirige hacia las células corticales para desarrollar un micelio intraradical que se ramifica intercelularmente, sin invadir endospermos ni meristemas. Una vez en las células corticales, las hifas fúngicas pueden seguir dos patrones diferentes de ramificación: tipo *Arum* y tipo *Paris* (Smith & Read, 1997). La ramificación tipo *Arum* ha sido más estudiada, y se caracteriza por un crecimiento de las hifas entre los espacios intercelulares, quedando rodeadas por una matriz interfacial formada por derivados de la pared celular vegetal, como poligalacturanos no esterificados, pectinas, xiloglucanos, arabinogalactanos, ramnogalacturonanos, glicoproteínas ricas en hidroxiprolina y homogalacturonanos no esterificados, que separa las hifas de la membrana de la célula vegetal (Balestrini *et al.*, 1994; Perotto *et al.*, 1994; Bonfante & Perotto, 1995). De forma regular, las hifas intercelulares penetran en la pared celular de alguna célula cortical, ramificándose altamente para formar un haustorio ramificado situado entre la pared celular y la membrana plasmática de la célula vegetal, denominado arbúsculo (Franken, 2010). Por su parte, la ramificación tipo *Paris*, aunque menos estudiada es más frecuente, (Smith & Read, 1997), y se caracteriza por un crecimiento de las hifas célula a célula, sin crecimiento intercelular, por lo que su desarrollo es mucho más lento, formando estructuras en forma de ovillo con pequeños arbúsculos intercalados (Franken, 2010). El tipo de micorriza que se forma parece estar determinado por el genoma de ambos simbioses (Cavagnaro *et al.*, 2001; Smith & Read, 2008), pero se han observado formas intermedias entre los dos tipo *Arum-Paris* (Dickson, 2004). Algunas especies de hongos MA pueden formar también otro tipo de estructuras denominadas

vesículas durante su colonización intraradical. Las vesículas son estructuras globosas con un alto contenido en lípidos y que parecen constituir un órgano de reserva de nutrientes (Walker, 1995)

- **Formación de los arbusculos**

Como se mencionó anteriormente, hay dos tipos de morfología MA (*Arum* y *Paris*) dependiendo del tipo de ramificación y estructuras que se formen en el interior de la raíz. En este apartado se describe de forma genérica el proceso de formación del arbusculo, independientemente del tipo de micorriza formado. Para la formación del arbusculo, las hifas del hongo se ramifican dicotómicamente dando lugar a hifas cada vez más finas, originando una estructura con forma de árbol rodeada por invaginaciones de membrana plasmática de la célula vegetal, que crece hasta ocupar la totalidad de la célula. La formación de esta estructura altamente ramificada resulta en un incremento muy considerable de la superficie de contacto, de forma similar a lo que ocurre en el epitelio intestinal. El incremento del área de contacto supone un mayor área de intercambio, lo que hace que estas estructuras sean particularmente eficaces para la transferencia de nutrientes, siendo los órganos encargados en el intercambio de nutrientes entre ambos simbioses (Reinhardt, 2007). A nivel de las ramificaciones distales del arbusculo la pared celular del hongo es muy precaria, por lo que la barrera entre ambos simbioses queda reducida al mínimo. Estas ramificaciones están separadas del citoplasma de la célula hospedadora por la membrana periarbuscular (PAM, por sus siglas en inglés **periarbuscular membrane**). La PAM es continua con la membrana plasmática de la planta, pero tiene una composición proteica diferente a esta (Harrison *et al.*, 2002) y un pH más ácido (Balestrini & Bonfante, 2005). Además, entre la pared del hongo y la PAM se encuentra la matriz interfacial, generada durante la formación del PPA y derivada de la pared vegetal. En el contexto de estas tres estructuras (PAM, pared del hongo y matriz interfacial), se produce el intercambio de señales y nutrientes (Harrison, 2005).

Los arbusculos se pueden desarrollar por todo el córtex, pero abundan más en la zona cortical interior, adyacente a la endodermis y a los tejidos vasculares, y aunque no se sabe lo que desencadena la entrada del hongo en una célula cortical determinada, parece ser que la percepción de un gradiente de azúcar radical entre el tejido vascular y las capas exteriores de células puede ser una señal de inducción de la formación de los arbusculos (Blee & Anderson, 1998). El establecimiento del arbusculo viene acompañado por una reorganización del citoesqueleto y grandes cambios celulares en la organización del citoplasma y orgánulos, como retículo endoplasmático, aparato de golgi y mitocondrias, que se agrupan en torno a las

ramificaciones de los arbusculos. También se produce una fragmentación de la vacuola, los núcleos migran desde la periferia hacia el centro, y se modifican los plastidios (Fester *et al.*, 2001), formando una red en contacto físico con los arbusculos (Strack & Fester, 2006), ya que estos están involucrados en numerosas actividades biosintéticas, incluyendo la producción de apocarotenoides que se acumulan en las raíces micorrizadas (Walter *et al.*, 2007), y de hormonas vegetales tales como el ácido abscísico, el cual tiene un papel importante en el desarrollo de estos arbusculos (Herrera-Medina *et al.*, 2007; Martín-Rodríguez *et al.*, 2010; Martín-Rodríguez *et al.*, 2011). Los arbusculos tienen una vida media de 8,5 días, ya que son una estructura temporal y transitoria pues se degradan a los 2 - 4 días después de completar su desarrollo (Genre *et al.*, 2005; Genre *et al.*, 2009). Las hifas arbusculares se separan del citoplasma restante del hongo por tabicación (Javot *et al.*, 2007a), dejando una célula cortical intacta que es capaz de acoger de nuevo otro arbusculo (Pumplin & Harrison, 2009).

Se han detectado moléculas que juegan un papel fundamental en el funcionamiento del arbusculo, como es el caso de una lisofosfatidilcolina (LPC, de sus siglas en inglés “**lysophosphatidylcholine**”), que está involucrada en el metabolismo de los fosfolípidos y es una molécula señal que activa la expresión de genes transportadores de fosfato, tales como el *PT3* (Drissner *et al.*, 2007) y el *PT4* (Paszkowski *et al.*, 2002). Estos dos transportadores de fosfato (*PT3* y *PT4*) están localizados en la membrana periarbuscular (PAM), translocando fósforo del hongo a las células vegetales con la ayuda de una H^+ -ATPasa encargada de crear un gradiente de protones localizado sobre la matriz interfacial. Estos transportadores son muy importantes para la formación de los arbusculos y así, la pérdida de función del gen *MtPT4* en *M. Truncatula* provoca una muerte prematura de los arbusculos (Javot *et al.*, 2007a). Por último, se ha encontrado una proteína azul de unión al cobre, *BCPI*, localizada también en la membrana periarbuscular (Valot *et al.*, 2006). Estudios recientes parecen indicar que la PAM está compuesta por dos áreas diferentes, donde una contiene el transportador *MTP4*, denominado “área de ramificación del arbusculo”, y otra contiene la proteína *BCPI*, denominada “área del tronco del arbusculo” (Pumplin & Harrison, 2009).

Debido al estudio llevado a cabo por varios investigadores, usando mutantes deficientes simbióticos deficientes en micorrización y plantas transgénicas, se han detectados varios genes involucrados en la formación y funcionamiento de los arbusculos. Por ejemplo, recientes investigaciones en el mutante *str1* y *str2* de *M. truncatula* han demostrado que estos mutantes tienen una menor micorrización y desarrollo de arbusculos. Los genes mutados en esta plantas

codifican para proteínas de la subfamilia de transportadores de unión a ATP (transportadores ABC) de tipo G (ABCG), y han sido localizadas en la membrana periarbuscular de las células que contienen arbusculos (Zhang *et al.*, 2010; Gutjahr *et al.*, 2012). También se ha observado que el gen *Vapyrin* de *M. truncatula* es esencial para la formación de los arbusculos, ya que se expresa transitoriamente en células del córtex durante la formación de los arbusculos. La proteína Vapyrin es una proteína citoplasmática, y en células que contienen arbusculos se sugiere que tiene un papel en el remodelamiento celular para el desarrollo intracelular de las hifas del hongo durante la simbiosis micorrícica arbuscular (Pumplin *et al.*, 2010). Otro gen importante en la formación de los arbusculos es el gen *MtMSBP1*, ya que en plantas transgénicas que tienen inhibida la expresión de este gen se produce una micorrización aberrante, con apresorio septado y disminución del número de arbusculos, siendo estos aberrantes morfológicamente. El gen *MtMSBP1* parece ser que participa en la homeostasis de esteroides en las raíces (Kuhn *et al.*, 2010), pues codifica para una proteína de membrana que une esteroides. Otro grupo de genes importantes para el desarrollo de arbusculos es el de las proteasas de tipo subtilasas. En concreto, en *L. japonicus*, la supresión de la expresión de los genes *SbtM1* o *SbtM3* causa un descenso de la colonización intraradical, especialmente la formación de arbusculos (Takeda *et al.*, 2009).

Por otra parte, el hongo necesita aporte de carbono por parte de la planta, y como se verá en el apartado II.2.3.3., este es adquirido principalmente por los arbusculos. Antes de entrar el carbono al hongo, el cual está en forma de sacarosa en la planta, debe de ser hidrolizada mediante la acción de sacarosas sintasas e invertasas (Schaarschmidt *et al.*, 2007). Se ha observado en ensayos de raíces *M. truncatula* micorrizadas que el promotor *MtSucS1* de sacarosas sintasas es activado específicamente en células que contienen arbusculos y células corticales que las rodean (Hohnjec *et al.*, 2003). Estudios en *M. truncatula*, con una reducción de 10 veces en los niveles de expresión del gen *MtSucS1*, han mostrado que ese déficit provoca una reducción de la colonización y sobretodo del desarrollo de arbusculos, que tienen además una temprana senescencia, acompañado con una reducción del desarrollo de arbusculos maduros, concluyendo este estudio que el gen *MtSucS1* es importante en el establecimiento y mantenimiento de los arbusculos (Baier *et al.*, 2010).

- **Formación de las vesículas**

La mayoría de las especies de hongos formadores de MA, salvo los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora*, pueden formar también otro tipo de estructuras diferentes al arbusculo durante su colonización, son las llamadas vesículas. Las vesículas son estructuras globosas con un alto

contenido en lípidos y que parecen constituir un órgano de reserva de nutrientes (Barea *et al.*, 1991). Estas se desarrollan bien en los espacios intercelulares de la raíz, o dentro de alguna célula cortical, ocupando la totalidad de esta y provocando un ensanchamiento de sus paredes. Su formación es posterior a la de los arbusculos, por lo que parece ser que necesitan la formación y funcionamiento previo de estos. Se forman a partir del hinchamiento de una hifa terminal, y para ello necesitan del aporte de carbohidratos procedentes de la planta (Smith & Read, 1997).

Las vesículas no son efímeras como los arbusculos, sino que desde que aparecen van madurando, pudiendo en algunas ocasiones llegar a convertirse en esporas del hongo. Esta transformación de vesículas en esporas podría estar ligada a situaciones de estrés para la micorriza, o a la muerte inminente de la planta. Se ha demostrado que a partir de vesículas sembradas “in vitro” pueden germinar nuevas hifas capaces de infectar la raíz (Declerck *et al.*, 1998), pero además, como se comentó anteriormente, su composición es fundamentalmente lipídica por lo que se les atribuye una función de reserva (Van Aarle & Olsson, 2003), y resistencia, pues estas estructuras aguantan varias semanas a bajas temperaturas y sin agua, por lo que parecen tener una función de resistencia a largos periodos de sequía y al invierno.

- **Desarrollo del micelio extraradical**

Al mismo tiempo que se desarrolla el hongo por el interior de la raíz, también se desarrolla el micelio extraradical en el suelo, encargado de explorar el entorno en busca de nutrientes minerales y agua para absorberlos y posteriormente cederlos a la planta (Barea, 2000). Este micelio externo permite a la planta explorar microhábitats del suelo a los que por sí solas las raíces no podrían acceder, y aumentar en consecuencia la superficie donde obtener nutrientes y agua, ya que se estima que por un centímetro de raíz micorrizada se puede producir hasta un metro de hifas extraradicales.

El desarrollo de técnicas de cultivo monoxénico, que permiten el establecimiento de la simbiosis entre raíces micotróficas y hongos micorrícicos en una placa de Petri con un medio sintético (Bécard & Fortin, 1988; Bago *et al.*, 1998b; Fortin *et al.*, 2002), permitió estudiar el patrón de ramificación y desarrollo del micelio extraradical. Según este patrón, las hifas principales crecen en línea recta, son relativamente gruesas y se denominan hifas exploradoras, que se ramifican formando hifas secundarias más estrechas y que a su vez se ramifican varias veces más, disminuyendo por tanto y de manera progresiva el grosor de la pared hacia el ápice de las hifas, provocando unas estructuras con un patrón de ramificación que recuerda a los

arbúsculos, y que son denominadas como estructuras ramificadas de absorción (BAS, de su siglas en inglés **B**ranch**e**d **A**bsorb**i**ng **S**tructures). Teniendo en cuenta su patrón ramificado, que aumenta su superficie, (Li *et al.*, 2008), y la estructura de su pared, mucho más delgada, se les atribuye a los BAS una función de absorción de nutrientes del suelo (Bago *et al.*, 1998b; Bago *et al.*, 2000). Esta hipótesis se ve reforzada por la existencia de un incremento en el número de mitocondrias en la base del BAS, que aumenta la disponibilidad de energía para el transporte (Bago *et al.*, 1998a), observándose que son capaces de absorber nutrientes a una distancia de hasta 25cm de las raíces (Jansa *et al.*, 2003).

Como ya se comentó anteriormente, al principio de este apartado, estas hifas extraradicales son una de las principales fuentes de inóculo, ya que pueden formar nuevos puntos de entrada sobre la superficie de la raíz y contribuir así a la generalización de la colonización micorrícica. Además, estas hifas extraradicales pueden colonizar otras plantas de la misma o diferente especie, formando una red interconectada dentro de un ecosistema determinado (Jakobsen, 2004; Smith & Read, 2008). También es normal encontrar en la naturaleza raíces colonizadas por varios hongos, que pueden tener una acción complementaria en la adquisición de los nutrientes, obteniendo así más beneficio la planta hospedadora (Jansa *et al.*, 2008). En este sentido, micelio de hifas tanto de un mismo hongo como de diferentes aislados de una misma especie con frecuencia se anastomosan (fusionan). Este proceso de anastomosis de dos o más micelios permite un intercambio de los núcleos, reparar la red fúngica y facilitar la transferencia de P (Avio *et al.*, 2006; Mikkelsen *et al.*, 2008; Giovannetti, 2008; Smith & Smith, 2011).

Los BAS son estructuras transitorias, y al final de su vida pierden su contenido citoplasmático, a menos que desarrollen esporas, ya que parece ser que la esporulación está relacionada con la absorción de nutrientes. Dichas esporas pueden desarrollarse de dos maneras diferentes en función de la especie de hongo micorrícico que las produzca, libres como en *G. irregulare*, o agrupadas en cuerpos fructíferos conocidos como esporocarpos como en el caso de *G. mosseae*.

Pero el micelio extraradical no solamente tiene una función en la absorción de nutrientes, sino que también aporta otros beneficios a la planta. Se ha demostrado que dicho micelio forma agregados estables en el suelo que ayudan a mantener la estructura del mismo, y que favorecen la mayor retención y captación de agua, favoreciendo así el desarrollo de la planta (Augé *et al.*, 2001). Además, el micelio extraradical es la estructura fúngica que está más expuesta a la

interacción con otros microorganismos, y con ellos crea una red de relaciones de gran importancia para el desarrollo de la planta y para el equilibrio de las poblaciones microbianas (Jeffries & Barea, 2001). En este contexto se ha denominado “Micorrizosfera” a la zona de interacción microbiana alrededor del micelio fúngico de hongos arbusculares, subrayándose de ese modo la importancia de este micelio en la biología del suelo.

Existe un caso curioso de plantas no fotosintéticas como *Arachnitis uniflora* y *Voyriella parciflora* que utilizan el micelio de hongos MA como puente con otras plantas fotosintéticas con las que se asocia, para así transportar nutrientes carbonados desde la planta fotosintéticas hasta estas plantas no fotosintéticas, que por tanto utilizan las micorrizas para parasitar a otras plantas (Bidartondo *et al.*, 2002).

II.2.3 Fisiología de la simbiosis Micorriza Arbuscular

La principal contribución de la micorriza arbuscular en el desarrollo de la planta es el aporte de nutrientes, ya que el hongo aporta nutrientes minerales captados del suelo y transferidos a la planta en las estructuras intraradicales. Tanto es así, que se ha definido a la simbiosis MA como el órgano de la planta encargado de la absorción de nutrientes del suelo (Harley & Smith, 1983). El hongo formador de MA sobretodo mejora la absorción de fósforo, pero también la de otros nutrientes de baja movilidad, como el amonio y el zinc (Parniske, 2008). A cambio, la planta aporta carbohidratos para satisfacer las necesidades del hongo, sin que este hecho normalmente repercuta negativamente en la planta, pues la simbiosis ejerce una compensación fotosintética en el sentido de que el mayor aporte de nutrientes aumenta la actividad fotosintética de la planta. Además, las plantas micorrizadas desarrollan menor superficie de raíz, por lo que incrementa la relación de carbono retenido en la parte aérea.

Hay varios factores que hacen que las plantas en simbiosis MA mejoren su nutrición mineral en relación a plantas no micorrizadas, y estos son: 1) mayor capacidad de competencia con otros microorganismos por absorción de nutrientes de las hifas del hongo en relación a la raíz (Linderman, 1992); 2) el menor tamaño de las hifas respecto a la raíz hace que estas puede llegar a zonas del suelo donde las raíces no pueden acceder (Sanders & Tinker, 1973); 3) las hifas fúngicas pueden además absorber nutrientes que no están disponibles para la planta (Leigh *et al.*, 2009; Hodge & Fitter, 2010); y, 4) los transportadores activos del microsimbionte (hongo) presentan mayor afinidad por los nutrientes minerales que los de la planta (Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001).

II.2.3.1 Nutrición Fosforada

El fósforo (P) es un nutriente limitante para el crecimiento de las plantas, ya que generalmente su disponibilidad en el suelo es baja. Es absorbido mayormente en forma de P inorgánico (Pi) (H_2PO_4^-), tanto por las raíces como por el micelio del hongo. El principal problema del P en el suelo es su baja movilidad y solubilidad, ya que, y dependiendo del pH del suelo, el P puede reaccionar con cationes formando compuestos de baja solubilidad y por tanto baja disponibilidad para las plantas (Schachtman *et al.*, 1998). La absorción del Pi disponible por parte de las raíces, unido a la baja tasa de reposición del mismo por problemas de movilidad y solubilidad, crea, por lo general, una zona de agotamiento de este nutriente alrededor de la raíz. Y es este sentido donde las hifas extraradicales del hongo tienen un papel fundamental explorando zonas alejadas donde las raíces no pueden acceder, siendo esta la principal razón de que las plantas micorrizadas aumenten su capacidad de captar Pi (Silberbush & Barber, 1983; Schachtman *et al.*, 1998).

Por tanto, son las hifas extraradicales las encargadas de la absorción de Pi del suelo, a través de un gradiente electroquímico y mediante la acción de transportadores de Pi de alta afinidad, asociado a un sistema simporte de protones, que es creado con distintas H^+ -ATPasas (Harrison & Van Buuren, 1995; Bucher, 2007; Javot *et al.*, 2007b; Smith & Read, 2008). Se ha estimado que se requieren tan sólo tres horas para alcanzar niveles máximos de incorporación del Pi en polifosfato en hongos arbusculares (Ezawa *et al.*, 2004), velocidad que solo tienen organismos hiperacumuladores de fosfato. La absorción de Pi en plantas micorrizadas es un proceso muy regulado a nivel fisiológico y genético. En este sentido, se ha demostrado que el sistema habitual de captación de Pi por la raíz, mediado por la acción de transportadores de P localizados en los ápices de los pelos radicales de las raíces, es inhibido a nivel transcripcional cuando la planta está micorrizada, llegando a ser el hongo de la MA responsable del 100% de la incorporación de P en algunas especies vegetales (Smith *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004). En algunas ocasiones, la dependencia de la captación de P por parte del hongo puede llegar a ser extrema, inhibiéndose por completo la captación por los transportadores de Pi de las raíces, y dependiendo del tipo de hongo MA puede ocurrir que el balance de captación sea menor en plantas micorrizadas respecto a plantas no micorrizadas, y conlleve a una disminución del rendimiento de la planta (Grace *et al.*, 2009; Facelli *et al.*, 2010).

Una vez que el micelio externo del hongo ha captado el Pi, este es acumulado en una forma osmóticamente inactiva mediante polimerización formando cadenas de polifosfato (poliP), unidas por bandas fosfoanhidridas, que se acumulan fundamentalmente en unas vacuolas tubulares fúngicas. De esta forma se realiza la translocación del P a través de las hifas del hongo hacia los sitios de transferencia a la planta (Rasmussen *et al.*, 2000; Ezawa *et al.*, 2002; Hijikata *et al.*, 2010). Al tener carga negativa las cadenas de poliP, esta debe ser balanceada con algún catión, y experimentos en cultivos monoxénico sugieren que la Arginina (Arg⁺) sea translocada con el poliP (Jin *et al.*, 2005), aunque otros cationes tales como el K⁺ y el Mg²⁺ también podrían jugar este papel (Ryan *et al.*, 2007). Los mecanismos moleculares que promueven el eflujo de Pi hacia las hifas intraradicales son desconocidos. Se ha observado que el tamaño de las cadenas de PoliP en las hifas extraradicales es mayor que en las intraradicales, sugiriendo que existe una hidrólisis localizada que genera altas concentraciones de Pi dentro de las hifas intraradicales, facilitando así el eflujo de PoliP hacia las hifas intraradicales (Viereck *et al.*, 2004; Preuss *et al.*, 2010). Además, este eflujo del Pi hacia las hifas intraradicales se incrementa, aproximadamente en un 10%, con un aporte extra de carbono por parte de la planta (Bücking & Shachar-Hill, 2005; Smith & Smith, 2011).

Una vez en el arbusculo, las cadenas de PoliP se deshacen mediante la acción de fosfatasas alcalinas presentes en la vacuola (Ohtomo & Saito, 2005), y el hongo lo libera hacia la célula cortical de la planta. En este punto se han encontrado transportadores de P específicos de la planta que se localizan en la membrana periarbuscular y que son exclusivos de las raíces micorrizadas. Estos transportadores de P pertenecen a la familia Pht1, son de alta afinidad y dependientes de la acción de ATPasas de la membrana periarbuscular, y posiblemente sean los responsables de flujo de P desde el arbusculo hacia la célula vegetal, utilizando el gradiente de pH existente entre la matriz interfacial y el citoplasma de la célula cortical. Estos transportadores tipo Pht1, cuya expresión es incrementada o exclusiva de la raíces micorrizadas, se han encontrado en distintas especies de plantas, tales como tomate (Nagy *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2007), arroz (Paszkowski *et al.*, 2002), *M. truncatula* (Javot *et al.*, 2007a), etc. Estudios recientes han demostrado que la ausencia en *M. truncatula* del gen *MtPT4*, que codifica para un transportador de Pi expresado exclusivamente en plantas micorrizadas, provoca una deficiencia en la micorrización y formación de los arbusculos, siendo por tanto esenciales para un correcto desarrollo de la simbiosis (Javot *et al.*, 2007a). En tomate, sin embargo, la falta del gen *LePT4* no elimina completamente la formación y desarrollo de la MA, posiblemente por la acción complementaria de los genes *LePT3* y *LePT5*, cuya expresión también está incrementada en

plantas micorrizadas y por tanto muestran redundancia funcional con *LePT4* (Nagy *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2007).

II.2.3.2 Nutrición Nitrogenada

La disponibilidad del Nitrógeno (N) frecuentemente limita el crecimiento de las plantas, y dependiendo de las condiciones del suelo, la transferencia de N por parte del hongo MA puede representar una parte significativa de la absorción de N por la planta. Durante mucho tiempo no se ha prestado suficiente atención a la posible captación de N por el hongo y su transferencia a la planta, ya que el N inorgánico en suelo es más móvil que el Pi, y además el N orgánico no se consideraba una fuente de N disponible para los hongos MA. Los primeros trabajos realizados al respecto parecían indicar la poca importancia de esta simbiosis para la absorción de N (Hawkins *et al.*, 2000; Reynolds *et al.*, 2005), salvo en el caso de plantas leguminosas, donde se incrementaba la captación de N por un incremento en la capacidad y eficiencia de nodulación de dichas plantas (Smith & Read, 2008). El uso de plantas crecidas en sistemas “splits-roots” (plantas con raíces divididas en dos compartimentos separados) y la utilización de compuestos de N marcado permitió demostrar la importancia de la MA en la nutrición nitrogenada de la planta (Leigh *et al.*, 2009; Hodge & Fitter, 2010; Feddermann *et al.*, 2010). De hecho, los hongos MA pueden transferir N desde una planta a otra, e incluso puede tomar N propio y transferírselo a la raíz hospedadora (He *et al.*, 2005). Por último, estudios recientes en mutantes de *M. truncatula* con ausencia de expresión del gen *MtPT4*, el cual como se comentó en el capítulo anterior codifica para un transportador de P, y en los cuales se producían arbusculos aberrantes (Javot *et al.*, 2007a), han demostrado que en condiciones de escasez de N los arbusculos que producían estas plantas mutantes eran normales, mostrando que la captación del N por parte del hongo es relevante, ya que el hongo en ausencia de intercambio de P, mantiene los arbusculos para favorecer el intercambio de N cuando este nutriente es limitante (Javot *et al.*, 2011).

El hongo micorrícico puede absorber por las hifas extraradicales N tanto en forma de amonio (NH_4^+) como en forma de nitrato (NO_3^-), aunque prefiere absorberlo en forma de amonio NH_4^+ , ya que el NO_3^- es más oxidado y se requiere más energía para su absorción (Gachomo *et al.*, 2009). No obstante la absorción de una u otra forma de N inorgánico depende también de la humedad del suelo y de la movilidad de las especies de N inorgánico (Tobar *et al.*, 1994; Tanaka & Yano, 2005). En este sentido se ha encontrado un transportador de NH_4^+ en *G. intraradices* cultivado en sistema monoxénico, denominado *GintAMT1*, que se encuentra en las hifas extraradicales del hongo (López-Pedrosa *et al.*, 2006). Además, recientemente se han identificado

y caracterizado dos transportadores de NH_4^+ más, *GintAMT2* (Pérez-Tienda *et al.*, 2011) y *GintAMT3* (Tisserant *et al.*, 2012). Por su parte, el NO_3^- es absorbido por una nitrato reductasa fúngica (Kaldorf *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 2005), y se han detectado dos transportadores de NO_3^- de *G. irregulare*, *GintNRT1* (Tian *et al.*, 2010) y *GintNRT2* (Tisserant *et al.*, 2012). Se ha observado también cierta capacidad de hongos MA de utilizar N a partir de materia orgánica (Hodge *et al.*, 2001; Leigh *et al.*, 2009), que representa una alta proporción del N total en el suelo. En este sentido, los hongos MA contienen un transportador de aminoácidos, *GmosAA1*, inespecífico de aminoácidos sin carga (Cappellazzo *et al.*, 2008), observándose también en experimentos en cultivos en monoxénico que las hifas extraradicales pueden tomar Arginina (Arg), además de Glicina (Jin *et al.*, 2005). También se ha propuesto la posibilidad que hongos MA puedan contribuir a la descomposición y amonificación del suelo, liberando N desde la materia orgánica (Smith & Read, 2008).

Una vez absorbido el N inorgánico del suelo por los hongos MA, rápidamente se incorpora a la Arg por la vía GS/GOGAT (Breuninger *et al.*, 2004). La Arg se acumula en altas concentraciones en el micelio extraradical y es transportado a las hifas intraradicales, y, tal y como se comentó en el apartado anterior, se sugiere que su transporte es conjunto con las cadenas de Poli-P. Una vez en los arbusculos se hidrolizan esas cadenas de Poli-P, liberándose a su vez la Arg, que por acción de arginasas y ureasas liberan NH_4^+ (Fellbaum *et al.*, 2012) y CO_2 , que es transportado a las hifas extraradicales para sintetizar más Arg (Guttenberger, 2000; Jin *et al.*, 2005; Smith & Smith, 2011). También se ha observado que las hifas intraradicales aumenta su actividad glutamina sintetasa, utilizando NH_4^+ y Glutamato (Glu) para formar Glutamina (Gln), y así es reasimilado por el hongo (Tian *et al.*, 2010).

La manera por la cual el N es transferido desde las hifas intraradicales a la planta colonizada es todavía objeto de debate. A pesar de que tanto en *L. japonicus* como en *M. truncatula*, se incrementa la expresión de transportadores de nitrato de plantas cuando estas están micorrizadas (Hohnjec *et al.*, 2005), se piensa que el N es liberado por el hongo en forma de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ (Chalot *et al.*, 2006). En este sentido se ha demostrado que el gen *LjAMT2;2*, en raíces de *L. japonicus* se sobre-expresa en raíces colonizadas con el hongo MA *Gigaspora margarita*, y este gen se ha caracterizado como un transportador de amonio de alta afinidad que pertenece a la subfamilia AMT2, estando localizado preferentemente en las células arbusculadas (Guether *et al.*, 2009). Se ha observado que este transportador *LjAMT2;2* es más eficaz a pH ácido, y esa acidez en el apoplasto interfacial es establecida por H^+ -ATPasas de la planta y del hongo,

proporcionando así la energía para los procesos de transporte dependientes de H^+ (Balestrini *et al.*, 2007). Además, LjAMT2;2, transporta el amonio sin carga en forma de NH_3 a las células corticales de la planta (Guether *et al.*, 2009).

Por último, destacar que los hongos MA tienen la capacidad de ajustar la transferencia de nutrientes, tanto de N como de P, en respuesta al C aportado por la planta. En estudios realizados en cultivo monoxénico se ha comprobado que aumentando la disponibilidad de C en forma de sacarosa en el micelio extraradical se incrementa la actividad de los genes de la ruta GS/GOGAT, implicada en la asimilación del N, y genes de biosíntesis de Arg, y en el micelio intraradical se aumenta la actividad arginasa y ureasa, implicadas en el catabolismo de la Arg y liberación de NH_4^+ (Fellbaum *et al.*, 2012).

II.2.3.3 Metabolismo carbonado en plantas micorrizadas

Durante la germinación de las esporas, los hongos MA son completamente dependientes de los nutrientes derivados de los depósitos internos, específicamente de sus reservas de lípidos (triacilglicéridos) (Bago *et al.*, 1999a). Una vez desarrollado el micelio tras la germinación de la espora, los hongos MA son biotrofos obligados, y son totalmente dependientes de sus hospedadores para completar su ciclo de vida. Por tanto, una vez dentro de la planta hospedadora y con sus reservas internas acabadas, el hongo establece mecanismos para poder absorber nutrientes de su hospedador.

En plantas micorrizadas hay un aumento de la capacidad de fotosíntesis, pues la demanda de C hacia la raíz se incrementa de un 4 a un 20% de los fotoasimilados respecto a la demanda observada en las raíces de plantas no micorrizadas. Por tanto, el establecimiento de esta simbiosis supone un flujo de carbono a las zonas colonizadas por el hongo MA (Graham, 2000; García-Rodríguez *et al.*, 2007). Se ha propuesto que en este mecanismo de redistribución de C en plantas micorrizadas interviene el ácido jasmónico (JA) como regulador (Hause *et al.*, 2002), y que el transporte se realiza gracias a transportadores de mono- y disacáridos (Williams *et al.*, 2000), los cuales están regulados durante el desarrollo de la simbiosis. De hecho, un gen que codifica para un transportador de hexosas de *Medicago*, que probablemente está involucrado en la absorción de azúcares, se ha visto que aumenta su expresión en raíces colonizadas por *G. versiforme*, y más específicamente en las regiones de la raíz con una elevada colonización fúngica (Harrison, 1996).

En plantas, gran parte del C fijado fotosintéticamente es canalizado en la síntesis de sacarosa, que es el metabolito usado para el transporte a larga distancia del C hacia los diferentes sumideros heterotróficos de la planta. Por tanto, no es de extrañar que el metabolismo de la sacarosa esté asociado a la transferencia de carbono en esta simbiosis (Bücking & Shachar-Hill, 2005). Varios estudios han mostrado que el micelio interno del hongo no puede absorber esta sacarosa, sino hexosas, principalmente glucosa (Shachar-Hill *et al.*, 1995; Solaiman & Saito, 1997). Por tanto, antes de entrar el C al hongo esta sacarosa debe de ser hidrolizada mediante la acción de sacarosa sintasas e invertasas. De hecho, tal es la importancia de la actividad invertasa que la inhibición de la actividad de una invertasa apoplastática en tabaco redujo la actividad del hongo MA (Schaarschmidt *et al.*, 2007). En este sentido, se ha observado una inducción de la expresión del gen *LIN6*, una invertasa extracelular, localizada cerca de las estructuras MA y en células del floema de raíces de tomate micorrizadas (Schaarschmidt *et al.*, 2006). También se ha detectado incremento en la actividad de genes de sacarosas sintasas, en concreto se ha observado que el promotor del gen *MtSucSI* es específicamente activado en células que contienen arbusculos y en células que rodean a células con arbusculos (Hohnjec *et al.*, 2003), y su inhibición conduce a que los arbusculos no terminen de desarrollarse normalmente (Baier *et al.*, 2010). Por tanto, estos datos sugieren que las enzimas de catabolismo de sacarosa están involucradas en la redistribución de C en las raíces micorrizadas, proporcionando metabolitos (hexosas) a las células colonizadas. Aún no se conoce el mecanismo activo del transporte de las hexosas hacia el hongo, pero se ha identificado un transportador de hexosas en la membrana interfacial de los arbusculos en el hongo MA *Geosiphon pyriformis* que tiene alta afinidad por la glucosa y que la cotransporta con H^+ (Schüßler *et al.*, 2006). Recientemente se ha caracterizado un transportador de azúcares de *Glomus sp.*, *MST2*, encontrándose también en la membrana interfacial de hifas y arbusculos, y cuyo silenciamiento provoca que los arbusculos no terminen de madurar (Helber *et al.*, 2011).

Estas hexosas son metabolizadas rápidamente en el interior de las hifas del hongo en trehalosa y glucógeno por la ruta de las pentosas fosfato con el fin de disminuir la osmolaridad (Pfeffer *et al.*, 1999), y una parte de estas hexosas es usada para la síntesis de lípidos, principalmente triacilglicéridos, los cuales se usan para el transporte de carbono desde el micelio intraradical al extraradical del hongo (Bago *et al.*, 2002), donde mediante gluconeogénesis se transformarán en carbohidratos. También el carbono puede ser transportado hasta el micelio extraradical como glicógeno (Bago *et al.*, 2003). El micelio extraradical depende para su desarrollo de este aporte de productos carbonados desde la raíz, dada su incapacidad para

absorber carbohidratos del medio (Bago *et al.*, 2000). En los hongos formadores de MA se produce una compartimentación del metabolismo, de forma que la capacidad de síntesis lipídica sólo reside en el micelio intraradical, mientras que la capacidad gluconeogénica se localiza únicamente en el micelio extraradical. Esta marcada compartimentación del metabolismo del hongo, asociada a la diferenciación que experimenta el micelio al establecer la simbiosis, podría estar también en la base de la incapacidad del hongo para crecer independientemente de la planta.

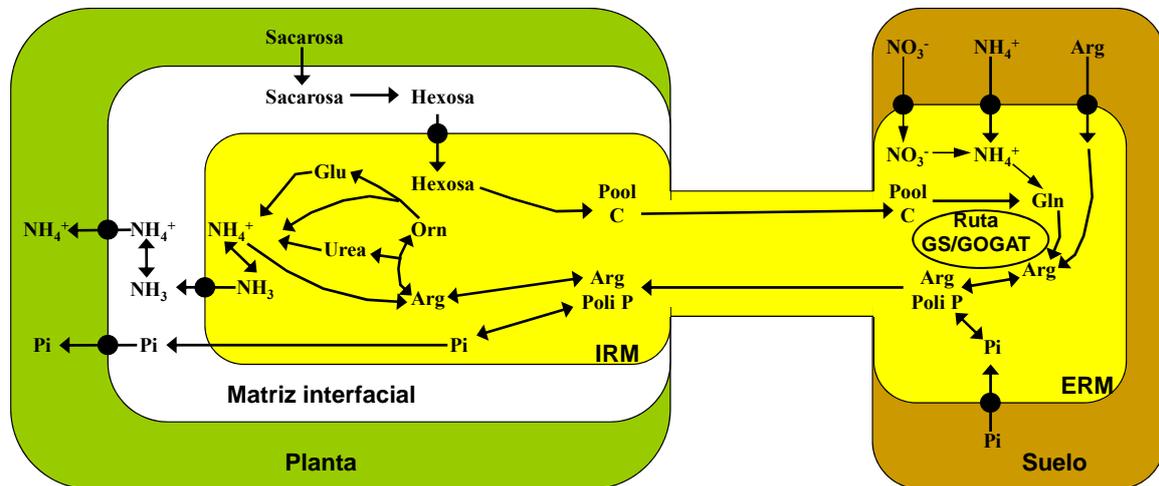


Figura II.5. Transferencia de nutrientes en las raíces de plantas micorrizadas. Se muestra tanto el transporte de nutrientes absorbidos por el hongo (N y P) desde el micelio extraradical (ERM) al micelio intraradical (IRM), en concreto al arbusculo, donde se produce el intercambio de nutrientes, primero hacia la matriz interfacial del arbusculo y por último a la célula vegetal. También se presenta la transferencia de C de la planta al hongo y desde el IRM al ERM (Fellbaum *et al.*, 2012).

II.3. PARTICIPACIÓN HORMONAL EN LA REGULACIÓN DE LA SIMBIOSIS MICORRIZA ARBUSCULAR

El funcionamiento normal de los organismos pluricelulares requiere mecanismos precisos de regulación que permitan una perfecta coordinación de las actividades de sus células, tejidos y órganos. Igualmente, el organismo debe ser capaz de percibir y responder a las fluctuaciones en su ambiente. Entre los posibles mecanismos de regulación, el más conocido es el sistema de mensajeros químicos (señales químicas) que permite la comunicación entre las células y coordina sus actividades. En las plantas, la comunicación química se establece fundamentalmente a través de hormonas vegetales (o fitohormonas) (Segura, 2000b).

Pero a diferencia de las hormonas animales, estas hormonas vegetales pueden sintetizarse en cualquier órgano de la planta, su transporte no es un componente esencial para la acción de las

hormonas y el control de la respuesta hormonal se lleva a cabo a través de cambios en la concentración y sensibilidad de los tejidos a las hormonas. Teniendo en cuenta todas las consideraciones anteriores, las hormonas vegetales se definen como un grupo de sustancias orgánicas, sintetizadas por las plantas, que tienen la capacidad de afectar a los procesos fisiológicos en concentraciones mucho más bajas que los nutrientes o las vitaminas (frecuentemente menos de $1\mu\text{M}$) (Segura, 2000b). El control de la respuesta hormonal se lleva a cabo, por tanto, a través de cambios en la concentración y la sensibilidad de los tejidos a las hormonas. No obstante, en determinadas situaciones uno de los factores puede dominar o excluir al otro. Los factores ambientales también afectan a los niveles hormonales y a la sensibilidad de las células a las hormonas vegetales, lo que se traduce en cambios en los programas de desarrollo de las plantas.

Por tanto, las hormonas vegetales regulan una multitud de eventos durante el desarrollo de la planta, y varios estudios utilizando métodos combinados de análisis de hormonas, mutantes, plantas transgénicas y datos de transcriptómica, han mostrado que las hormonas vegetales constituyen unas moléculas señales que desempeñan un papel importante para el establecimiento de la simbiosis micorrícica (Beyrle, 1995; Ludwig-Müller, 2000; Herrera Medina *et al.*, 2003; Hause *et al.*, 2007). Se ha observado que los niveles de las hormonas vegetales tales como citoquininas, ácido jasmónico (JA), auxinas, componentes relacionados con las auxinas y ABA, sufren cambios tras el establecimiento de la micorrización (Hause *et al.*, 2007). Sin embargo, todavía hay grandes lagunas de cómo estas hormonas vegetales afectan a la micorrización y de cómo ambos simbiosis contribuyen a la regulación sobre la producción de las hormonas vegetales.

A continuación, se expone de manera resumida cómo cada hormona vegetal y otras moléculas con propiedades similares, como el ácido salicílico, actúan sobre la micorrización.

II.3.1 Auxinas

Las auxinas son hormonas vegetales que se caracterizan por participar en fenómenos de alargamiento o elongación de las células vegetales. Además de esta acción sobre el crecimiento, las auxinas influyen de forma decisiva en procesos como la división celular del cámbium, la diferenciación vascular, la formación de raíces laterales, la dominancia apical y el desarrollo de frutos (Acosta-Echeverría *et al.*, 2000).

Varios estudios han mostrado que las auxinas, sobretodo el ácido indol-butírico (IBA de las siglas de su nombre en inglés “indole-3-butyric acid”), incrementa la formación de raíces laterales en varias especies de plantas (Kaldorf & Ludwig-Müller, 2000; Overvoorde *et al.*, 2010). De igual manera, la inoculación con hongos formadores de micorrizas en algunas especies de plantas también produce un incremento de raíces laterales (Yano *et al.*, 1996; Oláh *et al.*, 2005), y parece ser que esas modificaciones en la arquitectura radicular debido a la micorrización es dependiente de auxinas (Hanlon & Coenen, 2011). Y esas raíces laterales son las que preferentemente utiliza el hongo para colonizar la planta (Kaldorf & Ludwig-Müller, 2000; Gutjahr *et al.*, 2009).

Las auxinas pueden ser producidas por hongos, entre otros por especies del género *Hebeloma*, que son hongos formadores de ectomicorrizas (Gay & Debaud, 1987; Gay *et al.*, 1994) y por hongos endofíticos promotores del crecimiento tales como *Piriformospora indica* (Sirrenberg *et al.*, 2007; Vadassery *et al.*, 2008), y así estos hongos pueden incrementar el sistema radicular de la planta hospedadora (Splivallo *et al.*, 2009). Esporas del hongo MA *G. irregulare* producen pequeñas cantidades de ácido indo-acético (IAA de las siglas de su nombre en inglés “indole-3-acetic acid”) pero no de IBA (Ludwig-Müller *et al.*, 1997), aunque en las hifas extraradicales de los hongos MA no se ha detectado ningún tipo de auxinas (Jentschel *et al.*, 2007), por lo que parece que los hongos MA no producen auxinas.

Se han realizado varios estudios para determinar si las raíces MA varían su contenido de auxinas, aunque ha sido difícil de determinar, ya que la concentración de auxinas en raíces varía según el tipo de auxinas, la especie hospedadora y el estadio de la micorrización. Por ejemplo, el ácido indo-acético no sufre cambios en su concentración en plantas de maíz micorrizadas (Sirrenberg *et al.*, 2007), mientras que sí se incrementa la concentración de IBA (Kaldorf & Ludwig-Müller, 2000; Jentschel *et al.*, 2007). También el ácido fenilacético (PAA de las siglas de su nombre en inglés “phenylacetic acid”), un componente con actividad de auxina, incrementa su concentración con la micorrización en plantas de capuchina (Jentschel *et al.*, 2007). Se ha observado también que la concentración de IAA se incrementa en plantas micorrizadas en otras especies vegetales, tales como en soja, puerro y lichi (Ludwig-Müller, 2010).

Además, parecen existir cambios selectivos en la concentración de cada tipo de auxina dependiendo del estadio de micorrización. Por ejemplo, en *M. truncatula* se ha observado que el IBA incrementa a lo largo del desarrollo de la micorrización, mientras que el IAA solo

incrementa en un estadio determinado (Meixner *et al.*, 2005; Meixner *et al.*, 2007). La utilización de un inhibidor de IBA provocó un descenso tanto del número de raíces laterales como de la micorrización (Kaldorf & Ludwig-Müller, 2000).

Varios experimentos relacionan el IBA con las etapas iniciales de la micorrización, ya que este compuesto promueve la germinación de esporas e incremento de las hifas del hongo MA (Barea, 1986). Además, hay evidencias indirectas que indican que las auxinas podrían estar involucradas en la formación inicial de la MA, ya que controlan la expresión de genes en *Arabidopsis* responsables de la síntesis de estrigolactonas (Hayward *et al.*, 2009), que son hormonas vegetales involucradas en la formación inicial de la MA (apartado 3.7.) (Akiyama *et al.*, 2005; Koltai *et al.*, 2010). Por tanto, la acción de auxinas en etapas iniciales de la simbiosis podría estar relacionada con la síntesis de estrigolactonas. En este sentido, recientemente se han realizado experimentos con mutantes de tomate *dgt*, con capacidad reducida de respuesta a auxinas (Coenen & Lomax, 1998), y mutantes *cpt* que sobre-expresan el transportador de eflujo de auxinas *PINI* (Kharshiing *et al.*, 2010), y se ha comprobado que el incremento de raíces laterales debido a la micorrización es dependiente de auxinas, necesiéndose la presencia de auxinas para que las hifas fúngicas se dirijan hacia la raíz, efecto que es favorecido por las estrigolactonas. En los mutantes *pct* se acelera la micorrización en las primeras etapas, aunque después esa micorrización es menor (Hanlon & Coenen, 2011). La conclusión de estos autores es que las auxinas son requeridas para la formación de MA en los estadios tempranos, incluyendo el intercambio de señales presimbóticas.

II.3.2 Citoquininas

Las citoquininas son derivados de la base púrica adenina (6-aminopurina). Todas ellas poseen un sustituyente, de naturaleza isoprenoide o aromática, en el nitrógeno amínico de la posición 5 del anillo de purina. Entre los procesos en los que las citoquininas están implicadas destacan la división celular, proliferación de yemas axilares (ruptura de la dominancia apical), neoformación de órganos *in vitro*, senescencia foliar, desarrollo de los cloroplastos y floración (Segura, 2000a).

Si bien las citoquininas inhiben la germinación de las esporas de hongos formadores de MA (Barea, 1986), y aunque todavía no está establecido su papel durante la formación de la MA, se supone que juegan un papel importante durante el inicio de la micorrización (Ludwig-Müller, 2010). Esta suposición deriva del hecho de que en diferentes interacciones de plantas con

microorganismos beneficiosos se ha observado un papel relevante de receptores de citoquininas. Por ejemplo, en la interacción *A. thaliana* con *P. indica* es necesaria la activación de un receptor de citoquininas (Vadassery *et al.*, 2008), viéndose que *P. indica* puede sintetizar citoquininas en altas cantidades y así provocar la respuesta de la planta.

Algunos autores han relacionado el papel de citoquininas durante la micorrización con la regulación de mecanismos de defensa. En concreto, se sabe que las citoquininas producen una regulación negativa de la expresión de ciertos genes de PRs (denominados así por las siglas de su nombre en inglés “**P**athogenesis-**R**elated **P**rotein”) y quitinasas básicas, al igual que ocurre durante el proceso de micorrización (David *et al.*, 1998; Ginzberg *et al.*, 1998). Dado que tanto PRs como quitinasas están relacionadas con la defensa de plantas contra la infección de hongos, el papel de citoquininas podría estar relacionado con el control de la respuesta de defensa en planta durante el proceso de infección, permitiendo así el establecimiento de la micorrización. Además, se ha observado que ciertos hongos formadores de MA son capaces de producir sustancias con actividad de citoquininas (Barea & Azcón-Aguilar, 1982).

Otro posible papel de citoquininas durante la micorrización podría estar relacionado con la redistribución de asimilados. Se sabe que las citoquininas pueden redirigir asimilados (Walters & McRoberts, 2006) e inducir invertasas (Ehneb & Roitsch, 1997), y por tanto participar en la redistribución del C en plantas micorrizadas. También se ha sugerido su participación en la inducción de la formación de raíces laterales durante la micorrización (Fang & Hirsch, 1998).

Se ha observado que solo concentraciones muy elevadas de citoquininas pueden inhibir la micorrización, por lo que supone que a concentraciones fisiológicas normales no tendrían esa papel regulador negativo en la planta (Gryndler *et al.*, 1998). Se ha observado una relación de las citoquininas con la nutrición fosforada, y así un incremento de citoquininas puede ser debido a un incremento de la nutrición de fosfato en las raíces micorrizadas (Barker & Tagu, 2000), donde si se ha observado que incrementa los niveles de zeatín ribósido (Torelli *et al.*, 2000), el cual es considerado una forma de transporte para las citoquininas y por lo tanto de comunicación raíz-parte aérea (Dixon *et al.*, 1988).

II.3.3 Ácido jasmónico

El ácido jasmónico (JA) (JA de las siglas de su nombre en inglés “**J**asmonic **A**cid”) es un derivado del ácido linoleico (Vick & Zimmerman, 1983), y su metilación da lugar a la formación

de metiljasmonato (MeJA), que es un compuesto clave en la señalización del JA (Cheong & Choi, 2003). El JA puede promover la senescencia y actuar como regulador del crecimiento, y varios estudios han comprobado que el JA puede modular múltiples aspectos del desarrollo de las plantas, como la maduración del fruto, la viabilidad del polen, el crecimiento de la raíz, la curvatura de los zarcillos (Zacarías & Lafuente, 2000). Pero principalmente el JA regula la respuesta de la planta tanto a estreses abióticos como lesiones y déficit hídrico (Rao & Davis, 2001), así como a estreses bióticos frente a patógenos e insectos, siendo molécula mediadora de la resistencia sistémica inducida (ISR de las siglas de su nombre en inglés “Induced Systemic Resistance”) (Ton *et al.*, 2002).

Del análisis de los resultados de los estudios realizados en cuanto a la participación del JA en el proceso de micorrización se obtienen resultados contradictorios. Por un lado, la aplicación semanal de dosis pequeñas (5µM) en hojas de *Allium sativum* promovió la colonización del hongo en la raíz (Regvar *et al.*, 1996). Contrariamente a este resultado, otros estudios en *Carica papaya*, *Tropeolum majus*, *Cucumis sativus* y *Solanum lycopersicum* mostraron que la aplicación de JA sobre hojas causa una importante inhibición sistémica de la micorrización (Ludwig-Müller *et al.*, 2002; Herrera-Medina *et al.*, 2008), posiblemente debido a que en este caso las concentraciones de JA aplicadas eran mayores y la aplicación se repitió más frecuentemente. Estos resultados sugieren un efecto del JA sobre las plantas micorrizadas dependiente de la dosis, aunque también en estos diferentes resultados podrían influir las diferentes especies de plantas y de hongos micorrícicos utilizados en los diferentes experimentos.

En varios experimentos usando diferentes especies vegetales se ha observado que en plantas micorrizadas se incrementa tanto el contenido de JA libre como conjugado con isoleucina (Hause *et al.*, 2002; Meixner *et al.*, 2005), así como se incrementa la expresión de genes importantes en la respuesta y biosíntesis de JA, tales como el codificante para la proteína regulada por jasmonatos JIP23 y el de la enzima AOS (de las siglas de su nombre en inglés “Allene oxide synthase”). Ambos genes son inducidos específicamente en células que contienen arbusculos a los 4 ó 6 días después de que aparezcan estos (Hause & Schaarschmidt, 2009). Estos resultados sugieren que el JA debe de estar más relacionado con el establecimiento de la simbiosis más que con el reconocimiento entre ambos simbioses. En este sentido, el silenciamiento génico del gen que codifica para la enzima AOC (de las siglas de su nombre en inglés “Allene oxide cyclase”), relacionada con la síntesis de JA en plantas de *M. truncatula*, repercutió negativamente tanto en los niveles de JA formado en raíz, como en el desarrollo de la simbiosis, observándose sobre todo

una reducción en el número de arbusculos (Isayenkov *et al.*, 2005). En experimentos con sistema “splits-roots” en plantas de pepino, se observó que el JA incrementa en ambos compartimentos, tanto en el compartimento de raíz colonizada de las plantas micorrizadas, como en el compartimento de raíz no colonizada de plantas micorrizadas, por lo que existe un efecto de la micorrización sobre el incremento del JA de forma local y sistémica (Vierheilig & Piché, 2002). También se ha propuesto que el incremento de JA en raíces micorrizadas podría estar vinculado a una regulación del número de arbusculos formados, e incremento en el número de arbusculos colapsados, protegiendo así a la plantas de una excesiva colonización que podría causar parasitismo (Vierheilig, 2004b).

El incremento de JA a nivel sistémico debido a la micorrización podría ser parte del fenómeno de bioprotección de la planta activado por la micorrización, mediando el mecanismo de ISR activada por la micorrización (Wasternack & Hause, 2002; Pozo & Azcon-Aguilar, 2007). En este contexto, y debido a la activación de un mecanismo de defensa mediado por JA, es posible que la aplicación foliar de JA cause una reducción sistémica de la micorrización tal y como se describió anteriormente. En este sentido, los mutantes de tomate *jail*, los cuales tienen afectado el gen *LeCOI* necesario para la activación de genes de defensa inducidos por JA (Feys *et al.*, 1994), muestran una mayor capacidad de micorrización (Herrera-Medina *et al.*, 2008), apoyando así la hipótesis de que la ruta de señalización del JA es esencial para la regulación de la micorrización.

Estudios con mutantes *spr2* de tomate, los cuales tienen muy reducida la capacidad de producción de JA en respuesta a un estímulo inductor, han mostrado que esta deficiencia en la producción de JA origina una caída drástica de la intensidad de micorrización, así como de la abundancia de arbusculos, si bien la aplicación de MeJA provoca un rescate de estos parámetros (Tejeda-Sartorius *et al.*, 2008). Tejera y colaboradores sugieren que el JA es necesario para una correcta micorrización, posiblemente debido a que participa en la regulación de la acción de las invertasas extracelulares. En estos mutantes afectados en la biosíntesis de JA disminuye el transporte e hidrólisis de sacarosa y decrece la actividad extracelular de invertasas (Tejeda-Sartorius *et al.*, 2008), por lo que se sugiere que uno de los mecanismos por el cual el JA debe operar en la MA podría ser la regulación de la compartimentación y redistribución del C en la planta (Hause & Schaarschmidt, 2009).

Se han propuesto otras posibles funciones que el JA puede tener en la micorrización, ya que por ejemplo, el JA incrementa la producción de muchos metabolitos secundarios de la planta, tales como componentes fenólicos, terpenos, alcaloides, aceites esenciales e isoflavonoides entre otros (Bi *et al.*, 2007; Schliemann *et al.*, 2008; Grunwald *et al.*, 2009), para los cuales, principalmente flavonoides, se han descrito efectos estimuladores de la micorrización (Vierheilig & Piché, 2002). También se ha sugerido que el JA favorece la micorrización por su papel en la reorganización del citoesqueleto, así como por mejorar el estado general de la planta (Hause & Schaarschmidt, 2009).

II.3.4 Etileno

El etileno es una hormona vegetal gaseosa, lo que le confiere la capacidad de difundir libremente por los espacios intercelulares y de coordinar una respuesta rápida y uniforme en los tejidos. El etileno afecta a numerosos procesos del desarrollo de la planta, como son la germinación de semillas, participa en la diferencia radicular, afecta a la emergencia y desarrollo de las hojas, la maduración de frutos, la senescencia de flores, y la respuesta frente a numerosos estreses abióticos y bióticos, y está implicado junto al JA en la respuesta de resistencia inducida ISR (van Loon *et al.*, 1998; Zacarías & Lafuente, 2000).

Al ser una hormona relacionada con la respuesta de defensa en plantas y estar vinculada con la producción de proteínas implicadas en la patogénesis PR (Pozo *et al.*, 2002), se ha sugerido su participación en la regulación de esa respuesta durante la micorrización. Basándose en resultados de aplicación de etileno tanto en forma de ethephon (molécula que libera etileno), como en forma gaseosa, se observó una disminución de la micorrización (Azcón-Aguilar *et al.*, 1981; Ishii *et al.*, 1996; Geil *et al.*, 2001; Geil & Guinel, 2002; Herrera-Medina, 2008), y se ha propuesto que el etileno podría activar una respuesta de defensa. Aún más, se ha postulado que esa respuesta defensiva podría estar mediada por la modulación de los picos de Ca^{2+} intracelulares, de forma similar a lo que ocurre en la simbiosis con *Rhizobium*, donde el etileno reduce el número de puntos de infección (Penmetsa & Cook, 1997; Oldroyd *et al.*, 2001; Guinel & Geil, 2002). Además, otro de los factores que mediarían el efecto negativo del etileno sobre la colonización fúngica podría deberse a su acción negativa sobre el desarrollo del sistema radical, dificultando la frecuencia de micorrización (Kaldorf & Ludwig-Müller, 2000). Por otro lado, también se ha observado un efecto directo sobre el hongo, pues altos niveles de etileno provocan que el apresorio no se forme correctamente (Geil *et al.*, 2001). La acción del etileno sobre la micorrización es dependiente de la dosis, ya que se ha observado que bajas concentraciones de

etileno estimulan la germinación de esporas del hongo, mientras que altas concentraciones disminuyen la expansión del hongo por la raíz (Geil & Guinel, 2002).

Estudios realizados en diferentes plantas transgénicas y/o mutantes afectadas bien negativamente o positivamente en la producción de etileno han confirmado los resultados de los experimentos de aplicación exógena de etileno. En concreto, plantas transgénicas de tomate y pepino que sobreexpresan el gen que codifica para una 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa bacteriana (*ACCD*), y cuya producción de etileno es menor que en las plantas silvestres (Klee *et al.*, 1991), mostraron un incremento de colonización micorrízica final y de la abundancia arbuscular (Gamalero *et al.*, 2008; Herrera-Medina, 2008), si bien estas plantas mostraron un cierto retraso en el inicio de la colonización. Este retraso quedó eliminado con la aplicación de ethephon, concluyéndose que es necesario una mínima concentración de etileno para iniciar correctamente la micorrización, quizás mediante la estimulación de la germinación de las esporas del hongo (Herrera-Medina, 2008). Por otro lado, plantas mutantes de tomate afectadas en la maduración del fruto y más insensibles a la acción del etileno, en concreto mutantes *rin* (de las siglas de su nombre en inglés “**ri**penenig-**in**hibitor”), mostraron unos niveles de micorrización mayor que las plantas silvestres (de Los Santos *et al.*, 2011). De manera contraria, plantas mutantes de tomate *epi* (de las siglas en inglés “**epi**nastic), las cuales acumulan mayores niveles de etileno y muestran una respuesta constitutiva a la acción de etileno, mostraron menores niveles de micorrización que plantas de la variedad silvestre (de Los Santos *et al.*, 2011).

Los estudios de cuantificación de los niveles de etileno en plantas micorrizadas han mostrado resultados contradictorios dependiendo de la especie vegetal. Por ejemplo, en plantas micorrizadas de *Linum usitatissimum* se ha observado un incremento de los niveles de etileno asociado a la micorrización (Dugassa *et al.*, 1996). Sin embargo, en otras especies vegetales como tomate se reduce la concentración de etileno en plantas micorrizadas (Vierheilig *et al.*, 1994; Herrera-Medina, 2008; López-Raéz *et al.*, 2010). En plantas de patata micorrizadas se produjo una reducción de la actividad ACD oxidasa (Ácido 1-amino,ciclopropano-1-carboxílico oxidasa), enzima que cataliza el último paso en la síntesis de etileno, (McArthur & Knowles, 1992), mientras que en tomate no se apreciaron cambios en la actividad enzimática (Vierheilig *et al.*, 1994). Estudios realizados en papaya mostraron que en cultivos bien irrigados se incrementaba la concentración de etileno por la presencia de micorrización, mientras que bajo estrés hídrico su concentración disminuía (Cruz *et al.*, 2000). En plantas de *Antirrhinum majus* se

ha observado que la colonización micorrícica también afecta de manera sistémica al etileno, pues se apreció una reducción en la producción de flores que podría estar mediada por una respuesta a etileno (Besmer & Koide, 1999). En este sentido, varios autores soportan la hipótesis que el hongo micorrícico incrementa el crecimiento de la planta porque disminuye la respuesta a etileno (Barazani *et al.*, 2007; Riedel *et al.*, 2008).

Además de los estudios descritos anteriormente en cuanto a la medida de concentración en raíz, o determinación del efecto sobre la micorrización de la aplicación de distintas dosis de etileno, se han llevado a cabo otros estudios que se han centrado en el análisis del papel de receptores de etileno durante el proceso de micorrización. Los receptores de etileno actúan por inhibición, y su forma activa bloquea la señalización de etileno. La unión de etileno a los receptores bloquea su actividad, inactivándolos y dejan por tanto de inhibir la ruta de señalización del etileno, desencadenándose la respuesta (Gao *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2003). La inactivación de estos receptores con la aplicación de Ag^+ (un inhibidor competidor con etileno por la unión al receptor), en forma de tiosulfato de plata (STS) (Sisler & Serek, 2003) produce un incremento de la micorrización, demostrando así la importancia de la percepción del etileno durante la micorrización (Herrera-Medina, 2008). Estudios de micorrización en plantas mutantes de tomate incapacitadas en la funcionalidad de distintos receptores de etileno han permitido establecer la importancia de estos durante el proceso. Así, mutantes *nr* más insensibles a la acción de etileno por tener el receptor *LeETR3* inactivo (Klee, 2002), mostraron un aumento en su capacidad de micorrización. Por su parte, plantas transgénicas de tomate *ETR4AS* y *ETR6AS*, que son más sensibles al etileno por silenciamiento de los genes *LeETR4* y *LeETR6* que codifican para receptores de etileno *ETR4* y *ETR6* respectivamente (Tieman *et al.*, 2000), tienen inhibida su capacidad de micorrización (Herrera-Medina, 2008).

II.3.5 Ácido salicílico

El ácido salicílico (SA de las siglas de su nombre en inglés “Salicylic Acid”) es un compuesto aromático, que si bien no se ha reconocido tradicionalmente como hormona vegetal, su modo de acción es similar al de este tipo de moléculas tradicionales, y además afecta a la síntesis o señalización de las mismas, por lo que actualmente se incluye dentro del grupo de moléculas con acción hormonal en plantas. Durante el desarrollo de la planta, el SA actúa como inhibidor de la germinación y del crecimiento de raíz y coleoptilo, inducción de la floración (Saxena & Rashid, 1980), provoca cierre de estomas y reducción de la transpiración, mantiene turgente los estomas (Hao *et al.*, 2011), altera la permeabilidad de los tilacoides e influye sobre la

capacidad fotosintética de la planta (Arfan *et al.*, 2007), y es un inhibidor del crecimiento y germinación de las semillas (Dolatabadian *et al.*, 2009). Además, el SA juega un papel importante en la resistencia de la planta a diversos estreses abióticos (Drazic & Mihailovic, 2005) y bióticos, al ser mediador de respuestas defensivas y activador de la resistencia sistémica adquirida en plantas (SAR por las siglas de su nombre en inglés “Systemic Acquired Resistance”) frente a patógenos (Chen *et al.*, 1993).

Debido a su participación en la activación de respuestas defensivas, se estudió su papel como regulador de la respuesta de defensa frente al hongo MA en plantas micorrizadas (García-Garrido & Ocampo, 2002). La aplicación exógena de SA en la rizosfera provoca un retraso en la micorrización de plantas de arroz, aunque la capacidad de colonización final del sistema radicular no se vio afectada (Blilou *et al.*, 2000b). Al contrario que sucede con el JA, la aplicación foliar de SA en plantas micorrizadas de *Carica papaya*, *Tropeolum majus*, y en *Cucumis sativus* no tiene ningún efecto sobre la micorrización de la raíz (Ludwig-Müller *et al.*, 2002). Por tanto, la respuesta defensiva del SA ante la micorrización parece tener una acción local, y no sistémica.

Por otro lado, al igual que ocurre con la respuesta de defensa frente a patógenos, se ha observado que los niveles de SA incrementan en plantas micorrizadas de arroz, guisante y tabaco durante los estados tempranos de la interacción (Blilou *et al.*, 1999; Blilou *et al.*, 2000b; Blilou *et al.*, 2000a), coincidiendo con un incremento en proteínas relacionadas con la respuesta de defensa en plantas (Blilou *et al.*, 2000a; Blilou *et al.*, 2000b). Además, gracias a experimentos con sistema “splits-roots”, se observó que ese aumento de SA es solo a nivel local en las zonas micorrizadas, y no sistémico (Khaosaad *et al.*, 2007).

A diferencia de la respuesta de defensa a patógenos, la respuesta de defensa generada durante la micorrización parece ser transitoria y menos intensa, ya que una de las claves de la micorrización de la raíz es el control del desarrollo de la respuesta de defensa (García-Garrido & Ocampo, 2002). En plantas de guisante mutantes Myc-, incapaces de micorrizarse y alterados en la capacidad de regular su respuesta defensiva frente a hongos MA se observó un incremento de la concentración de SA en respuesta a la inoculación con hongos MA (Blilou *et al.*, 1999), lo que sugiere el papel regulador del SA durante la micorrización.

Apoyando lo anterior, en estudios con plantas transgénicas de tabaco CSA (con una capacidad mayor de síntesis y acumulación de SA) y NahG (con niveles inferiores de SA por

activación de su catabolismo) se demostró que existe una relación inversa entre la cantidad de SA endógeno en la raíz, y la velocidad de dispersión del hongo en la raíz, sin afectación de la capacidad máxima de micorrización de las plantas. Por tanto, el papel del SA durante la micorrización estaría más relacionado con la regulación del número de puntos de infección y la resistencia de la planta a la penetración por el hongo, provocando un retraso en su colonización, y no afectando la formación de los arbusculos (Herrera Medina *et al.*, 2003; Gutjahr & Paszkowski, 2009). Apoyando esta hipótesis se han obtenido resultados que indican que en los pelos radicales en *M. truncatula* se incrementan los niveles de expresión de un gen codificante de una proteína relacionada con la patogénesis, PR10. Este gen responde positivamente a SA, y su expresión se activa específicamente en células cercanas del apresorio fúngico durante las etapas iniciales de la infección, ya que después su expresión disminuye durante la formación y acceso del hongo a la planta a través del aparato de penetración (Siciliano *et al.*, 2007).

II.3.6 Estrigolactonas

Las estrigolactonas, moléculas derivadas de los carotenoides, han sido recientemente reconocidas como una clase nueva de hormonas vegetales, que controlan tanto la arquitectura de la planta mediante su implicación en el proceso de ramificación del tallo (Gómez-Roldán *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008), como las relaciones de la planta con organismos de su entorno, siendo una molécula señal en la rizosfera tanto como estimulantes de la germinación de semillas de plantas parásitas de la familia *Orobanchaceae*, tales como *Striga*, *Orobanche* y *Phelipanche* (Paszkowski, 2006; Bouwmeester *et al.*, 2007), como inductora de la ramificación de hifas de hongos formadores de MA (Akiyama *et al.*, 2005). Atendiendo a las teorías evolutivas, que consideran a la asociación MA “la madre de todas las relaciones simbióticas de plantas”, se sugiere que las estrigolactonas fueron señales para la interacción simbiótica MA, y las plantas parásitas han explotado posteriormente este mecanismo de señalización para detectar a sus hospedadores (Rochange, 2010).

Se ha comprobado que tanto la inhibición general de la síntesis de carotenoides mediante Fluridona, como la inhibición específica de la síntesis de estrigolactonas en mutantes *ccd7* y *ccd8*, produce una disminución de la micorrización, que es restablecida con la aplicación de un análogo sintético de las estrigolactonas, el GR24 (Gómez-Roldán *et al.*, 2007; Gómez-Roldán *et al.*, 2008; Yoneyama *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2009). Además, los exudados de estos mutantes *ccd7* y *ccd8* tienen reducida tanto la capacidad de estimular la ramificación de hifas de hongos MA, como la germinación de semillas de las plantas parásitas *Striga* y *Orobanche* (Gómez-Roldán *et*

al., 2008; Umehara *et al.*, 2008). Aun así, estos mutantes tiene cierta capacidad de micorrización, bien por producir aún suficiente cantidad de estrigolactonas para inducir la ramificación y crecimiento de las hifas fúngicas, o porque simplemente otros componentes, además de los derivados de la acción de CCD7 y CCD8 son más importantes para estimular la MA. Recientemente se ha observado que no solo los genes que codifican para las enzimas de síntesis de estrigolactonas CCD7 y CCD8 son importantes, sino que el transportador de estrigolactonas de tipo ABC, *PDR1* de *Petunia hybrida*, tiene un papel clave en la regulación del desarrollo de MA, y en el proceso de ramificación de la planta, al funcionar para exportar las estrigolactonas hacia los lugares donde realizan su acción (Kretschmar *et al.*, 2012).

Existen varias investigaciones que muestran que una vez el hongo micorrícico se ha establecido en la planta decrece la producción de estrigolactonas en la raíz (Lendzemo *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2008; López-Raéz *et al.*, 2011), y esto podría estar relacionado con el fenómeno de autorregulación de la micorrización, pues los exudados de plantas micorrizadas disminuyen la capacidad de micorrización de otras plantas (Vierheilig *et al.*, 2003; Vierheilig, 2004a). Además, se ha observado que la inoculación de maíz y sorgo con hongos MA conlleva a una reducción de la infección por *Striga* debido a la bajada en la producción de estrigolactonas y por tanto la bajada en la estimulación de la germinación de las semillas de la planta parásita (Lendzemo *et al.*, 2005).

En condiciones de altas concentraciones de P también se produce una reducción de la cantidad de estrigolactonas liberadas a la rizosfera, lo cual reduce el desarrollo presimbiótico del hongo (Yoneyama *et al.*, 2007; López-Raéz *et al.*, 2008), poniendo en evidencia una relación entre niveles de P, producción de estrigolactonas, y micorrización, en especies micotróficas (Yoneyama *et al.*, 2007; Yoneyama *et al.*, 2008).

Se ha observado que las estrigolactonas estimulan el metabolismo de las hifas de hongos formadores de MA, ya que incrementan la actividad mitocondrial, el consumo de O₂ y la densidad mitocondrial (Besserer *et al.*, 2006), incrementándose también el metabolismo oxidativo al aumentar la producción de NADH y ATP (Besserer *et al.*, 2008), lo cual parece estar relacionado con la necesidad energética para la ramificación de las hifas (Besserer *et al.*, 2009).

II.4. EL ÁCIDO ABSCÍSICO Y SU PARTICIPACIÓN EN LA MICORRIZACIÓN

II.4.1 Estructura química y actividad biológica

El ácido abscísico (ABA de las siglas de su nombre en inglés “Abscisic Acid”) es un ácido débil de 15 carbonos, ópticamente activo que fue identificado en la década de los años 60 como un inhibidor del crecimiento que se acumulaba en el fruto del algodón en proceso de abscisión (recibiendo el nombre de abscisina II) y, en hojas de sicomoro inducidas por fotoperiodo que permanecían durmientes (denominado como dormina) (Finkelstein & Rock, 2002). El compuesto abscisina II, tenía un efecto inhibitor del crecimiento del coleóptilo de avena aunque el efecto del ABA como promotor de la abscisión era un efecto indirecto producido por la inducción de la biosíntesis de etileno (Cracker & Abeles, 1969). Otro grupo aisló un compuesto que denominaron dormina, que era un inhibidor de la germinación del embrión en maíz y que se encontraba en extractos de hoja del sicomoro. Análisis químicos posteriores determinaron que la dormina y la abscisina II eran el mismo compuesto (Conforth *et al.*, 1965a). Desde ese momento este compuesto recibió el nombre de ácido abscísico. El ABA fue inmediatamente conocido como regulador del crecimiento en plantas, además de estar presente como compuesto endógeno en algunos hongos y animales (Nambara & Marion-Poll, 2005; Wasilewska *et al.*, 2008).

La estructura molecular del ABA fue deducida por métodos de espectroscopia poco después de su descubrimiento, confirmándose posteriormente mediante la síntesis química de la molécula (Conforth *et al.*, 1965b; Ohkuma *et al.*, 1965). La estructura molecular del ABA posee una serie de características químicas que son importantes para su actividad biológica en plantas. El ABA es un sesquiterpeno apocarotenoide con un carbono asimétrico ópticamente activo C-1'. El ABA posee en la cadena lateral de sus moléculas dos enlaces dobles conjugados en el ácido carboxílico, la configuración del doble enlace adyacente al anillo es en *trans* y la del doble enlace proximal al grupo ácido es en *cis*. El ABA tiene por tanto dos isómeros, *cis* o (+) ABA y *trans* o (-) ABA, interconvertibles entre ellos en la planta y dos enantiómeros R y S que no son interconvertibles. La exposición a la luz ultravioleta provoca que la forma biológicamente activa del ABA que es 2-*cis*, 4-*trans* ABA se isomerize a su forma inactiva 2-*trans*, 4-*trans*. En la naturaleza se encuentra la forma S(+)-ABA, donde la cadena lateral de cinco carbonos del ABA es por definición 2-*cis*,-4-*trans*. La forma *trans*-ABA es inactiva biológicamente.

El ABA participa en la regulación de muchos aspectos del desarrollo de las plantas, tales como la embriogénesis, la maduración, la dormición y la germinación de las semillas. Además,

esta hormona ejerce un papel muy importante en el control de las respuestas frente a estreses ambientales, tanto bióticos (ataque de patógenos y heridas provocadas por insectos) como abióticos (sequía, estrés osmóticos, alta osmolaridad, alta radiación UV y tolerancia a bajas temperaturas) (McCarty, 1995; Ueno, 1998; Albinsky *et al.*, 1999; Nambara & Marion-Poll, 2005; Zhang *et al.*, 2006; Seki *et al.*, 2007).

II.4.2 Localización y movimiento del ABA

El ABA se encuentra de forma ubicua tanto en plantas superiores como inferiores, también se produce en algunos hongos fitopatógenos (Kitagawa *et al.*, 1995) y se ha encontrado en tejido cerebral de mamíferos (Page-Degivry *et al.*, 1986). Al ser un ácido débil, el ABA no se encuentra cargado en el apoplasto, que es relativamente ácido por lo que puede atravesar con cierta facilidad la membrana plasmática y entrar en la célula. La distribución del ABA en los compartimentos celulares se rige por el concepto de “trampa de aniones”, que consiste en que la forma disociada del ácido débil se acumula en los compartimentos alcalinos y se distribuye de acuerdo con el gradiente de pH a través de las membranas. Además de este reparto dependiente del pH relativo de cada compartimento, existen transportadores específicos que contribuyen a mantener una baja concentración de ABA en el apoplasto de plantas no estresadas. A pesar de la facilidad con la que el ABA puede entrar en las células, existen evidencias tanto de la percepción intracelular como extracelular de ABA (Leung & Giraudat, 1998; Rock, 2000).

II.4.3 Biosíntesis del ABA

En la actualidad, el estudio de mutantes deficientes en la biosíntesis del ABA, principalmente en *Arabidopsis*, así como de inhibidores específicos de la biosíntesis de carotenoides, tales como la fluridona y el tungstato sódico, ha permitido aumentar nuestro conocimiento sobre los intermediarios que participan en la ruta de biosíntesis de esta hormona. La información procedente de *Arabidopsis* es aplicable a otras especies de plantas, porque los genes implicados en esta ruta de biosíntesis están muy conservados en Angiospermas. Estos estudios sugieren que en plantas superiores, el ABA se sintetiza en los cloroplastos y otros plastidios a partir de β -carotenoides, al igual que las giberelinas, los α -carotenoides y las estrigolactonas (Zacaría & Lafuente, 2000; Finkelstein & Rock, 2002; González-Guzmán *et al.*, 2002; Schwartz *et al.*, 2004; Nambara & Marion-Poll, 2005).

En primer lugar se produce la síntesis de los epoxi-carotenoides, donde la zeaxantina se produce como un isómero *trans* después de la ciclación e hidroxilación del todo *trans*-licopeno a

través de β -caroteno (Figura II.6). Los pasos siguientes consisten en la síntesis de isómeros *cis* de violaxantina y neoxantina que serán cortados para formar un precursor de quince carbonos de ABA.

La conversión de zeaxantina a violaxantina está catalizada por la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP) a través del intermediario anteraxantina (Figura II.6).

A partir de violaxantina se produce la síntesis de neoxantina por la neoxantina sintasa (NSY, de las siglas en inglés “neoxanthin synthase) (Figura II.6), identificada en tomate y patata por homología de secuencia con la enzima licopeno ciclasa β (LCYB, de sus siglas en inglés “lycopene cyclase β ”) y capsantina capsorubina sintasa de pimienta (Al Babili *et al.*, 2000; Bouvier *et al.*, 2000) y *Arabidopsis* (North *et al.*, 2007).

A continuación se produce el corte de la xantofila, donde la 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED, de sus siglas en inglés “Nine(9)-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase”) corta los isómeros de violaxantina y neoxantina formando un producto de 15 carbonos xantoxina y un metabolito de 25 carbonos (Figura II.6). Como es el caso de otras enzimas de la biosíntesis de carotenoides, la proteínas NCED de distintas especies están localizadas en los cloroplastos (Qin & Zeevaart, 1999; Iuchi *et al.*, 2000; Bao-Cai *et al.*, 2001; Bao-Cai *et al.*, 2003). Debido a que las siguientes reacciones enzimáticas tienen lugar en el citosol, la xantoxina es transportada desde el plastidio hasta el citosol.

En el citosol, se produce el ABA biológicamente activo a partir de las *cis*-xantoxina, en dos pasos enzimáticos pasando por el intermediario abscísico aldehído (ABA-aldehído) (Figura II.6). La conversión de xantoxina a ABA-aldehído está catalizada en *Arabidopsis* por la enzima AtABA2 perteneciente a la familia SDR. En esta enzima, se ha identificado varios dominios de gran importancia en la actividad de la enzima que afecta a la producción de ABA, un dominio de unión a NAD, centro catalítico, hélice de interacción con subunidades, y el sitio de unión a sustrato (González-Guzmán *et al.*, 2002). Además, se sugiere que AtABA2 podría tener una estructura multimérica, de manera similar a la estructura dimérica o tetramérica de la mayoría de las proteínas de la familia SDR de varios organismos (Joernvall *et al.*, 1995; Merlot *et al.*, 2002; Rook *et al.*, 2001).

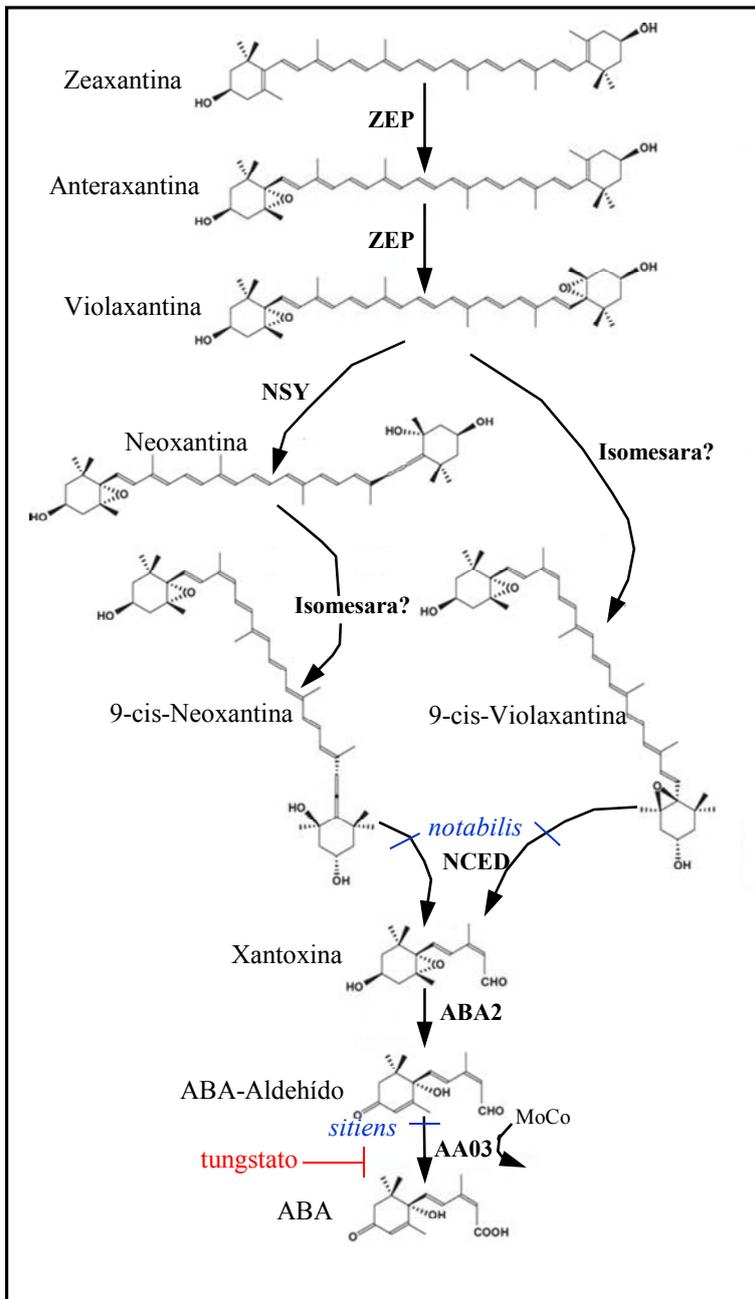


Figura II.6. Ruta de biosíntesis del ABA. En azul se muestran las etapas catalizadas por enzimas cuyos genes están mutados en los mutantes de tomate deficientes en ABA. En rojo se muestra el paso bloqueado por el inhibidor de la biosíntesis de ABA, tungstato, utilizado en esta tesis. Adaptado de Nambara & Marion-Poll, 2005.

La oxidación del ABA-aldehído a ácido carboxílico es el paso final de la biosíntesis de ABA, este paso está catalizado por una abscísico aldehído oxidasa (AAOs, de sus siglas en inglés “*Arabidopsis* Aldehyde Oxidases”) (Figura II.6). Se han encontrado 4 enzimas AAOs en

Arabidopsis siendo AAO3 la que procesa el aldehído abscísico (Seo *et al.*, 2000a). La enzima aldehído oxidasa requiere de un cofactor de molibdeno (MoCo) para su actividad catalítica.

II.4.4 Genes que codifican los enzimas implicados en la ruta del metabolismo de ABA

El gen *ZEP*, que codifica para la enzima ZEP, fue clonado por primera vez en *Nicotiana plumbaginifolia*, codifica una proteína similar a las monooxigenasas que unen FAD y requieren ferredoxina (Bouvier *et al.*, 1996; Marin *et al.*, 1996). Se han aislado mutantes en la enzima ZEP en varias especies, como *Arabidopsis* (Niyogi *et al.*, 1998; Merlot *et al.*, 2002; Xiong & Zhu, 2003), *N. plumbaginifolia* (Agrawal *et al.*, 2001) y arroz (Xiong *et al.*, 2002). Estos mutantes acumulan zeaxantina y muestran una reducción severa en el contenido en ABA, que produce un fenotipo marchito y semillas que tienen alterada la dormición. En *Arabidopsis*, las mutaciones producidas por sustituciones de ácidos aminos en el dominio monooxigenasa alteran la función de la enzima, indicando que este dominio podría ser importante para su actividad (Merlot *et al.*, 2002).

Las mutaciones en el gen *NSY* de tomate, que codifica para la enzima NSY, afectan a la síntesis de β -caroteno a partir de licopeno, demostrando que éste codifica una isoforma LCYB (Ronen *et al.*, 2000). También se han identificado mutantes que carecen de isómeros de neoxantina en *Arabidopsis* (North *et al.*, 2007) y tomate (Galpaz *et al.*, 2006).

En todas las plantas de especies analizadas, los genes *NCED* pertenecen a una familia multigénica. En maíz se clonó el primer gen que codifica para NCED, el gen *VP14* (Schwartz *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 1997). La enzima VP14 recombinante es capaz de cortar 9-*cis*-violaxantina y 9'-*cis*-neoxantina pero no isómeros de *trans*-xantofila (Schwartz *et al.*, 1997). Además requiere hierro y oxígeno para formar isómeros *cis* de xantoxina (Schwartz *et al.*, 1997). Como ocurre con los mutantes *Vp14* de maíz y *Notabilis* de tomate, los mutantes *nced* presentan un fenotipo leve de deficiencia a ABA debido a la redundancia genética (Tan *et al.*, 1997; Burbidge *et al.*, 1999). En *Arabidopsis*, se han identificado nueve secuencias relacionadas con *NCED* de las que cinco de ellas están probablemente involucradas en la biosíntesis de ABA, como indican experimentos de análisis funcional (Iuchi *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 2003).

La proteína AtABA2, que cataliza la conversión de xantoxina a ABA-aldehído, está codificada por un único gen en el genoma de *Arabidopsis*, por lo que la pérdida de función de

este gen conduce a una deficiencia severa en ABA. Las mutaciones han sido identificadas en los supuestos dominios funcionales comentados anteriormente (González-Guzmán *et al.*, 2002).

Con respecto a los genes que codifican las enzimas AAOs, se ha observado que el mutante *ao3-1* en *Arabidopsis* muestra un fenotipo de marchitamiento pero con una pequeña reducción en la dormición de semillas, en comparación con otros mutantes de ABA en *Arabidopsis* afectados en genes únicos. Este fenotipo leve en las semillas se ha atribuido a la redundancia de genes postulándose que otros genes de AAOs podrían estar implicados en la biosíntesis de ABA (Seo *et al.*, 2000b). Aunque la identificación de alelos nulos *ao3* que exhiben fenotipos deficientes en ABA importantes en semillas indican que probablemente AAO3 es el único gen de las AAOs que participa en la síntesis de ABA (González-Guzmán *et al.*, 2004; Seo *et al.*, 2004). Además, mutaciones en los genes de la biosíntesis del cofactor MoCo producen deficiencia en ABA. Consistente con esto, las mutaciones en *Flacca* en tomate (Sagi *et al.*, 2002) y en *AtABA3* en *Arabidopsis* (Bittner *et al.*, 2001; Debeaujon & Koornneef, 2000) que codifican una MoCo sulfurasa producen los esperados fenotipos deficientes en ABA (Nambara & Marion-Poll, 2005).

II.4.5 Catabolismo de ABA

El catabolismo de ABA está en gran medida caracterizado dentro de dos tipos de reacción, hidroxilación de la molécula de ABA y la conjugación con glucosa (Nambara & Marion-Poll, 2005) (Figura II.7). En la mayor parte de las plantas la hidroxilación ocurre en los carbonos 7', 8' y 9' (Zhou *et al.*, 2004), siendo la hidroxilación en el C-8' la predominante en la mayoría de los procesos fisiológicos regulados por ABA (Nambara & Marion-Poll, 2005). Estas formas de ABA hidroxilado mantienen importantes actividades biológicas (Zou *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 2004), aunque la hidroxilación desencadena en otras ocasiones la inactivación.

II.4.6 Hidroxilación de ABA

Entre las vías catabólicas de ABA, la hidroxilación en el carbono 8' es el principal paso que regula muchos eventos fisiológicos controlados por ABA (Figura II.7). De conformidad, esta vía produce los catabolitos ácido faseico (PA, de sus siglas en inglés “**p**haseic acid”) y ácido dihidrofaseico (DPA, de sus siglas en inglés “**D**ihydro**p**haseic acid”), que son los catabolitos más extendidos y abundantes (Zeevaart & Creelman, 1988; Cutler & Krochko, 1999). Además, los análogos de ABA modificados en el grupo metilo C-8' que son resistentes a la hidroxilación exhiben fuertes actividades tipo ABA en comparación con otras sustituciones (Todoroki *et al.*, 1995; Cutler *et al.*, 2000; Todoroki *et al.*, 2004). La hidroxilación-8' del ABA es catalizada por

una monooxigenasa citocromo P450 (P450), donde en *Arabidopsis* se han encontrado cuatro, de *AtCYP707A1* a *AtCYP707A4* (Kushiro *et al.*, 2004). El 8'-hidroxi ABA resultante se isomeriza espontáneamente a PA (Gillard & Walton, 1976; Krochko *et al.*, 1998). Aunque esta isomerización se produce rápidamente *in vitro*, esta reacción se piensa que *in vivo* está catalizada enzimáticamente (Milborrow *et al.*, 1988). El nivel de transcrito de los genes *CYP707As* es inducido por estrés abiótico, deshidratación y tratamientos de ABA exógeno (Kushiro *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2004). Además, se produce una acumulación de los transcritos *CYP707A2* predominantemente en semillas secas, y este gen está sobre-regulado inmediatamente después de la imbibición de las semillas (Kushiro *et al.*, 2004). El PA es catabolizado a DPA por una reductasa soluble (Gillard & Walton, 1976). El ABA es biológicamente inactivado de manera gradual durante el transcurso del catabolismo. Así, el 8'-hidroxi ABA mantiene importante actividad biológica (Zou *et al.*, 1995; Arai *et al.*, 1999). La ciclación espontánea para formar PA provoca una reducción significativa en la actividad biológica, aunque el grado de reducción varía entre bioensayos (Gusta *et al.*, 1992; Balsevich *et al.*, 1994b; Balsevich *et al.*, 1994a; Hill *et al.*, 1995; Zou *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2001). Varias evidencias mostraron que las proteínas de unión a ABA del fruto de la manzana y las capas de aleurona de cebada son incapaces de unirse a PA (Zhang *et al.*, 2001; Razem *et al.*, 2004), lo que sugiere que PA es un catabolito inactivo al menos para algunos procesos fisiológicos. DPA es inactivo en diferentes bioensayos, por lo tanto la inactivación de ABA es completa en esta etapa.

Por otro lado, el 7'-hidroxi ABA es encontrado en una variedad de especies de plantas como un catabolito minoritario (Zeevaart & Creelman, 1988) que se metaboliza a productos desconocidos (Figura II.7) (Hampson *et al.*, 1992). Aunque varios estudios han mostrado que el 7'-hidroxi ABA es inactivo biológicamente, en semillas de cebada, el 7'-hidroxi ABA inhibe la giberelina GA₃ estimulado por la actividad α -amilasa, aunque no de forma tan efectiva como el ABA (Hill *et al.*, 1995).

También hay una ruta minoritaria, descubierta en *Brassica napus*, de hidroxilación en el carbono 9', dando lugar al 9'-hidroxi ABA (Figura II.7) (Zhou *et al.*, 2004). A partir del 9'-hidroxi ABA se produce una ciclación dando ácido neofaseico (neo-PA, de sus siglas en inglés “**neophaseic acid**”). El neo-PA también exhibe bioactividad tipo ABA en inhibición de germinación de semillas en *Arabidopsis* y en inducción de expresión de genes en *B. napus*. El neo-PA fue también detectado en frutos de naranjo y tomate, en *Arabidopsis*, y en el garbanzo, así como en cebada estresada por la sequía y plántulas de *B. napus* (Zhou *et al.*, 2004).

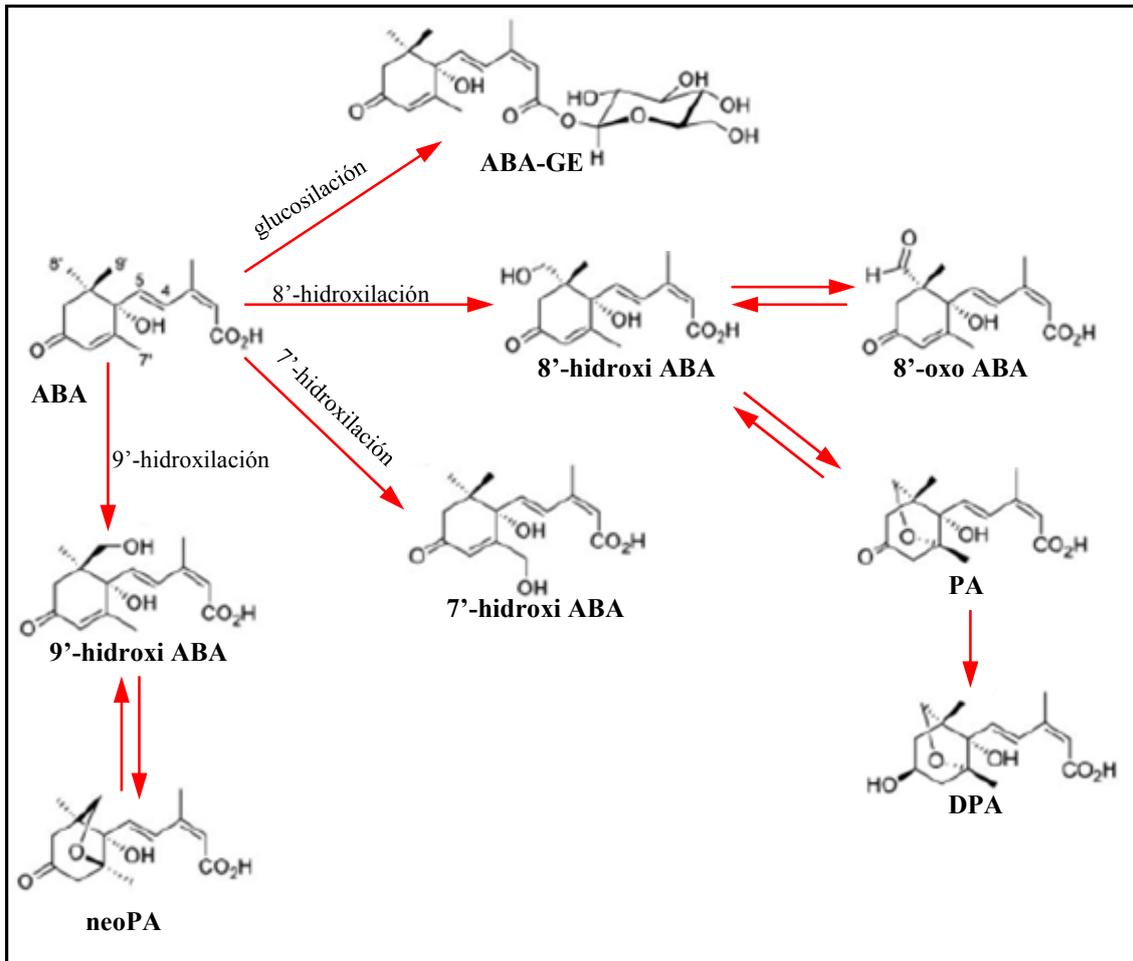


Figura II.7. Ruta del catabolismo del ABA.

II.4.7 Conjugación de ABA

Los grupos carboxilo (en el C-1) e hidroxilo de ABA y sus catabolitos oxidativos son los objetivos potenciales para la conjugación con glucosa (Figura II.7). El ABA glucosil éster (ABA-GE, de sus siglas en inglés “**ABA glucosyl ester**”) es el conjugado más extendido (Boyer & Zeevaart, 1982). Además de los ésteres de glucosilo, se dan también otros conjugados con los grupos de hidroxilo de ABA y sus catabolitos hidroxilados. En un principio los conjugados de ABA se pensaban que eran fisiológicamente inactivos y se acumulaban en vacuolas durante el envejecimiento de la planta (Bray & Zeevaart, 1985; Lehmann & Glund, 1986). Sin embargo, estudios posteriores han propuesto que el ABA-GE participa en el transporte de larga distancia de ABA (Hartung *et al.*, 2002; Wilkinson & Davies, 2002). ABA-GE fue identificado como una sustancia alelopática de *Junis cítricos* (Kato-Noguchi & Tanaka, 2003), y el suelo con cultivos agrícolas contiene mayores concentraciones de ABA-GE (hasta 30 nM) que de ABA. Aunque se

ha mostrado que tanto la exodermis como la endodermis de las raíces son barreras perfectas para el ABA-GE, se ha observado en fabáceas y plantas en cultivo hidropónico, que cuando las bandas de Caspary no se forman en la hipodermis externa, el ABA-GE puede ser absorbido por la corteza de las raíces, al ser arrastrado por el agua, y pasar al apoplasto de las raíces (Sauter & Hartung, 2000; Hartung *et al.*, 2002). Además el ABA-GE puede ser transportado en el xilema, ya que debido a sus propiedades hidrofílicas esta molécula es diferente al ABA libre, y es transportado sin ninguna pérdida o enriquecimientos a través del tallo de la planta (Jiang & Hartung, 2008), observándose, que el ABA-GE es el catabolito más abundante en la savia del xilema en el girasol (Hansen & Dörffling, 1999). Sin embargo, debido a que el ABA-GE no puede migrar pasivamente a través de la membrana plasmática, el mecanismo molecular subyacente al transporte de ABA o sus conjugados, sigue siendo poco claro.

La enzima β -glucosidasa cataliza la liberación de ABA a partir de ABA-GE en el trigo, la cebada y girasol (Lehmann & Vlasov, 1988; Dietz *et al.*, 2000; Sauter *et al.*, 2002). Las plantas de *Arabidopsis* deficientes en β -glucosidasa exhiben bajos niveles de ABA en hojas y produce un fenotipo más sensible a estreses (Lee *et al.*, 2006). La actividad β -glucosidasa incrementa por la salinidad y es inhibida competitivamente por ABA-GE o zeatin ribósido, además su polimerización es en microsomas, donde libera el ABA al citosol. Varios investigadores discuten en detalle la significancia del ABA-GE como una molécula señal de estrés (Sauter *et al.*, 2002). Se piensa que el ABA-GE es un buen candidato a actuar como señal de la raíz a la parte aérea que libera ABA libre a células diana *in situ* para el cierre de estomas en etapas de sequía (Sauter *et al.*, 2002).

II.4.8 Transportadores de ABA

El ABA se produce de forma predominante en tejidos vasculares y ejerce su respuesta hormonal en distintos tipos celulares, incluyendo las células oclusivas. El ABA se mueve dentro de la planta y los transportadores de ABA podrían ser de especial relevancia en condiciones de estrés, ya que en estas situaciones se incrementa el pH celular (Wilkinson & Davies, 1997). El incremento de este pH causa que el ABA en su forma protonada no cargada (ABAH) se disocie a su forma aniónica cargada (ABA^-), la cual no puede difundir pasivamente a través de la bicapa lipídica, en contradicción con la necesidad del reparto rápido de la hormona de estrés en el interior de la célula para obtener una respuesta en el tiempo oportuno.

Se han identificado varios transportadores de ABA, pertenecientes a la gran familia de los transportadores ABC (de sus siglas en inglés “ATP-binding cassette”) PDR12 (de sus siglas en inglés “Pleiotropic drug resistant transporter”) (de sus siglas en inglés “Pleiotropic drug resistant transporter”) y AtABCG25 (Kang *et al.*, 2010; Kuromori *et al.*, 2010). Son proteínas integrales de membrana que actúan como transportadores impulsados por ATP para una gran variedad de sustratos, como lípidos, metales pesados y auxinas (Rea, 2007).

En plantas con sobreexpresión de la proteína PDR12, en *Arabidopsis* denominada AtPDR12 o ABCG40, se ha observado que incrementa la toma de ABA. Mientras que en plantas mutantes *atabcg40*, la inducción de genes de respuesta a ABA tras la aplicación de ABA exógeno está fuertemente retrasada, y los estomas se cierran más lentamente en respuesta a ABA, lo que resulta en una reducida tolerancia a la sequía (Kang *et al.*, 2010).

El transportador AtABCG25 de *Arabidopsis* expresa fundamentalmente en tejidos vasculares, y plantas que sobre-expresan *AtABCG25* muestran una elevación de la temperatura en hojas como consecuencia de la influencia de este transportador en la regulación de estomas.

II.4.9 Percepción del ABA

Tras llegar a su lugar de acción, el ABA ha de ser reconocido por un receptor específico. Algunos estudios sugieren que hay varios tipos de receptores, tanto intracelulares como extracelulares.

Hay tres proteínas a las que se asigna el papel de receptores de ABA (Novikova *et al.*, 2009). La proteína FCA (de sus siglas en inglés “Flowering Time Control Protein Alpha), de unión a ARN que participa en la regulación de la floración (Razem *et al.*, 2006). Otro hipotético receptor encontrado es la subunidad H del complejo Mg²⁺-quelatasa (CHLH), denominada ABAR, implicada en las respuestas a ABA durante la germinación, en el desarrollo post-germinativo, así como en el movimiento estomático (Shen *et al.*, 2006). Por último, GCR2 (de sus siglas en inglés “G Protein Coupled Receptor 2) es una proteína transmembrana que interactúa con la subunidad α de una proteína G trimérica (Liu *et al.*, 2007). Sin embargo, trabajos recientes cuestionan el papel de estas tres proteínas como receptores de ABA (Gao *et al.*, 2007; Risk *et al.*, 2008; Müller & Hansson, 2009).

En este sentido, se ha identificado una familia de 14 proteínas que presentan un dominio START denominadas PYR/PYLs (**Pyrobactin Resistantce 1-PYR-like**), también conocidas como RCARs (de sus siglas en inglés “**R**egulatory **C**omponent of **A**BA **R**eceptor”), capaces de interaccionar e inhibir a proteín-fosfatasas de tipo 2C (PP2Cs) tras unirse a ABA (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009).

II.4.10 Cascadas de señalización del ABA

El ABA regula multitud de procesos del desarrollo y respuesta al estrés en plantas. Análisis bioquímicos, farmacológicos y genéticos, han mostrado que tras la unión del ABA al receptor comienza la cascada de transducción de la señal hormonal, en la que participan diversos componentes como proteínas G, fosfolipasas, segundos mensajeros (Ca^{2+} , IP_3 ,...), proteín-fosfatasas, proteín-quinasas y FTs (Finkelstein & Rock, 2002; Assmann, 2004).

Las proteínas G pertenecen a la familia de las GTPasas, diferenciándose en plantas dos tipos: triméricas y monoméricas. Dentro de las primeras, hay que destacar que la pérdida de función de la subunidad α afecta a la ruta de señalización del ABA y de las auxinas (Ullah *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001). Por lo que se refiere a las monoméricas (denominadas proteínas ROP o AtRACs en *Arabidopsis*), las proteínas ROP9 y ROP10 regulan negativamente la percepción del ABA durante la germinación y crecimiento de las plantas, y ROP2 regula negativamente los efectos del ABA en la semilla (Li *et al.*, 2001).

En cuanto a los segundos mensajeros, se ha observado que tras un tratamiento exógeno con ABA se produce un aumento de Ca^{2+} y ácido fosfatídico en la célula. Además, otros segundos mensajeros como las especies reactivas de oxígenos (ROS), óxido nítrico y fosfolípidos como el fosfatidilinositol 3-fosfato o el inositol-trifosfato (IP_3), están implicados en la regulación de los niveles de Ca^{2+} (Fan *et al.*, 2004; Israelsson *et al.*, 2006). El pH también podría actuar como segundo mensajero en la señalización del ABA, participando en el cierre estomático de las células guarda mediado por ABA a través de un descenso en los niveles de K^+ citosólico, provocado por un incremento en la actividad del canal de salida de K^+ y una disminución en su entrada (Grabov & Blatt, 1998).

Después de la actuación de los segundos mensajeros, interviene una compleja red de reguladores positivos y negativos, principalmente proteín-quinasas y proteín-fosfatasas, así como un gran número de factores de transcripción. Diferentes investigaciones han revelado la conexión

entre las proteínas fosfatasa de tipo 2C (PP2C, de sus siglas en inglés “**Phosphate Protein 2C**”) y las proteína-quinasas (PK), particularmente con SnRK2 y SnRK3 (de sus siglas en inglés “**ABA activated SNF-1 related protein kinase 2 and 3**”). Así, se ha observado que SnRK2 participa en el cierre estomático regulando la expresión de genes inducidos por ABA, además de en la respuesta a estrés durante la germinación (Fujii *et al.*, 2007). La conexión OST1 (de sus siglas en inglés “**Open Stomata 1**”)/SRK2E/SnRK2.6, es un elemento clave en la apertura estomática en respuesta a ABA y que interacciona directamente con la proteína ABI1, que pone de manifiesto una compleja conexión entre PP2C y SnRK2. Para que se produzca la activación de estas kinasas, es necesaria la fosforilación de algunos residuos de Ser/Thr, poniendo de manifiesto que otras kinasas podrían actuar aguas arriba de SnRK2 en la señalización del ABA. Además estudios con mutantes *knockout* en tres proteínas de la familia SnRK2, dieron lugar a fenotipos de insensibilidad a ABA y ausencia de actividad ABA-quinasas, lo que indica que las SnRK2s desarrollan un papel fundamental en las respuestas mediadas por ABA (Umezawa *et al.*, 2009).

En *Arabidopsis*, las PP2Cs se clasifican en 10 grupos (A-J). Dentro del grupo A se encuentran proteína-fosfatasa implicadas en la regulación de la ruta de señalización del ABA tales como ABI1, ABI2, HAB1 (de sus siglas en inglés “**Homology to ABI1**”) y AtPP2CA. Diversos análisis genéticos han revelado que todas ellas actúan como reguladores negativos de esta ruta de señalización, interaccionando e inhibiendo a las proteína-quinasas SnRK2s (Park *et al.*, 2009). Así, mutantes de pérdida de función de estos genes muestran fenotipos similares de hipersensibilidad a ABA (Robert *et al.*, 2006).

El mecanismo de represión de las PP2Cs en la ruta de señalización se produce por las proteínas PYR (de sus siglas en inglés “**pyrabactin resistance**”), PYL (de sus siglas en inglés “**pyrabactin resistance 1-like**”) y RCAR (de sus siglas en inglés “**Regulatory Component of ABA Receptor**”) con capacidad de unión al ABA (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009). Tales proteínas actúan como receptores, interaccionando con las PP2Cs e inhibiendo su función represora de una manera ABA dependiente.

Los factores transcripcionales también son importantes en la cascada de señalización del ABA. Se han identificado diferentes clases de factores *trans* implicados en la regulación transcripcional de la respuesta a ABA, entre los que se encuentran proteínas bZIP (de sus siglas en inglés “**Leucine Zipper Basic**”), proteínas con dominio B3, AP2/EREBP, MYC/MYB y proteínas con homeodominio junto a una cremallera de leucina (Finkelstein & Rock, 2002). Las

secuencias reguladoras más comunes que confieren especificidad de respuesta a ABA son los elementos de respuesta a ABA G-box ABRE (de sus siglas en inglés “**ABA-Responsive Element**”) reconocidos por factores transcripcionales de la familia b-ZIP, secuencias ricas en GC, que son elementos de respuesta a sequía DRE (de sus siglas en inglés “**Dehydration-Responsive Element**”) y CES (de sus siglas en inglés “**Coupled Elements**”) reconocidos por proteínas de la familia APETALA2 (AP2) o elementos RY/Sph, a los que se unen proteínas con dominio B3. Además, muchos genes regulados por ABA contienen lugares de unión para TFs de la familia MYB y MIC.

II.4.11 Importancia del ABA en la interacción planta-microorganismos

Aparte de su papel en la fisiología de la planta, también se ha evidenciado una función del ABA en los procesos de interacción de la planta con microorganismos, comprobándose que incrementa la susceptibilidad de las plantas a ciertas enfermedades (Mohr & Cahill, 2007; Thaler & Bostock, 2004). Este efecto negativo sobre la resistencia a la enfermedad parece ser debido a la interferencia del ABA con la señalización a estreses bióticos regulada por el ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno (Thaler & Bostock, 2004; Anderson *et al.*, 2004), y a un efecto adicional del ABA sobre los diferentes componentes de la señalización de estreses (Ryerson *et al.*, 1993). Sin embargo, algunos estudios han mostrado que el ABA puede estar implicado positivamente en el incremento a la resistencia a patógenos, activando la deposición de callosa (Mauch-Mani & Mauch, 2005; Maksimov, 2009; Cao *et al.*, 2011) y por desencadenar la producción de especies de oxígeno reactivo mediadoras en la inducción de la respuesta defensiva (Xing *et al.*, 2008).

II.4.12 Importancia del ABA en procesos de nodulación

En los últimos años se ha demostrado que el ABA también participa en la regulación del proceso de nodulación, ya que controla tanto el número de nódulos como su desarrollo (Bano *et al.*, 2002; Bano & Harper, 2002; Suzuki *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2007). La primera evidencia fue obtenida al aplicar ABA exógeno, observando que se reducía el número de nódulos en *P. sativum* (Phillips, 1971), al igual que en *L. japonicus*, si bien se recuperaba el número de nódulos al añadir abamina, un inhibidor de la biosíntesis de ABA (Suzuki *et al.*, 2004). Además, en mutantes insensibles al ABA se observó un fenotipo supernodulante (Ding *et al.*, 2008), y un mutante supernodulante, concretamente *nts382*, tiene sus niveles basales de ABA significativamente reducidos en comparación con el cultivar silvestre (Caba *et al.*, 2000). No obstante, se ha observado en experimentos en sistemas “splits-roots” que aunque la reducción de

ABA es constitutiva y generalizada en la planta, la regulación de la nodulación es solamente a nivel local y no sistémica (Biswas *et al.*, 2009). La acción negativa del ABA sobre la nodulación se ha postulado que está realmente controlada por la relación ABA/citoquininas en la raíz, la cual se ha visto que es más baja en los mutantes supernodulantes que en sus silvestres (Bano *et al.*, 2002), lo que provoca una menor división celular inducida por citoquininas en el córtex, necesaria para una correcta nodulación (Ding *et al.*, 2008).

El ABA también regula la señalización de los factores Nod, suprimiendo por un lado los picos de Ca^{2+} que desencadenan dicha respuesta, y además puede suprimir la señalización de los factores Nod en la epidermis (Ding *et al.*, 2008). Estudios posteriores han mostrado que altas concentraciones de ABA suprimen la expresión del gen *LATD/NIP*, un transportador de la familia NRT1 necesario para el desarrollo de los nódulos (Yendrek *et al.*, 2010). Además del número de nódulos, el ABA también produce una reducción del N fijado por los nódulos al provocar una disminución de la producción del óxido nítrico en los mismos (Tominaga *et al.*, 2010).

II.4.13 Importancia del ABA en la formación de la simbiosis Micorriza Arbuscular

Respecto al papel que desempeña el ABA en la micorrización arbuscular existen todavía bastantes lagunas. Se conoce que el hongo micorrícico produce ABA, localizado sobre todo en las esporas, pero también en las hifas extra e intraradicales (Esch *et al.*, 1994), siendo este hecho también característico de algunos hongos patógenos que también sintetizan ABA (Oritani & Kiyota, 2003). La producción de ABA por parte del hongo formador de MA puede tener un papel de señalización, pudiendo constituir el ABA una señal temprana para el incremento de la síntesis de auxinas en raíces jóvenes y así incrementar el número de raíces laterales y por tanto aumentar el número de posibles puntos de entrada para el hongo (Ludwig-Müller *et al.*, 1997; Kaldorf & Ludwig-Müller, 2000). Esta hipótesis se basa en que la síntesis de auxinas es inducible por ABA (Ludwig-Müller *et al.*, 1995). Además en muchas especies vegetales se ha observado como la concentración de ABA incrementa durante la micorrización (Danneberg *et al.*, 1993; Meixner *et al.*, 2005; Ludwig-Müller, 2010).

Estudios previos realizados en el grupo de investigación que alberga este trabajo de Tesis han demostrado que el ABA es importante para el correcto establecimiento de la simbiosis micorrícica, ya que mutantes de tomate *Sitiens*, los cuales tienen reducido hasta en un 90% su nivel de ABA, tienen reducida su colonización y especialmente el nivel de arbusculos. En estos mutantes se recuperan los parámetros de micorrización con la aplicación de ABA (Herrera-

Medina *et al.*, 2007), siendo por tanto necesario un nivel determinado de ABA en la raíz para una correcta micorrización, y aunque el hongo aporte cierta cantidad de ABA a la planta (Esch *et al.*, 1994), este aporte no es suficiente para permitir una correcta colonización.

II.5. EL ÁCIDO GIBERELEICO Y SU PARTICIPACIÓN EN LA MICORRIZACIÓN

II.5.1 Estructura química y actividad biológica

Las giberelinas (GA de las siglas de su nombre en inglés “Gibberellic Acid”) constituyen una familia de diterpenos tetracíclicos ácidos cuyo esqueleto básico está constituido por un anillo de *ent*-giberelano (Talón, 2000; Thomas *et al.*, 2005). Las GAs pueden actuar como reguladores endógenos del crecimiento controlando diversos procesos del desarrollo de las plantas como la germinación, la elongación del tallo, la expansión de las hojas, el desarrollo de los tricomas, la inducción de flores y frutos, inducción de la partenocarpia o la de la liberación de enzimas hidrolíticas (Pharis & King, 1985; Huttly & Phillips, 1995; Sponsel, 1995; Talón, 2000; Thomas *et al.*, 2005). Estos compuestos se identificaron en 1935 en el hongo *Gibberella fujikuroi*, que causa crecimiento excesivo de los tallos y brotes de la planta del arroz, provocando la enfermedad conocida como “bakanae”. A mediados de los años 50 se aisló, a partir del filtrado secretado por el hongo, el compuesto inductor del crecimiento del tallo que se denominó ácido giberélico (giberelina A₃ o GA₃). Posteriormente, se aislaron en plantas compuestos de estructuras similares al ácido giberélico, y es en este momento cuando las GAs adquieren mayor importancia para los fisiólogos vegetales (Hedden & Proebsting, 1999; Talón, 2000).

Actualmente se conocen diferentes tipos de GAs presentes en plantas, hongos y bacterias, asignándoles un número según el orden cronológico de su descubrimiento (GA₁, 2, 3,... n) (MacMillan & Takahashi, 1968). Pero generalmente se clasifican en dos grupos atendiendo al número de átomos de carbono presentes en su estructura:

- Las GAs C-20, con 20 átomos de carbono en el esqueleto de *ent*-giberelano, presentando varios estados de oxidación del carbono 20 (C-20), pudiéndose encontrar como grupo metilo, hidroximetilo, aldehído o carboxilo.
- Las GAs C-19, con 19 átomos de carbono en el esqueleto de *ent*-giberelano, y que proceden de las GAs C-20 que poseen un grupo aldehído en el C-20, al perder ese carbono por descarboxilación oxidativa formándose una γ -lactona. Entre estas GAs C-19 se encuentran las GAs activas biológicamente. La presencia o ausencia de grupos hidroxilo y la

estequiometría de los mismos en las posiciones C-2, C-3 y C-13 del *ent*-giberelano de las GAs C-19 determina la existencia o no de actividad biológica de las GAs (Talón, 2000).

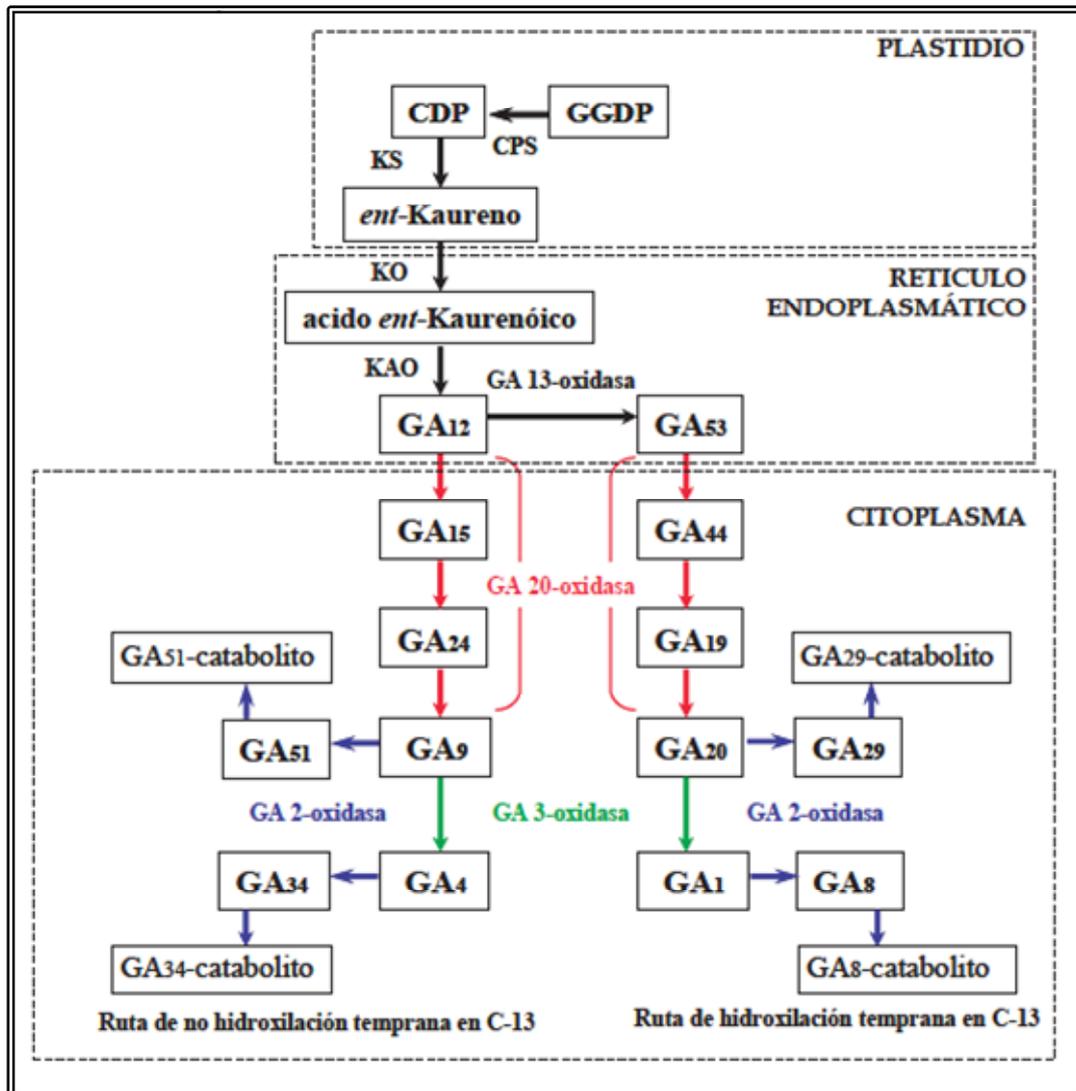


Figura II.8. Esquema de la ruta del metabolismo de las GAs. Paso de GGDP a *ent*-kaureno en el plastidio. Paso de *ent*-kaureno a GA₁₂ en el retículo endoplasmático. Síntesis de GAs de C-20 y C19 a partir de GA₁₂ en el citoplasma. Ruta de la hidroxilación y no hidroxilación temprana en C-13. Síntesis de GAs activas GA₄ y GA₁. Formas inactivas tanto de las GAs activas como de sus precursores GA₉ y GA₂₀. Adaptado de (Gallego-Giraldo, 2008).

La mayoría de las GAs son compuestos precursores o de degradación de las GAs activas, que son pocas y son principalmente GA₁, GA₄, GA₃ y GA₇ (Kobayashi *et al.*, 2000). La GA activa GA₃ se ha encontrado en un número reducido de plantas, de ahí que su función como fitohormona endógena no pueda generalizarse a todos los vegetales. En el caso de GA₄ y GA₇ es

posible que su actividad se deba a la conversión en la planta a GA₁ y GA₃ respectivamente (Talón, 2000).

II.5.2 Biosíntesis de GAs

Como se comentó anteriormente, se sintetizan a partir de los β -carotenoides, y las enzimas de su biosíntesis se han caracterizado utilizando sistemas de células libres derivadas de semillas inmaduras de calabaza, guisante y haba (Graebe, 1987), siendo los primeros pasos en la ruta de síntesis de GA comunes al resto de compuestos terpenoides, y donde el geranylgeranyl bifosfato (GGPP de las siglas de su nombre en inglés “Geranylgeranyl diphosphate”) es el precursor isoprenoide necesario para la síntesis de muchos compuestos terpenoides, incluyendo las GAs. El paso inicial en la biosíntesis isoprenoide es la condensación del isopentenil bifosfato (IPP de sus siglas en inglés “isopentenyl diphosphate”) y dimetilalil bifosfato (DMAPP de sus siglas en inglés “dimethylallyl diphosphate”). El IPP es sintetizado bien por la ruta del ácido mevalónico (MVA de sus siglas en inglés “mevalonic acid”) o por la ruta metileritritol-4-fosfato (MEP de sus siglas en inglés “methylerythritol 4-phosphate”) plastidial (Thomas *et al.*, 2005).

La biosíntesis de GAs en plantas superiores se puede dividir en tres etapas principales:

1. El primer paso comprometido en la biosíntesis de GAs propiamente dicha transcurre en los proplastidios y está catalizada por ciclasas. Se inicia por la ciclación del GGPP produciendo *ent*-copalyl bifosfato (CDP de sus siglas en inglés “*ent*-copalyl-diphosphate”) catalizado por la enzima *ent*-copalil-difosfato sintasa (CPS de sus siglas en inglés “*ent*-copalyl-diphosphate synthase”), y este producto es también ciclado por la enzima *ent*-kaureno sintasa (KS), donde el producto final obtenido es el *ent*-kaureno (Figura II.8) (MacMillan, 1997; Hedden & Phillips, 2000; Talón, 2000).
2. La segunda etapa ocurre en la membrana del retículo endoplasmático y está catalizada por monoxigenasas del tipo P-450. Se produce una oxidación secuencial produciendo *ent*-kaurenol, *ent*-kaurenal hasta producir ácido *ent*-kaurenóico catalizado por la enzima *ent*-kaureno oxidasa (KO). A continuación la enzima ácido *ent*-kaurenóico oxidasa (KAO) cataliza 3 pasos consecutivos, donde el ácido *ent*-kaurenóico es oxidado a ácido *ent*-7 α -hidroxikaurenóico, el cual, tras una contracción del anillo B produce GA₁₂-aldehído que es oxidado finalmente a GA₁₂ (Figura II.8) (Olszewski *et al.*, 2002).
3. La tercera etapa de la vía de biosíntesis de las GAs ocurre en el citoplasma de las células y está catalizada en su mayor parte por dioxigenasas dependientes de 2-cetoglutarato y Fe²⁺

(Yamaguchi & Kamiya, 2000). Aunque este proceso puede variar entre especies, las dos rutas principales son:

- a. Ruta de la hidroxilación temprana en el C-13, que es la ruta predominante en la mayoría de las especies. Donde en primer lugar, la GA₁₂ es oxidado en el C-13 por la enzima GA 13-hidroxilasa (GA13ox), una monooxigenasa P-450, incorporando un grupo hidroxilo en el C-13 dando lugar a GA₅₃. Posteriormente, el C-20 de la GA₅₃ sufre tres oxidaciones consecutivas catalizada por la enzima GA 20-oxidasa (GA20ox) para dar sucesivamente GA₄₄, GA₁₉ y GA₂₀. A continuación se elimina el C-20 de la GA₂₀, quedándose en una molécula de 19 carbonos, y que es hidroxilada en la posición C-3β mediante la enzima GA3-oxidasa (GA3ox) originando la GA₁, compuesto de elevada actividad biológica (Talón, 2000) (Figura II.8 y II.9). Algunos enzimas GA3ox pueden también catalizar la síntesis de otras GAs activas como GA₃, GA₅ y GA₆ a partir de GA₂₀.
- b. Ruta de la no hidroxilación temprana en el C-13, que es la menos común, donde el C-20 de GA₁₂ se oxida dos veces dando origen a GA₁₅ y GA₂₄. La posterior descarboxilación o eliminación del C-20 de GA₂₄ da origen a GA₉, que es la primera GA C-19 de esta ruta; ambos pasos están catalizados por la GA20ox. La enzima GA3ox incorpora un grupo hidroxilo en la posición 3β de GA₉ produciendo GA₄, compuesto con actividad biológica (Figura II.8 y II.9) (Talón, 2000).

II.5.3 Desactivación de GAs

Las GAs de C-19, productos finales de las dos rutas de la no hidroxilación temprana en el C-13 y de la hidroxilación temprana en el C-13, se desactivan o pierden su actividad biológica de forma irreversible mediante la β-hidroxilación en el C-2, cuya reacción es catalizada por las enzimas GA 2-oxidasa (GA2ox), siendo este sistema de desactivación un aspecto importante en la regulación de los niveles de GAs activas en plantas (Ross *et al.*, 1995). De esta manera tanto GA₉, GA₄, GA₂₀ y GA₁ pueden transformarse en los productos inactivos GA₅₁, GA₃₄, GA₂₉ y GA₈ respectivamente. Las GAs 2β-hidroxiladas pueden ser oxidadas nuevamente por GA2ox para formar los productos finales GA₅₁-catabolito, GA₃₄-catabolito, GA₂₉-catabolito y GA₈-catabolito respectivamente (Figura II.8 y II.9) (Talón, 2000). Existe un tipo diferente de GA 2-ox capaces de catalizar la 2β-hidroxilación en las GAs de C-20 como la GA₁₂ y GA₅₃, los cuales originan los productos inactivos GA₁₁₀ y GA₉₇ respectivamente (Figura II.9). La desactivación de estos precursores también puede reducir el flujo de la biosíntesis de GAs activas (Schömburg *et al.*, 2003).

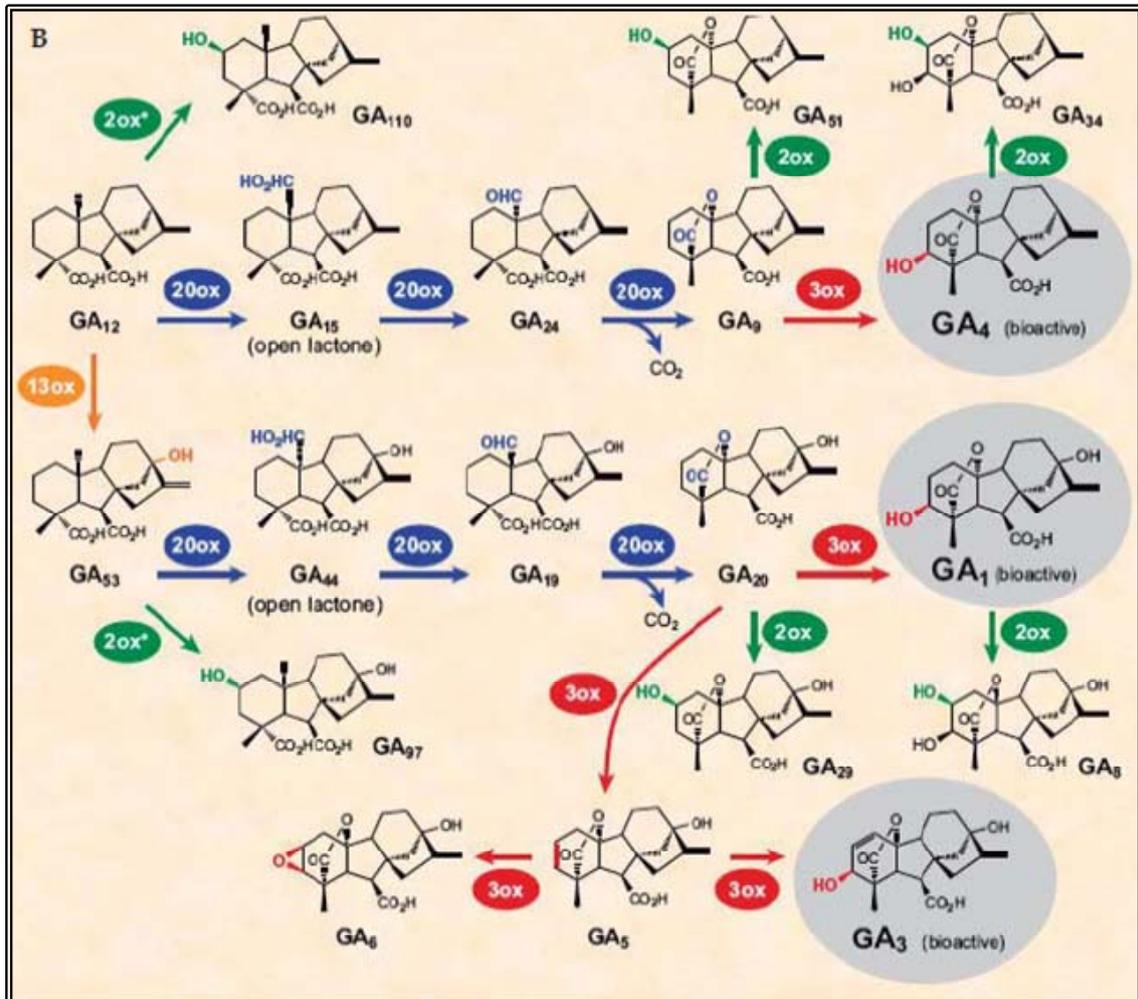


Figura II.9. Estructura de GAs representativas de la tercera parte de la ruta del metabolismo de GA. Tales como: GA₁₂, GA de C-20, GA₁ y GA₄, GAs activas de C-19 GA₈ y GA₃₄, GAs inactivas de C19 y GA₅ y GA₆, otras GAs activas. Adaptado de Yamaguchi, 2008.

Además de las GA2-ox, estudios sobre otros enzimas tales como las GA epoxidasas y GA metiltransferasas (GAMTs) han demostrado que ellos también pueden realizar una función catabólica dentro de la homeóstasis de los niveles de GAs durante el desarrollo de la planta. Por ejemplo, se ha puesto de manifiesto en arroz una monooxigenasa dependiente del citocromo P450, codificada por el gen *EUIc*, que cataliza la 16 α ,17-epoxidación de GAs, GA₄, GA₉ o GA₁₂ de la ruta de la no hidroxilación temprana en C-13 (Figura II.7) (Zhu *et al.*, 2006).

Por otra parte, los enzimas GA metiltransferasas, codificadas por los genes *GAMT1* y *GAMT2* en *Arabidopsis*, producen otras formas inactivas de GAs (Varbanova *et al.*, 2007). Estos enzimas utilizan S-adenosin-1-metionina (SAM) como un donante del grupo metilo y son capaces de metilar el grupo carboxilo del C-7 de las GAs, lo cual produce ésteres metilados de GAs

(MeGAs) (Fig. II.7). La sobreexpresión de estos genes en *Arabidopsis*, tabaco y petunia produce enanismo (Varbanova *et al.*, 2007).

II.5.4 Genes que codifican los enzimas implicados en el metabolismo de GAs

Se han clonado todos los genes de la ruta del metabolismo de GAs en diversas especies, a excepción del gen que codifican para la GA 13-oxidasa (GA13ox), enzima que cataliza la hidroxilación del C-13 en GA₁₂ para dar GA₅₃ (Hedden & Phillips, 2000). Además, se conocen mutaciones en los genes de la biosíntesis de GAs en varias especies, estos mutantes se conocen como “deficientes en GAs” y la mayor parte de ellos son enanos. Generalmente estas mutaciones son recesivas y producen bloqueos incompletos de la ruta de síntesis de GAs (Ross *et al.*, 1997). Tanto en *Arabidopsis* como en arroz, los enzimas que catalizan los primeros pasos de la biosíntesis de GAs están codificados por uno o dos genes (Yamaguchi, 2008), mientras que los enzimas dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato, que catalizan la última parte de la biosíntesis de GA, son codificadas por familias multigénicas. Los miembros de estas familias de genes se expresan diferencialmente en los distintos órganos de la planta en función del estadio de desarrollo de la misma (Yamaguchi, 2008).

II.5.5 Genes que codifican ciclasas

En la primera parte de la ruta, la ciclación de GGDP a *ent*-kaureno, pasando por el intermediario CDP, es catalizada por la CPS y KS. Estos enzimas están localizados principalmente en los protoplastidios de los tejidos meristemáticos de los brotes, pero no en los cloroplastos maduros (Talón, 2000). Se han aislado genes codificantes de CPS en *Arabidopsis* (*GAI*) (Sun & Kamiya, 1994), maíz (*An1*) (Bensen *et al.*, 1995), guisante (*LS*) (Ait-Ali *et al.*, 1997), tomate y calabaza (*CmCPS1* y *CmCPS2*) (Smith *et al.*, 1998), y genes codificantes de KS en *Arabidopsis* (*GA2*) (Yamaguchi *et al.*, 1998) y calabaza (*CmKS*) (Yamaguchi *et al.*, 1996). En tomate se ha encontrado expresión en varios órganos de la planta como hojas jóvenes y viejas, yemas florales, internudos, ovarios, sépalos, pétalos y frutos, pero no en raíces (Serrani *et al.*, 2007b).

Los genes que codifican KS han sido aislados en *Arabidopsis* (*GA2*) (Yamaguchi *et al.*, 1998), calabaza (*CmKS*) (Yamaguchi *et al.*, 1996), arroz (Margis-Pinheiro *et al.*, 2005) y otras especies. En *Arabidopsis*, el patrón de expresión de *AtKS* es similar al de *AtCPS* pero los niveles de transcritos son más elevados en el primer caso (Yamaguchi *et al.*, 1998). Este hecho sugiere que la síntesis de *ent*-kaureno estaría determinada principalmente por los niveles de expresión de

AtCPS y por su localización. El patrón específico de expresión del gen *AtCPS* y la mayor expresión de *AtKS*, apoyan la idea de que *AtCPS* controla el lugar y la actividad de las etapas tempranas de la ruta de biosíntesis de GAs en la planta (Olszewski *et al.*, 2002).

II.5.6 Genes que codifican monooxigenasas dependientes de citocromo P450

La actividad enzimática de los genes que codifican monooxigenasas dependientes de citocromo P450 (KO y KAO) es poco conocida a causa de la dificultad que supone la purificación de estas enzimas cuando se expresan en bacterias (Hedden & Phillips, 2000). Se han clonado los genes que codifican para **KO** en *Arabidopsis* (*GA3*) (Helliwell *et al.*, 1998), arroz (*D35*) (Itoh *et al.*, 2004) y otras especies. La expresión de los genes *KO* tanto en *Arabidopsis* (Helliwell *et al.*, 1998) como en arroz (Itoh *et al.*, 2004) ocurre en todos los tejidos de la planta, incluidas las inflorescencias.

Los genes que codifican **KAO** se han aislado en arroz (Sakamoto *et al.*, 2004), *Arabidopsis* (Helliwell *et al.*, 2001) y guisante (Davidson *et al.*, 2003), en estas últimas dos especies se han clonado dos genes KAO. En guisante, *PsKAO1* (gen *NA*) se expresa en tallo, brote apical, hojas, vainas y raíces (Davidson *et al.*, 2003) y *PsKAO2* en semillas.

II.5.7 Genes que codifican dioxigenasas

Estas enzimas catalizan la última parte de la ruta del metabolismo de las GAs. Las GA 20-oxidasas y las GA 3-oxidasas se encargan de la activación de GAs y las GA 2-oxidasas de su inactivación.

La familia de **GA 20-oxidasas** (*GA20ox*) pertenecen a familias multigénicas, formada por un número variable de genes según la especie. Los diferentes genes que codifican *GA20ox* en *S. lycopersicum* se expresan de forma diferencial según el tejido y el momento de desarrollo. Por ejemplo, tienen un patrón de expresión diferencial durante el desarrollo de las yemas florales. Así, dos niveles de transcritos de *LeGA20ox1* y de *LeGA20ox2* aumentan en las etapas previas a la antesis, mientras que se reducen en las flores abiertas, sin embargo, tras la antesis aumentan los niveles de los transcritos de los genes *LeGA20ox1* y *LeGA20ox3* (Rebers *et al.*, 1999). Por tanto, las *GA20ox* de tomate se expresan de forma diferencial en las distintas etapas del desarrollo de las yemas florales (Rebers *et al.*, 1999). En las raíces, solamente se ha visto expresión de *LeGA20ox3* (Serrani *et al.*, 2007b). Además, estudios en plantas de tomate con sobre-expresión de *GA20ox1* han mostrado que contienen altas concentraciones de GA₄, de la ruta de la no

hidroxilación temprana en el C-13, la cual es generalmente menos activa en tomate, por tanto el metabolismo de GAs se desvía desde la ruta de la hidroxilación temprana en el C-13 a la ruta de la no hidroxilación temprana en el C-13, aunque el mayor contenido de GA₄ respecto a GA₁ no produce cambios significativos en el fenotipo de la planta (García-Hurtado *et al.*, 2012). Recientemente, se ha descrito otro gen *LeGA20ox4*, que se ha demostrado que metaboliza GA₁₂ y GA₅₃ a GA₉ y GA₂₀, respectivamente, y se detecta a mayores concentraciones en ovarios antes de la antesis (Serrani *et al.*, 2008).

Las **GA 3-oxidadas** (*GA3ox*) catalizan el último paso de la biosíntesis de las GAs activas convirtiendo GA₂₀ y GA₉ en GA₁ y GA₄ respectivamente. Estos enzimas presentan, al igual que las GA20ox, una preferencia de sustrato; así, en *Arabidopsis* las GA3ox transforman GA₉ a GA₄ como la GA activa predominante. También están codificadas por pequeñas familias multigénicas. El análisis de la función de los miembros de la familia de genes *GA3ox* en *Arabidopsis* indica que existe una expresión diferencial de cada miembro de la familia, lo que sugiere que cada gen podría tener un papel individual en la biosíntesis de GAs durante el desarrollo de la planta. Sin embargo se ha visto solapamiento funcional, ya que se ha demostrado que los genes *AtGA3ox1* y *2* son los principales responsables de la biosíntesis de GA activa durante el desarrollo vegetativo pero también son necesarios para el desarrollo reproductivo (Mitchum *et al.*, 2006). En tomate, el gen *LeGA3ox2* muestra un incremento gradual de su expresión en las flores hasta la antesis y disminuye en las etapas tempranas de la formación del fruto, al igual que *LeGA3ox1* (Rebers *et al.*, 1999). En raíces de tomate hay expresión del gen *LeGA3ox1*, pero no del gen *LeGA3ox2* (Serrani *et al.*, 2007b).

Las **GA 2-oxidadas** oxidan el C-2 de sus sustratos (GAs activas y sus precursores) originando compuestos 2β-hidroxilados, inactivos (Ross *et al.*, 1995). Esta característica les ha conferido el nombre de enzimas desactivadores. Es también una familia multigénica clonándose GA 2-oxidadas (*GA2ox*) en diversas especies. Dentro de la familia de genes que codifican GA2ox se han descrito tres subfamilias génicas *GA2ox*. El primer (I) y segundo (II) grupo de *GA2ox* utilizan las GAs de C-19 como sustrato. Mientras que el tercer (III) grupo de *GA2ox* utiliza las GAs de C-20 como sustrato (Lee & Zeevaart, 2005). Los enzimas del grupo II catalizan una sola oxidación en el C-2 de sus sustratos (monocatalíticos) y en el grupo I algunos enzimas catalizan dos oxidaciones consecutivas (multicatalíticos) (Thomas *et al.*, 1999) originando por ejemplo, GAs tales como GA₈-catabolito (Figura II.8 y II.9). En tomate, se encuentran 5 genes de *GA2ox*, que también tiene diferente distribución en la planta dependiendo del órgano y del estado de

desarrollo. Por ejemplo en raíces solamente se expresan los genes *GA2ox3*, *GA2ox4* y *GA2ox5*, mientras que el gen *GA2ox1* solamente se encuentra en flores, ovarios en antesis y frutos, y el gen *GA2ox2* se encuentra en todos los órganos salvo raíces y hojas jóvenes antes de la floración (Serrani *et al.*, 2007b).

II.5.8 Receptor de GAs y proteínas DELLA

La caracterización del gen *GIDI* (siglas de su nombre en inglés “*gibberellin insensitive drarwf I*”) de arroz y sus homólogos en *Arabidopsis* han demostrado su afinidad estructural con las GAs activas (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005; Nakajima *et al.*, 2006). Resultados obtenidos en levadura han postulado que tras la percepción de las GAs activas por el receptor, se forma un complejo compuesto por GAs-GID1 y las proteínas DELLA (Thomas *et al.*, 2005; Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2007; Chebotar & Chebotar, 2011). Las proteínas DELLA actúan como reguladores negativos de la respuesta a GAs (Harberd, 2003). Cuando ocurre la percepción de las GAs por el receptor, se induce la fosforilación de las proteínas DELLA y en consecuencia quedan destinadas a la degradación por el proteosoma 26S (Hare *et al.*, 2003). Tras la degradación estos reguladores negativos (proteínas DELLA), se activa la transcripción de los genes de respuesta a GAs involucrados en diversos procesos del desarrollo de las plantas (Figura II.10). Las proteínas DELLA fosforiladas son poliubiquitinadas por el complejo enzimático SCF-E3 ubiquitina ligasa, cuya subunidad F-box posee un dominio C-terminal que confiere la especificidad de la unión al sustrato que se debe ubiquitinar (Thomas & Sun, 2004). En *Arabidopsis* las proteínas DELLA son degradadas vía un complejo de ubiquitinación SCF^{S^{LY1}} cuya proteína F-box esta codificada por el gen *S^{LY1}* (McGinnis *et al.*, 2003).

Las proteínas DELLA pertenecen a una familia de factores de transcripción, la familia GRAS (Pysh *et al.*, 1999). La estructura de las proteínas DELLA posee dos dominios. El del extremo C-terminal denominado dominio GRAS, importante para la función de la proteína y común a todas las proteínas de las misma familia, y el del extremo N-terminal denominado DELLA importante para la regulación por GAs (Thomas *et al.*, 2005). Este dominio contiene dos secuencias consenso de aminoácidos: "DELLA", que le da nombre a estas proteínas y "VHYNP" (Thomas *et al.*, 2005).

Existen proteínas que regulan la actividad de las proteínas DELLA. Dichas proteínas pueden ejercer una regulación positiva si disminuyen la estabilidad de las proteínas DELLA para ser degradadas, o negativa si aumentan la estabilidad frente a la degradación (Figura II.10). Entre los

reguladores negativos se encuentran el gen SPY de *Arabidopsis*, una N-acetilglucosamina transferasa (OGT) (Thornton *et al.*, 1999). Por el contrario, PHOR1 es una proteína que actúa como regulador positivo de las proteínas DELLA, y dicha proteína, aislada de patata, contiene un dominio u-box en el extremo amino terminal que lleva asociada, en la mayoría de los casos, la actividad E3 ubiquitina ligasa (Olszewski *et al.*, 2002).

Por otro lado, el gen *GAST1*, un gen de tomate de respuesta a GA de función desconocida, que se sabe que está inhibido parcialmente por ABA (Shi & Olszewski, 1998b), que actúa específicamente a través de las GAs, y su expresión incrementa con la aplicación de GA₃.

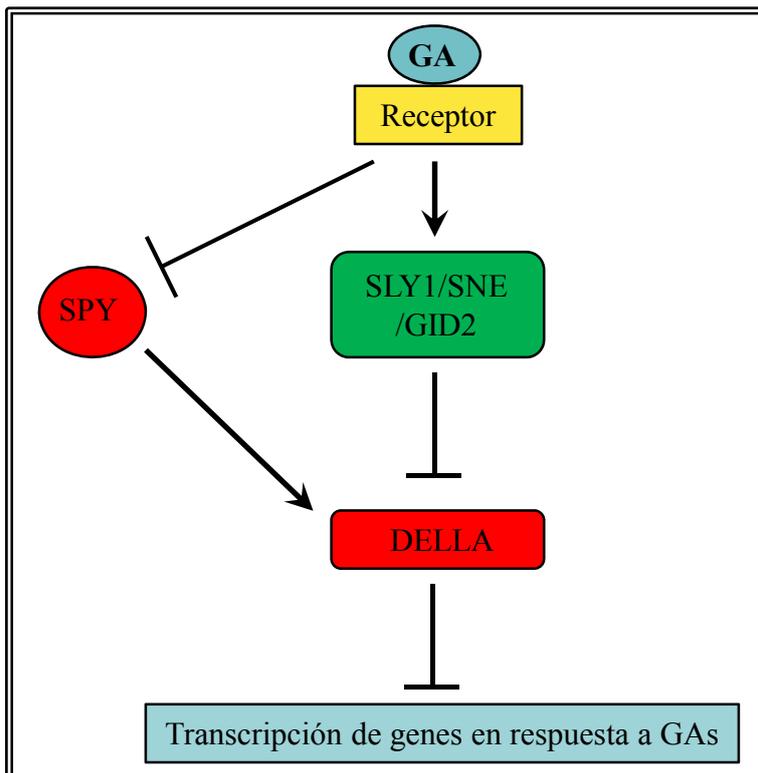


Figura II.10. Modelo de la vía de señalización de GAs. Adaptado de (Fleet & Sun, 2005).

II.5.9 Regulación de la ruta de biosíntesis de GAs por retroalimentación

La biosíntesis de GAs está regulada por las GAs activas, de manera que la síntesis *de novo* y el catabolismo de éstas están controlados por los niveles endógenos de las GAs activas en la planta (Elliott *et al.*, 2001; Israelsson *et al.*, 2004).

La regulación transcripcional de los genes implicados en el metabolismo de las GAs tiene lugar mediante un mecanismo de retroalimentación negativa en el caso de los genes biosintéticos

(*GA20ox* y *GA3ox*), o positiva en el caso de los genes catabólicos (*GA2oxidasa*) (Figura II.11). Este mecanismo proporciona de este modo a las plantas un control homeostático de sus niveles endógenos de GAs activas (Yamaguchi & Kamiya, 2000).

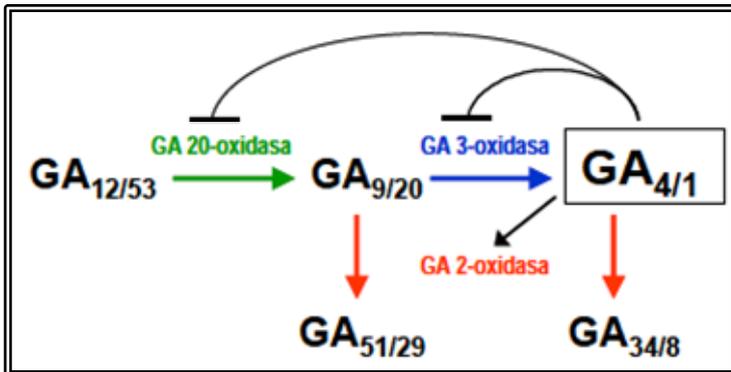


Figura II.11. Esquema de la regulación por retroalimentación negativa de genes de biosíntesis (*GA 20-oxidasa* y *GA 3-oxidasa*) y retroalimentación positiva de genes de catabolismo (*GA 2-oxidasa*) de GAs.

Este tipo de regulación transcripcional de las dioxigenasas es importante para controlar los niveles de GAs activas en la planta, pues la sobreexpresión de estos genes produce una alteración en los niveles de GAs activas en las plantas transgénicas (Hedden & Phillips, 2000; Yamaguchi & Kamiya, 2000). En plantas deficientes en GA (*gib-1* de tomate) o en plantas silvestres tratadas con inhibidores de la biosíntesis de GAs, las bajas concentraciones de GAs son la razón del aumento de los niveles de transcritos del gen *GA20ox*; dichos niveles disminuyen con la aplicación de GA exógena (Phillips *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1996; Toyomasu *et al.*, 1997).

II.5.10 Importancia de las GAs en interacciones planta-microorganismo

Aparte de su acción en la fisiología de la planta, las GAs tienen una función en los procesos de interacción de la planta con microorganismos. La producción de GAs en hongos y bacterias se supone relacionada con el fenómeno de señalización, de tal forma que actuarían como metabolitos secundarios encargados de establecer interacción con las plantas hospedadores. En un principio las GAs no han sido estudiadas desde el punto de vista de su relación con la respuesta de defensa de la planta, pero estudios recientes han sugerido que juegan un papel importante en la resistencia y susceptibilidad a enfermedades. Por ejemplo, mutantes *gid1* de arroz, con altos niveles de GAs, tienen incrementada la resistencia al hongo *Magnaporthe grisea*, indicando así un papel de las GAs en la defensa (Tanaka *et al.*, 2006). De igual manera, la aplicación de GA exógeno en arroz aumenta la resistencia a *Pythium graminicola*, y a la inversa, la reducción de GA, usando el inhibidor de biosíntesis uniconazol, promovía la susceptibilidad a

la enfermedad (de Vleesschauwer *et al.*, 2012). Sin embargo, altas concentraciones de GAs incrementan la susceptibilidad en arroz al patógeno *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*, por lo que en este caso juega un papel negativo en la resistencia a la enfermedad (Yang *et al.*, 2008), sugiriendo que las GAs promueven la respuesta frente a patógenos biotrofos pero la disminuye frente a parásitos necrotrofos (Bari & Jones, 2009). Por otro lado, la proteína DELLA, el regulador negativo de la respuesta de GA, provoca un incremento a la resistencia de patógenos necrotrofos tales como *Alternaria brassicicola* y *Botrytis cinerea*, y aumenta la susceptibilidad a patógenos biotrofos como los patógenos *Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000* y *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Navarro *et al.*, 2008), sugiriendo que la proteína DELLA promueve la resistencia a parásitos necrotrofos por activación de la respuesta de defensa dependiente de JA/etileno pero aumenta la susceptibilidad a los biotrofos por represión de la respuesta de defensa dependiente de SA, y sugieren que *G. fujikuroi* secreta GA como factor de virulencia al promover la degradación de proteínas DELLA y atenuar la respuesta de defensa dependiente de JA (Bari & Jones, 2009).

II.5.11 Importancia de las GAs en el proceso de nodulación

Varias investigaciones han demostrado también la participación de las GAs durante el proceso de nodulación en leguminosas. Las plantas mutantes con baja cantidad de GAs forman una menor cantidad de nódulos que sus variedades silvestres, siendo estos además morfológicamente aberrantes, más pequeños, blancos y probablemente no funcionales, recuperando parcialmente su aspecto normal con la aplicación de GA exógeno (Ferguson *et al.*, 2005). Estudios en guisante y *L. japonicus* han demostrado que la aplicación de GAs produce una reducción de la formación de los nódulos en estadios tempranos de su desarrollo (Ferguson *et al.*, 2005; Maekawa *et al.*, 2009), al igual que ocurre con el uso del mutante de guisante *cry-s*, con una respuesta constitutiva a GAs (Weston *et al.*, 2008). Por tanto, se sugiere que es necesario un óptimo de concentración de GA para una efectiva nodulación. Además, estudios más recientes con mutantes de guisante deficientes en GAs han sugerido que las GAs no son esenciales en estadios iniciales de la nodulación, sino en estadios más tardíos de elongación y expansión del desarrollo de los nódulos (Ferguson *et al.*, 2010). También parece existir una relación GA/etileno en la regulación de la nodulación, de tal forma que bajas concentraciones de GA provocan un incremento en la producción de etileno, siendo este el causante de la reducción en el número de nódulos, ya que utilizando un inhibidor de etileno se recupera el número de nódulos, aunque estos siguen siendo aberrantes (Ferguson *et al.*, 2011).

II.5.12 Importancia de las GAs en la formación de la simbiosis Micorriza Arbuscular

Por último, existen pocos datos sobre el papel de las GAs durante el proceso de formación de la MA, si bien un estudio en guisante describe un efecto negativo sobre la formación de arbusculos tras aplicación de GA exógeno (El Ghachtouli *et al.*, 1996). En tabaco se ha observado que las GAs activas de la ruta biosintética de la 13-hidroxicilación (GA1, GA8, GA19 y GA20) son más abundantes en la raíz de plantas micorrizadas (Shaul-Keinan *et al.*, 2002).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

III.1.1 Variedades de plantas

En este trabajo de tesis se han utilizado plantas de tomate y *Medicago truncatula* de distintas variedades, muchas de ellas alteradas genéticamente. A continuación se redactan las plantas utilizadas y los mutantes o transgénicos de cada variedad.

Líneas de **tomate** silvestres: *Solanum lycopersicum* L. variedades Moneymaker (cod. LA2706 del Tomato Genetics Resource Center, TGRC), Flora-Dade (cod. LA3242 del TGRC), UC82B (cod. LA1706 del TGRC), Ailsa Craig (cod. LA2838A del TGRC), Rheinlands Ruhm (cod. LA0535 del TGRC) y MicroTom. Las líneas de tomate con alteraciones genéticas usadas, han sido:

- ◆ **NRO**: Este mutante de la variedad silvestre Flora-Dade sobre-expresa el gen *LeETR3* que codifica para el receptor NR. Estas plantas muestran un descenso en su sensibilidad al etileno (Ciardi *et al.*, 2000).
- ◆ **ETR4AS**: Línea transgénica de la variedad Flor-Dade en la que se ha introducido la secuencia completa y en la orientación anti-sentido del gen *LeETR4* (receptor de etileno). Esta línea presenta un genotipo incapaz de producir *LeETR4* y un fenotipo de sensibilidad incrementada al etileno (Tieman *et al.*, 2000).
- ◆ **ETR6AS**: Línea transgénica de la variedad Flora-Dade a la que se ha introducido la secuencia completa en la orientación anti-sentido del gen *LeETR6* (receptor de etileno). Presentan un fenotipo de sensibilidad incrementada al etileno (Kevany *et al.*, 2008).
- ◆ **ACCD**: Línea transgénica de la variedad UC82B en la que se ha introducido la secuencia completa del gen que codifica para la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa (ACD) de *Pseudomonas*, cuya actividad rompe a la molécula precursora del etileno ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) impidiendo así la formación del etileno. La baja producción de etileno no afecta al crecimiento vegetativo de la planta, pero sí a ciertas funciones fisiológicas del etileno como la maduración del fruto y su senescencia (Klee *et al.*, 1991).
- ◆ **Sitiens**: (Cod. LA0575 del TGRC), mutante de la variedad Rheinlands Ruhm impedido en la correcta actividad de la enzima ácido abscísico-específica aldehído oxidasa, última responsable

de la síntesis del ABA en plantas (Taylor *et al.*, 1988a; Okamoto *et al.*, 2002). En estas plantas la síntesis de ABA es inferior al 8% de la síntesis en la línea silvestre, y han perdido la capacidad de inducción de síntesis de ABA en situaciones de estrés (herida, calor, o corriente eléctrica) (Herde *et al.*, 1999).

◆ **Notabilis:** (Cod. LA3614 del TGRC), mutante de la variedad Ailsa Craig que tiene una deficiencia en los niveles de ABA, produciendo un 40% con respecto al silvestre. La deficiencia metabólica de este mutante parece estar en un paso clave en la biosíntesis de ABA, la hendidura oxidativa de un precursor 9-cis xantofila para formar el intermediario C15, xantoxina (Burbidge *et al.*, 1999).

◆ **Procera:** (Cod. LA3614 del TGRC), este mutante de la variedad Ailsa Craig contiene una mutación en el gen *LeGAI* de la proteína DELLA, que es un regulador negativo de la respuesta de GAs. En concreto una mutación puntual que resulta en un cambio de aminoácido en la región conservada de DNA-binding de VHVID a VHEID (Bassel *et al.*, 2008). Presenta un fenotipo de respuesta constitutiva a GA bien caracterizado.

◆ **CcGA20oxidasa:** Línea transgénica de la variedad Micro-Tom con sobre-expresión del gen que codifica para la GA 20-oxidasa 1 de tomate, por lo que sintetizan más GAs (García-Hurtado *et al.*, 2012).

La mayoría de líneas silvestres y mutantes de ABA han sido obtenidas en el Tomato Genetics Resource Centre (Universidad de California, Davis), los mutantes con respuesta alterada a etileno han sido amablemente cedidos por el Dr. Harry Klee (Universidad de Florida, Gainesville) y la línea *CcGA20oxidasa* por el Dr. García-Martínez (IBMCP, Valencia).

III.1.2 Cultivo de plantas y germinación de semillas

Las semillas de tomate se esterilizaron en superficie, sumergiéndolas durante 15 minutos en una solución de lejía (hipoclorito de sodio) con una concentración de cloro activo de 1,75%. Tras enjuagarlas con agua estéril varias veces, se sumergen en una solución de H₂O₂ al 7% durante 15 minutos. A continuación se enjuagaron bien con agua destilada estéril y se dejaron en imbibición durante una hora y media. Posteriormente, y en condiciones asépticas, las semillas se colocaron de forma dispersa sobre papel de filtro húmedo y en placas de petri, donde germinaron en oscuridad a 25°C durante 3 días aproximadamente. Estas semillas, una vez germinadas, se colocaron en semilleros de vermiculita estéril, donde permanecieron en crecimiento aproximadamente una semana antes de ser trasplantadas las plántulas a maceta, seleccionándose las más homogéneas.

Para la esterilización de las semillas de *M. truncatula* fue necesaria una escarificación previa en H₂SO₄ durante 5 minutos, y lavado repetido con agua estéril. Posteriormente se esterilizaron las semillas escarificadas con solución de lejía con una concentración de cloro de 4% durante 2 minutos. Seguidamente se enjuagaron bien con agua estéril y se dejaron durante 2 días en condiciones asépticas en medio agar-H₂O al 0,8% y 13°C en oscuridad.

III.1.3 Sustrato de cultivo y condiciones de cultivo de plantas

El sustrato usado para el cultivo de las plantas fue una mezcla de arena:suelo:vermiculita en proporciones 3:2:1 (v:v:v). La arena, con un diámetro de grano inferior a 2mm, y la vermiculita se enjuagaron para eliminar los residuos y exceso de sales que pudiesen contener, y posteriormente se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 120°C, con el fin de eliminar todos los microorganismos y propágulos microbianos que pudieran interferir en los ensayos. Por su parte, el suelo, proveniente de la finca “Cortijo Peinado” perteneciente a la Diputación de Granada, y cuya composición química se detalla en la tabla III.1, se tamizó en dos pasos, con una malla de 1cm de luz para eliminar las partes más gruesas y después con otra de 4mm, y a continuación se esterilizó mediante tindalizado bajo vapor fluente durante tres días consecutivos, 1hora a 100°C cada 24 horas, y de este modo se eliminaron todos los propágulos de microorganismos del suelo que pudieran interferir en los ensayos, pero sin degradar sus propiedades físico-químicas.

Para el abonado de las plantas se empleó el abono “Osmocote Exact Mini” (Tabla III.2.), el cual es un abono NPK de liberación lenta (longevidad 3-4 meses a 21°C, temperatura media del suelo) que contiene una cantidad baja de fósforo para no inhibir el desarrollo de la micorriza. La aplicación realizada fue de 0,5g/kg de mezcla arena:suelo:vermiculita.

Las plantas, una vez en macetas, se cultivaron en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad. El periodo luz/oscuridad fue de 16/8 horas, alternando la temperatura de 25°C/19°C respectivamente. La humedad relativa fue del 50% y la intensidad de la luz de 450µmol de fotones·m⁻²·s⁻¹, con una longitud de onda de 400-700nm. Las plantas se regaron por capilaridad aproximadamente tres veces por semana con el fin de no alterar las propiedades físico-químicas del sustrato.

Tabla III.1. Composición química del suelo

Composición	Concentración	Composición	Concentración
Al (ppm)	36135,69	Mn (ppm)	344,89
B (ppm)	17,18	Ni (ppm)	22,10
Ca (%)	6,35	Pb (ppm)	21,80
Cd (ppm)	1,43	P (%)	0,10
Cr (ppm)	47,17	S (%)	0,05
Cu (ppm)	22,64	Fe (ppm)	68,90
Zn (ppm)	26597,84	N (%)	0,10
K (%)	0,90	C (%)	4,10
Mg (%)	2,11	C orgánico (%)	1,08
Na (%)	0,20		

El análisis de suelo fue realizado por el Servicio de Ionómica del Centro de Edafología y Biología aplicada del Segura (CSIC).

Tabla III.2. Abono Osmocote Exact Mini (Scotts)

- 16% N total (8,4% nitrógeno nítrico y 7,6% nitrógeno amoniacal)
- 8% Anhídrido fosfórico (P_2O_5), soluble en citrato neutro y 5,7% soluble en agua
- 11% Óxido de Magnesio (MgO), 1,4% soluble en agua
- 0,02% B soluble en agua
- 0,05% Cu, 0,038% soluble en agua
- 0,4% Fe, 0,2% quelatado EDTA
- 0,06% Mn
- 0,02% Mo, 0,014% soluble en agua
- 0,015% Zn, 0,008% soluble en agua

III.1.4 Tratamientos y requerimientos específicos de los cultivos

Según experimentos y características de las líneas usadas, se realizaron tratamientos específicos sobre las plantas:

- **Cultivo de los mutantes de tomate *Sitiens*:** Debido a la casi nula resistencia de estos mutantes al estrés hídrico (Taylor *et al.*, 1988a), su parte aérea se pulverizó todos los días con agua para prevenir su desecación.
- **Tratamientos con tungstato sódico:** Inicialmente se preparó una solución madre de 10mM de tungstato sódico (Na_2WO_4) (Panreac) en agua destilada. La aplicación se realizó a la semana de la de la inoculación con el hongo de la micorriza arbuscular, regando con 1mM o 1,5mM según el experimento, aplicando dos veces por semana una solución de 20ml/planta (Hansen &

Grossmann, 2000). Este producto bloquea la formación de ABA al ser un potente inhibidor de enzimas molibdo, tales como el ABA aldehído oxidasa (Milborrow, 2001).

- **Tratamientos con ácido abscísico (ABA):** Se preparó igualmente una solución madre de 1mM de ABA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) a pH 7, en agua destilada con el 1% de etanol y 0,1% de tritón X-100 (sigma) (Audenaert *et al.*, 2002). Para la preparación de la solución madre se disolvió el ABA en el etanol, después se añadió el tritón, y finalmente se agregó el agua destilada y se ajustó el pH. La aplicación se realizó a la semana de la inoculación, regando con una solución de 50 μ M o 75 μ M, dependiendo del ensayo, dos veces por semana, aplicando 20ml/planta (Herrera-Medina *et al.*, 2007). Los tratamientos control se regaron con el mismo volumen de agua destilada a pH 7, con igual proporción de etanol.

- **Tratamientos con Aminoetoxivinilo glicina hidrocloreto (AVG):** Previa preparación de una solución madre de 1mM de AVG (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) en agua destilada, se aplicaron dos tratamientos de una concentración de 50 μ M a las 2 y 4 semanas después de la inoculación con el hongo formador de micorriza arbuscular, añadiendo 20ml/planta. El AVG es un potente inhibidor de la conversión de metionina a ácido-1-amino ciclopropanocarboxílico en la ruta de biosíntesis de etileno (Adams & Yang, 1979).

- **Tratamiento con ácido gibereleico 3 (GA₃):** A la semana de la inoculación del hongo micorrízico, se aplicaron tratamientos de 0,1 μ M, 1 μ M, 5 μ M y/o 10 μ M de GA₃ (Sigma) a pH de 6,5, añadiendo dos veces por semana 20ml/planta de cada dilución (El Ghachtouli *et al.*, 1996). Dichas diluciones se obtuvieron a partir de una solución madre de 1mM, en agua destilada con el 1% de etanol y 0,01% de Tween 20 (sigma). Los tratamientos control se regaron con el mismo volumen de agua destilada a pH 6,5, con igual proporción de etanol y Tween 20.

- **Tratamiento con prohexadiona cálcica (PrCa):** La PrCa, 3-óxido-5-oxo-4propionil ciclohex-3-enecarboilato de calcio (Apogee), es un inhibidor del crecimiento vegetal ya que actúa a nivel de las enzimas dioxigenasas de la ruta de biosíntesis de GAs, GA 20-oxidasas y GA 3-oxidasas, enzimas que realizan el último paso en la biosíntesis de GAs (Hisamatsu *et al.*, 2000). Su acción inhibitoria se debe a que su estructura tiene mucha similitud al 2-oxoglutarato, que es un co-factor esencial para estas enzimas (Nakayama *et al.*, 1990a; Hedden, 1991). Pero hay otras dioxigenasas dependientes del 2-oxoglutarato, que están involucrados tanto en el metabolismo de los flavonoides y sus precursores fenólicos, como es el caso de la flavonona 3-hidroxilasa, provocando inhibición de esta enzima, y por lo consiguiente un descenso del contenido de flavonoides (Rademacher, 2004; Rademacher *et al.*, 2006). Además, la Pr-Ca también reduce la formación de etileno, debido a su estructural similar con el ácido ascórbico, el co-substrato del

ácido-1-amino ciclopropanocarboxílico oxidoreductasa (ACC oxidasa), otro dioxigenasasa, que está involucrada en la biosíntesis de etileno (Rademacher, 2000; Rademacher *et al.*, 2006). Se preparó una solución madre de PrCa 1mM en agua destilada con el 1% de etanol y 0,01% de Tween 20. A la semana de ser inoculadas las plantas se aplicaron sobre la maceta 20ml/planta de 10 μ M, 50 μ M o 100 μ M de PrCa a un pH de 6,5, dos veces por semana (Ilias *et al.*, 2007). Los tratamientos control se regaron con el mismo volumen de agua destilada a pH 6,5, con igual proporción de etanol y Tween 20



Figura III.1. Cultivo en sistema splits-roots

- **Cultivo en condiciones de raíz compartimentalizada (sistema “splits-roots”):** Para el cultivo de plantas en sistema de raíces compartimentalizadas, doce días después de sembrar las semillas en el semillero, se cortó la raíz principal de las plántulas de tomate para provocar la división lateral de la raíz y la aparición de raíces secundarias. Para ello se cultivaron las plántulas durante otros 21 días en vermiculita añadiéndole solución nutritiva de Hewit, cuya composición se muestra en la tabla III.3. A continuación, se tomaron las plantas necesarias para ser transferidas al sistema splits-roots, el cual está formado por dos macetas con la mezcla comentada en el apartado III.1.3, unidas con cinta y pegadas en su parte superior. Se lavaron las raíces de las plántulas y se dividieron cuidadosamente en dos partes iguales, de las cuáles una se introdujo en la maceta con medio MW sin hongo micorrícico y la otra en la maceta con medio MM con hongo micorrícico, se cubrieron las raíces con la mezcla de sustrato con cuidado de que no se contaminara el compartimento sin inocular, quedando la parte aérea entre las dos macetas como se representa en la figura III.1.

Tabla III.3. Solución Hewit

	Concentración (μM)	Solución madre (g/100ml)	Volumen (ml) de sol. Madre para 1l
KNO ₃	$2,99 \cdot 10^3$	3,03	10
Ca(NO ₃) ₂	$8,63 \cdot 10^3$	7,08	20
MgSO ₄ ·7H ₂ O	$1,49 \cdot 10^3$	1,84	20
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O(*)	$1,33 \cdot 10^3$	2,08	10
EDTA-Fe(II)	67	0,25	10
MnSO ₄ ·4H ₂ O	9,86	0,22	1
H ₃ BO ₃	30,08	1,86	0,1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,96	0,24	0,1
ZnSO ₄ ·2H ₂ O	1,47	0,29	0,1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,12	0,03	01

El pH se llevó a 7 con una solución de NaOH al 10%

III.2. CULTIVO CON EL HONGO MICORRÍFICO

III.2.1 Inóculo de *Glomus irregulare*

El punto de partida del inóculo de *G. intraradices* fue un cultivo monoxénico, donde raíces de zanahoria (*Daucus carota*) DC2 transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* se cultivaron en un medio M descrito previamente por Bécard (Bécard & Fortin, 1988), solidificado con 0,4% (w/v) de Gel-Gro (ICN Biochemicals Corp., Aurora, OH, USA) y denominado M modificado (medio MM) (tabla III.3) (St-Arnaud *et al.*, 1996). En dicho medio MM y en placas de petri de 150mm de diámetro, como se muestra en la figura III.2, se lleva a cabo la colonización de las raíces transformadas de zanahoria, colocando cerca del ápice de una pieza de esta raíz de zanahoria de 2cm de longitud, unas 10 – 15 esporas del hongo micorrízico arbuscular *G. intraradices* (DAOM 197198), reclasificado como *G. irregulare* (Stockinger *et al.*, 2009a), perteneciente al grupo A de la familia *Glomeraceae*, y que recientemente ha sido renombrado como *Rhizophagus irregularis* (Krüger *et al.*, 2012). En nuestros estudios será nombrado como *G. irregulare*. Estas placas de petri se incubaron en oscuridad a 27°C. Las placas en las que el hongo había alcanzado y colonizado la raíz y estaba creciendo y esporulando se seleccionaron, bien para obtener sucesivos subcultivos en un medio fresco MM, o bien para la obtención de inoculante para los ensayos, de tal forma que cada maceta de 500ml de capacidad fue inoculada con un trozo del medio de cultivo monoxénico MM que contenía una media de 50 esporas de *G. irregulare* y trozos de raíz de zanahoria micorrizadas. A los tratamientos no inoculados se les

agregó un trozo de medio de cultivo MW con raíces de zanahoria transformada, pero sin el hongo micorrícico, y cuya composición se muestra en la tabla III.4.

Tabla III.4. Medios MM y MW

	Concentración		Preparación de 500ml		
	MM (g/l)	MW (g/l)	Soluciones 1000X/g/l)	MM (500ml)	MW (500ml)
Macronutrientes					
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,731	0,731	-	0,365g	0,365g
KNO ₃	80·10 ⁻³	80·10 ⁻³	-	40·10 ⁻³ g	40·10 ⁻³ g
KCl	65·10 ⁻³	65·10 ⁻³	-	32·10 ⁻³ g	32·10 ⁻³ g
KH ₂ PO ₄	4,8·10 ⁻³	-	-	2,4·10 ⁻³ g	-
Na ₂ SO ₄ anhidro	-	0,199	-	-	99·10 ⁻³ g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	-	19·10 ⁻³	-	-	9,5·10 ⁻³ g
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0,288	0,288	-	0,144g	0,144g
EDTA-NaFe	8·10 ⁻³	8·10 ⁻³	8	0,5ml*	0,5ml*
KI	0,75·10 ⁻³	0,75·10 ⁻³	0,75	0,5ml*	0,5ml*
Microelementos					
MnCl ₂	6·10 ⁻³	6·10 ⁻³	6	0,5ml*	0,5ml*
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,65·10 ⁻³	2,65·10 ⁻³	2,65	0,5ml*	0,5ml*
H ₃ BO ₃	1,50·10 ⁻³	1,50·10 ⁻³	1,5	0,5ml*	0,5ml*
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,13·10 ⁻³	0,13·10 ⁻³	0,13	0,5ml*	0,5ml*
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2,4·10 ⁻⁶	2,4·10 ⁻⁶	2·10 ⁻³	0,5ml*	0,5ml*
Vitaminas					
Glicina	3·10 ⁻³	3·10 ⁻³	3	0,5ml*	0,5ml*
Tiamina	0,1·10 ⁻³	0,1·10 ⁻³	0,1	0,5ml*	0,5ml*
Piridoxina	0,1·10 ⁻³	0,1·10 ⁻³	0,1	0,5ml*	0,5ml*
Ácido nicotínico	0,5·10 ⁻³	0,5·10 ⁻³	0,5	0,5ml*	0,5ml*
Mio-inositol	50·10 ⁻³	50·10 ⁻³	50	0,5ml*	0,5ml*
Sacarosa	10	30	-	5g	5g
pH 5,5 (ajustado con Gel-Gro)	soluciones 4	al 10% de 4	KOH/HCL)	2g	2g

Se esterilizó durante 15 minutos a 120°C. Acto seguido se tendió en placas petri.

*Volumen tomado de las soluciones 1000X

III.2.2 Inóculo de *Glomus mosseae*

En algunos ensayos se utilizó el hongo micorrícico *G. mosseae* (BEG 12; La Banque Européenne des Glomales), perteneciente al grupo A de la familia *Glomeraceae*. El inóculo utilizado fue un suelo que contenía esporas, micelio y fragmentos de raíces colonizadas por el hongo micorrícico. En concreto dicho suelo contenía 25-35 esporas/g, y raíces con una infección de 60-75% de su longitud micorrizada. Para la inoculación de las plantas se tomó 5g de suelo/inóculo por planta crecida en maceta de 500ml.



Figura III.2. Cultivo sistema monoxénico de *G. irregulare* con raíces de zanahoria transformadas

III.3. TINCIÓN Y DETERMINACIÓN DEL HONGO MICORRÍCICO EN LA RAÍZ

En los experimentos de micorrización de las plantas y con objeto de determinar de manera secuencial los distintos parámetros de micorrización, se realizaron varias cosechas en tiempos consecutivos. Cada planta fue cuidadosamente cosechada y lavada, separando la raíz de la parte aérea. La raíz de cada planta se troceó en fragmentos de 1cm de longitud, eliminándose previamente la parte apical y la parte superior próxima al tallo. Todos los fragmentos de raíz procedentes de la misma planta se mezclaron para homogeneizar la muestra, tomándose una porción representativa de dicha mezcla para su tinción y cuantificación de la micorrización, así como 1g para la cuantificación de ácido abscísico (capítulo III.4.1) y 0,5g para la extracción de ARN (capítulo III.5.1). Las técnicas de tinción usadas para la cuantificación posterior de la micorrización fueron la tinción con azul tripán y la tinción vital de fosfatasa alcalina fúngica (ALP).

III.3.1 Tinción con azul tripán

La tinción con azul tripán es una no vital, donde se tiñe la quitina de las paredes del hongo con azul tripán, realizando posteriormente una identificación y cuantificación visual bajo lupa, ya que las estructuras fúngicas se tiñen de color azul oscuro, resaltando dentro de la raíz, tal como se muestra en la figura III.3.

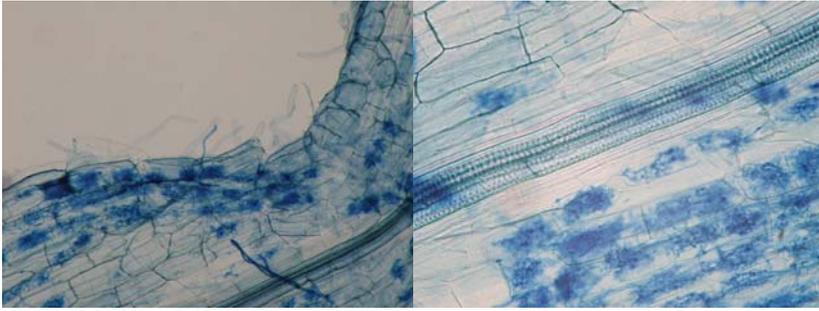


Figura III.3. Muestras de raíz micorrizada teñida con azul tripán.

La metodología de tinción utilizada se basa en la descrita previamente por (Phillips & Hayman, 1970). Las raíces se incubaron durante 15 minutos en una solución de KOH al 10% en un baño a 100°C para hidrolizar las paredes celulares de la raíz, y a continuación se enjuagan varias veces con agua corriente y se incuban 3 minutos en HCl 0,1N a temperatura ambiente, para neutralizar los restos de KOH y hacer que la coloración posterior sea más eficaz. Seguidamente, se incuban las raíces en una disolución del colorante azul tripán (Sigma) al 0,5% en ácido láctico durante 15 minutos en un baño a 100°C, y para finalizar se enjuagan con agua corriente para eliminar el colorante, y se conservan en ácido láctico.



Figura III.4. Muestras de raíz micorrizadas con tinción fosfatasa alcalina.

III.3.2 Tinción de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (tinción ALP)

Este tipo de tinción pone de manifiesto la actividad fosfatasa alcalina (ALP) localizada en las vacuolas fúngicas, y por tanto es una tinción vital, que ha sido propuesta como medida de la eficiencia fúngica en el transporte y acumulación de fósforo en las hifas (Tisserant *et al.*, 1993). El fundamento de la técnica consiste en la aparición de un producto precipitado de color marrón tras la acción de la fosfatasa alcalina fúngica sobre el sustrato proporcionado en la mezcla de

reacción (ácido α -naftil fosfato), observándose perfectamente bajo lupa dicho precipitado marrón oscuro, tal y como se muestra en la figura III.4.

Tabla III.5. Soluciones para tinción ALP.

Solución de hidrólisis	50ml	Solución de ALP	50ml
Tris/ácido cítrico 0,05M pH 9,2	50ml	tris/ácido cítrico 0,05M pH 9,2	48ml
Sorbitol	2,5g	ácido α -naftil-fosfato	0,05g
Celulasa	0.016 g	fast blue RR	0,05g
Pectinasa de <i>Aspergillus niger</i>	0,114 g	de MgCl ₂	0,05g
		MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,04g
Preparar en fresco. En oscuridad		Preparar en fresco y filtrar. En oscuridad	

Las raíces troceadas (1cm) se cubrieron con la solución de hidrólisis durante 1 hora a temperatura ambiente para digerir enzimáticamente la pared celular y permitir el posterior acceso de la mezcla de reacción ALP. A continuación se realizaron tres lavados con agua destilada para aclarar las raíces y eliminar la solución de hidrólisis. Una vez lavadas las raíces se sumergen en la solución ALP, aplicándose vacío durante 5 – 10 minutos para permitir mayor penetración de la solución dentro de la raíz, y se incubó a 37°C durante toda la noche para permitir la acción enzimática. Tras la incubación se lava con agua destilada repetidas veces, para eliminar la solución ALP y se añade hipoclorito sódico al 1% de cloro activo, incubándose a temperatura ambiente durante 15 o 20 minutos para aclarar las raíces y visualizar mejor las partes de la raíz con actividad ALP. Por último, las raíces se lavan con agua destilada varias veces y se conservan en ácido láctico, manteniéndose el precipitado visible durante al menos 2 semanas. La composición de la soluciones de hidrólisis y actividad ALP se describe en la tabla III.5. Ambas soluciones se preparan en fresco y se mantienen en oscuridad para evitar daños causados por la luz. Además es necesario filtrar la solución ALP antes de usar.

III.3.3 Cuantificación del porcentaje de raíz micorrizada

Las raíces teñidas, tanto por la tinción no vital azul tripán como por la tinción vital ALP, se utilizaron para cuantificar el nivel de infección mediante dos formas, una de ellas nos da información del tanto por ciento de raíz infectada respecto del total de la raíz, y la otra es una medida de la intensidad y frecuencia de la micorrización de la raíz (ver apartado III.3.4).

El tanto por ciento de raíz infectada respecto del total de la raíz es el porcentaje de raíz micorrizada (Giovannetti & Mosse, 1980). Esta medida se realiza mediante observación a la lupa binocular de los trozos de raíces teñidos, los cuales se extendieron aleatoriamente en placas de

10cm de lado divididas en cuadrículas de 1,2cm de lado. Para estas dimensiones de las cuadrículas y según la fórmula de Newman, el número de entrecruzamientos de la raíz con las líneas de las cuadrículas es directamente proporcional a la longitud total de la raíz extendida en la placa (Newman, 1966). Del mismo modo, el número de entrecruzamientos de raíz con infección (raíz micorrizada) con las líneas de las cuadrículas es directamente proporcional a la longitud de la raíz micorrizada. Por lo tanto el porcentaje de entrecruzamientos con infección respecto al total de entrecruzamientos nos proporciona el valor en tanto por ciento de la longitud de la raíz colonizada respecto al total de raíz (Figura III.5). De forma similar podemos calcular el tanto por ciento de raíz con actividad ALP en placa en raíces teñidas para este tipo de actividad.

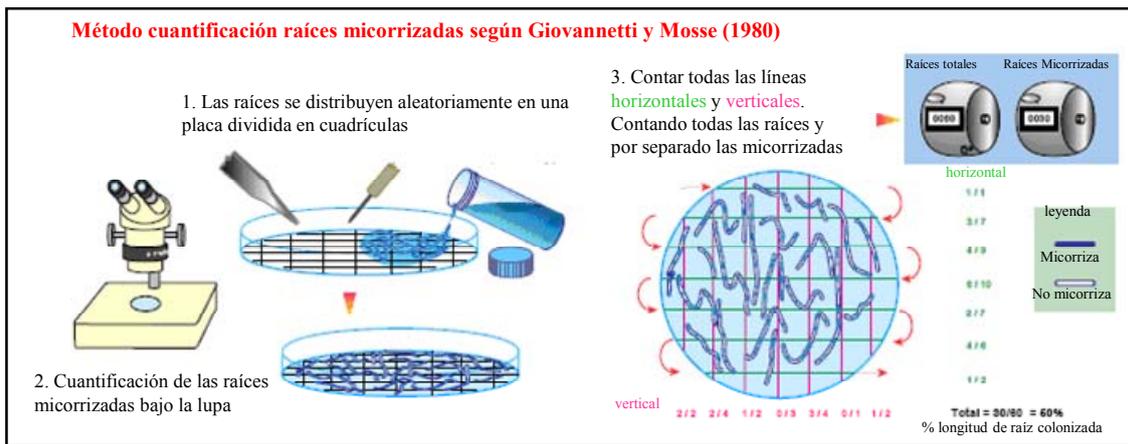


Figura III.5. Cuantificación del porcentaje de micorrización mediante la tinción azul tripán y la observación bajo lupa binocular usando una placa dividida en cuadrículas de 1,2cm de lado.

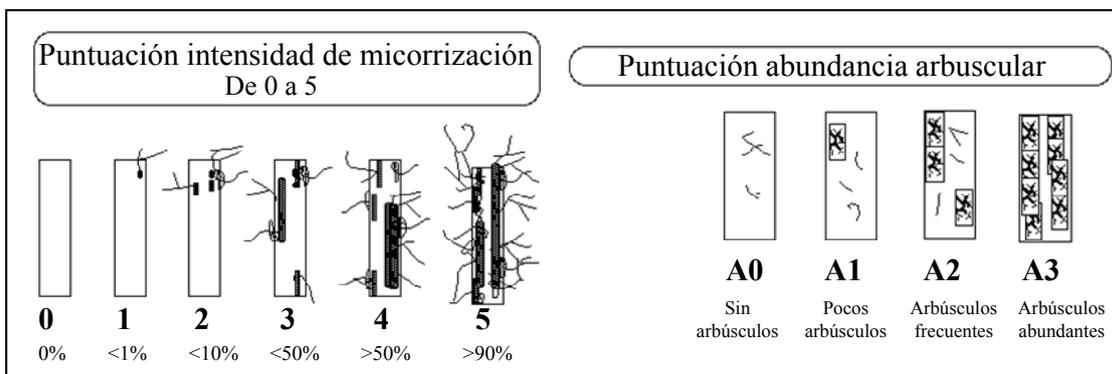
III.3.4 Determinación de la frecuencia e intensidad de micorrización y del porcentaje de arbusculos en la raíz micorrizada.

Para obtener mayor información sobre el desarrollo de la micorrización se determinaron otros parámetros infectivos, además del citado porcentaje de colonización. Esta determinación se realizó al microscopio (40X) según la metodología de Trouvelot (Trouvelot *et al.*, 1986). Para ello, se colocaron 30 trozos de raíces de 1cm cada una teñidas con azul tripán sobre un porta-objetos, y se realizó un análisis de las estructuras fúngicas en cada fragmento de raíz, otorgando valores numéricos en función de la proporción de dichas estructuras fúngicas. En concreto, se otorgan valores de 0 a 5 según el grado de ocupación por el hongo del fragmento de raíz (Figura III.6), y valores de 0 a 3 según la proporción de arbusculos observada (Figura III.6). Con los valores numéricos obtenidos para los 30 fragmentos de cada porta-objetos, tanto para intensidad, como presencia arbuscular y usando el programa MYCOCALC

(<http://www.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocal-prg/download.html>.) se obtienen los valores de los siguientes parámetros de micorrización: frecuencia de micorrización (%F), intensidad de micorrización en el sistema radical (%M), intensidad de micorrización media por fragmento de raíz (m%), abundancia de arbusculos en fragmentos de raíces micorrizadas (a%) y abundancia de arbusculos en el total del sistema radical (%A).

Las fórmulas matemáticas que aplica el programa MYCOCAL para el cálculo del valor de los distintos parámetros son las siguientes (Trouvelot *et al.*, 1986):

- $F\% = n^{\circ} \text{ de fragmentos con micorrización} \cdot 100 / n^{\circ} \text{ total de fragmentos}$
- $M\% = (95 \cdot n_5 + 70 \cdot n_4 + 30 \cdot n_3 + 5 \cdot n_2 + n_1) / n^{\circ} \text{ total de fragmentos}$
- $m\% = M\% \cdot n^{\circ} \text{ total de fragmentos} / n^{\circ} \text{ de fragmentos con alguna micorrización}$
- $a\% = (100 \cdot mA_3 + 50 \cdot mA_2 + 10 \cdot mA_1) / 100$, donde
 - $mA_3 = (95 \cdot n_5 \cdot A_3 + 70 \cdot n_4 \cdot A_3 + 30 \cdot n_3 \cdot A_3 + 5 \cdot n_2 \cdot A_3 + n_1 \cdot A_3) \cdot 100 / n^{\circ} \text{ fragmentos con micorrización}$
 - $mA_2 = (95 \cdot n_5 \cdot A_2 + 70 \cdot n_4 \cdot A_2 + 30 \cdot n_3 \cdot A_2 + 5 \cdot n_2 \cdot A_2 + n_1 \cdot A_2) \cdot 100 / n^{\circ} \text{ fragmentos con micorrización}$
 - $mA_1 = (95 \cdot n_5 \cdot A_1 + 70 \cdot n_4 \cdot A_1 + 30 \cdot n_3 \cdot A_1 + 5 \cdot n_2 \cdot A_1 + n_1 \cdot A_1) \cdot 100 / n^{\circ} \text{ fragmentos con micorrización}$
- $A\% = a \cdot M / 100$



III.6. Método de determinación de la intensidad y frecuencia de la micorrización, y abundancia de arbusculos (Trouvelot *et al.*, 1986).

III.3.5 Determinación del estado de desarrollo de los arbusculos

Para la determinación del estado de desarrollo de los arbusculos se establecieron tres grupos o clases pertenecientes a estados morfológicos diferentes: La clase “a” se correspondió con arbusculos en formación, o degradación, sin ramificaciones finas y que ocupaban parcialmente la célula hospedadora; La clase “c”, correspondió a arbusculos con abundancia de ramificaciones finas, que se teñían con gran intensidad con el colorante azul tripán, y que ocupaban la totalidad de la célula cortical; y la clase “b”, se correspondía a estados intermedios entre los arbusculos de la clase “a” y “c”, donde estos arbusculos tenían algunas ramificaciones estrechas, que se teñían con cierta intensidad con el colorante azul tripán (Figura III.7).

La determinación del porcentaje de cada una de estas clases en las raíces micorrizadas se realizó por cuantificación directa bajo microscopio (40X), clasificando visualmente todos los arbusculos en alguna de las tres clases, contabilizándose al menos 100 arbusculos en un mismo campo visual y obteniendo el porcentaje de cada una de estas clases.

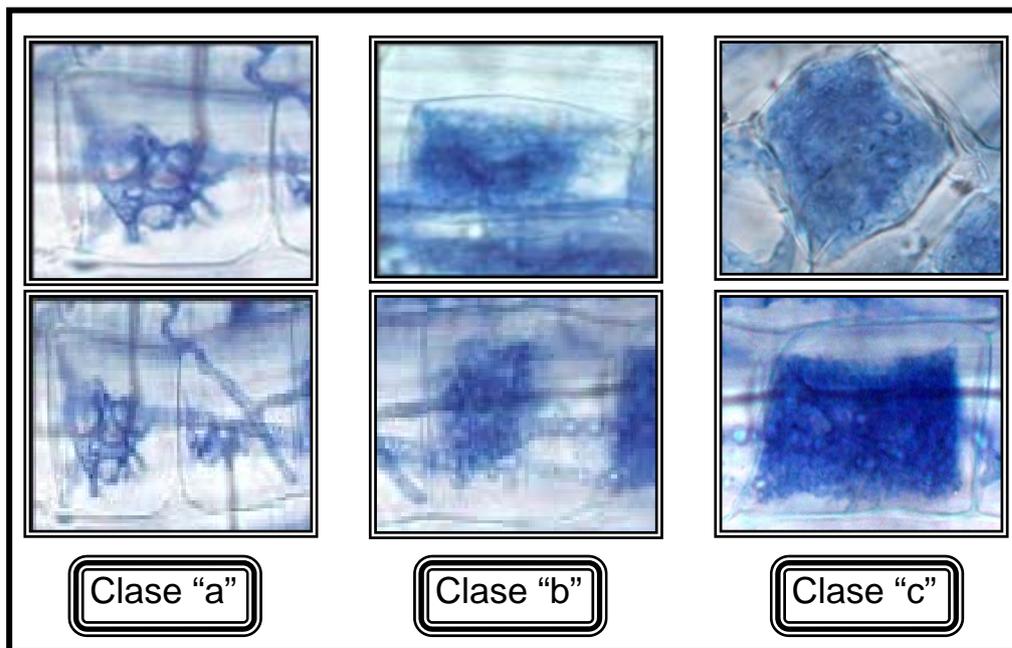


Figura III.7. Clases de arbusculos.

III.4. DETERMINACIÓN DE NIVELES HORMONALES EN RAÍCES**III.4.1 Extracción y cuantificación de la producción de etileno en raíces**

La producción de etileno se determinó siguiendo la metodología de Lund y col., para la producción de etileno en hojas de tomate (Lund *et al.*, 1998). Una vez lavadas las raíces con agua destilada, se cortan por debajo del cuello del tallo y se dejan reposar en un tubo abierto de 16 a 50ml de volumen (dependiendo del tamaño de raíz) durante 30 minutos (para liberar el etileno que se produce por un posible estrés en la manipulación de la planta durante la cosecha), y a continuación se cierra herméticamente el tubo (cierre de silicona que no traspasa gases) y se dejan las raíces en incubación durante una hora a temperatura ambiente. Tras este tiempo de incubación se toma con una jeringa 1ml del volumen interior del tubo para su análisis cromatográfico (Figura III.8). Se analizan un mínimo de tres réplicas independientes por tubo.

La concentración de etileno por mililitro de aire se obtuvo por cromatografía de gases, con detección por ionización de llama. Se utilizó el cromatógrafo de gases P 5890 (Hewlett packard), con una columna R de Porapak y el integrador HP3396. La llama del detector de ionización se mantuvo con un flujo de aire de H₂ con una presión de 2 y 1 bares respectivamente. La fase móvil se basó en un flujo de N₂ de 45ml/minuto, y una presión de 2 bares. La columna se mantuvo a 70°C, el inyector a 120°C, y el detector a 105°C. El tiempo de retención del etileno en estas condiciones fue de aproximadamente 2,3 minutos.

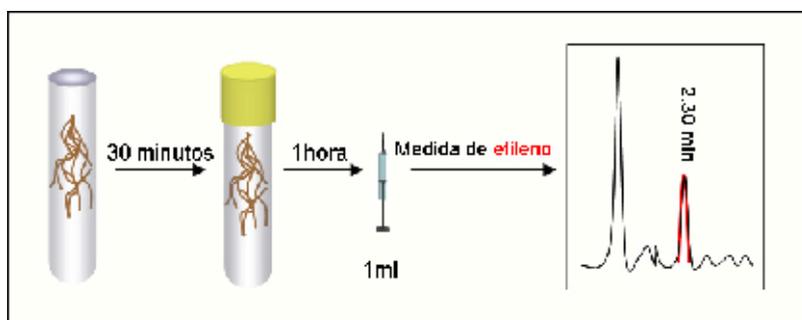


Figura III.8. Extracción y medida del etileno producido en raíces

La cantidad de nmoles de etileno por mililitro de aire analizado se determinó por interpolación del área del pico obtenido en cada muestra problema respecto a una curva patrón preparada con cantidades conocidas de etileno (de 0 a 0,3888 nmoles). Los datos de etileno en nmoles de etileno/ml se multiplicaron por el volumen total del tubo, excluyendo el volumen que

ocupa la raíz, y se dividió entre el peso de la raíz y entre el tiempo (1 hora) de incubación. Por tanto, la cantidad de etileno final se cuantifica en $\text{nmoles} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$.

III.4.2 Extracción y cuantificación de la producción de ácido abscísico en raíces

Como se detalló en el capítulo III.3, se tomó 500mg de cada mezcla homogénea de raíces por cada planta cosechada. Se analizaron un mínimo de tres réplicas biológicas independientes por tratamiento.

Las muestras de raíz se congelan rápidamente en N_2 líquido, y a continuación son liofilizadas. El procedimiento de extracción y determinación de ABA se realizó en el Institut für Botanik, Technische Universität Dresden, Alemania por la Dra. Ludwig-Müller. Las raíces se sometieron a un proceso de extracción con una mezcla de ácido acético e isopropanol (95:5, v/v), y se le añadió a cada muestra 100ng del estándar interno (D6)-ABA (Plant Biotechnology Institute, National Research Council de Canadá, Saskatoon, Canadá). La preparación de las muestras se realizó según protocolo de (Meixner *et al.*, 2005). Las muestras fueron incubadas en agitación durante 2 horas a 4°C , centrifugándose después durante 10 minutos a 10.000g, donde se recogió el sobrenadante y se evaporó a sequedad bajo una corriente de N_2 . El residuo seco se resuspendió en metanol, centrifugándose de nuevo durante 10 minutos a 10.000g, recogiendo el sobrenadante y colocándose en un vial de vidrio. El metanol se evapora bajo una corriente de N_2 y la muestra se resuspende en 100 μl de acetato de etilo. La metilación se llevó a cabo utilizando diazometano recién preparado en un aparato de vidrio soplado (Takoma Park, MD, U.S.A.) (Cohen, 1984).

La detección y cuantificación se lleva a cabo por cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas (GC-MS) (Varian Saturn 2100) con detector de captura de electrones a 70eV, conectado a un cromatógrafo de gases Varian CP-3900 equipado con un inyector automático (Varian, Berkeley, CA, U.S.A.). Para el análisis, 2 μl de la muestra metilada disuelta en 30 μl de acetato de etilo se inyecta de manera dividida (apertura del divisor de 1:100 cada 1 minuto) sobre una columna ZB-5 Phenomenex (Aschaffenburg, Alemania) (30m x 0,25mm x 0,25 μm) usando el gas He como transportador a 1ml/minuto. La temperatura del inyector fue de 250°C , y el programa de temperatura de 60°C durante 1 minuto seguido por un incremento de $25^\circ\text{C}/\text{minuto}$ hasta 180°C , incrementando a continuación $5^\circ\text{C}/\text{minuto}$ hasta 250°C y $25^\circ\text{C}/\text{minuto}$ hasta 280°C , y se mantiene 5 minutos isotérmicamente a esta temperatura. El ester metil de ABA eluyó en 13,5

minutos bajo estas condiciones. Para una mayor sensibilidad se utiliza el μ SIS mode (VarianManual) (Wells & Huston, 1995)).

La concentración de ABA endógeno es calculada en base a los principios de dilución de isótopos usando los iones de las sustancias metiladas en $m/z = 190/194$ (iones derivados de concentración endógenas y de (D6)-ABA (Walker-Simmons *et al.*, 2000). La cantidad de ABA final por muestra, correspondiente a su producción, se cuantifica en $\text{nmoles} \cdot \text{g}^{-1}$.

III.4.3 Extracción y cuantificación de la producción de ácido abscísico y sus catabolitos en raíces

Se tomó 500mg de cada mezcla de raíces de cada planta cosechada. Se analizaron un mínimo de tres réplicas biológicas independientes por tratamiento.

Las muestras de raíz se congelan rápidamente en N_2 líquido, y a continuación son liofilizadas. El procedimiento de extracción y determinación de ABA y sus derivados, ácido faseico (PA), ácido hidridrofaseico (DPA), 7'-hidroxi ABA (7'-OH-ABA), ácido neofaseico (neoPA), ABA glucosilado (ABAGE) y el ABA biológicamente inactivo *trans*-ABA, se realizó en el National Research Council of Canada, Saskatoon, SK, Canadá (NRCC SK) por la Dr. Zaharia. Las formas deuteradas de las hormonas que se utilizaron como patrones internos incluyen: d_3 -DPA, d_5 -ABA-GE, d_3 -PA, d_4 -7'-OH-ABA, d_3 -neoPA, d_4 -ABA, and d_4 -*trans*-ABA fueron sintetizados y preparados en NRCC SK (Abrams *et al.*, 2003; Zaharia *et al.*, 2005). Las formas deuteradas de hormonas seleccionadas utilizados como controles externos, d_6 -ABA and d_2 -ABA-GE, se prepararon y se sintetizaron en NRC Saskatoon SK Canadá.

El análisis se realizó en un UPLC/ESI-MS/MS utilizando un sistema Waters ACQUITY UPLC, equipado con un gestor de entrega de disolvente binario y un gestor de muestra acoplado a un Waters Micromass Quattro Premier XE cuadrupolo espectrómetro de masas en tándem a través de una interfaz de Z-spray. Los programas MassLynx™ y QuanLynx™ (Micromass, Manchester, UK) fueron utilizados para la adquisición de análisis de datos.

Una alícuota (100 μ l) que contiene los controles internos deuterados, cada uno a una concentración de 0,2pg μl^{-1} , se añadió al tejido de la planta homogeneizada (aproximadamente 500mg); se añadió después 3ml de una mezcla isopropanol:agua:ácido acético glacial (80:19:1, v/v/v), y las muestras se agitaron en oscuridad durante 24 horas a 4°C. Las muestras se

centrifugaron y el sobrenadante se aisló y se secó en un Polyvap Büchi Syncore (Büchi, Suiza). Las muestras se reconstituyeron en 100µl de metanol acidificado, se ajustó a 1ml con agua acidificada, y después se repartió contra 2ml de hexano. Después de 30 minutos, la capa acuosa se aisló y se secó como anteriormente. Las muestras secas se reconstituyeron en 100µl de metanol acidificado y se ajustó a 1ml con agua acidificada. Las muestras reconstituidas se cargaron en cartuchos equilibrados Oasis HLB (Waters, Mississauga, ON, Canadá), se lavaron con agua acidificada, y se eluyeron con una mezcla acetonitrilo:agua:ácido acético glacial (30:69:1, v/v/v). El eluido se secó en un concentrador CentriVap LABCONCO (Labconco Corporation, Kansas City, MO, EE.UU.). Un control interno blanco se preparó con 100µl de la mezcla control interno deuterado. Muestras de control de calidad (QC, del inglés “Quality Control”) se prepararon mediante la adición de 100µl y 30µl (por separado) de una mezcla que contiene los analitos de interés, cada uno a una concentración de 0,2pg µl⁻¹, a 100µl de la mezcla control interna. Finalmente, las muestras, blancos y QC se reconstituye en una solución acuosa de metanol al 40% (v/v), que contiene 0,5% de ácido acético y 0,1pg µl⁻¹ de cada uno de los estándares de recuperación. Las muestras se sometieron a análisis y cuantificación por UPLC-ES-MS/MS, similar al que se describe en detalle en Ross et al. (2004). Las muestras se inyectaron en una columna ACQUITY UPLC[®] HSS C18 (2.1x100mm, 1,8µm) con una pre-columna ACQUITY HSS C18 VanGuard (2.1x5mm, 1,8µm) y separadas por un gradiente de elución de agua que contiene 0,025% de ácido acético contra un porcentaje creciente de acetonitrilo que contiene 0,025% de ácido acético. En resumen, el análisis utiliza el control de la reacción múltiple (MRM, de sus siglas en inglés “Multiple Reaction Monitoring) en función del software control v4.1 MassLynx (Waters Inc). Las trazas cromatográficas resultantes se cuantifican fuera de línea por el software QuanLynx v4.1 (Waters Inc) en la que cada traza se integra y la relación resultante de las señales (no deuteradas/controles internos) se comparan con una curva de calibración previamente construido para producir la cantidad de analito presente (ng por muestra). Las curvas de calibración se generaron a partir de las señales de MRM obtenidos a partir de soluciones controles basadas en la relación entre el área del pico cromatográfico para cada analito a la del estándar interno correspondiente (Ross *et al.*, 2004). Las muestras de control de calidad, los controles blancos internos y blancos de disolventes también se prepararon y se analizaron a lo largo de cada lote de muestras de tejido. Los resultados se expresan en nanogramos por gramo de peso liofilizado (ng·g⁻¹ peso liofilizado).

III.5. DETERMINACIONES DE LA EXPRESIÓN GÉNICA**III.5.1 Extracción de ARN de raíces**

Previo a la extracción de ARN, todos los productos y materiales fueron tratados para evitar la contaminación por RNAsas. Todos los reactivos de la extracción se prepararon con H₂O milliQ tratada con DEPC (H₂O-DEPC). Así, el agua milliQ se trató a temperatura ambiente, y en agitación, al menos 12 horas con 0,2% de DEPC (dietilpirocarbonato, que inhibe a enzimas como las RNAsas); después se dejó agitar sin el tapón bajo una campana de extracción de gases para eliminar los gases tóxicos que se desprenden con el tratamiento; finalmente se autoclavó a 120°C durante 20 minutos. El material de vidrio y porcelana se esterilizó previamente en horno a 180°C durante al menos 4 horas, mientras que el material de plástico se trató con NaOH 5mM durante 2 horas, pasadas las cuales el material se enjuagó con abundante H₂O-DEPC.

Como se detalló en el capítulo III.3, se tomaron 0,5g de cada mezcla de raíces de cada planta cosechada, e inmediatamente se procedió a su congelación en N₂ líquido, y conservación a -80°C hasta la extracción. Se analiza un mínimo de tres réplicas independientes por tratamiento. Las muestras de raíz, previamente congeladas a -80°C, se maceran con mortero y pistilo de porcelana en N₂ líquido hasta obtener una textura de polvo fino. La extracción de ARN a partir de este macerado se realizó con el “RNeasy Plant Mini Kit” de Qiagen (Valencia, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura III.9):

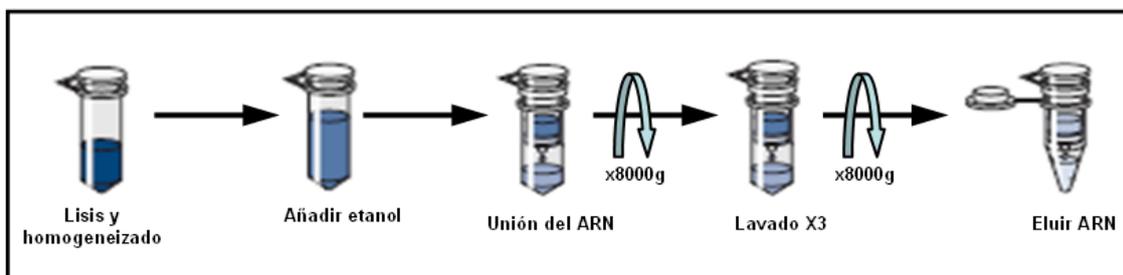


Figura III.9. Extracción de ARN con “RNeasy Plant Mini Kit” de Qiagen.

1. Añadir 450µl de tampón RLT (tampón de lisis que contiene guanidina tiocianato) a la muestra y agitar con vórtex vigorosamente. Al tampón RLT antes de usar hay que añadirle 10µl de β-mercaptoetanol 14,5M/1ml RLT.
2. Incubar a 56 ° C durante 3 minutos.

3. Transferir el lisado a una columna de centrifugación QIAshredder (color lila) colocado en un tubo eppendorf de 2ml, y centrifugar durante 2 minutos a máxima velocidad. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 2ml con cuidado de no resuspender el precipitado celular.
4. Añadir 0,5 volúmenes de etanol (96-100%) al lisado anterior, e inmediatamente mezclar pipeteando sucesivamente. En este paso se deshidratan las moléculas de ácido nucleicos, apelmazándose y no pasando así por el filtro de la columna.
5. Transferir la muestra a la columna RNeasy mini Spin (color rosa) colocada en un tubo eppendorf de 2ml y centrifugar 15 segundos a 8000g. Si el volumen de la mezcla es mayor a 700µl cargar las alícuotas sucesivamente en la columna hasta agotar el volumen total. Tirar el líquido sobrante del tubo.
6. Añadir sobre la columna de centrifugación RNeasy mini Spin 700µl de tampón RW1 (contiene etanol) y centrifugar 15 segundos a 8000g para lavar la columna. Tirar el líquido sobrante del tubo.
7. Añadir 500µl de tampón RPE (preparado a razón de 800µl de etanol 100% por cada 200µl de tampón RPE concentrado) a la columna de centrifugación RNeasy mini Spin para rehidratar la muestra y centrifugar 15 segundos a 8000g. Tirar el líquido sobrante
8. Volver a añadir 500µl de tampón RPE a la columna de centrifugación RNeasy mini Spin y centrifugar 2 minutos a 8000g. Tirar el líquido sobrante del tubo y centrifugar de nuevo la muestra 1 minuto a máxima velocidad para secar bien la muestra.
9. Transferir la columna a un nuevo tubo eppendorf de 1,5ml estéril, y añadir sobre esta 30 – 50µl de H₂O-DEPC (o libre de RNasa) y centrifugar 1 minuto a $\geq 8000g$ para eluir el ARN.

III.5.2 Tratamiento con desoxirribonucleasa (DNAsa I)

Junto con el ARN extraído se encuentran contaminaciones de ADN que pueden interferir en los análisis de expresión por amplificación del ADNc. Para evitarlo, se realizó un tratamiento en columna con desoxirribonucleasa (DNAsa I tal y como indica el protocolo de Qiagen, entre el paso 6 y 7 del protocolo anterior de extracción de ARN (apartado III.5.1). Antes de su utilización se diluye la DNAsa I en 550µl de H₂O DEPC, y se aplican 10µl en la columna RNeasy mini Spin junto con 70µl de tampón RDD, manteniéndose en incubación durante 25 minutos a temperatura ambiente.

III.5.3 Cuantificación del ARN

La cuantificación del ARN se llevó a cabo mediante espectrofotometría a 260nm, usando el NanoDrop-1000 Spectrophotometer UV/Vis (Thermo Scientific) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La relación de absorbancia 260/280 se utiliza para determinar la pureza del ARN, y valores por debajo de 2 indican la presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes con absorbancia ≥ 280 nm.

Como cuantificación adicional y como medida de la integridad del ARN se realizó una separación por electroforesis en gel de agarosa (ver apartado III.5.8). Mediante electroforesis, las moléculas de ARN se separaron en función de su tamaño y la concentración de ARN se estimó comparando la intensidad de las bandas pertenecientes a los ARN ribosomales con la intensidad de las bandas de ADN de concentración conocida, pertenecientes a marcadores de peso molecular estándar (ver apartado III.5.8). Para visualizar las bandas de ARN y ADN se utilizó la tinción con Gel-Red (Biotium) y la visualización de la fluorescencia emitida al someter las moléculas teñidas a luz UV (260nm). La comparación de la intensidad en la fluorescencia de las bandas de ARN problema con las del marcador de peso molecular dio una estimación aproximada de la cantidad de ARN en la muestra (Sambrook *et al.*, 1989).

III.5.4 Transcripción inversa de ARNm (RT)

Mediante transcripción inversa, el ARNm fue transcrito a ADN de cadena simple (ADNc) para su posterior amplificación mediante PCR, obteniéndose así una medida de la expresión genética. Para ello se utilizó el kit “iScript cDNA Synthesis” de Bio-Rad. Se tomaron 2 μ g de cada muestra de ARN, añadiéndole 4 μ l del “iScript reaction mix” que aporta el kit (mezcla única de tampones, cebadores, estabilizantes y dNTPs), 1 μ l de la enzima “MMLV reverso transcriptasa” y H₂O de grado milliQ hasta alcanzar un volumen final de reacción de 20 μ l. La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo mediante la incubación de la mezcla anterior en las siguientes condiciones:

- 5 minutos a 25°C
- 30 minutos a 42°C
- 5 minutos a 85°C

Seguidamente se conservó la solución a 4°C, y a partir de ella se prepararon las diluciones 1/1, 1/10 y 1/50 con H₂O grado milliQ, que se usaron para el análisis de la expresión genética. Este ADNc se conserva a -20°C.

III.5.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación PCR de fragmentos de cadena sencilla de ADN se realizó empleando el “termociclador Eppendorf MasterCycler™ Personal” y la enzima Taq-ADN Polimerasa (Roche). La mezcla de reacción se preparó en tubos de 0,2ml, atendiendo a la composición descrita en la tabla III.6.

Las condiciones de reacción incluyeron una desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación, consistiendo cada uno de ellos en tres fases: una de desnaturalización de 30 segundos a 95°C; otra de hibridación de 1 minuto a la temperatura de alineamiento (T_m) adecuada para cada pareja de cebadores (según la tablas III.7 y III.9); y otra última de polimerización a 72°C de 1 minutos y 30 segundos. Tras los 30 ciclos se realizó una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

Los productos de la reacción se conservaron a 4°C hasta su análisis por observación directa de bandas de ADN en electroforesis en gel de agarosa (apartado III.5.8).

Tabla III.6. Mezcla para la reacción de PCR

	Concentración final	Para 25 μ l (μ l)
ADNc		10
Tampón 10X de Taq-Polimerasa (Roche)	1X	2,5
MgCl ₂ (25mM)	1,5mM	1,5
Tritón x-100 1%	0,1%	2,5
dNTPs (1mM)	0,1mM	2
Cebador 5' (10 μ M)	1 μ M	2
Cebador 3' (10 μ M)	1 μ M	2
Taq-ADN polimerasa (Roche)(5u/ μ l)	1,25u	0,25
H ₂ O-milliQ estéril		2,25

III.5.6 PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

Mediante la metodología qRT-PCR la acumulación de productos amplificados es detectada y medida en la reacción en progreso, es decir, en “tiempo real”, mediante la inclusión en la reacción de una molécula fluorescente de unión al ADN amplificado (colorantes de unión al ADN y/o sondas marcadas fluorescentemente) que informa del aumento en la cantidad de ADN amplificado proporcional con el incremento de la señal fluorescente. En este caso se ha utilizado la metodología iQ SYBR Green de Bio-Rad. La mezcla de reacción (supermix) contiene además de la enzima Taq polimerasa, una fluoresceína de unión al ADN (SYBR green), un tampón

adecuado y estabilizadores específicos de PCR. Además de la mezcla, se añadieron otros componentes hasta alcanzar un volumen final de 21 μ l por reacción. Para cada ADNc la reacción se realizó por triplicado. En definitiva, la mezcla de reacción contenía:

- 10,5 μ l taq-polimerasa “iQ SYBR Green supermix”
- 8,6 μ l H₂O milliQ
- 0,45 μ l Cebador 5' (10 μ M)
- 0,45 μ l Cebador 3' (10 μ M)
- 1 μ l ADNc

La reacción PCR se llevó a cabo en placas de 96 pocillos (Bio-Rad) y cada pocillo contenía un volumen de 19 μ l tomados de los 21 μ l de cada mezcla de reacción anterior. El proceso de amplificación se realizó en el termociclador “iQ5 Real-Time PCR Detection System” (Bio-Rad), el cual está equipado con módulos de detección de fluorescencia, donde la fluorescencia medida refleja la cantidad de producto amplificado en cada ciclo.

Las condiciones de reacción incluyeron una desnaturalización a 95°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación, consistiendo cada uno de ellos en tres fases: una de desnaturalización de 30 segundos a 95°C, otra de hibridación de 30 segundos a la temperatura de alineamiento (T_m) adecuada para cada pareja de cebadores (tablas III.8 y III.10), y otra última de polimerización a 72°C de 30 segundos. Tras los 30 ciclos se realizó una extensión final a 72°C durante 5 minutos. La especificidad del procedimiento de amplificación por qRT-PCR se comprobó con una “curva de fusión (melting curve)” después del último ciclo de la PCR. Esta curva consiste en 70 ciclos de 30 segundos de 60°C a 95°C con una tasa de incremento de 0,5°C/ciclo.

En función de la curva teórica de la amplificación PCR la técnica qRT-PCR se fundamenta en la determinación del valor del ciclo umbral (C_T de sus siglas en inglés = **threshold cycle**), que es el ciclo de la PCR en el cual se comienza a detectar la fluorescencia a partir de un umbral, y este valor C_T está determinado principalmente por la cantidad inicial de ADNc y por tanto con la cantidad de ARN del gen correspondiente que originó el ADNc y por tanto con los niveles de expresión génica. Si hay mayor cantidad de cierto ARN significará un valor alto de ADNc y por tanto un valor C_T bajo, mientras que si hay poca cantidad de ARN, el valor del C_T para la el gen analizado será más alto, ya que se requiere más ciclos de amplificación para que la señal de fluorescencia llegue a ser detectada.

Los niveles relativos de transcripción se calculan usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001), donde además del valor C_T del “gen problema” necesitamos el valor C_T de un gen de expresión constitutiva y estable del organismos a analizar (housekeeping gene), y que en nuestro caso el gen que codifica para el factor de elongación 1α de tomate (*LeEF-1 α* ; X14449) (mostrado en la tabla III.8).

Normalmente los valores de variación en C_T se dan normalizados respecto a una situación experimental control. Para ello, primero se normaliza el C_T tanto del gen “problema” como el gen “constitutivo” con respecto a la situación control elegida, de la siguiente manera:

$$\Delta C_{T(\text{gen problema})} = C_{T(\text{situación tratamiento, gen problema})} - C_{T(\text{situación control, gen problema})}$$

$$\Delta C_{T(\text{gen constitutivo})} = C_{T(\text{situación tratamiento, gen constitutivo})} - C_{T(\text{situación control, gen constitutivo})}$$

Una vez normalizados los resultados respecto a una situación control elegida, se normalizan los incrementos en la expresión del gen problema respecto a la expresión del gen constitutivo, y para ello, y usando los incrementos calculados anteriormente, se calcula el incremento del gen problema respecto al gen constitutivo:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{gen problema})} - \Delta C_{T(\text{gen constitutivo})}$$

Y finalmente, con cada valor $\Delta\Delta C_T$ se calcula el valor de expresión relativa a la situación control elegida, usando la siguiente operación matemática:

$$2^{-\Delta\Delta CT} = \text{Relación de expresión normalizada}$$

El resultado obtenido es veces de incremento (o disminución) en los niveles de expresión del gen problema en el tratamiento ensayado en relación a la situación experimental control y normalizada la expresión en referencia al gen constitutivo.

En todos los experimentos qRT-PCR se usaron ADNc de tres réplicas biológicas distintas por tratamiento y cada PCR se realizó por triplicado (tres réplicas técnicas).

III.5.7 Cebadores utilizados y diseño de los mismos

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de PCR fue, en su mayor parte, obtenida de referencias bibliográficas. En otros casos, el diseño de los oligonucleótidos se realizó con ayuda del programa NetPrimer, a partir de la secuencia de los genes en cuestión, y en función de la finalidad de la amplificación. Los cebadores de genes de tomate (*S. lycopersicum*) para PCR semicuantitativa se muestran en la tabla III.7 y los usados en qRT-PCR en la tabla III.8. Los cebadores de genes del hongo micorrícico arbuscular *G. intraradices* para PCR semicuantitativa se muestran en la tabla III.9 y los utilizados para qRT-PCR en la tabla III.10.

Tabla III.7. Cebadores de genes de tomate para PCR semicuantitativa

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Nombre y referencia
EFα1-F	GCGTTGAGACTGGTGTGAT	54	<i>LeEFα1</i> (Martín-Rodríguez <i>et al.</i> , 2010)
EFα1-R	GATGATGACCTGGGCAGTG		
LePT ₄ -F	GAAGGGGAGCCATTTAATGTGG	60	<i>LePT₄</i> (Nagy <i>et al.</i> , 2005)
LePT ₄ -R	CCATCTTGTGTGATTGTTGTAC		

Tabla III.8. Cebadores de genes de tomate para qRT-PCR

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Nombre y referencia
EFα1-F	GATTGGTGGTATTGGAAGCTGTC	60	<i>LeEFα1</i> (Martín-Rodríguez <i>et al.</i> , 2010)
EFα1-R	AGCTTCGTGGTGCATCTC		
LePT ₄ -F	GAAGGGGAGCCATTTAATGTGG	65	<i>LePT₄</i> (Nagy <i>et al.</i> , 2005)
LePT ₄ -R	ATCGCGGCTTGTTTAGCATTTC		
ETR3-F	AGGGAACCACTGTCACGTTTG	60	<i>LeETR3 (NR)</i> (Kevany <i>et al.</i> , 2008)
ETR3-R	CTCTGGGAGGCATAGGTAGCA		
ETR4-F	GGTAATCCCAAATCCAGAAGGTTT	60	<i>LeETR4</i> (Kevany <i>et al.</i> , 2008)
ETR4-R	CAATTGATGGCCGCAGTTG		
ETR6-F	CAATTGATGGCCGCAGTTG	60	<i>LeETR6</i> (Kevany <i>et al.</i> , 2008)
ETR6-R	CAATTGATGGCCGCAGTTG		
CPS-F	GATCAATGGGAGACGGAGAA	60	<i>LeCPS</i> (García-Garrido <i>et al.</i> , 2010)
CPS-R	TTGTTTCGCAATCCACTCAAG		
GA3ox1-F	TCACTGTCCCTCCAATACCC	60	<i>LeGA3ox1</i> (García-Garrido <i>et al.</i> , 2010)
GA3ox1-R	ATCGTGTTTCGGTTTACGACC		
GA3ox2-F	GATCATAAATTTGTCATGGATAC	60	<i>LeGA3ox2</i> (Serrani <i>et al.</i> , 2010)
GA3ox2-R	TGTTTCCATATGGTTAAGTAATC		
GA20ox1-F	CTCATTCTAATGCTCATCGT	60	<i>LeGA20ox1</i> (Serrani <i>et al.</i> , 2010)
GA20ox1-R	TGAGATGATTCTTTCTTAGCG		
GA20ox2-F	TTCCATATTCTACCCTACAAG	60	<i>LeGA20ox2</i> (Serrani <i>et al.</i> , 2010)
GA20ox2-R	TCATCGCATTACAATACTCTT		
GA20ox3-F	AGCCAAATTATGCTAGTGTTAC	60	<i>LeGA20ox3</i> (Serrani <i>et al.</i> , 2010)
GA20ox3-R	TTTTATGAGATTTGTGTCAACC		
GA20ox4-F	GATGATAAATGGCACTCTATTC	60	<i>LeGA20ox4</i> (IMBCP)
GA20ox4-R	TGACTTCCTTGTTCTTCTACAG		

GA2ox1-F	GGCATGTAAGATATTAGAATTGA	60	<i>LeGA2ox1</i> (Serrani <i>et al.</i> , 2010)
GA2ox1-R	TTAATCCGTAGTAGAGAATCAGA		
GA2ox2-F	ATTAAGATCCAATAACACTTCG	60	<i>LeGA2ox2</i> (Serrani <i>et al.</i> , 2010)
GA2ox2-R	TCTTGATTTACACTATTTG		
GA2ox3-F	GACCCTTCTACTTTCAGCTC	60	<i>LeGA2ox3</i> (Serrani <i>et al.</i> , 2010)
GA2ox3-R	AAATTGAATTGTCTTCTATCCA		
GA2ox4-F	ATGGAAGGAAAAGACAGTTTA	60	<i>LeGA2ox4</i> (Serrani <i>et al.</i> , 2010)
GA2ox4-R	CTTTTCTCAAATAGGACCAAC		
GA2ox5-F	GATCACTTACCAATAATCAACAG	60	<i>LeGA2ox5</i> (Serrani <i>et al.</i> , 2010)
GA2ox5-R	CGTCATGGTTTACGACTTTA		
GAST1-F	CAACAACAGAGAAATAACCAAC	60	<i>LeGAST1</i> (IBMCP)
GAST1-R	TTATACGATGTCTTTGAACACC		
GAI-F	TGATGCGACTATACTTGATATAAG	60	<i>LeGAI</i> (DELLA)
GAI-F	TGATGCGACTATACTTGATATAAG		(IBMCP)

Tabla III.9. Cebadores del hongo *G. irregulare* para PCR semicuantitativa

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Nombre y referencia
RM-F	TGTTAATAAAAATCGGTGCGTTGC	60	<i>Gi18s</i> (González-Guerrero <i>et al.</i> , 2005)
RM-R	AAAACGCAAATGATCAACCGGAC		

Tabla III.10. Cebadores del hongo *G. irregulare* para qRT-PCR

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Nombre y referencia
GinEF-F	GCTATTTTGATCATTGCCGCC	58	<i>GinEF</i> (Benabdellah <i>et al.</i> , 2009)
GinEF-R	TCATTAACCGTTCTTCCGACC		
GinGS-F	CCTCAAGTCCCTATTATTGTTCTG	58	<i>GinGS</i> (Gomez <i>et al.</i> , 2009)
GinGS-R	ACGATAATGAGCTTCCACAACGT		

III.5.8 Electroforesis en gel de agarosa

Como se comentó en el apartado III.5.3, tanto la calidad como la cantidad del ARN total extraído se comprobó mediante electroforesis horizontal en gel sumergido de agarosa al 1% (p:v), preparado en tampón TBE 1X con H₂O-DEPC. El tampón TBE 1X proviene de una dilución con H₂O destilada de un stock preparado TBE 5X (ver tabla III.11). La electroforesis se realizó a 50V durante 45 - 60 minutos. Las muestras se prepararon mezclándolas con tampón de carga Orange G 10X a razón de 10:1 (v:v) (ver tabla III.12), que para ARN el tampón de carga contenía 0,5% de GelRed Nucleic Acid stain (GelRed) (Biotium) (0,5µl de GelRed 10000X en 1000µl de tampón de carga Orange G 10X). De forma paralela se carga 4µl del marcador DNA Molecular Weight Marker III de 0,56 – 21,2Kpb (Roche) con la misma proporción de tampón de carga con GelRed. Los geles de agarosa se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador bajo luz UV (260nm) de BioRad (Figura III.10).

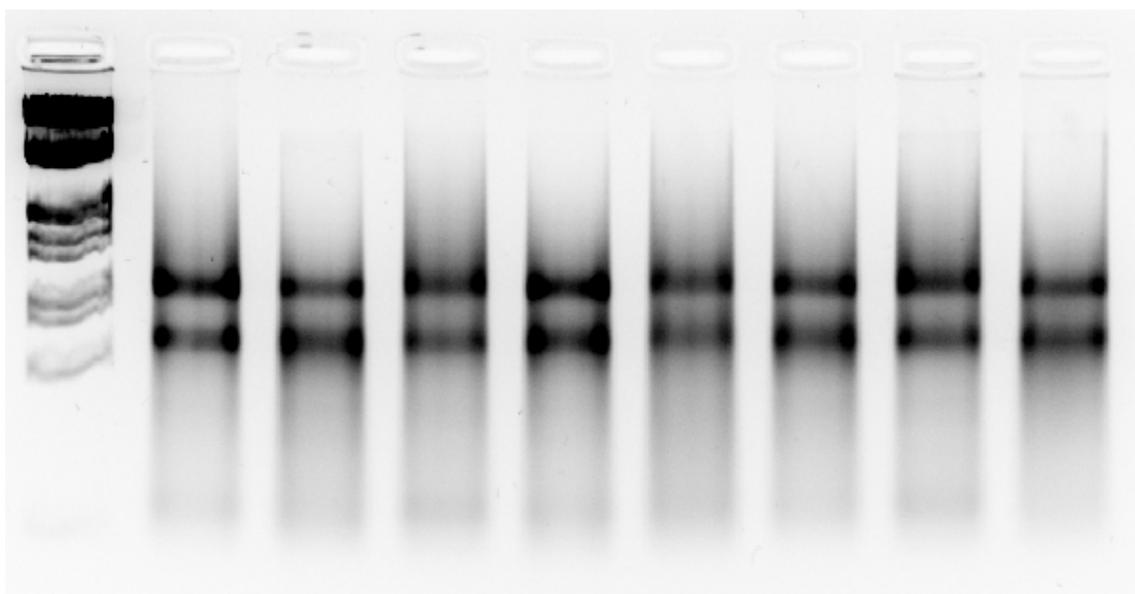


Figura III.10. Ejemplo de electroforesis en gel de agarosa de muestras de ARN extraídas en paralelo con el marcador DNA Molecular Weight Marker III.

Los productos de PCR semicuantitativa se analizaron también mediante electroforesis horizontal en gel sumergido de agarosa preparado en tampón TBE 1X. La concentración de agarosa usada dependió del tamaño de los fragmentos a separar, como se indica en la tabla III.13. Las muestras se prepararon mezclando 20 μ l de la reacción de PCR con 5 μ l de tampón de carga Orange G 10X. Para comprobar el tamaño del amplificado, se analizó de forma paralela un marcador de peso molecular adecuado con la misma proporción de tampón de carga. Habitualmente se usó el marcador Real Escala N°2 de 100 – 1250pb (Durviz). En este caso de la separación de fragmentos de ADN amplificados por PCR, y una vez resuelta la electroforesis, el gel se tiñó por inmersión en una solución de Gel-Red 10X (40 μ l Gel-Red 10000X en 400ml H₂O destilada) durante 30 minutos y a continuación se visualizaron y fotografiaron las diferentes bandas de ADN en un equipo Gel-Doc (Bio-Rad) que lleva acoplado un transiluminador de luz UV (260nm) y un sistema de fotografiado de geles.

Tabla III.11. Tampón TBE 5X.

	Concentración (g/l)	
Tris	450mM	54
Na ₂ EDTA	12,5mM	4,7
BO ₃ H ₂	450mM	27
El pH se lleva a 8,2		

Tabla III.12. Tampón de carga Orange G 10X.

	Concentración	Para 20ml
Glicerol	450mM	10ml
EDTA	12,5mM	74mg
OrangeG	450mM	0,1mg
Se conserva a 4°C		

Tabla III.13. Concentración de agarosa adecuada según rangos de separación de fragmentos de ADN.

Rango de separación (Kb)	% agarosa (p:v)
5 – 60	0,3
1 – 20	0,6
0,8 – 10	0,7
0,5 – 7	0,9
0,5 – 6	1,2
0,2 – 3	1,5
0,1 – 2	2

III.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

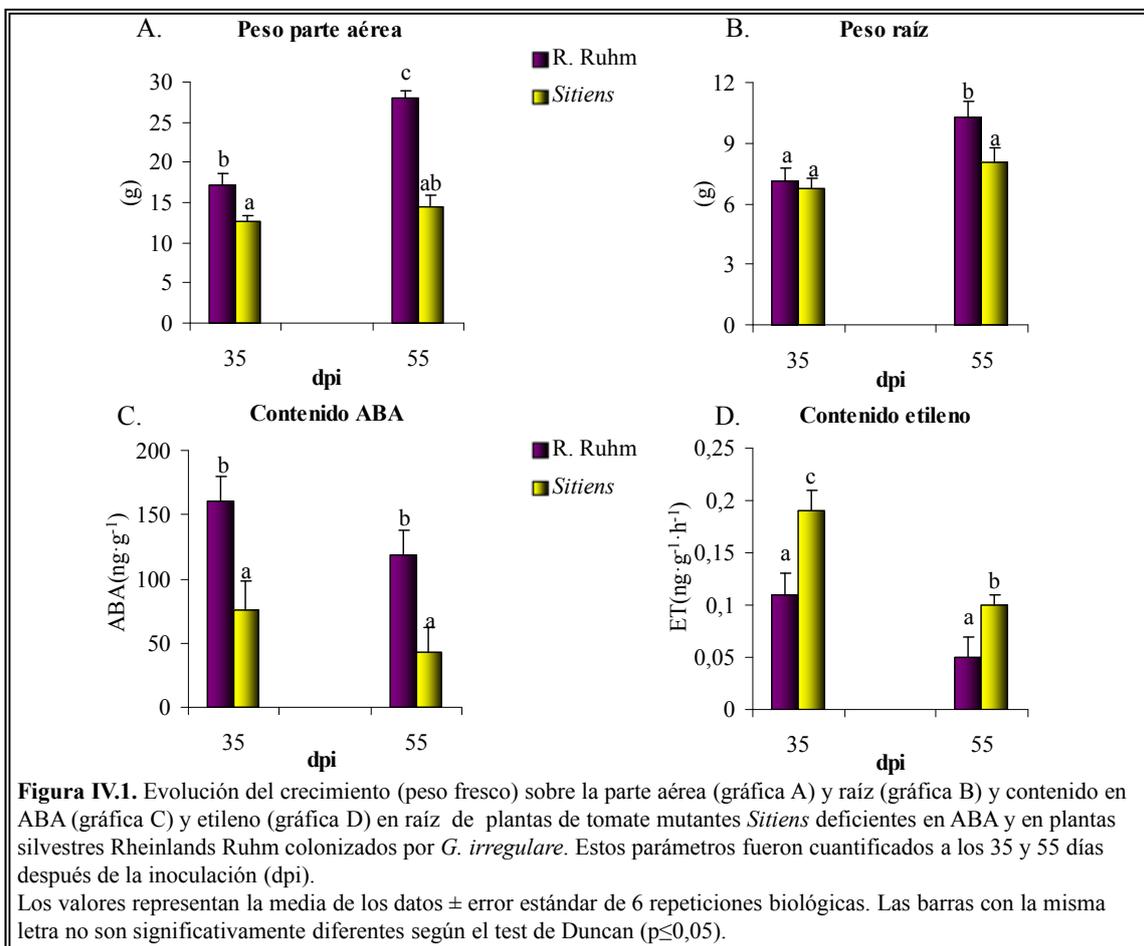
Cada ensayo se repitió al menos dos veces, obteniendo resultados similares. Se utilizaron para el análisis estadístico datos de al menos tres replicas biológicas diferentes de cada tratamiento. Los resultados de todas las gráficas y tablas presentadas en la sección de resultados de esta tesis doctoral se sometieron a un análisis ANOVA de una vía, bajo el test de rango múltiple de Duncan con un nivel de significación de $p \leq 0,05$. Se utilizó para ello el programa estadístico spss. Las diferencias significativas encontradas se indican con letras diferentes en los distintos tratamientos.

Además, en algunos ensayos para analizar las interacciones en los parámetros de micorrización de las plantas, el genotipo de estas y los tratamientos aplicados, se realizó un análisis de la varianza de dos vías (Two-Way ANOVA), bajo el test rango múltiple de Duncan y la probabilidad de significancia se estableció en $p \leq 0,05$. Para ello se utilizó la siguiente aplicación disponible en la web: <http://vassarstats.net/anova2u.html>.

IV. RESULTADOS

IV.1. IMPORTANCIA DEL ÁCIDO ABSCÍSIICO (ABA) EN EL PROCESO DE FORMACIÓN DE LA SIMBIOSIS MICORRIZA ARBUSCULAR

Si bien el proceso de formación de la simbiosis micorriza arbuscular es aún bastante desconocido a nivel de señalización molecular, también es cierto que cada vez son más los estudios que aportan conocimiento sobre la cascada de transducción de señales activada en las raíces de las plantas tras el reconocimiento del hongo micorrícico, y las consiguientes adaptaciones morfológicas de la raíz para recibirlo y acomodarlo (Parniske, 2004; Parniske, 2008). Tras la penetración del hongo en la raíz, los eventos bioquímicos, morfológicos y fisiológicos que se producen en las raíces de las plantas son bastante desconocidos, si bien existen suficientes evidencias para sugerir que las alteraciones en la homeostasis de las hormonas vegetales es un factor implicado en el proceso de desarrollo y formación de la micorriza (Beyrle, 1995; Ludwig-Müller, 2000; Herrera Medina *et al.*, 2003; Hause *et al.*, 2007).



Los niveles de hormonas vegetales, tales como citoquininas, jasmonatos, auxinas, componentes relacionados con auxinas y el ABA, sufren cambios tras el establecimiento de la micorrización (Hause *et al.*, 2007), sugiriendo una alteración en el balance hormonal en las plantas micorrizadas. Con respecto al ABA, los resultados de la medida de niveles endógenos de esta hormona en plantas micorrizadas con respecto a plantas no micorrizadas muestran cierto grado de contradicción, ya que en raíces de *Zea mays* y *Glycine max* se detectó un incremento en los niveles de ABA (Danneberg *et al.*, 1993; Bothe *et al.*, 1994; Meixner *et al.*, 2005), mientras que en raíces micorrizadas de *Bouteloua gracilis* este incremento no se apreció (Allen *et al.*, 1982). El incremento de los niveles de ABA en algunas plantas micorrizadas puede deberse a que, tal y como se ha explicado en el apartado II.4, el hongo micorrícico tiene cierta capacidad de producir ABA (Esch *et al.*, 1994).

En estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio se observó que el ABA es un factor necesario para una correcta micorrización. En estos estudios se usaron plantas mutantes *Sitiens*, que están afectadas en el gen que codifica la enzima aldehído-oxidasa específica de ABA, y que en consecuencia tienen disminuida la capacidad de biosíntesis de esta hormona, no superando en ocasiones el 8% de los niveles de ABA del cultivar silvestre Rheinlands Ruhm (Herde *et al.*, 1999). Los resultados mostraron que estas plantas mutantes tenían una menor colonización que las plantas silvestres y una menor abundancia arbuscular, siendo la mayoría de los arbusculos de las plantas *Sitiens* estructuras en formación (o degradación) con pocas ramificaciones, a diferencia de los arbusculos del cultivar silvestre, donde la mayoría son maduros y con muchas ramificaciones (Herrera-Medina *et al.*, 2007).

En este apartado, y continuando con la línea de investigación iniciada en el grupo, se presentan resultados de los experimentos realizados con objeto de identificar el papel y la importancia del ABA durante la formación de la Micorriza Arbuscular. En concreto se describen tres tipos de resultados. En primer lugar se muestra el análisis de la micorrización en distintas plantas mutantes alteradas en el metabolismo del ABA, para continuar con los resultados de los experimentos de análisis de las alteraciones del proceso infectivo tras aplicación exógena de ABA y/o el inhibidor de la síntesis de ABA tungstato sódico, y finalizar con un estudio analítico de la concentración de ABA y sus derivados en la raíz de plantas micorrizadas.

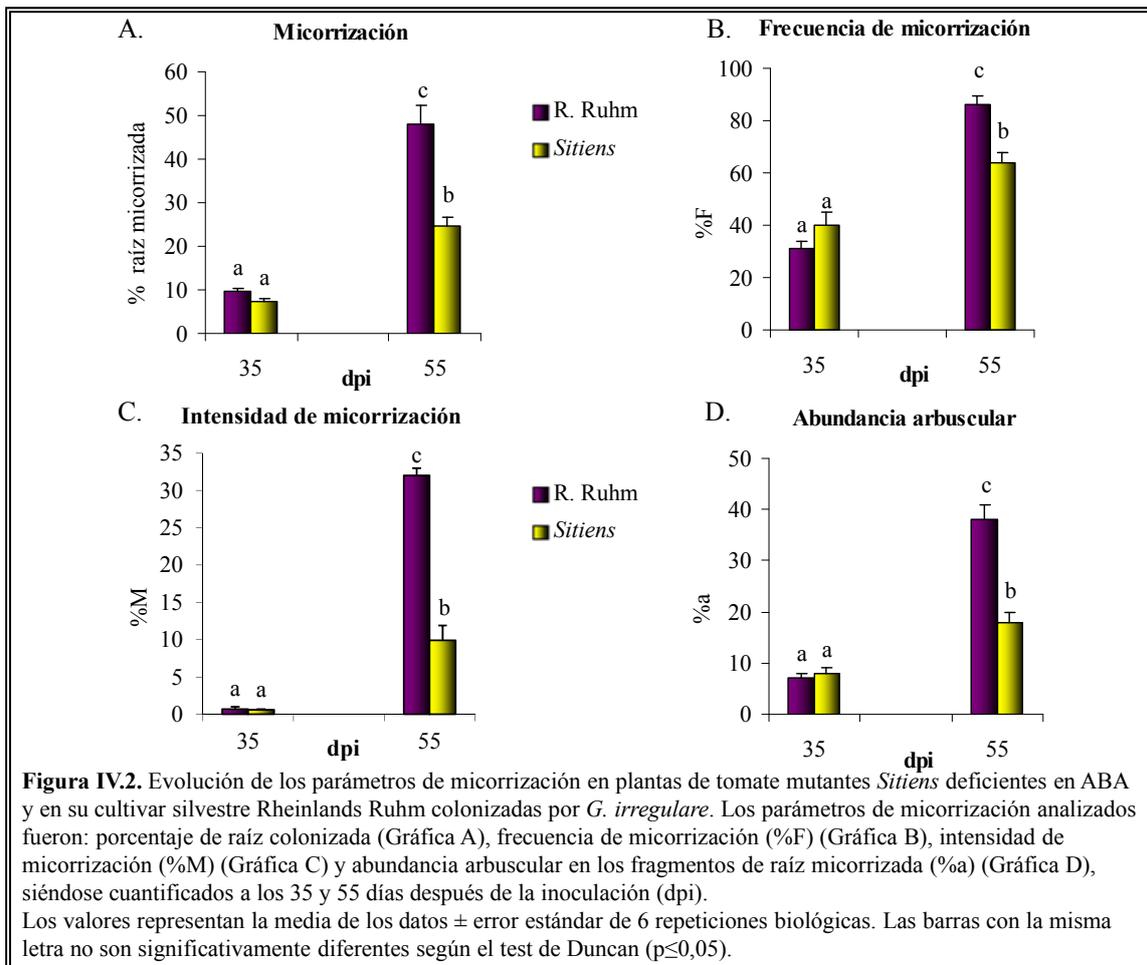
IV.1.1 Análisis de la micorrización en diferentes mutantes de tomate deficientes en la biosíntesis de ABA

Para investigar la posible correlación entre el grado de micorrización y el contenido de ABA en raíces, se realizaron experimentos de análisis de la colonización por el hongo micorrícico *G. irregulare* (Stockinger *et al.*, 2009b), tanto de plantas de tomate silvestres como mutantes deficientes en la síntesis de ABA. En concreto se utilizó el mutante *Sitiens*, que como se mencionó anteriormente contiene tan solo un 8% de ABA respecto a su cultivar silvestre Rheinlands Ruhm, además del mutante *Notabilis*, con unos niveles de producción de ABA del 40% respecto a su cultivar silvestres Ailsa Craig. En los experimentos realizados, las plantas se cosecharon a diferentes tiempos de cultivo para cuantificar tanto la evolución de la micorrización, como el contenido en ABA libre y etileno en las raíces. El análisis comparativo de los diferentes mutantes deficientes en la biosíntesis de ABA muestra tanto diferencias cuantitativas como cualitativas en el patrón de colonización.

En el caso de mutantes *Sitiens*, la limitación en la producción de ABA conlleva un fenotipo de limitación del crecimiento. Por tanto, en este experimento, así como en el resto de los realizados con este mutante, su desarrollo estuvo limitado como parte de su fenotipo. La deficiencia de ABA afecta negativamente al crecimiento de la planta y a su capacidad de adaptación a diversos estreses, afectándose sobre todo la parte aérea de la planta en ambas cosechas, si bien también el peso de la raíz estuvo deprimido a tiempos más largos (Gráficas A y B, figura IV.1).

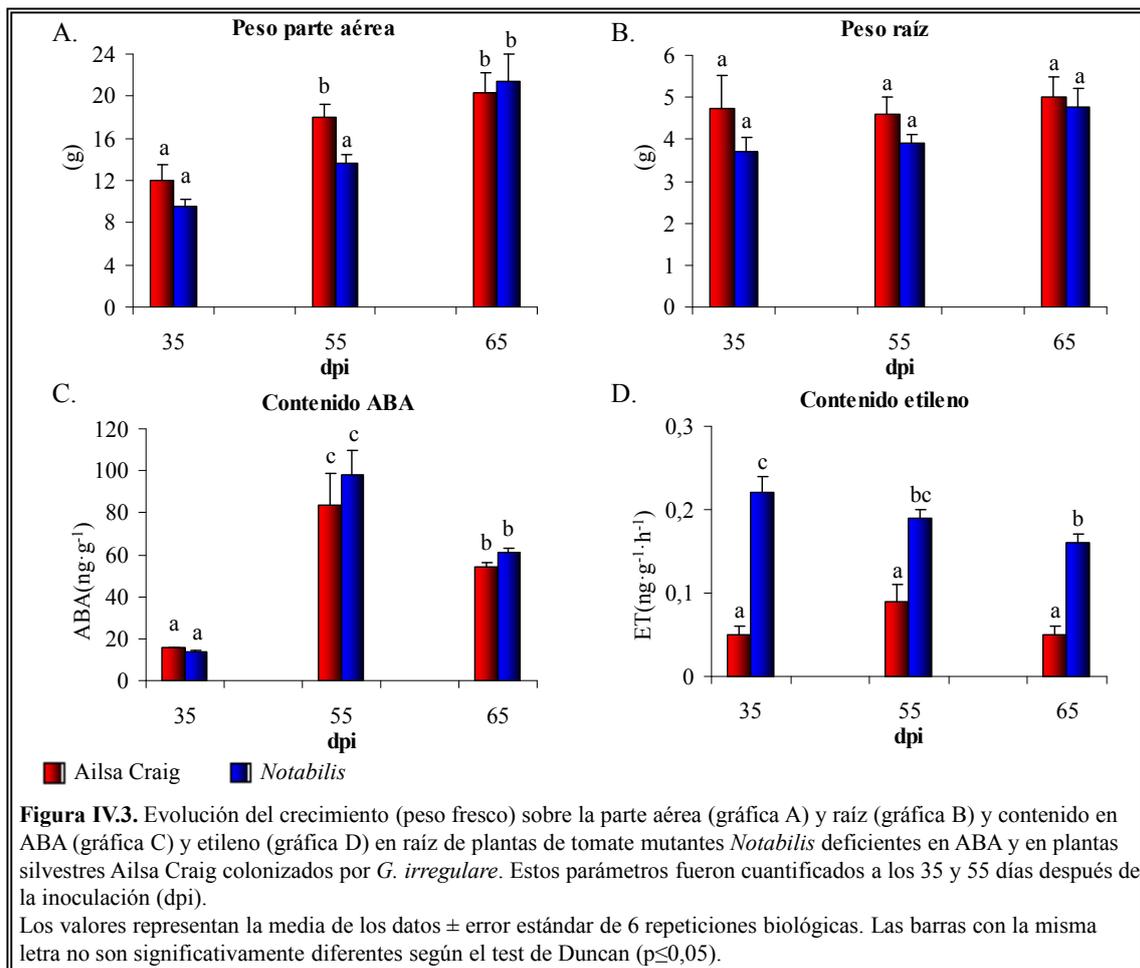
La cuantificación del grado de micorrización de la raíz en lupa binocular mostró que los mutantes *Sitiens* poseen el mismo grado de micorrización que las plantas silvestres en una primera cosecha, a los 35 días después de la inoculación (dpi), aunque en la segunda cosecha, a los 55 dpi, estos mutantes mostraron una gran reducción en el porcentaje de raíz micorrizada, descendiendo más de un 50% con respecto a su silvestre (Gráfica A, figura IV.2). En un estudio más exhaustivo del desarrollo de la micorrización mediante determinación de los parámetros de micorrización al microscopio, se observó que ocurría algo parecido. No hubo diferencias significativas en el valor de los parámetros de micorrización entre plantas mutantes *Sitiens* y silvestres en la primera cosecha. Sin embargo, tanto la intensidad de micorrización (%M) que descendió casi un 70% con respecto a su silvestre (Gráfica C, figura IV.2), como la abundancia de arbusculos en fragmentos de raíces micorrizadas (%a) que disminuyó más de un 50% (Gráfica D, figura IV.2), sufrieron una reducción muy importante en los mutantes respecto al cultivar

silvestre en el segundo tiempo de cosecha. La frecuencia de micorrización (%F) solo disminuyó en la segunda cosecha en un 25% respecto al valor de plantas silvestres (Gráfica B, figura IV.2). Estas limitaciones en los parámetros de micorrización se correlacionan con la incapacidad del mutante en la biosíntesis de ABA. La concentración de dicha hormona fue cuantificada en las raíces de las plantas, y se observó que el mutante *Sitiens* contenía tan solo el 16% y 21% de los niveles de ABA medidos en raíces de su silvestre Rheinlands Ruhm, a los 35 y 55 dpi respectivamente (Gráfica C, figura IV.1).



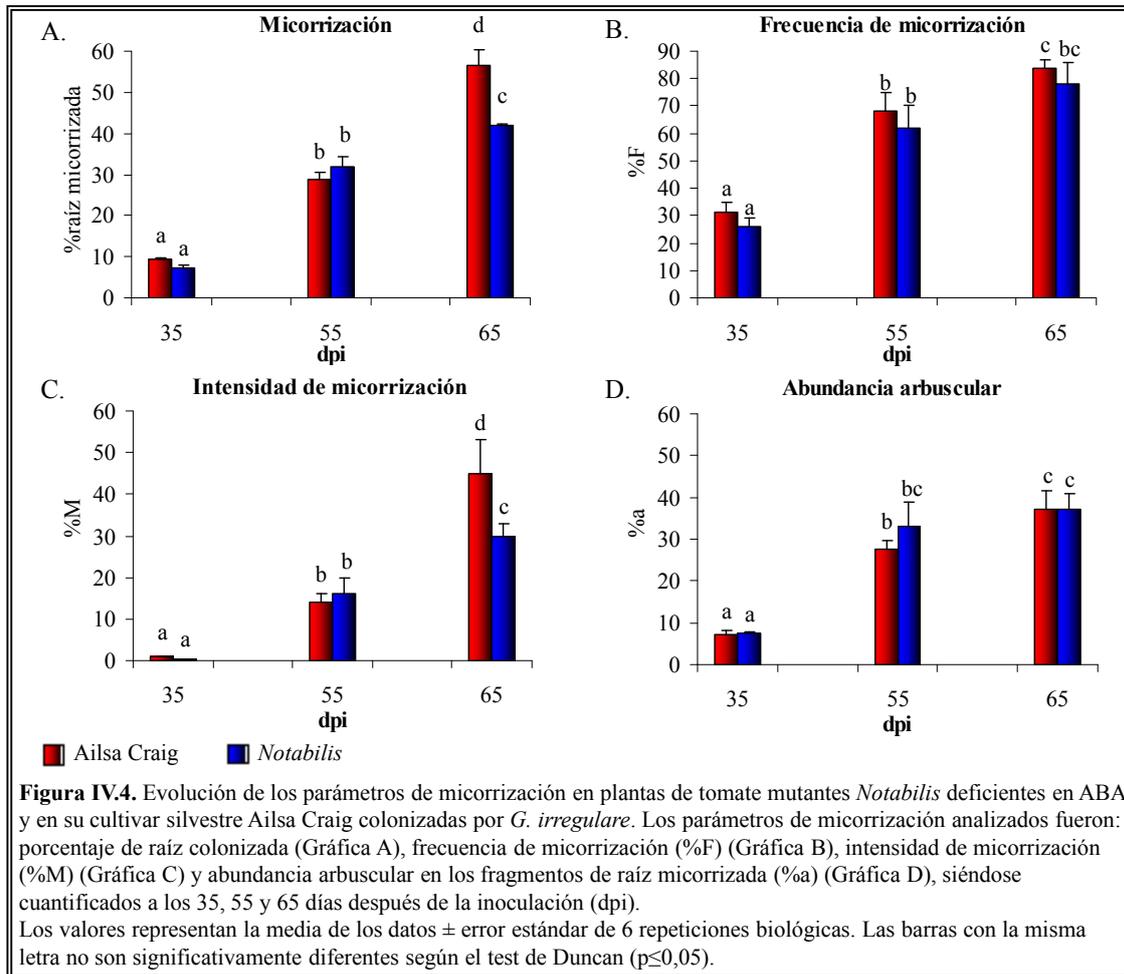
El mismo tipo de experimentos realizados con plantas mutantes *Sitiens* se ejecutaron con los mutantes *Notabilis*. Las plantas mutantes *Notabilis* no mostraron una limitación en su crecimiento, como ocurrió con *Sitiens*, manteniendo un peso fresco de raíz similar al de plantas silvestres, y observándose un leve descenso de peso de parte aérea tan solo en la segunda cosecha (Gráficas A y B, figura IV.3). Además, bajo nuestras condiciones experimentales, estos mutantes

mantuvieron niveles de ABA en sus raíces similares a los niveles detectados en las raíces de plantas silvestres (Gráfica C, figura IV.3). En consonancia con lo anterior, tampoco se detectó una afectación grave en su capacidad de micorrización, siendo el porcentaje de raíz micorrizada igual que en plantas silvestres, tanto en la primera (35 dpi) como segunda cosecha (55 dpi), y disminuyendo solo un 26% en la tercera cosecha (65 dpi) (Gráfica A, figura IV.4). En una observación más detallada al microscopio, determinando los parámetros de micorrización, observamos que la intensidad de micorrización disminuye un 33% tan solo en la última cosecha (65 dpi) (Gráfica C, figura IV.4). Tanto el valor de la frecuencia de micorrización como del nivel de porcentaje de arbusculos en las raíces colonizadas del mutante *Notabilis* no difieren con el valor mostrado para estos parámetros en el silvestre Ailsa Craig (Gráficas B y D, figura IV.4).



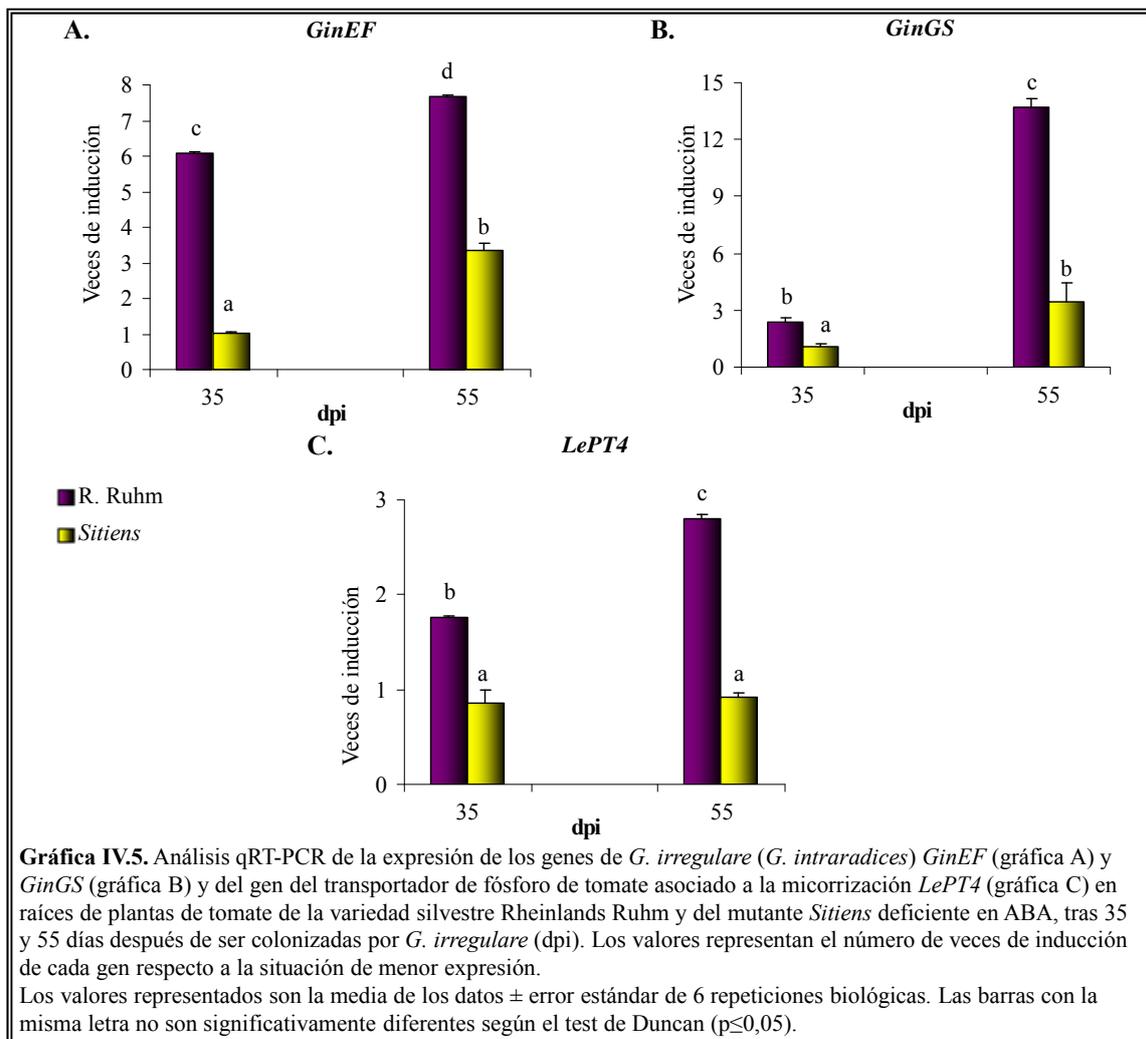
La cuantificación de la acumulación de etileno en raíces de plantas micorrizadas, silvestres y mutantes en la biosíntesis de ABA, *Sitiens* y *Notabilis*, mostró que la concentración de etileno en

raíz fue superior en un 50% o más en los fenotipos mutantes en biosíntesis de ABA respecto a sus respectivos cultivares silvestres, siendo similar ese incremento en *Sitiens* (Gráfica D, figura IV.1) y en *Notabilis* (Gráfica D, figura IV.3)



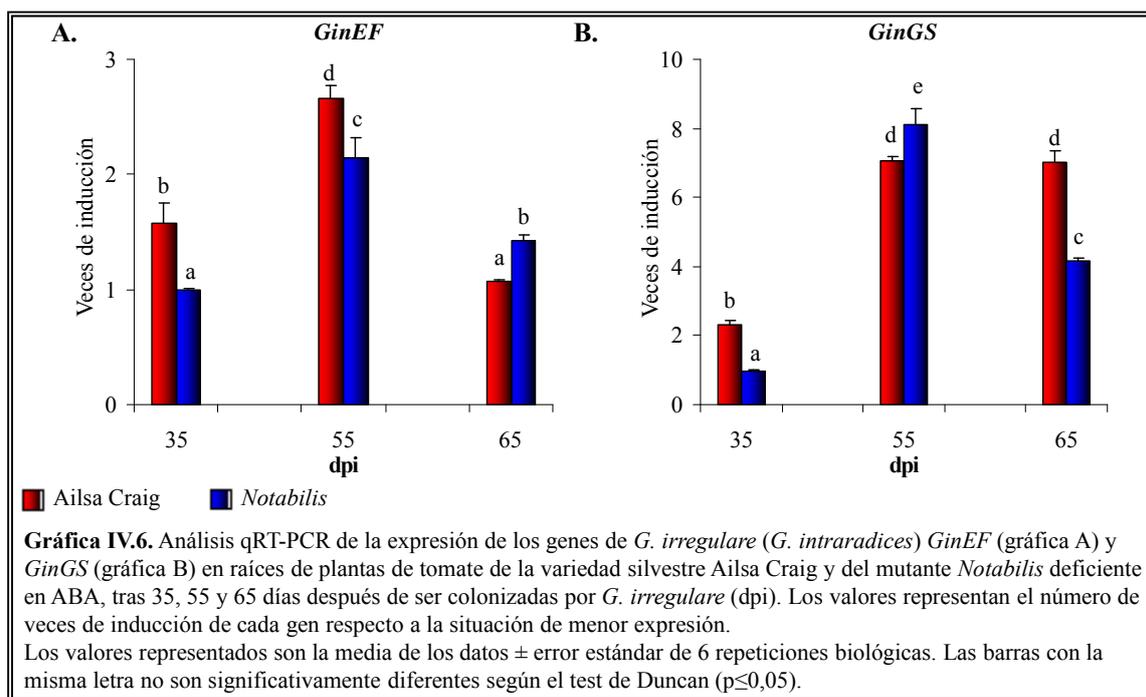
Se llevaron a cabo experimentos de análisis de expresión génica por qRT-PCR con ADNc sintetizado a partir del ARN de plantas de tomate mutantes *Sitiens* y de su cultivar silvestre *Rheinlands Ruhm*. El objeto de estos experimentos fue determinar a nivel molecular el desarrollo de la micorrización, usando la expresión de genes fúngicos y vegetales como medida tanto del desarrollo del hongo como de la actividad arbuscular. La tasa de colonización por el hongo se determinó a nivel molecular cuantificando la acumulación de ARNm para el gen codificante del factor de elongación 1 α de *G. intraradices* (*G. irregulare*) (gen *GinEF*) (Gráfica A, figura IV.5). Para examinar tanto la presencia como la funcionalidad de los arbusculos en las raíces micorrizadas se cuantificó la cantidad de transcrito de los genes glutamina sintasa de *G.*

intraradices (*G. irregulare*) (gen *GinGS*) y del transportador de fosfato específico de arbusculos de plantas de tomate *LePT4*. Ambos genes han sido descritos por otros investigadores como de expresión asociada a las células con arbusculos (Nagy *et al.*, 2005; Gomez *et al.*, 2009) (Gráfica B y C, figura IV.5). El nivel de expresión se normalizó respecto a la cantidad de ARNm del gen de tomate factor de elongación 1 α , *LeEFa1*. El cambio inducido en la expresión génica, tanto de *GinEF*, *GinGS* como de *LePT4*, se calculó usando el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$, mostrándose el valor en veces de inducción.



En el experimento con plantas *Sitiens* y en ambas cosechas, los niveles de expresión de los genes *GinEF*, *GinGS* y *LePT4* fueron más altos en las raíces de las plantas silvestres inoculados con *G. irregulare* que en las raíces de las plantas mutantes *Sitiens* (Gráficas A, B y C, figura IV.5). Concretamente, el gen *GinEF* tiene un incremento en su expresión en plantas silvestres

con respecto a los mutantes *Sitiens* de 6 y 2,3 veces, a los 35 y 55 dpi respectivamente, y tanto las raíces de plantas silvestres como del mutante muestran una elevación en la expresión de este gen en la segunda cosecha con respecto a la primera (Gráfica A, figura IV.5). La expresión del gen *GinGS* también muestra un incremento en raíces de plantas silvestres con respecto a raíces de plantas mutantes *Sitiens*, siendo dicho incremento de 2,3 veces en la primera cosecha y de 4 veces en la segunda cosecha. Tanto las plantas mutantes como silvestres incrementan la expresión en raíz del gen *GinGS* en la segunda cosecha en relación a la primera, si bien mientras que el cultivar silvestre incrementa su expresión casi 6 veces, el mutante *Sitiens* solo lo hace en 3,4 veces (Gráfica B, figura IV.5). Por último, el análisis de la expresión del gen *LePT4* muestra que las raíces micorrizadas de plantas silvestres tienen un incremento en la acumulación del transcrito de 2 y 3 veces a los 35 y 55 dpi respectivamente, respecto a la expresión detectada en plantas mutantes *Sitiens*. Además, mientras que en las raíces de las plantas silvestres este gen incrementa su expresión en 1,6 veces de la primera a la segunda cosecha, las raíces de los mutantes *Sitiens* mostraron similares niveles de expresión del gen *LePT4* en ambos tiempos de cosecha (Gráfica C, figura IV.5).



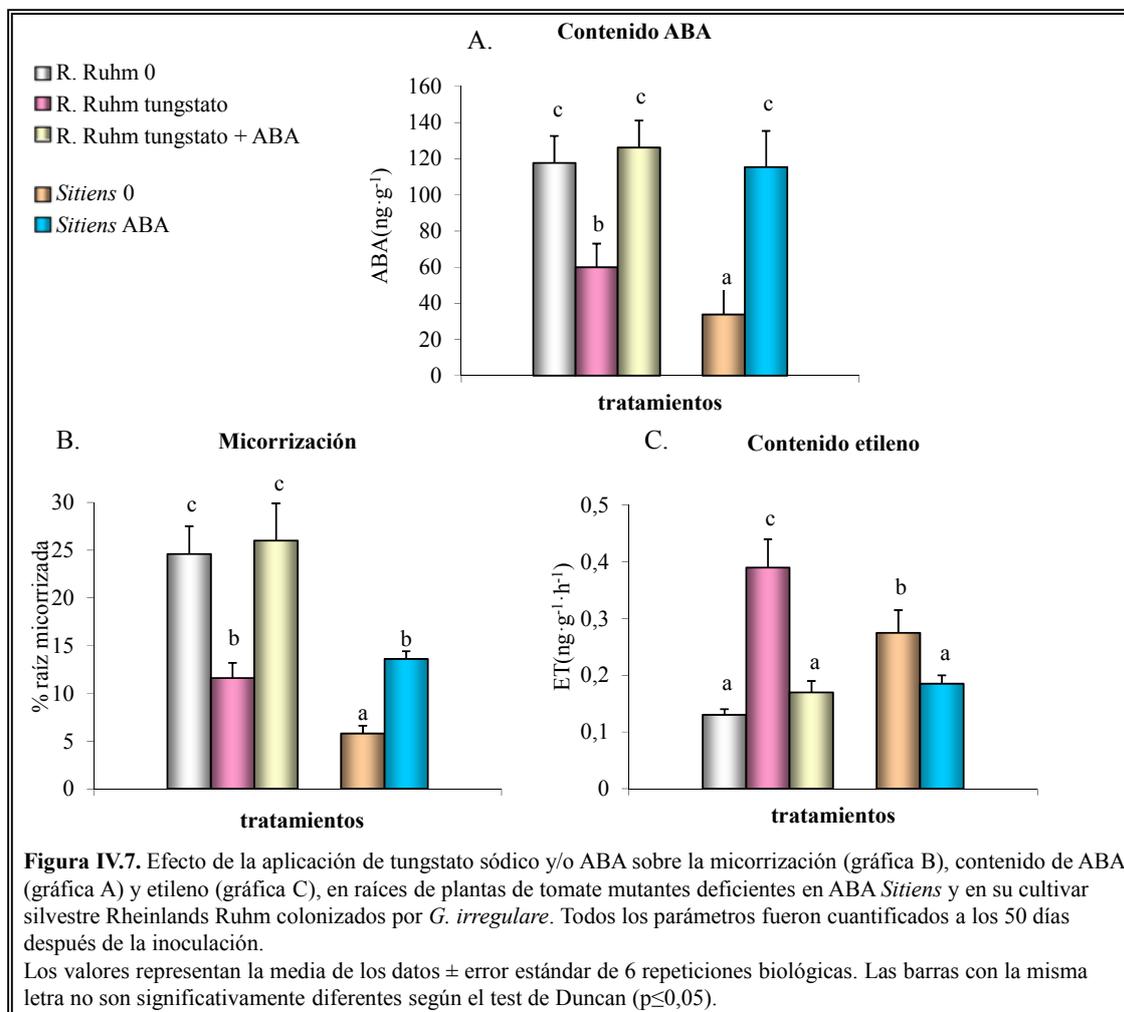
También se estudió la expresión por qRT-PCR en plantas de tomate mutantes *Notabilis* y su silvestre Ailsa Craig a los 35, 55 y 65 dpi. La tasa de colonización por el hongo se determinó

cuantificando la acumulación de ARNm para el gen *GinEF* de *G. intraradices* (*G. irregulare*) en las raíces de las plantas de tomate (Gráfica A, figura IV.6). Y, al igual que en el caso anterior, se cuantificó a nivel molecular la acumulación de transcrito del gen *GinGS* de *G. intraradices* (*G. irregulare*) como medida de la presencia y funcionalidad de los arbusculos en la raíz micorrizada. El nivel de expresión se normalizó respecto a la cantidad de ARNm del gen de tomate factor de elongación 1α , *LeEFA1*. El cambio inducido en la expresión génica tanto de *GinEF* como de *GinGS* en las raíces de estas plantas se calculó usando el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$, mostrándose el valor en veces de inducción. La expresión del gen *GinEF* en plantas *Notabilis* fue menor que en plantas silvestres en las dos primeras cosechas (35 y 55 dpi), aunque en la última cosecha se invierte la tendencia y el mutante *Notabilis* muestra una mayor expresión *GinEF*. En ambos casos, tanto cuando hubo descenso o incremento de los niveles de expresión respecto al cultivar silvestre, las diferencias en la expresión fueron menores de 1,5 veces (Gráfica A, figura IV.6). El mutante *Notabilis* muestra una reducción de aproximadamente el 50% de la expresión cuantificada en plantas silvestres para el gen específico de arbusculos *GinGS*, tanto en la primera como en la tercera cosecha, no afectándose la expresión en la segunda cosecha (Gráfica B, figura IV.6). Tanto para el gen *GinEF* como para el gen *GinGS*, la reducción que sufre el mutante *Notabilis* con respecto a su cosechar silvestre no es tan acusada como la reducción que sufre el mutante *Sitiens* con respecto a su cosechar silvestre. Esta reflexión es sobretodo válida para el gen *GinGS*, ya que en el mutante *Sitiens* está afectado en mayor grado en el parámetro de intensidad en la formación de los arbusculos en el sistema radicular, y dicho parámetro está muy relacionado con la expresión del gen *GinGS* (Gráfica A y B, figura IV.5 y IV.6).

IV.1.2 Análisis de la micorrización en plantas de tomate tratadas con un inhibidor de la biosíntesis de ABA

Continuando con el objetivo de identificar el papel y la importancia del ABA durante la formación de la micorriza arbuscular, y para complementar los estudios realizados con plantas mutantes deficientes en ABA, se realizaron una serie de experimentos de análisis de las alteraciones del proceso infectivo tras aplicación exógena de un inhibidor de la síntesis de ABA. En concreto, usamos como inhibidor de la biosíntesis de ABA el tungstato sódico (Na_2WO_4), el cual es un potente inhibidor de molibdo-enzimas en plantas, tales como la aldehído oxidasa, encargada del paso de ABA-aldehído a ABA (Hansen & Grossmann, 2000). Los experimentos se diseñaron para determinar el efecto del inhibidor de la biosíntesis de ABA sobre el desarrollo de la micorrización de plantas de tomate de genotipo silvestre, y evaluar si dicho efecto es similar al encontrado en las plantas *Sitiens* deficientes en ABA, las cuales muestran una limitación en el

desarrollo de la micorrización. Para comprobar que los efectos del tungstato sobre la micorrización son específicos de su acción negativa sobre la biosíntesis de ABA, dado que puede afectar la actividad de otras enzimas no relacionadas con la biosíntesis de ABA, tales como la nitrato reductasa, se realizaron también aplicaciones combinadas de ABA+tungstato, comprobando así que los efectos del tungstato podían ser anulados por un aporte exógeno de ABA.



El tratamiento con 1,5mM de tungstato, aplicado en suelo, substancialmente disminuye la acumulación de ABA en raíz, observándose que la cantidad de ABA se reduce en un 52% con respecto a las plantas no tratadas (Gráfica A, figura IV.7). La deficiencia en ABA en raíz de plantas *Sitiens* bajo nuestras condiciones experimentales fue del 30% respecto a su silvestre. La deficiencia en ABA de ambos tipos de plantas, silvestres tratadas con tungstato y plantas *Sitiens*

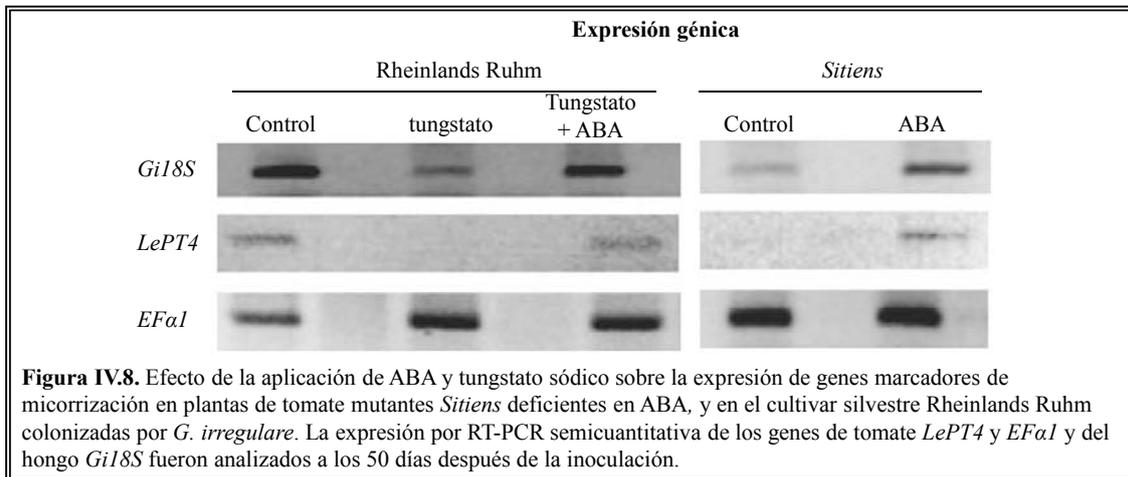
sin tratar fue eliminada cuando se aplicó una dosis de 75 μ M de ABA en suelo (Gráfica A, figura IV.7).

La extensión de la micorrización, determinada como porcentaje de raíz colonizada, fue reducida tras la aplicación del tungstato sódico (1,5mM) en plantas de tomate de tipo silvestre (Gráfica B, figura IV.7). El grado de reducción, en términos de porcentaje, fue similar para el observado en el contenido de ABA, pues la reducción de la longitud de raíz colonizada fue de un 49% frente a un 52% de reducción en el contenido de ABA en raíz. La aplicación de ABA restauró la micorrización en las plantas silvestres Rheinlands Ruhm tratadas con tungstato, e incrementó la capacidad de micorrización de plantas *Sitiens* (Gráfica B, figura IV.7).

Para valorar el efecto sobre la acumulación de etileno en raíces producido por la aplicación de tungstato se realizó una determinación de etileno en raíces de plantas silvestres no tratadas y tratadas con 1,5mM de tungstato solo o en combinación con 75 μ M de ABA. Como se esperaba, tanto plantas *Sitiens* no tratadas, que contenían bajo contenido en ABA, como plantas silvestres tratadas con tungstato, donde se disminuía la acumulación de ABA, mostraban un incremento en su concentración de etileno en raíz, que fue de un 53,7% y 66,7%, respectivamente. El incremento en etileno fue bloqueado cuando se aplicó una dosis de 75 μ M de ABA tanto a las plantas *Sitiens* sin tratar como a plantas silvestres tratadas con tungstato 1,5mM (Gráfica C, figura IV.7).

La colonización fúngica fue también cuantificada por técnicas de RT-PCR semicuantitativa. Estos experimentos se llevaron a cabo para verificar, a nivel molecular, la cuantificación histoquímica de la micorrización en plantas silvestres sin tratar y tratadas con tungstato y/o ABA y en plantas *Sitiens* sin tratar o tratadas con ABA. Se cuantificó la colonización fúngica como la cantidad relativa del ADNc amplificado a partir del ARN ribosómico 18S de *G. irregulare* en raíces de tomate. Además, también se determinó a nivel molecular la funcionalidad arbuscular en raíces micorrizadas cuantificando la cantidad de transcritos del ARN del gen que codifica para el transportador de fosfato *LePT4* de tomate, específico de arbusculos. Ambos genes se cuantificaron en relación a la cantidad de ARNm del gen de expresión constitutiva *LeEFa1* de tomate. La cantidad de ARNr fúngico *Gil8S* en raíces colonizadas claramente confirma los datos histoquímicos, siendo los niveles de ARNr fúngico *Gil8S* significativamente menores en plantas silvestres tratadas con 1,5mM de tungstato y en plantas *Sitiens* no tratadas, en relación a plantas silvestres sin tratar. El tratamiento con 75 μ M de ABA incrementa estos niveles en ambos tipos de

plantas. Evidentemente, los valores de acumulación de ARNr fúngico 18S en plantas *Sitiens* son menores que los de las plantas silvestres (Figura IV.8). Por otro lado, la acumulación del transcrito de *LePT4* estuvo claramente asociada con el contenido en ABA y la colonización fúngica en raíces, ya que tanto el tratamiento con tungstato 1,5mM en las plantas silvestres, como la deficiencia inherente de ABA en los mutantes *Sitiens* dio lugar a una abolición completa de su acumulación (Figura IV.8).



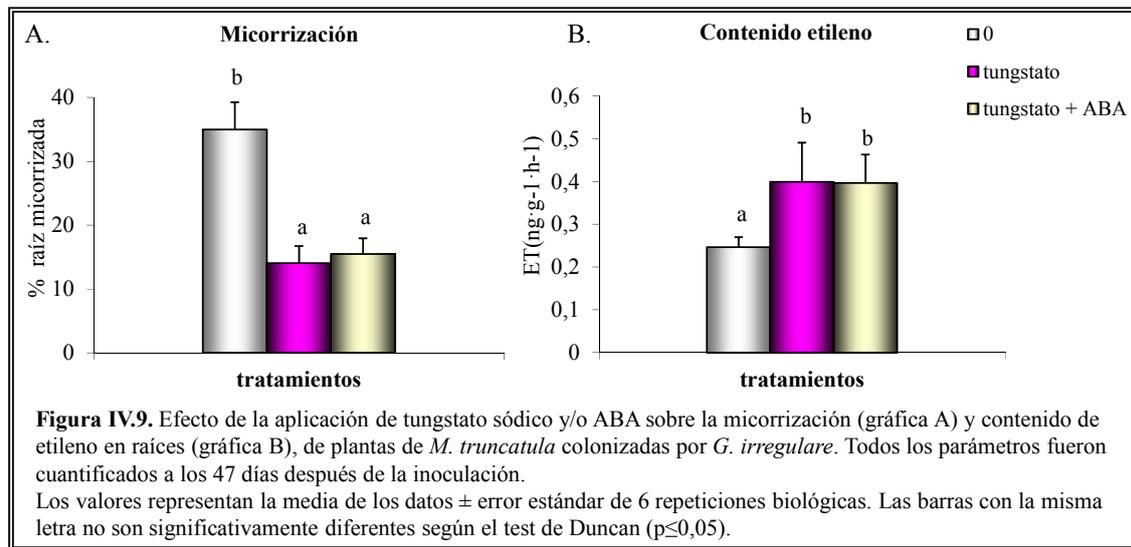
IV.1.3 Análisis de la micorrización en plantas de *Medicago truncatula* tratadas con un inhibidor de la biosíntesis de ABA

Para determinar si la disminución del contenido de ABA por el tratamiento con tungstato sódico, con el consiguiente descenso en los niveles de micorrización, es un hecho generalizado en otras especies vegetales se llevó a cabo un experimento paralelo con la planta leguminosa *M. truncatula*. La extensión de la micorrización también sufrió una reducción en plantas de *M. truncatula* tratadas con tungstato, siendo incluso más acusada que en plantas de tomate, ya que el descenso de la micorrización fue de un 60% en las plantas tratadas con 1,5mM de tungstato con respecto a las plantas sin tratar. En el caso de *M. truncatula* la aplicación de 75µM de ABA no restauró la micorrización en las plantas de *M. truncatula* tratadas con tungstato (Gráfica A, figura IV.9).

Al igual que en tomate, se determinó la acumulación de etileno en raíces en plantas tratadas y no tratadas con 1,5mM de tungstato solo o en combinación con 75µM de ABA. Las plantas tratadas con tungstato acumulaban un 38,2% más de etileno en sus raíces que las plantas no

tratadas y la aplicación de ABA a estas plantas no bloqueó el incremento de etileno (Gráfica B, figura IV.9).

En conclusión, las plantas de *M. truncatula* responden de igual forma que las de tomate a la aplicación de tungstato, incrementando su concentración de etileno y limitando el desarrollo de la colonización fúngica. Sin embargo, y al contrario que en tomate, no se produce la recuperación de estos efectos por aplicación conjunta de tungstato y ABA.

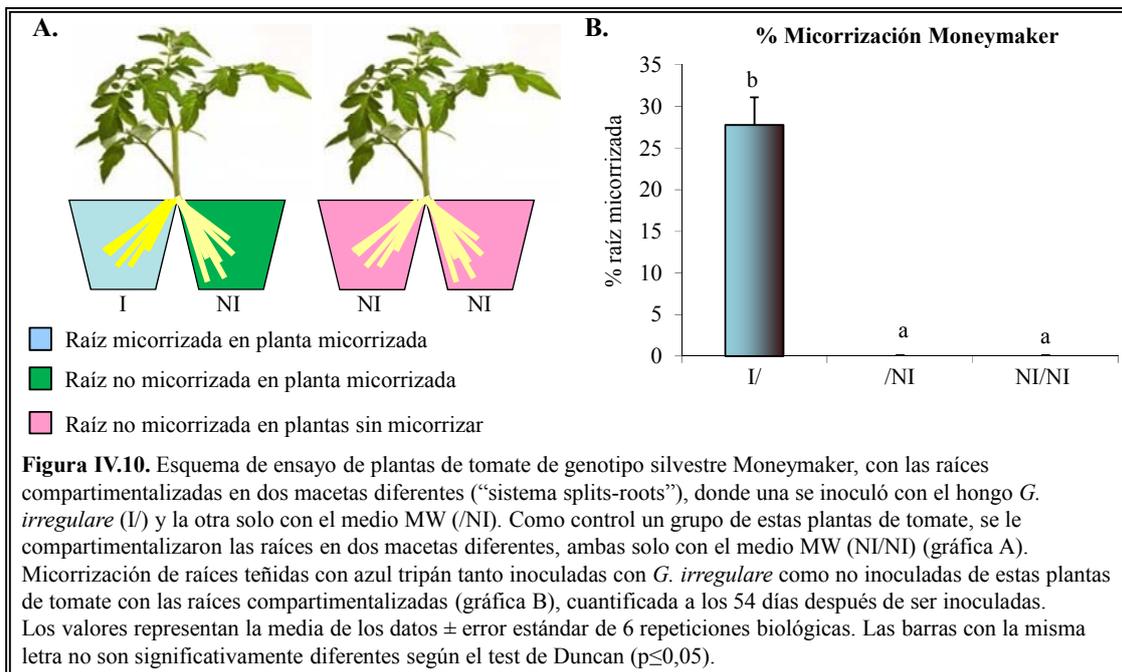


IV.1.4 Efecto de la simbiosis Micorriza Arbuscular sobre el contenido en ABA y sus derivados en raíz

Existen varios estudios centrados en el análisis del contenido en ABA en raíces micorrizadas, observándose en ciertas especies vegetales un incremento en la concentración de ABA libre en raíz durante la micorrización (Danneberg *et al.*, 1993; Meixner *et al.*, 2005; Ludwig-Müller, 2010). No obstante, también hay casos, como en plantas *Bouteloua gracilis*, donde no se detectó un incremento de ABA como consecuencia de la micorrización (Allen *et al.*, 1982). También ha sido determinada la presencia de ABA en ciertas estructuras de hongos micorrícicos, sobretodo en las esporas, y en las hifas extra e intraradicales (Esch *et al.*, 1994), siendo este hecho también característico de algunos hongos patógenos que tienen la capacidad de sintetizar ABA (Oritani & Kiyota, 2003).

Por tanto, dados estos antecedentes, y dentro de los objetivos planteados en este trabajo de Tesis, parece evidente que un estudio sobre el papel del ABA durante la micorrización requiere

de un análisis cuantitativo y cualitativo del contenido en ABA en la raíz micorrizada. En este sentido en este trabajo se ha realizado un análisis del contenido tanto de ABA libre como de los diferentes metabolitos derivados de las diferentes vías catabólicas del ABA.



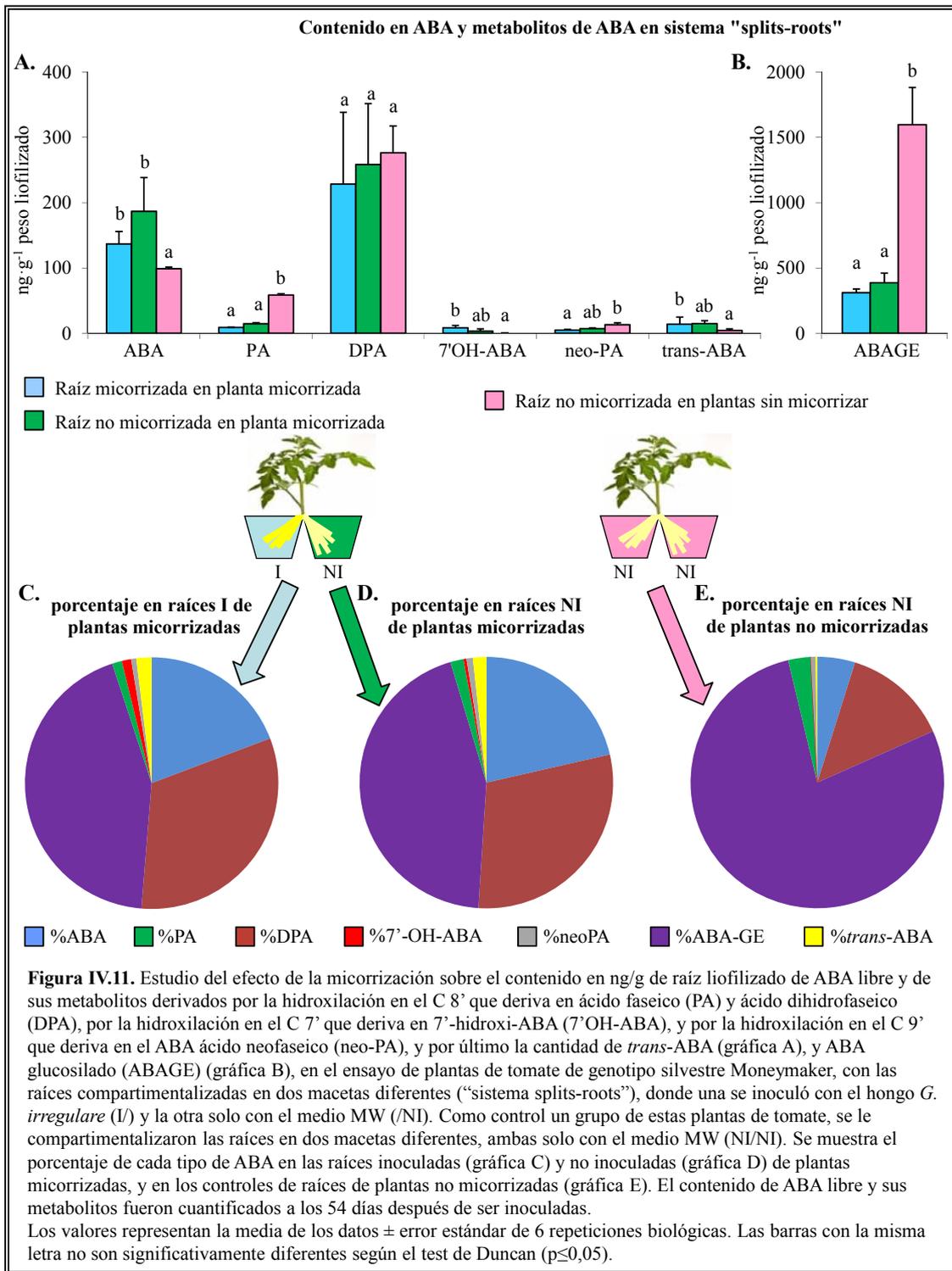
La hidroxilación en el carbono 8' del ABA es la ruta catabólica mayoritaria, y produce los dos catabolitos más abundantes, ácido faséico (PA) y ácido dihidrofaséico (DPA). También hay otras rutas minoritarias que requieren atención, como la 7' hidroxilación que deriva en el metabolito 7'-hidroxi ABA (7'-OH-ABA), y la 9' hidroxilación que da lugar al metabolito ácido neofaséico (neoPA). En plantas, también se produce la conjugación del ABA con glucosa dando lugar al ABA glucósido (ABAGE). Por tanto, realizamos un estudio cuantitativo de la acumulación de los diferentes compuestos en la raíz de plantas micorrizadas y no micorrizadas, incluyendo el análisis de *trans*-ABA, metabolito biológicamente inactivo, y que se genera durante el proceso de extracción y análisis.

Al objeto de poder determinar también las alteraciones sistémicas en la concentración de estos compuestos en la raíz, decidimos realizar el experimento con raíces en un sistema "splits-roots". A cada plántula de tomate de genotipo silvestre Moneymaker, se le dividió su sistema radicular en dos partes iguales y se introdujo en dos compartimentos diferentes. En un compartimento se inocularon las raíces con el hongo micorrícico *G. irregulare*, dejando el resto

de las raíces en otro compartimento sin micorrizar. Además, se utilizó como control un grupo de plantas donde también se dividieron sus raíces en dos compartimentos pero en este caso no se inoculó con el hongo micorrízico ninguno de los dos compartimentos (Esquema A, figura IV.10). Las plantas se cosecharon a los 54 días después de su inoculación, y se cuantificó el porcentaje de raíz micorrizada en lupa binocular, observando tanto la raíz de los compartimentos micorrizados como no micorrizados, al objeto de descartar una posible contaminación y por tanto una micorrización no deseada en los compartimentos no inoculados. Como era de esperar, en los compartimentos sin inóculo no encontramos micorrización, mientras que en los compartimentos inoculados con el hongo encontramos un porcentaje medio de micorrización del 28% (Gráfica B, figura IV.10).

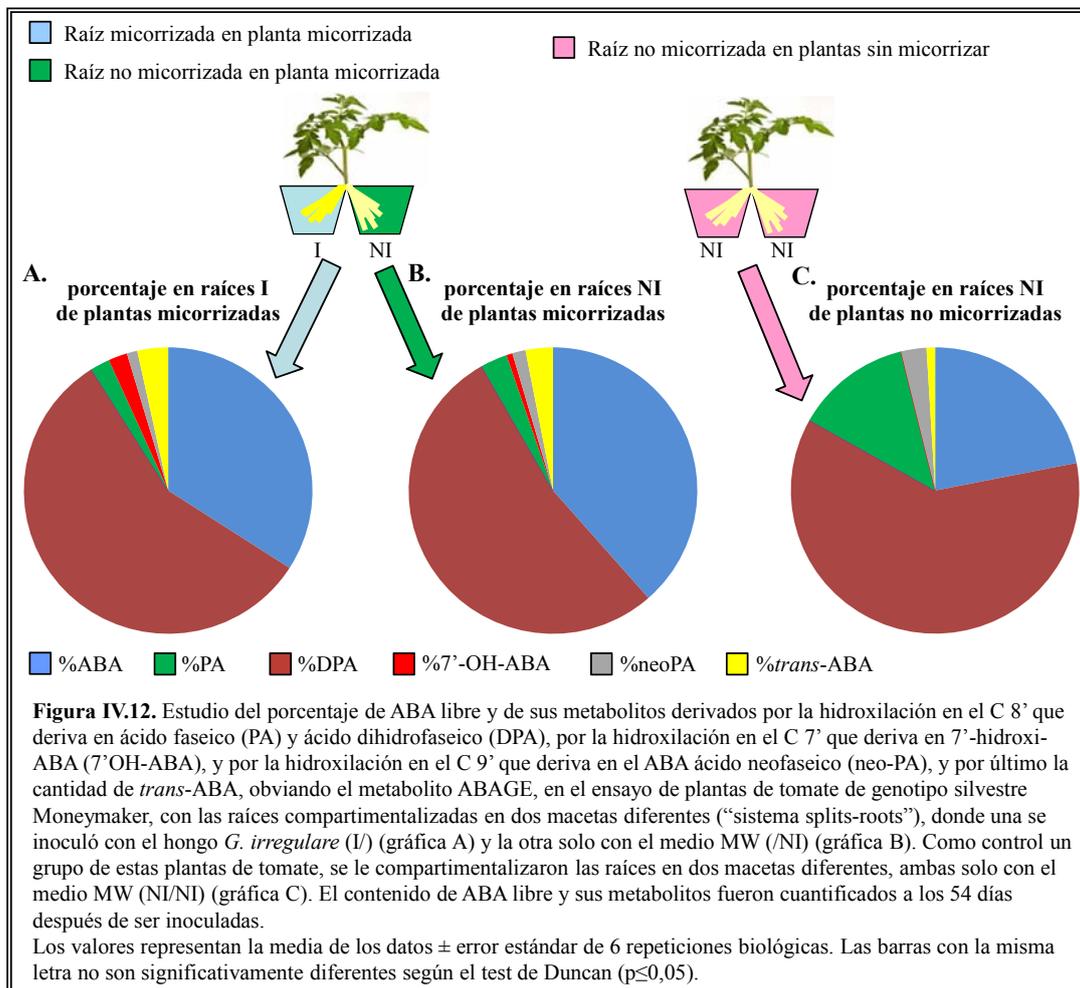
El contenido en ABA libre plantas de tomate micorrizadas fue similar en la zona de la raíz micorrizada como no micorrizada y superior en un 30% al de raíces de plantas no micorrizadas (Gráfica A, figura IV.11). Por tanto parece existir una respuesta generalizada de incremento de ABA libre en la raíz ante su colonización por el hongo micorrízico.

El análisis de metabolitos que derivan de la hidroxilación mayoritaria en las plantas, en el C 8', PA y DPA, mostró que los niveles de PA fueron iguales en la parte de la raíz colonizada o no colonizada de las plantas micorrizadas y que este nivel fue más de cuatro veces inferior al de raíces de plantas no micorrizadas (Gráfica A, figura IV.11). El PA deriva en DPA que parece ser completamente inactivo biológicamente, y en este caso se encontraron niveles similares tanto en la raíces de plantas micorrizadas como no micorrizadas (Gráfica A, figura IV.11). La hidroxilación en C 7' da lugar al 7'-OH-ABA, no detectado en las raíces de plantas no micorrizadas, aunque sí se observa cierta cantidad de esta molécula en las raíces de plantas micorrizadas. En concreto, se obtuvieron 8,48ng/g peso liofilizado en raíces colonizadas de plantas micorrizadas y 3,33ng/g peso liofilizado en raíces no colonizadas de plantas micorrizadas. La hidroxilación en el C 9' deriva en neo-PA, compuesto con cierta actividad biológica tipo ABA (Zhou *et al.*, 2004), y cuya concentración fue superior en raíces de plantas no micorrizadas con respecto a ambos tipos de raíces de plantas micorrizadas. Por último, en los tres tipos de raíces se detecta *trans*-ABA, que es un producto de isomerización natural debido al efecto de la luz UV (Gráfica A, figura IV.11). En resumen, los datos sugieren que en las raíces de plantas micorrizadas existe un mayor contenido de ABA libre, y en las raíces de plantas no micorrizadas parece que la ruta de la hidroxilación en el C 8' y 9' es superior que en raíces de plantas micorrizadas, donde es superior la hidroxilación en el C 7'.



El contenido de ABA glucósido (ABAGE) se analizó por separado. El ABAGE es el conjugado de ABA más extendido en las plantas (Boyer & Zeevaart, 1982), además de participar en el transporte de larga distancia de ABA (Hartung *et al.*, 2002; Wilkinson & Davies, 2002),

incrementando su concentración en condiciones de diferentes estreses (Sauter *et al.*, 2002). En nuestro experimento, el contenido en ABAGE fue cinco veces mayor en las raíces de plantas no micorrizadas con respecto a las raíces de plantas micorrizadas tanto inoculadas como no inoculadas con el hongo micorrícico (Gráfica B, figura IV.11).



El análisis de los datos obtenidos muestra que en las plantas micorrizadas existe un contenido y distribución similar de ABA y sus catabolitos en las zonas colonizadas y no colonizadas por el hongo arbuscular, con la excepción de un ligerísimo incremento de PA en la zona colonizada. En contenido proporcional las raíces de plantas micorrizadas presentaron un 44% de ABAGE, un 31% de DPA y un 20% en ABA libre, y el 5% restante se reparte en PA, 7'-OH-ABA, neo-PA y *trans*-ABA (Gráficas C y D, figura IV.11). Comparadas con las plantas micorrizadas, las raíces de plantas no micorrizadas tienen un mayor contenido total de ABA, que se incrementa en casi tres veces respecto a las raíces de plantas micorrizadas. Este mayor

contenido de ABA total se debe sobretodo a la gran cantidad de ABAGE en sus raíces que representa el 78% del ABA total en las mismas, mientras que el resto de componentes se distribuye en un 13% en DPA, 5% en ABA libre y el 4% restante dividido entre PA, neo-PA y *trans*-ABA (Gráfica E, figura IV.11).

Si obviamos los valores elevados de ABAGE en plantas micorrizadas y no micorrizadas y comparamos los demás componentes, vemos que el contenido total de ABA es similar en ambos casos, pero con un matiz interesante, pues los porcentajes de ABA libre y PA varían entre plantas micorrizadas y no micorrizadas. Donde claramente hay un mayor contenido de ABA libre en las raíces de las plantas micorrizadas, representado más del 34% del ABA total (Gráficas A y B, figura IV.12), con respecto a las no micorrizadas, representando solamente el 22% del ABA total (Gráfica C, figura IV.12). Además, en las raíces de plantas no micorrizadas los metabolitos derivados de la hidroxilación en el C8' (PA y DPA) representan $\frac{3}{4}$ partes del ABA total de la raíz, dividido en 62% de DPA y 13% de PA (Gráfica C, figura IV.12), mientras que en las raíces de plantas micorrizadas estos compuestos derivados de la hidroxilación en el C8' representan menos de un 60% del total de la raíz, dividido en aproximadamente 55% de DPA y 3% de PA (Gráficas A y B, figura IV.12).

IV.2. REGULACIÓN POR ABA DEL PROCESO DE LA SIMBIOSIS MICORRIZA ARBUSCULAR EN PLANTAS DE TOMATE, DEPENDIENTE E INDEPENDIENTE DE LA ACCIÓN DE ETILENO

En el capítulo anterior, usando diferentes mutantes en la biosíntesis de ABA (*Sitiens* y *Notabilis*) y tratamientos con el inhibidor de la biosíntesis de ABA, tungstato sódico, se ha determinado que el ABA tiene un papel importante para una correcta colonización fúngica y formación de la simbiosis MA. En el siguiente paso en nuestra investigación, tratamos de profundizar en su papel real y su mecanismo de acción para desarrollar ese papel regulador. Hemos comprobado también que la deficiencia de ABA induce la producción de etileno, y eso nos sugiere que uno de los mecanismos usados por el ABA para ejercer su labor reguladora de la infección fúngica es a través de la modulación negativa de la ruta del etileno.

En este sentido, la vía de señalización del ABA interactúa antagónicamente con la vía de señalización del etileno y viceversa, con el fin de modular el desarrollo de las plantas (Beaudoin *et al.*, 2000; Ghassemian *et al.*, 2000) y la resistencia a enfermedades de estas (Anderson *et al.*, 2004). Sin embargo, no se ha demostrado un papel específico para el etileno durante la simbiosis micorrícica, aunque resultados recientes sugieren su participación en la regulación de la simbiosis Micorriza Arbuscular (Varma Penmetsa *et al.*, 2008; Riedel *et al.*, 2008; Zsögön *et al.*, 2008), y nuestro conocimiento de cómo la vía del ABA interactúa con la vía de etileno durante el establecimiento de la micorrización es muy limitado.

El objetivo de los experimentos realizados en este capítulo fue analizar el papel desempeñado por la relación entre el ABA y etileno en la regulación de la formación de la simbiosis micorrícica en plantas de tomate, y para ello se han utilizado herramientas genéticas, tales como plantas mutantes defectivas en la producción o percepción de hormonas, en combinación con experimentos de aplicación exógena de ABA y los inhibidores tanto de ABA (tungstato sódico) como de etileno aminoetoxivinilo glicina hidróclorido (AVG).

IV.2.1 Funciones distintas para etileno y el ABA durante la formación de la simbiosis Micorriza Arbuscular

Resultados previos han mostrado que la aplicación del inhibidor de la síntesis de ABA tungstato sódico a las raíces reduce la micorrización, y tiene un efecto positivo sobre la producción de etileno y un impacto negativo sobre la biosíntesis de ABA en plantas de tomate

(apartado IV.1.2). Por tanto, es necesario investigar si los efectos negativos sobre la micorrización debidos a la aplicación de tungstato se deben a una reducción en la producción de ABA y/o un incremento en la producción de etileno, y si el “efecto ABA” está siempre ligado al “efecto etileno”.

La primera cuestión a resolver fue determinar la curva de producción de etileno en plantas tras la aplicación de tungstato. Esta cuestión resulta clave, pues la micorrización es un proceso continuo y asincrónico y si queremos investigar las consecuencias de un agente externo debemos asegurarnos que dicho agente está ejerciendo continuamente su acción sobre el sistema. Por ello determinamos la curva de producción de etileno tras la aplicación de tungstato, cuantificando la producción de etileno a las 0, 12, 24 y 48 horas después del tratamiento de tungstato aplicado a las raíces. El contenido en etileno sigue un patrón de campana de gauss, donde a las 12 horas después del tratamiento el contenido en etileno incrementa un 35%, llegando a su concentración máxima a las 24 horas después del tratamiento de tungstato ya que incrementa hasta un 40% su concentración respecto al tiempo 0, y por último a las 48 horas el contenido en etileno empieza a disminuir otra vez, alcanzando el mismo nivel que a las 12 horas (Gráfica A, figura IV.13). Para comprobar si los efectos del tungstato podrían ser anulados por ABA aportado exógenamente, un grupo de estas plantas fue tratado con tungstato y ABA, observándose que a diferencia de las plantas tratadas solo con tungstato, en las raíces de las plantas con doble tratamiento no se acumula mayor contenido en etileno que en las plantas sin tratar a los tiempos 0, 12, y 48 horas, y solamente a las 24 horas del tratamiento se produce un ligero incremento de etileno (Gráfica A, figura IV.13). Una vez determinada la curva de acumulación de etileno en raíz, tras la aplicación de la dosis de tungstato, conocemos el periodo de cadencia del efecto y por tanto la frecuencia con la que debemos aplicar el tungstato para mantener de manera continuada altas concentraciones de etileno. Esta frecuencia se estimó en cuatro días.

Para intentar delimitar y diferenciar el efecto sobre la micorrización provocado por la disminución de la concentración de ABA, del efecto del incremento de la acumulación de etileno, ambos generados tras la aplicación de tungstato, necesitábamos de un sistema biológico apropiado, que nos permitiera diferenciar ambos efectos. La búsqueda de mutantes en la ruta de síntesis de etileno en tomate nos permitió identificar la línea transgénica ACCD. Esta línea transgénica expresa una ACC desaminasa bacteriana (Klee *et al.*, 1991), la cual está involucrada en la degradación irreversible de la molécula precursora del etileno, el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). Consecuentemente, estas plantas exhiben una

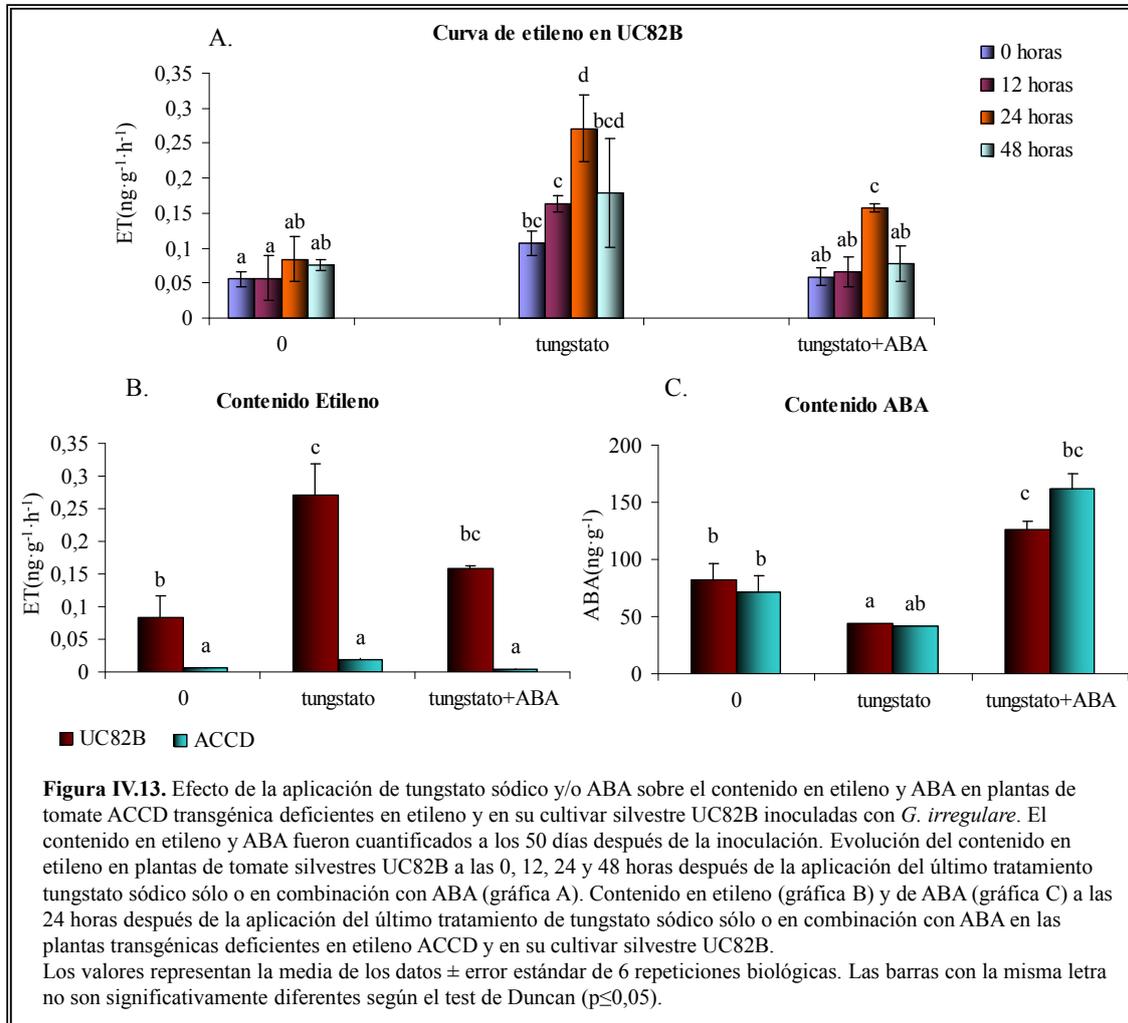
reducción en el contenido en etileno como resultado de la degradación permanente del precursor del mismo, y por tanto la aplicación de tungstato no debería tener efecto sobre la síntesis de etileno.

Para comprobar la funcionalidad de este modelo biológico se diseñó un experimento de micorrización de planta silvestres UC82B y plantas transgénicas ACCD, aplicando tungstato solo o en combinación con ABA cada cuatro días, a partir de la primera semana tras la inoculación con *G. irregulare*. Transcurridos 50 días tras la inoculación se cosecharon las plantas y se realizaron los análisis pertinentes sobre contenido en etileno, ABA, parámetros de micorrización y análisis de expresión génica.

Efectivamente, y bajo nuestras condiciones experimentales, la aplicación de tungstato causó un efecto diferente sobre el contenido en etileno en plantas ACCD y silvestres UC82B. Tras 24 horas después de la última aplicación de tungstato el contenido en etileno de las raíces de plantas silvestres UC82B se elevó significativamente, y este efecto se mitigó cuanto la aplicación de tungstato se realizó en combinación con ABA (Gráfica B, figura IV.13). Sin embargo, en plantas ACCD, el contenido de etileno, además de ser siempre inferior al de plantas silvestres, no incrementó significativamente tras la aplicación de tungstato, solo o en combinación con ABA (Gráfica B, figura IV.13). El análisis estadístico de la interacción de los factores genotipo y tratamiento mediante el test de ANOVA dos vías, mostró una interacción significativa entre los factores genotipo y aplicación tungstato sódico/ABA, demostrando que el efecto sobre el contenido en etileno de la aplicación de tungstato fue dependiente de la capacidad de síntesis de etileno de cada planta (Two-Way ANOVA, $F_{2,12} = 18$, $P = 0,0002$).

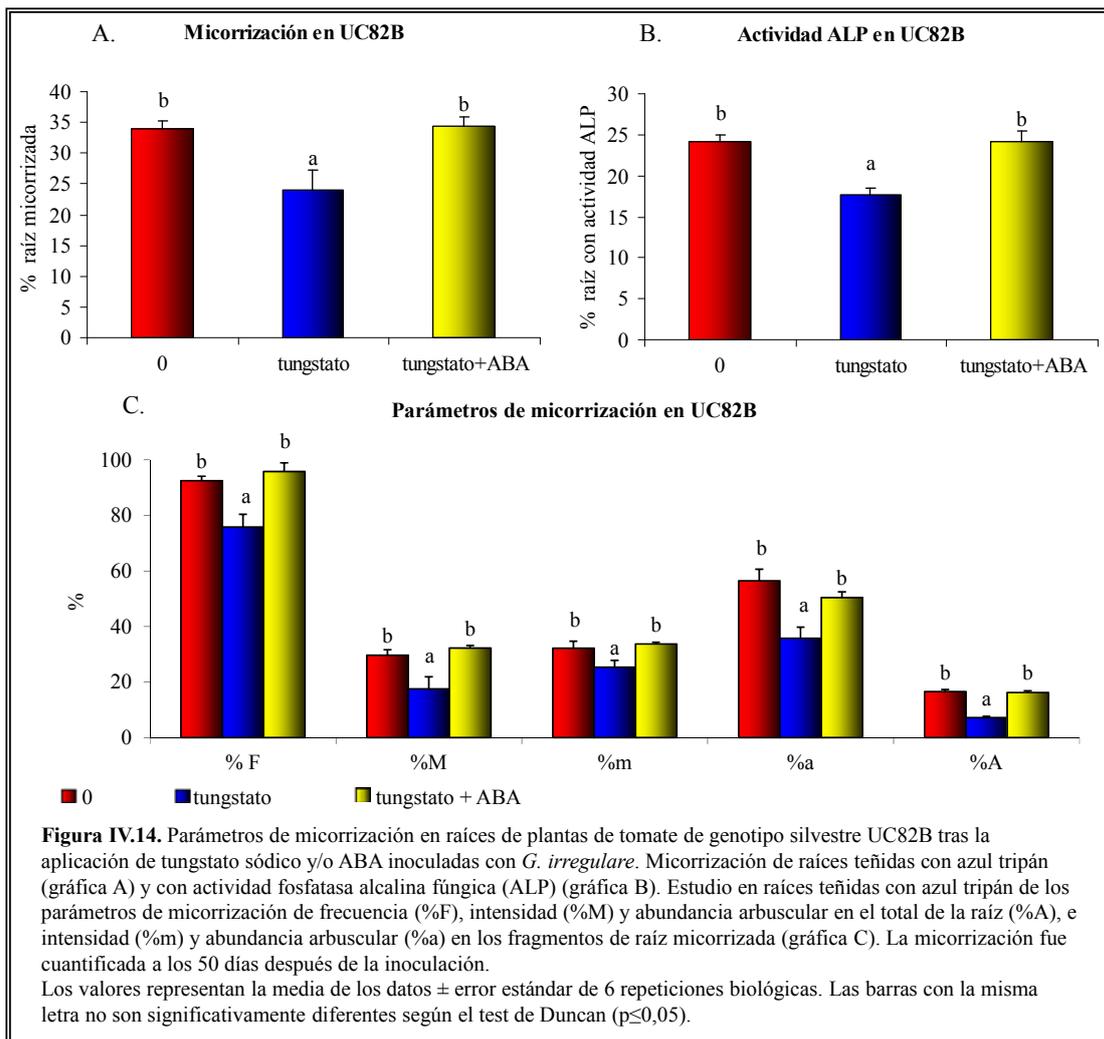
También se determinó el contenido en ABA en las raíces de plantas silvestres de tomate UC82B y transgénicas ACCD tras 24 horas de la última aplicación de tungstato, observando una reducción en el contenido de ABA en las raíces de casi un 45% en ambos tipos de plantas. La aplicación de 75µM de ABA anulaba los efectos del tungstato sobre la deficiencia en ABA, incrementando incluso el contenido de esta hormona en raíz (gráfica C, figura IV.13). La línea transgénica ACCD, además de responder de manera similar a la línea silvestre, contenía también concentraciones similares de ABA (Gráfica C, figura IV.13). El análisis ANOVA dos vías mostró que no hubo interacción significativa entre los factores genotipo y tratamiento de tungstato sódico/ABA ($F_{2,12} = 1,7$, $P = 0,212$), indicando que el contenido en ABA en las raíces es solo dependiente del factor de aplicación tungstato/ABA, y no del genotipo de la planta.

Los resultados del análisis del contenido de etileno y ABA en respuesta a la aplicación de tungstato en plantas silvestres y transgénicas ACCD indican que esta línea de tomate transgénica es una herramienta válida para el análisis por separado del efecto de ABA y etileno sobre la micorrización.

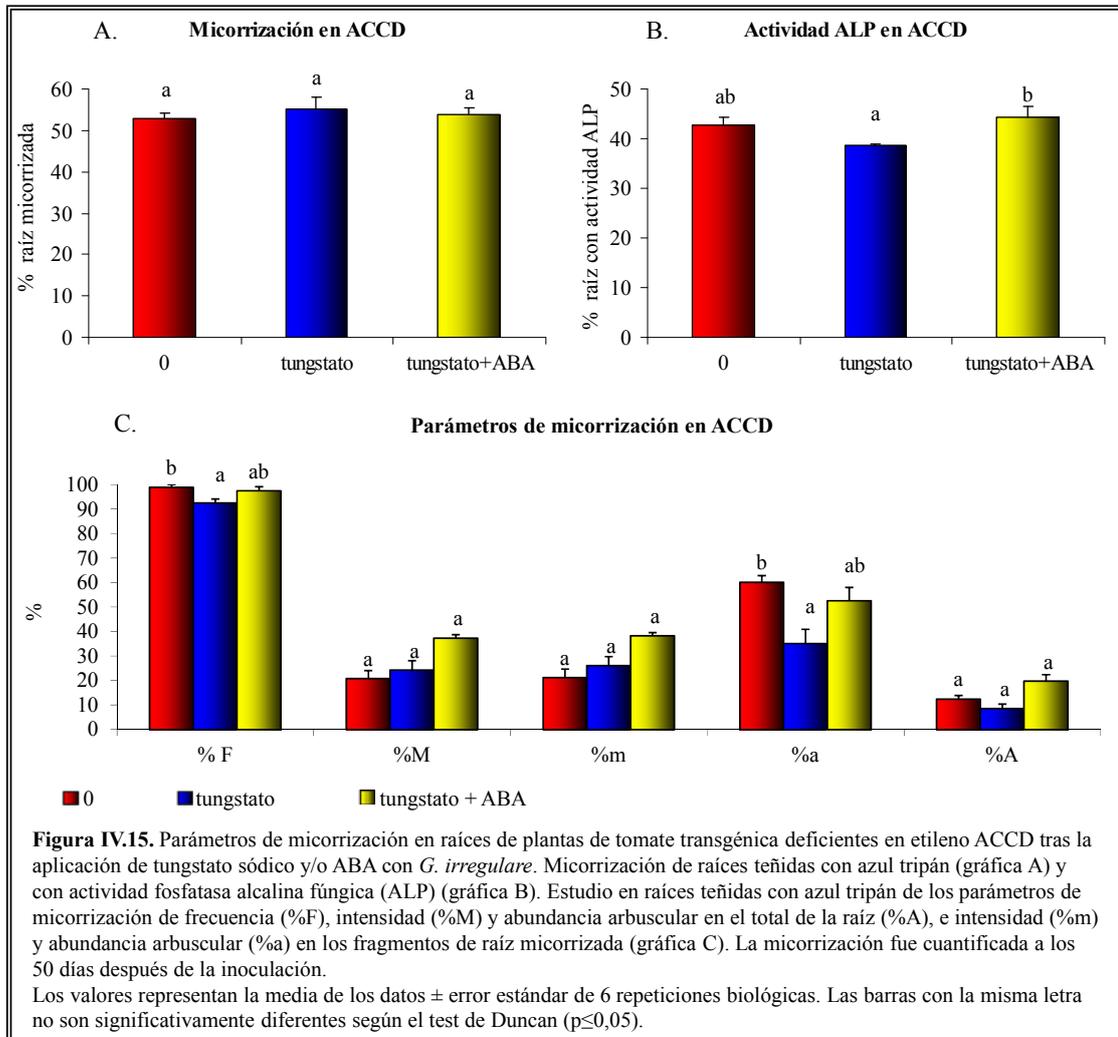


El estudio detallado de la micorrización en plantas silvestres UC82B y transgénicas ACCD mostró diferencias interesantes en cuanto a la afectación diferencial de la micorrización en cada una de ellas tras la aplicación de tungstato. La aplicación de tungstato sódico a las plantas silvestre UC82B afectó negativamente al porcentaje de longitud de raíz micorrizada, cuantificada en lupa binocular, disminuyendo un 26% su micorrización. La aplicación de ABA en combinación con tungstato rescataba la capacidad de micorrización (Gráfica A, figura IV.14).

Por el contrario, en las plantas transgénicas ACCD, el porcentaje de micorrización no se vio afectado tras la aplicación del inhibidor de ABA (Gráfica A, figura IV.15).



De forma paralela se analizó la actividad fosfatasa alcalina fúngica en las raíces (ALP), que es una tinción vital de eficiencia fúngica, y tal y como ocurría con el porcentaje de longitud de raíz micorrizada, la aplicación de tungstato en las plantas silvestres redujo el porcentaje de actividad ALP en un 26%, rescatándose también dicha actividad cuando se aplicaban conjuntamente tungstato y ABA (Gráfica B, figura IV.14). La actividad ALP también disminuyó en las plantas transgénicas ACCD tras la aplicación de tungstato, pero en este caso tan sólo un 10%, y al igual que en las plantas silvestres, la actividad ALP recupera los valores registrados en las plantas sin tratar tras aplicar el tungstato conjuntamente con ABA (Gráfica B, figura IV.15).

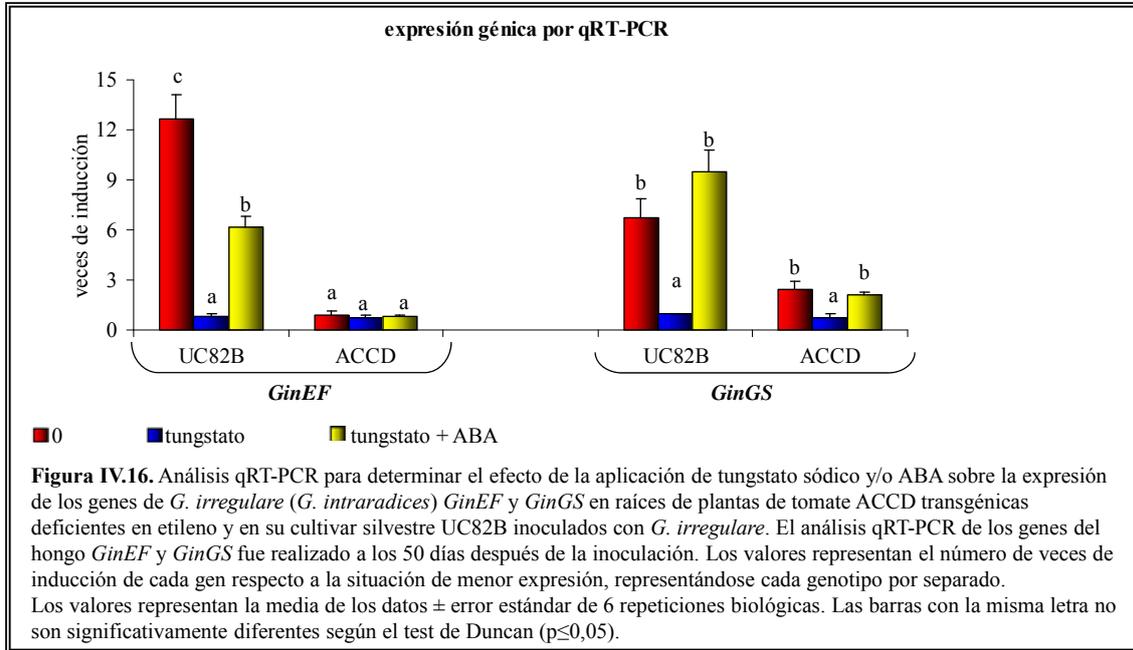


El análisis exhaustivo de los parámetros de micorrización mostró que la aplicación del tungstato a las raíces de las plantas silvestres UC82B, al igual que ocurría con el porcentaje de micorrización y actividad ALP fúngica, se afectó negativamente a todos los parámetros de micorrización medidos en este experimento. En concreto, la frecuencia (%F) e intensidad de micorrización (%M) disminuyeron en un 18% y 40% respectivamente, y a la abundancia arbuscular, tanto en fragmentos micorrizados (%a) como en el total de la raíz (%A), se vieron decrecidas en un 37% y 57% respectivamente (Gráfica C, figura IV.14). Sin embargo, las plantas ACCD mostraron un comportamiento diferente a la aplicación de tungstato, y solo se afectó levemente la frecuencia de micorrización, y de manera considerable y de forma negativa la abundancia arbuscular (%a) en las zonas micorrizadas de la raíz, con una caída del 42%, permaneciendo inalterable la intensidad de micorrización (%M) (Gráfica C, figura IV.15). Consecuentemente, el parámetro de abundancia arbuscular en el total de la raíz (%A), calculado a

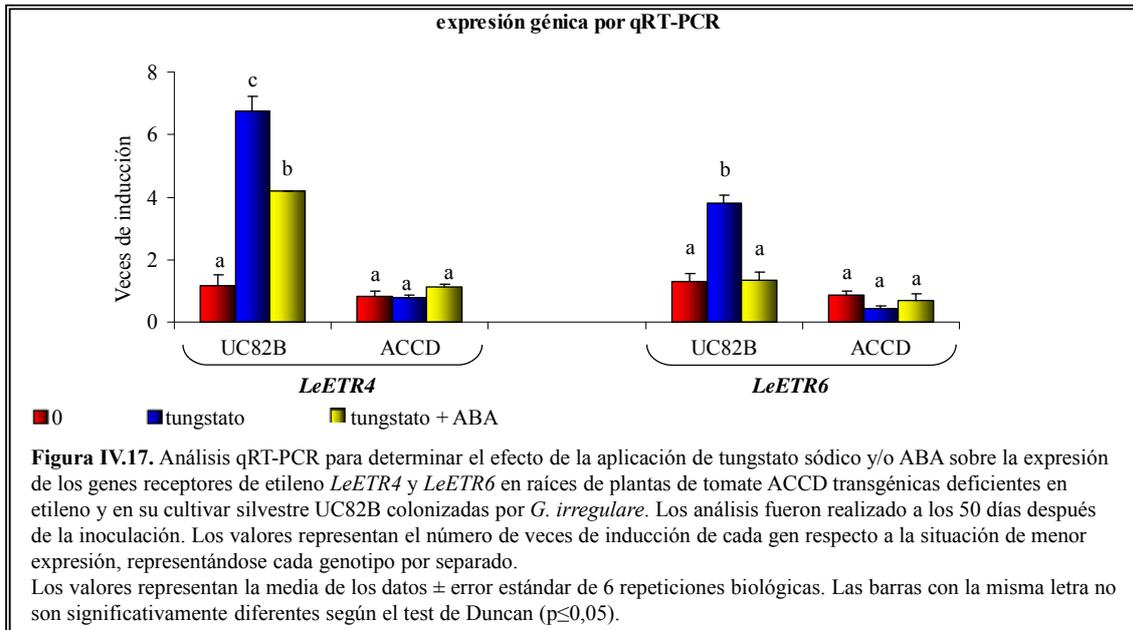
partir de los datos de %a y %M se redujo en plantas transgénicas ACCD tratadas con tungstato solamente en un 30% (Gráfica C, figura IV.15). La aplicación de ABA en combinación con tungstato sódico rescata todos los parámetros de micorrización tanto en plantas silvestres UC82B como en las transgénicas ACCD (Gráficas C, figuras IV.14 y IV.15). Incluso los valores de intensidad de la micorrización (%M y %m) son significativamente más altos en plantas transgénicas ACCD tratadas con tungstato más ABA. En el caso de la intensidad de micorrización (%M) se observa una interacción significativa entre los factores genotipo y aplicación tungstato sódico/ABA (Two-Way ANOVA, $F_{2,18} = 3,88$, $P = 0,05$), demostrando que la aplicación de tungstato selectivamente alteró el parámetro de %M conforme al genotipo de la planta estudiado, que está directamente relacionado con su capacidad de acumular etileno en respuesta al tratamiento con tungstato. Para los parámetros de %a no hay una interacción significativa entre los factores genotipo y aplicación de tungstato sódico/ABA (Two-Way ANOVA, $F_{2,18} = 0,18$, $P = 0,836$), indicando que la reducción en %a observado en estas plantas fue principalmente causado por la reducción en la biosíntesis de ABA que ocurre de manera similar en ambos tipos de plantas tras la aplicación de tungstato (Two-Way ANOVA, $F_{2,18} = 16,32$, $P = 0,0001$).

La colonización fúngica fue también cuantificada por qRT-PCR en plantas micorrizadas, silvestres UC82B y transgénicas ACCD, no tratadas o tratadas con 1,5mM de tungstato, y con 1,5mM de tungstato más 75 μ M de ABA. Se cuantificó la acumulación de ARNm para el gen factor de elongación 1 α de *G. intraradices* (*G. irregulare*) (*GinEF*) en raíces de tomate como medida de la tasa de colonización por el hongo arburcular. La presencia de arbusculos en la totalidad de las raíces micorrizadas se cuantificó determinando la cantidad de transcrito del gen glutamina sintetasa de *G. intraradices* (*G. irregulare*) (*GinGS*), el cual ha sido descrito por otros investigadores como de expresión restringida en arbusculos (Gomez *et al.*, 2009). El nivel de expresión se normalizó respecto a la cantidad de ARNm del gen de tomate factor de elongación 1 α , *LeEFa1*. El cambio inducido en la expresión génica de *GinEF* y *GinGS* en las plantas se calculó usando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, mostrándose el valor en veces de inducción en cada genotipo por separado. No se observaron cambios en la expresión de *GinEF* para plantas ACCD tanto sin tratar como tratadas con tungstato o tungstato más ABA. Sin embargo, la expresión de *GinEF* decrece en plantas silvestres UC82B tratadas con tungstato casi 13 veces con respecto a las plantas silvestres sin tratar, y la aplicación de ABA en combinación con tungstato rescató la expresión de *GinEF* en estas plantas, disminuyendo solo en 2 veces su expresión respecto a los controles no tratados (Figura IV.16). Los datos para la expresión del gen *GinGS* reflejan la

presencia de actividad fúngica en células arbusculares, mostrando que el tratamiento con tungstato afecta negativamente la expresión del gen *GinGS* en ambos tipos de plantas. La aplicación de tungstato disminuye la expresión de *GinGS* unas 7 y 3 veces en plantas silvestres y transgénicas ACCD, respectivamente. No hay un impacto negativo sobre la expresión del gen *GinGS* cuando la aplicación de ABA fue combinada con tungstato (Figura IV.16).



También se realizó el análisis de expresión de los genes que codifican para los receptores de etileno *LeETR4* y *LeETR6* para determinar así la respuesta de activación de la ruta de señalización de etileno en plantas silvestres UC82B y plantas transgénicas ACCD después de la aplicación de tungstato (Kevany *et al.*, 2008). La acumulación de los transcritos de los receptores de etileno *LeETR4* y *LeETR6* fue claramente inducida en raíces de plantas silvestres cuando el tungstato fue aplicado sobre estas. Tras la aplicación de tungstato, el incremento de expresión de *LeETR4* en plantas silvestres fue mayor que el incremento de expresión del gen *LeETR6*. Sin embargo, la aplicación de tungstato combinado con ABA mitigó el efecto sobre la acumulación del transcrito *LeETR4*, y eliminó el efecto del tungstato sobre la expresión del gen *LeETR6* (Figura IV.17). En plantas transgénicas ACCD no se afectó la acumulación de los transcritos de los receptores de etileno *LeETR4* y *LeETR6* tras la aplicación de tungstato solo o en combinación con ABA (Figura IV.17).

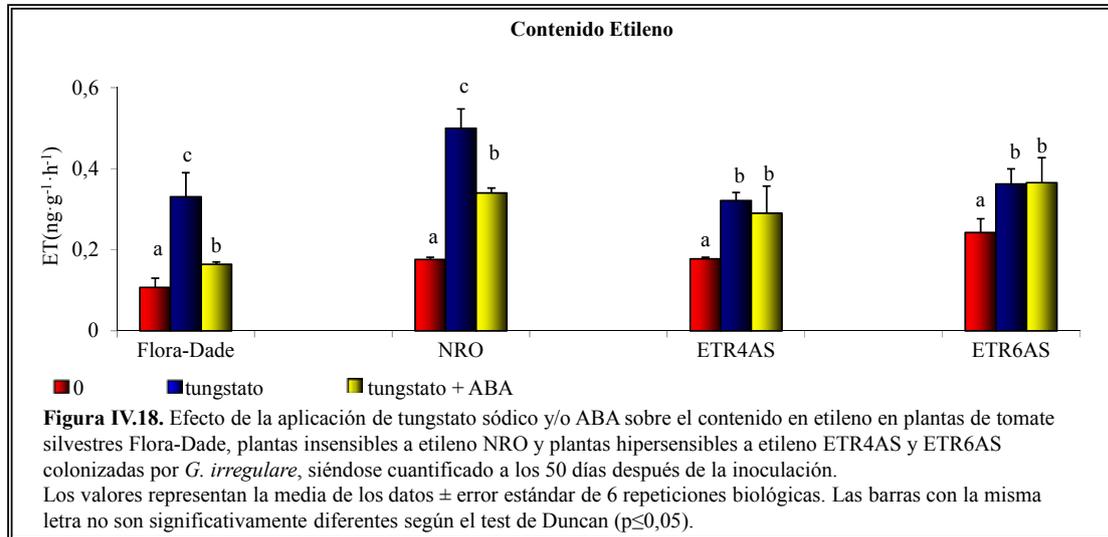


IV.2.2 La sensibilidad de las plantas a etileno media el grado de colonización fúngica, tras inhibición de la biosíntesis de ABA

Con el uso de las plantas transgénicas ACCD, deficientes en la biosíntesis de etileno, y el tungstato, se ha comprobado que el etileno afecta de forma negativa a la micorrización. Con el fin de determinar si el efecto negativo de las aplicaciones de tungstato en la micorrización siempre es causado por la activación de la ruta del etileno, se estudió el impacto de las aplicaciones de tungstato en diferentes plantas de tomate mutantes con diferentes grados de sensibilidad al etileno. Para ello, hemos utilizado el mutante NRO, que sobre-expresa el gen *LeETR3* que codifica para el receptor NR. Consecuentemente, estas plantas muestran un descenso en su sensibilidad a etileno (Ciardi *et al.*, 2000), y aunque la aplicación de tungstato incrementa la concentración de etileno en la planta, este incremento no debería tener efecto sobre el fenotipo de la planta. Además, utilizamos las líneas transgénicas ETR4AS y ETR6AS, en las cuales se han introducido respectivamente, la secuencia completa y en la orientación anti-sentido de los genes receptores de etileno *LeETR4* y *LeETR6*. Ambas líneas transgénicas presentan un fenotipo de sensibilidad incrementada al etileno (Tieman *et al.*, 2000; Kevany *et al.*, 2008), y por consiguiente, estas plantas deberían tener una mayor respuesta al incremento de etileno producido por la aplicación de tungstato.

Para determinar la importancia de los receptores de etileno en la micorrización, se realizó un experimento de micorrización de plantas silvestres Flora-Dade y plantas transgénicas insensibles

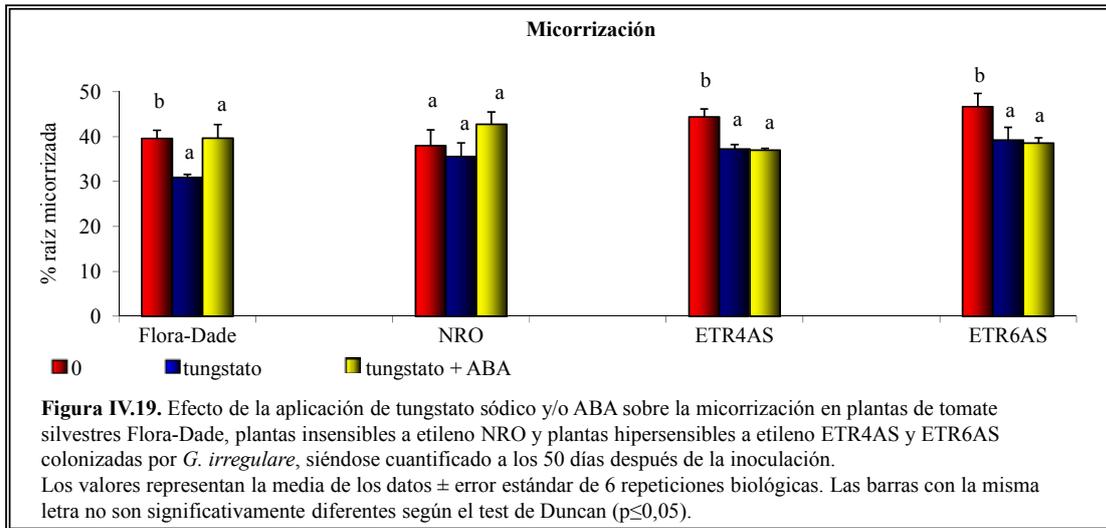
a etileno (NRO) e hipersensibles a etileno (ETR4AS y ETR6AS), aplicando tungstato solo o en combinación con ABA cada cuatro días, a partir de la primera semana tras la inoculación con *G. irregulare*. Estas plantas se cosecharon transcurridos 50 días tras la inoculación con *G. irregulare*, realizándose los análisis pertinentes sobre contenido en etileno, parámetros de micorrización y análisis de expresión génica.



En este experimento al igual que en experimentos anteriores, se cuantificó la producción de etileno 24 horas después de la última aplicación de tungstato, provocando un incremento en el contenido de etileno en raíces tanto en plantas de tomate silvestres Flora-Dade, plantas con baja sensibilidad a etileno (plantas NRO), y plantas hipersensibles a etileno (plantas ETR4AS y ETR6AS) (Figura IV.18). Tanto en las plantas de genotipo silvestre como en las plantas transgénicas NRO, la aplicación conjunta de tungstato y ABA mitigó el efecto sobre el contenido en etileno. Mientras que en las plantas transgénicas ETR4AS y ETR6AS, hipersensibles a etileno, la aplicación de tungstato junto con ABA no mostró diferencias con respecto a las plantas tratadas solo con tungstato (Figura IV.18).

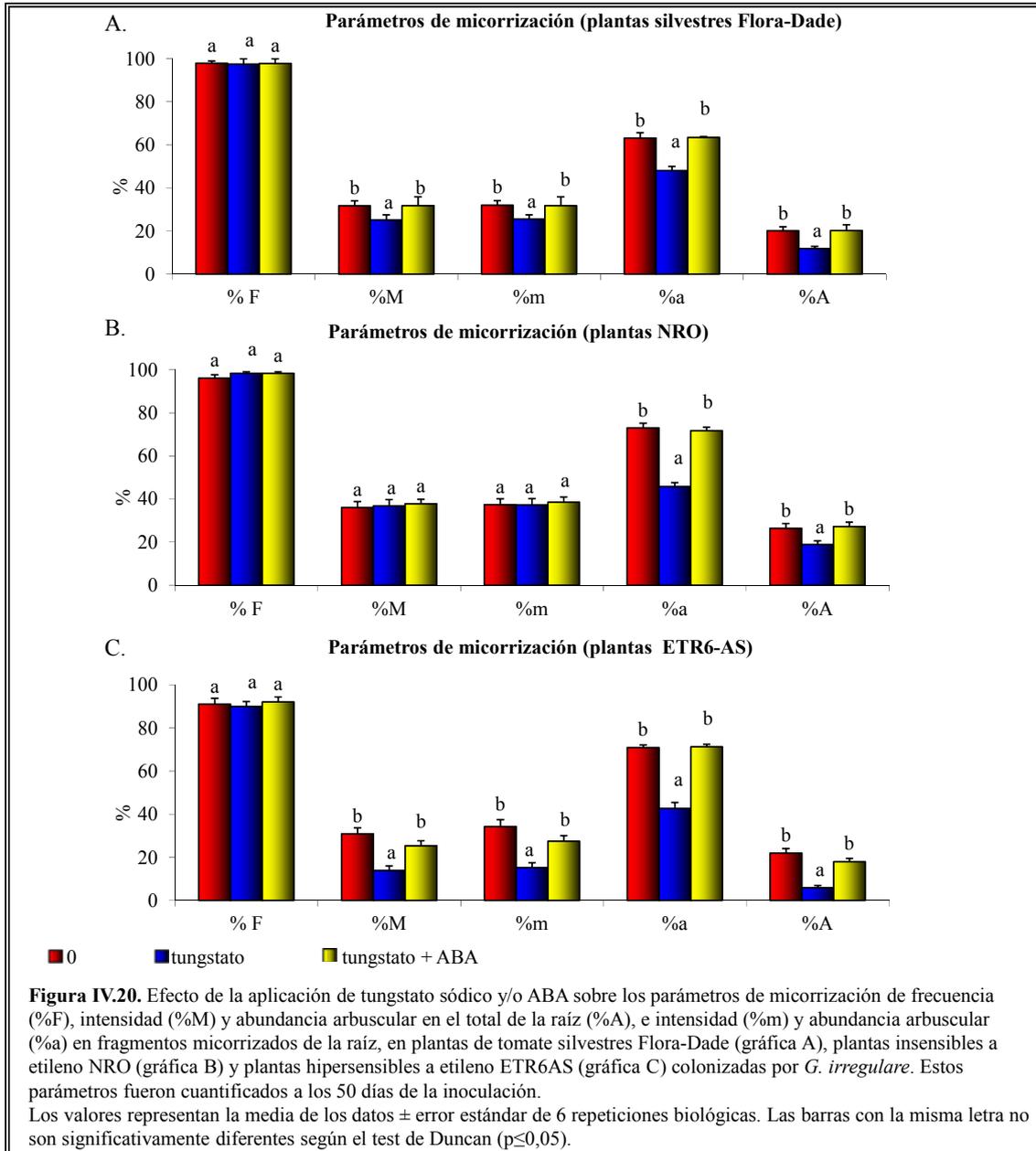
El análisis de micorrización en plantas con diferente sensibilidad a etileno mostró que, al igual que en experimentos anteriores, la aplicación de tungstato a raíces de plantas de tomate silvestres afectó negativamente el porcentaje de longitud de micorrización, en este caso en un 22%, y que la aplicación conjunta de tungstato y ABA recuperaba los niveles de micorrización registrados en las plantas sin tratamiento. En las plantas insensibles a etileno NRO, el tungstato no afectó significativamente el porcentaje de micorrización. Por el contrario, en las plantas

hipersensibles a etileno ETR4AS y ETR6AS, y aunque se disminuía la micorrización sólo en un 16% en ambas con la aplicación de tungstato, cuando se aplicó este producto junto con ABA, la micorrización no se recuperaba (Gráfica A, figura IV.19).

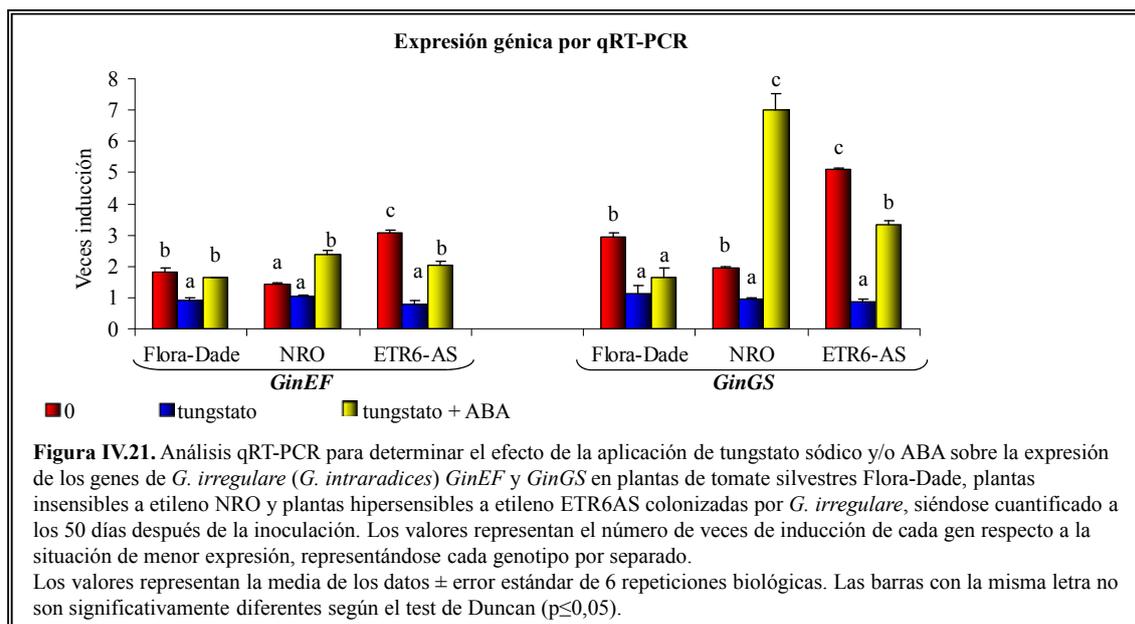


Al objeto de definir de manera más exhaustiva las alteraciones en la micorrización provocadas por el tungstato sódico, se realizó un estudio más preciso de los parámetros de micorrización en plantas de tomate silvestres Flora-Dade, plantas NRO con una baja sensibilidad a etileno y plantas hipersensibles a etileno ETR6AS. Los resultados muestran que al igual que en apartados anteriores (IV.1.2, IV.1.3 y IV.2.1), la aplicación de 1,5mM de tungstato en las raíces de plantas silvestres Flora-Dade provoca un descenso de todos los parámetros de micorrización medidos, excepto en la frecuencia de micorrización (%F), siendo la reducción de un 16% en %M y del 40% en abundancia de arbusculos en el sistema radical (%A). No se observaron efectos negativos sobre los parámetros de micorrización cuando la aplicación de 75 μ M de ABA fue combinado con 1,5mM de tungstato (Gráfica A, figura IV.20). Por otro lado, las plantas con la percepción de etileno reducida, NRO, no se afectaron por la aplicación de tungstato, en términos de frecuencia de micorrización e intensidad de micorrización, pero si se detectó una reducción del 35% en el parámetro de %a y de algo menos del 20% en %A (Gráfica B, figura IV.20). Por último, en presencia de 1,5mM de tungstato, las plantas con sensibilidad a etileno incrementada (ETR6-AS) registraron una fuerte reducción de los parámetros de micorrización, descendiendo sobre un 60% la %M y la intensidad de micorrización en fragmentos de raíces micorrizados (%m). El parámetro de %a se redujo en un 40% en plantas ETR6AS, valor similar a la reducción de este parámetro en las plantas de genotipo silvestre y mutantes NRO, no encontrando, sin

embargo, reducción en la frecuencia de micorrización (%F). La fuerte disminución en los parámetros de %M y %a en las plantas ETR6-AS tratadas con 1,5mM de tungstato provocó una reducción de un 75% en el %A (Gráfica C, figura IV.20). Cuando se aplicó 75µM de ABA junto con 1,5mM de tungstato a plantas ETR6-AS los parámetros de %M y %m alcanzaron solo el 80% de sus valores originales en los tratamientos control, pero los parámetros de %a y %A si recuperaron a valores similares a los de plantas no tratadas (Gráfica C, figura IV.20).



Estos resultados revelan que la reducción en la intensidad de la colonización fúngica en la raíz (%M) por la aplicación de 1,5mM de tungstato fue altamente dependiente del genotipo de la planta (Two-Way ANOVA, $F_{2,45} = 27,44$, $P < 0,0001$). Por el contrario, la reducción en el parámetro de %a fue principalmente como resultado por la aplicación de tungstato (Two-Way ANOVA, $F_{2,27} = 174,07$, $P < 0,0001$), independientemente de la sensibilidad a etileno de las plantas. Sin embargo, hay una interacción significativa entre los factores de genotipo de la planta y aplicación de tungstato/ABA para los dos parámetros de micorrización, %M (Two-Way ANOVA, $F_{4,45} = 4,21$, $P = 0,005$) y %a (Two-Way ANOVA, $F_{4,27} = 6,13$, $P = 0,001$), demostrando que estos factores interactúan.



La cuantificación por qRT-PCR de la expresión de genes marcadores de la micorrización vino a verificar las medidas de micorrización en microscopio. Se cuantificó la acumulación de ARNm para el gen *GinEF* de *G. intraradices* (*G. irregulare*) en raíces de tomate con el fin de medir la tasa de colonización por hongos. La presencia de arbusculos en la totalidad de las raíces micorrizadas fue cuantificada a nivel molecular a través de la detección de la cantidad de transcrito del gen *GinGS* de *G. intraradices* (*G. irregulare*), gen con expresión limitada a arbusculos (Gomez *et al.*, 2009). Se observó un cambio significativo en la expresión de *GinEF* en las plantas ETR6-AS tratadas con 1,5mM de tungstato en relación a las sin tratar, pues disminuye su expresión en más de 3 veces (Figura IV.21), mientras que en plantas silvestres Flora-Dade y mutantes NRO, el tratamiento con 1,5mM de tungstato provocó una disminución de solo 2 y 1,4

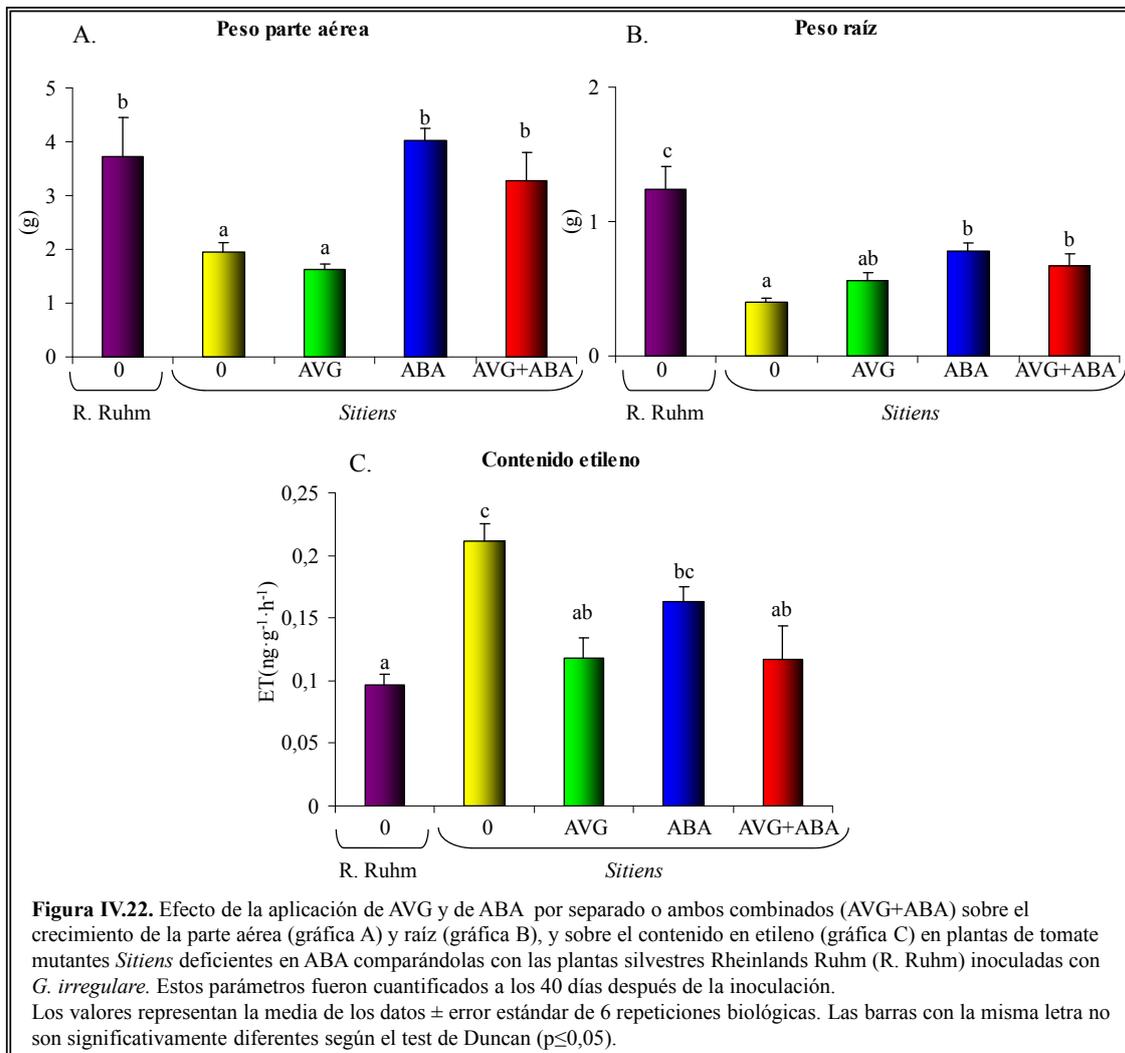
veces, respectivamente. Por otro lado, la expresión de *GinGS* decrece de 3 y más de 5 veces en las raíces micorrizadas tratadas con 1,5mM de tungstato del cultivar silvestre y del mutante ETR6-AS, respectivamente (Figura IV.21), mientras que dicha aplicación afectó en menor medida la expresión de dicho gen en las plantas NRO, con una afectación negativa de 2 veces. Por último, la aplicación conjunta de 75µM de ABA y 1,5mM de tungstato sódico rescata en mayor (en plantas NRO) o en menor medida (en plantas silvestres y mutantes ETR6-AS) la expresión de genes *GinEF* y *GinGS* (Figura IV.21).

Estos resultados muestran que tras la aplicación de tungstato se afecta la micorrización de forma diferente y de acuerdo con la sensibilidad a etileno de cada cultivar, y muestran claramente que el efecto de la reducción de la colonización micorrícica en las raíces como resultado de la aplicación de tungstato está mediada por la vía de etileno.

IV.2.3 El doble mecanismo: deficiencia de ABA e incremento de etileno causa una simbiosis Micorriza Arbuscular defectuosa en plantas mutantes *Sitiens* deficientes en ABA e inoculadas con *G. irregulare*

Los experimentos realizados y los consiguientes resultados obtenidos, descritos en apartados anteriores, sugieren claramente que la reducción en los niveles de ABA repercute en un incremento en los niveles de etileno, y por tanto hay una interacción antagonista ABA/etileno que afecta el proceso de micorrización. También parece claro que existen papeles diferentes para el ABA y el etileno durante el proceso de micorrización. Por un lado, el etileno parece tener un papel importante en el desarrollo de la intensidad de micorrización, mientras que el ABA participa de forma más directa en el desarrollo y función de arbusculos.

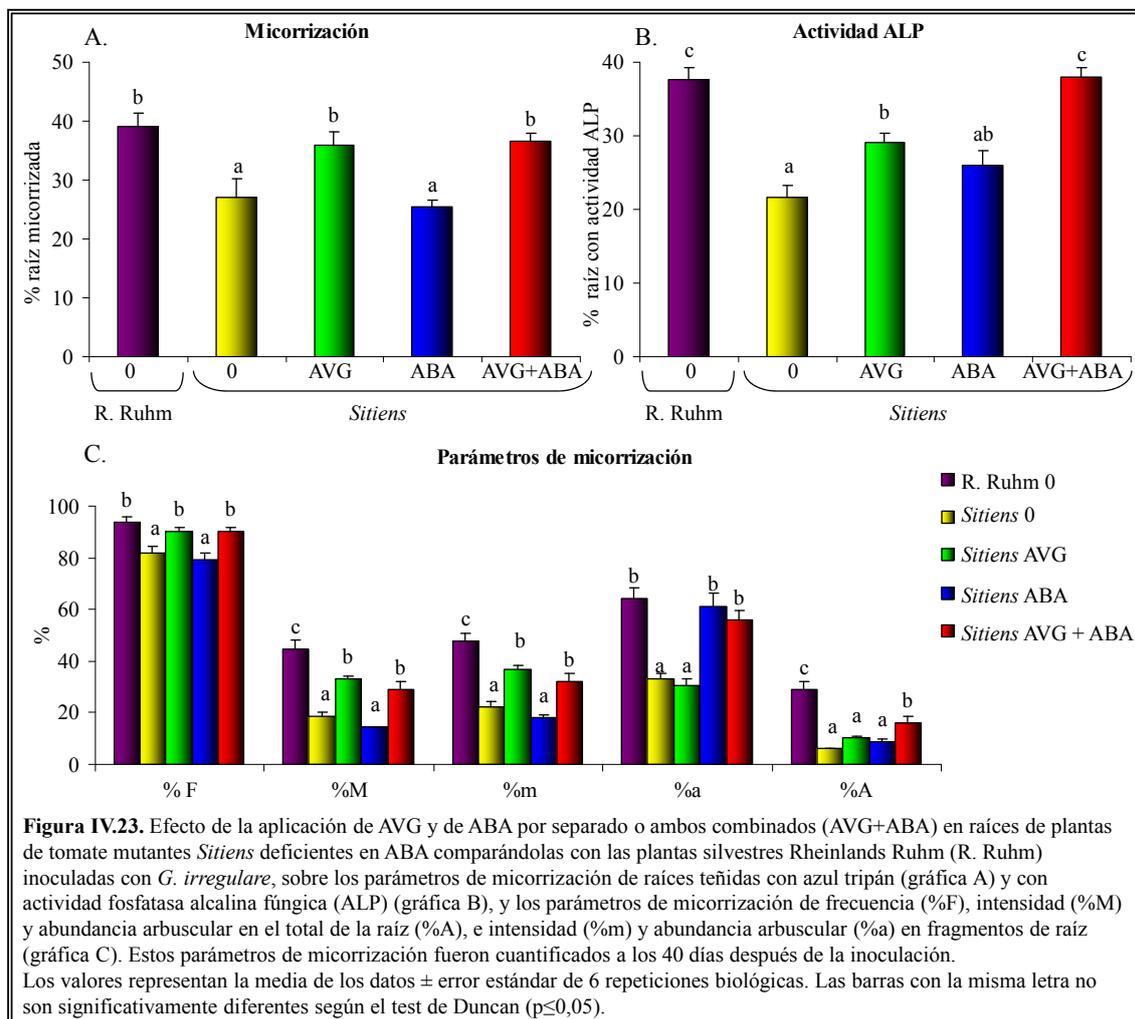
Para confirmar de una forma experimental esa especificidad de acción, se idearon experimentos en plantas *Sitiens* tratadas con ABA y/o el inhibidor de la síntesis de etileno Aminoetoxivinilo glicina hidrocloreto (AVG), comparando los efectos de la aplicación de estos productos sobre la micorrización y desarrollo de parámetros de micorrización, y sobre la expresión de genes marcadores del desarrollo fúngico y del desarrollo de arbusculos. Las aplicaciones de 50µM de AVG y 75µM de ABA de manera individual o conjunta se realizaron en suelo donde crecían plantas *Sitiens*, realizando dos aplicaciones en la segunda y cuarta semana después de la inoculación con *G. irregulare*. El experimento se prolongó hasta los cuarenta días después de la inoculación con el hongo arbuscular.



Al igual que en ensayos anteriores, la deficiencia de ABA provoca un retraso en el desarrollo y crecimiento de las plantas mutantes *Sitiens*, tanto de su parte aérea como de sus raíces y en relación con las plantas silvestres Rheinlands Ruhm, recuperándose el crecimiento de la parte aérea totalmente y parcialmente el de la raíz tras la aplicación de ABA de manera individual o en combinación con AVG. La aplicación de solo AVG no afecta al crecimiento de la planta (Gráficas A y B, figura IV.22).

Se determinó el contenido en etileno en las raíces de las plantas para verificar que efectivamente la aplicación de AVG provocaba un bloqueo en la síntesis de esta hormona. Como se determinó en el apartado IV.1.1., las plantas *Sitiens* tienen un mayor contenido en etileno, en este caso 2 veces más, que su cultivar silvestre. El AVG, aplicado solo o en combinación con

ABA, reduce la producción de etileno en plantas *Sitiens* a cantidades similares a las registradas por las plantas silvestres, mientras que la aplicación únicamente de ABA no fue tan efectiva en el descenso del contenido de etileno en raíces en las plantas *Sitiens* (Gráfica C, figura IV.22).



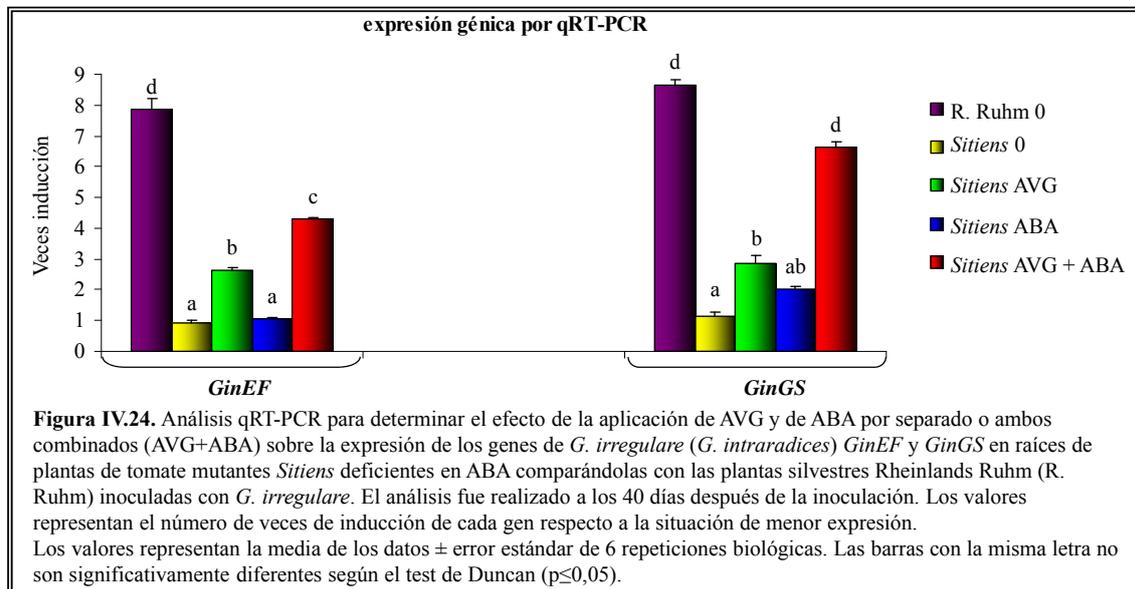
Los primeros análisis de la afectación de la micorrización se realizaron determinando tanto el porcentaje de raíz colonizada como el porcentaje de raíz con actividad ALP. Como en otros experimentos, las plantas mutantes *Sitiens* presentan un descenso del porcentaje de raíz micorrizada con respecto a plantas de tomate silvestres Rheinlands Ruhm, que en este caso fue de un 30%. La aplicación de AVG solo, o en combinación con ABA, rescata casi por completo la micorrización en estos mutantes *Sitiens* (Gráfica A, figura IV.23). Al igual que en raíces teñidas con azul tripán, las plantas *Sitiens* tienen menor porcentaje de actividad ALP, disminuyendo en un 42% con respecto a su cultivar silvestre, y tanto la aplicación de AVG como de ABA por

separado rescató parcialmente dicha actividad ALP, y solamente tras la aplicación conjunta de AVG y ABA se recuperaron totalmente esos valores en plantas *Sitiens*, siendo similares a los registrados por las plantas silvestres (Gráfica B, figura IV.23).

Realizando un estudio más exhaustivo de los parámetros de micorrización se observaron resultados interesantes. En las plantas *Sitiens* sin tratar se produce un descenso de la frecuencia de micorrización (%F) de un 14% con respecto a su cultivar silvestre. La aplicación de ABA a plantas *Sitiens* no rescata el valor de este parámetro, y tan sólo la aplicación de AVG, tanto de manera aislada como en combinación con ABA, incrementa el valor de este parámetro a registros similares a los de plantas silvestres no tratadas, (Gráfica C, figura IV.23). Estos mutantes *Sitiens* también sufren un descenso de un 60% con respecto al cultivar silvestre tanto de la intensidad de micorrización total (%M), como en la intensidad de micorrización en los fragmentos micorrizados (%m). Al igual que en el caso de la frecuencia de micorrización, solamente la aplicación de AVG (aplicado de manera aislada o en combinación con ABA) provocó un incremento notable del valor de estos parámetros en las plantas *Sitiens*, aunque sin llegar a superar el nivel de plantas silvestres no tratadas (Gráfica C, figura IV.23). El porcentaje de abundancia arbuscular en los fragmentos de las raíces micorrizadas (%a) también se afectó de manera muy significativa en plantas *Sitiens* con respecto al cultivar silvestre, con una reducción del 49%. El valor del parámetro de %a fue rescatado a los valores registrados por plantas silvestre Rheinlands Ruhm solamente cuando el ABA estaba presente (Gráfica C, figura IV.23). Como en el resto de parámetros, el porcentaje de arbuscúlos en el total de las raíces (%A), sufre un drástico descenso en las raíces de plantas *Sitiens*, con una reducción de más del 80%. La aplicación de ABA o AVG de manera individual no rescató el valor de %A en las raíces de estos mutantes deficientes en ABA, mientras que la aplicación combinada de ambos compuestos si tuvo un efecto positivo en la recuperación de este parámetro en las raíces micorrizadas *Sitiens* (Gráfica C, figura IV.23).

Mediante análisis de expresión génica por qRT-PCR se verificó también a nivel molecular la distinta respuesta de plantas *Sitiens* al tratamiento con 50 μ M de AVG y 75 μ M de ABA aplicados de manera individual o combinada. Para determinar la tasa de colonización por el hongo arbuscular se cuantificó la acumulación del transcrito de ARNm para el gen fúngico *GinEF* en raíces de tomate. Se cuantificó la cantidad de transcrito del gen fúngico *GinGS* para determinar el total de arbuscúlos funcionales en las raíces micorrizadas. En las raíces de plantas de tomate *Sitiens* se observó que disminuye la expresión de *GinEF* en unas 8 veces respecto al valor de

expresión de este gen en plantas silvestres, y la aplicación de 50 μ M de AVG solo o en combinación con 75 μ M de ABA rescata parcialmente la cantidad de transcrito del gen *GinEF* en las raíces de estos mutantes (Figura IV.24). Por tanto, el patrón de expresión del gen *GinEF*, es muy similar al patrón de comportamiento observado para el parámetro de %M en estas plantas. Con respecto a la cantidad de transcrito acumulado del gen *GinGS*, se observó que en las plantas *Sitiens* se encuentra disminuido 9 veces respecto al valor del cultivar silvestre, y tanto la aplicación de AVG y ABA por separado produce un leve incremento de la expresión de dicho gen. Sin embargo, es la aplicación conjunta de ambos compuestos lo que incrementa su expresión en plantas *Sitiens*, alcanzando niveles similares a los de plantas silvestres (Figura IV.24). El patrón de expresión del gen *GinGS*, se asemeja al patrón de comportamiento del parámetro de %A determinado en nuestro experimento en las raíces de estas plantas *Sitiens* y de su cultivar silvestre.

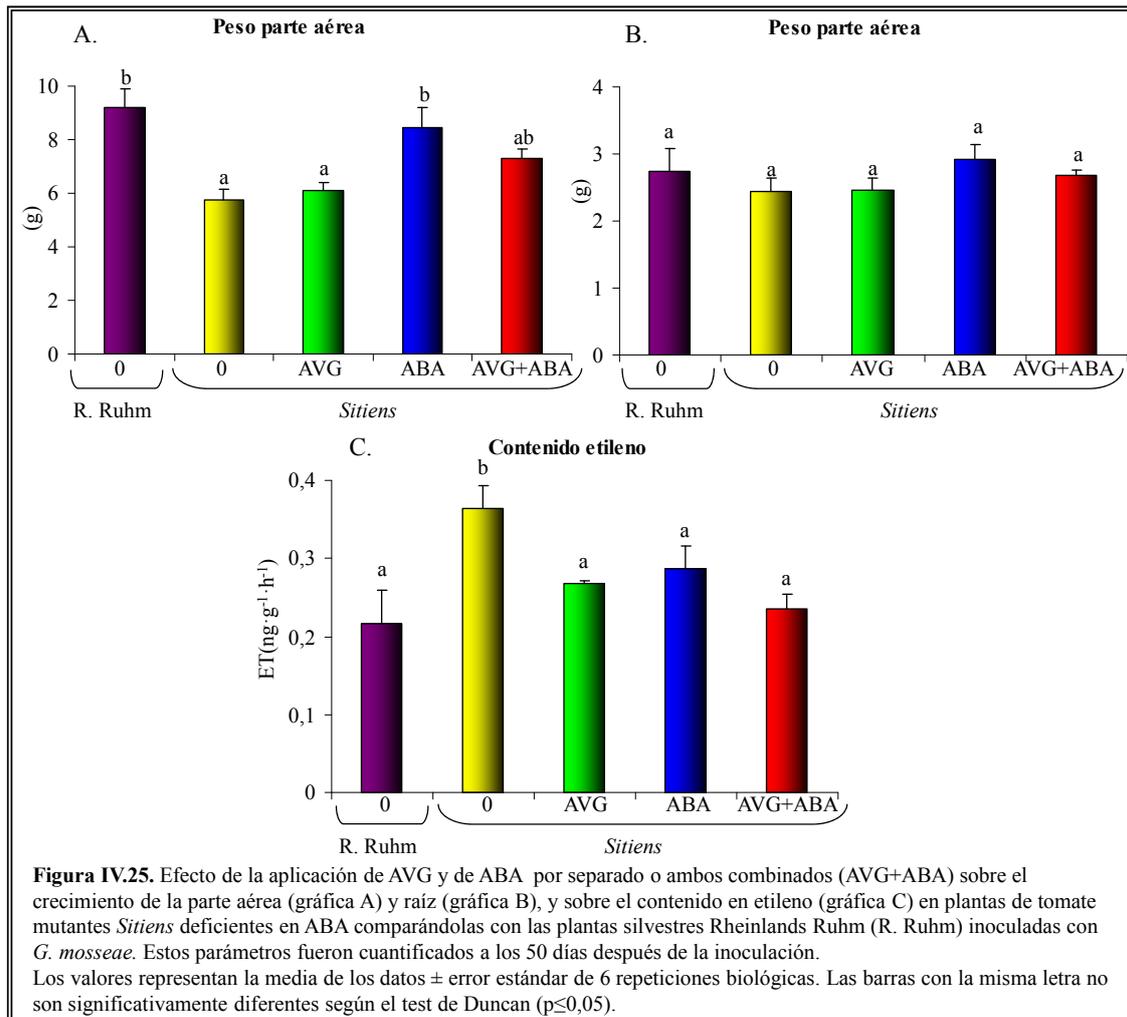


IV.2.4 El doble mecanismo: deficiencia de ABA e incremento de etileno causa una simbiosis Micorriza Arbuscular defectuosa en plantas mutantes *Sitiens* deficientes en ABA e inoculadas con *G. mosseae*

Con el fin de verificar los resultados anteriores y generalizar el patrón de micorrización de plantas *Sitiens* deficientes en ABA, se realizó un experimento de inoculación de plantas *Sitiens* con otro hongo formador de MA distinto a *G. irregulare*, en concreto *G. mosseae*, que posee menor capacidad infectiva y una dinámica de colonización diferente. El diseño del experimento y la metodología empleada fue similar al descrito en el apartado anterior, utilizando tratamientos

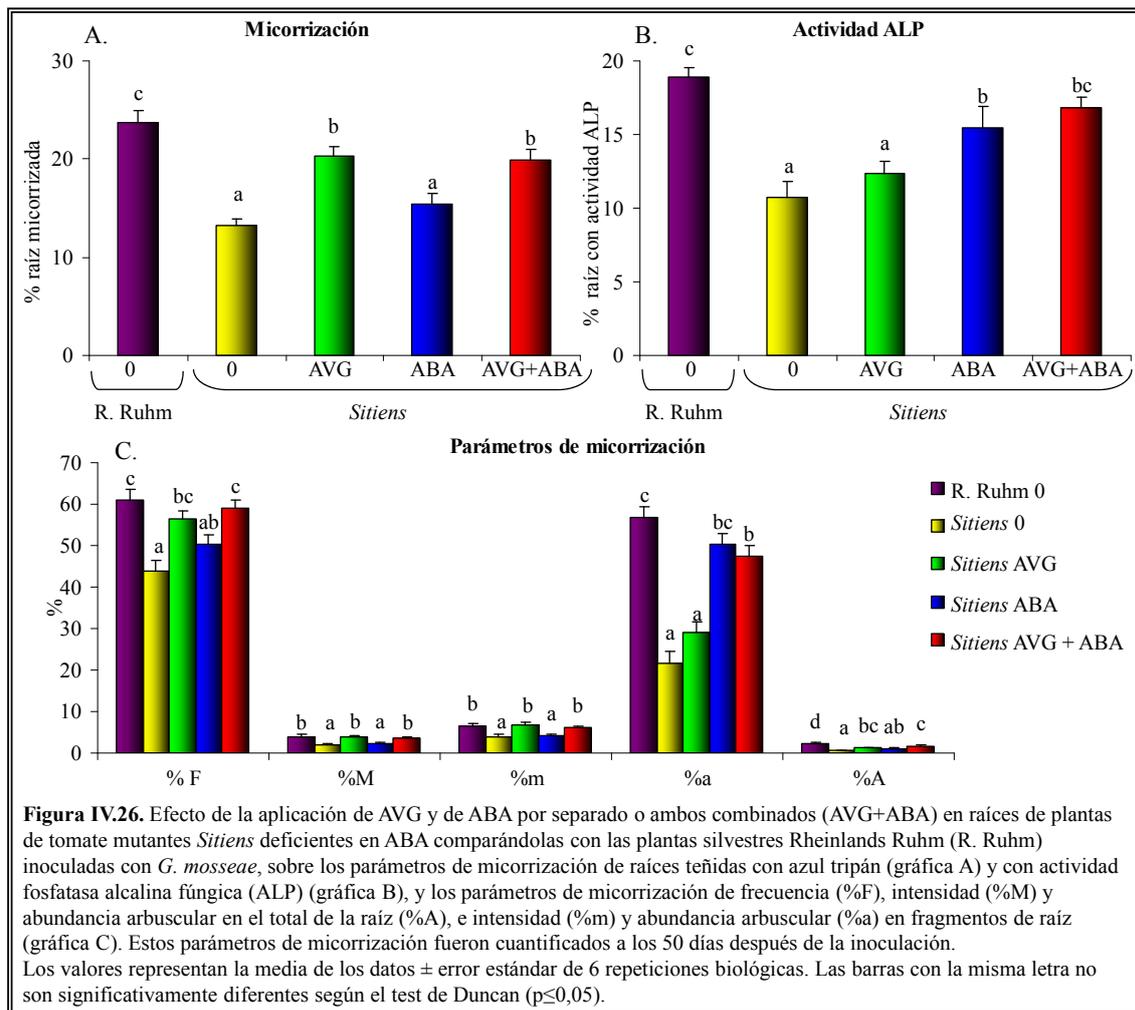
IV. RESULTADOS

controles en plantas silvestres y plantas *Sitiens* no tratadas o tratadas con 50 μ M de AVG y 75 μ M de ABA, aplicados de manera individual o conjunta. Al igual que en el caso de inoculación con *G. irregulare*, las plantas *Sitiens* inoculadas con *G. mosseae*, y debido a su innata deficiencia en ABA, sufren un retraso en el crecimiento y desarrollo que se manifiesta en pérdida de peso de su parte aérea con respecto a su cultivar silvestre. La aplicación de ABA sólo o en combinación con AVG palió esta deficiencia (Gráfica A, figura IV.25). En este experimento no se encontraron diferencias significativas en el peso fresco de raíz de las plantas *Sitiens* en relación a las silvestres (Gráfica B, figura IV.25).



Como era de esperar, las plantas *Sitiens* sin tratar poseían un contenido de etileno en la raíz de casi dos veces superior al encontrado en las raíces de las plantas silvestres Rheinlands Ruhm. Tanto la aplicación de AVG y ABA, por separado o de manera combinada, reducía el contenido

en etileno en las raíces de estos mutantes hasta niveles cercanos a los registrados por las raíces de plantas silvestres (Gráfica C, figura IV.25).



A estas plantas mutantes *Sitiens* tratadas con AVG y ABA por separado o de manera conjunta, como al silvestre Rheinlands Ruhm, se les realizó un estudio de micorrización cuantificada como porcentaje de raíz colonizada y actividad ALP fúngica en raíz, para comprobar que el desarrollo de colonización por el hongo *G. mosseae* tiene un patrón similar al del hongo *G. irregulare*. Se observó que aunque los valores de micorrización en las plantas inoculadas con el hongo micorrícico *G. mosseae* (Gráfica A, figura IV.26) fueron menores que en plantas inoculadas con *G. irregulare* (Gráfica A, figura IV.23), aun cuando el tiempo de desarrollo del experimento de la colonización fue mayor, el comportamiento fue similar en tanto que los mutantes *Sitiens* tenían un 45% menos de porcentaje de raíz colonizada que el cultivar silvestre, y

que la aplicación de AVG sólo o en combinación con ABA recupera el porcentaje de micorrización a valores cercanos a los registrados por el silvestre Rheinlands Ruhm (Gráfica A, figura IV.26). Al igual que el porcentaje de micorrización, la actividad ALP de raíces inoculadas con el hongo *G. mosseae* (Gráfica B, figura IV.26) fue inferior a la observada en el caso de *G. irregulare* (Gráfica B, figura IV.23), y sigue manteniendo una proporción de un 43% inferior en plantas mutantes *Sitiens* respecto a las silvestres. En este experimento, la aplicación de ABA, bien sea solo o en combinación con AVG provoca una recuperación casi total de la actividad ALP, con valores cercanos a los registrados por las plantas silvestres Rheinlands Ruhm (Gráfica B, figura IV.26).

El resultado de la cuantificación de los distintos parámetros de micorrización también mostró que en las plantas inoculadas con *G. mosseae* se reducen bastante todos los parámetros de micorrización en comparación con las plantas inoculadas con *G. irregulare* (Gráfica C, figura IV.23), salvo la abundancia arbuscular en los fragmentos micorrizados (%a) que se mantienen en valores similares (Gráficas C, figuras IV.23 y IV.26). Este hecho significa que *G. mosseae* es un hongo menos infectivo que *G. irregulare* pero con igual capacidad para la formación de arbusculos. No obstante, y como para el caso del porcentaje de micorrización y actividad ALP en raíz, aunque cambien los valores, el patrón que siguen los distintos parámetros en respuesta a los tratamientos es similar en las plantas independientemente del hongo colonizador. Se observó que la frecuencia de micorrización (%F) descendió en las plantas mutantes *Sitiens* deficientes en ABA en un 29% con respecto a las plantas silvestres, recuperándose dicho parámetro a valores cercanos a los registrados por las plantas silvestres cuando estas plantas mutantes fueron tratadas con AVG, tanto solo o aplicado conjuntamente con ABA. También el tratamiento únicamente con ABA palió en parte el descenso de este parámetro (Gráfica C, figura IV.26). De igual manera, los parámetros de intensidad de micorrización %M y %m sufren un descenso de aproximadamente el 50% en plantas *Sitiens* respecto a plantas silvestres, y tal y como ocurría en plantas *Sitiens* inoculadas con el hongo micorrícico *G. irregulare*, y estos parámetros se recuperaron tras la aplicación de AVG, ya sea solo o conjuntamente con ABA (Gráfica C, figura IV.26). En las plantas silvestres Rheinlands Ruhm también se observó mayor porcentaje de abundancia arbuscular en los fragmentos micorrizados (%a) que en los mutantes *Sitiens*, los cuáles mostraron una reducción del 60%. Tras la aplicación de ABA (aplicada de manera individual o conjunta con AVG), el %a en estas plantas incrementó a valores cercanos a los encontrados en plantas silvestres (Gráfica C, figura IV.26). En cuanto al porcentaje de arbusculos totales en las raíces (%A), calculado en función de los parámetros %a y %M, las plantas *Sitiens*

mostraron una disminución del 80% con respecto a las plantas silvestres, y que como era de esperar, únicamente la aplicación de ambos compuestos a la vez (AVG y ABA) provoca una recuperación casi por completo del nivel de arbusculos totales en estas plantas (Gráfica C, figura IV.26).

Como resumen de este capítulo de resultados podemos concluir que los datos presentados muestran que las plantas *Sitiens*, independientemente del hongo colonizador, muestran una ineficiencia en la formación de la Micorriza Arbuscular. Esta ineficacia puede ser paliada tanto por la manipulación de la síntesis de etileno como por la compensación de su deficiencia en ABA. La inhibición de la síntesis de etileno provoca un incremento significativo de la intensidad de colonización, mientras que la recuperación en la abundancia arbuscular está asociada a la presencia de niveles de ABA fisiológicamente normales.

IV.3. IMPORTANCIA DEL ÁCIDO GIBERELEICO EN EL PROCESO DE FORMACIÓN DE LA SIMBIOSIS MICORRIZA ARBUSCULAR EN TOMATE

En los resultados presentados en capítulos anteriores y usando mutantes en la síntesis o percepción de etileno o ABA, y bloqueadores de síntesis tanto de ABA como de etileno, se ha evidenciado que el ABA tiene un papel directo sobre la formación de los arbusculos durante el proceso de micorrización, y una acción indirecta, a través de la ruta del etileno, sobre la intensidad de la micorrización.

De igual manera, estudios de transcriptómica realizados en nuestro laboratorio usando la metodología de Microarrays, nos han mostrado que las variaciones en la micorrización entre las raíces de las plantas de tomate silvestres y mutantes *Sitiens* deficientes en ABA se acompañan con alteraciones transcriptómicas en la expresión de varios genes que codifican para ciertas enzimas claves de la ruta de biosíntesis de las Giberelinas (GAs), tales como la ent-copalyl difosfato sintasa (CPS), la ent-kaureno oxidasa (KO), la giberelina-20-oxidasa 1 (GA20ox1) y la giberelina-3-oxidasa 1 (GA3ox1), así también como de genes que codifican enzimas de su catabolismo, como la giberelina-2-oxidasa 1 (GA2ox1), y cuya expresión es diferente en las plantas silvestres inoculadas en comparación con plantas silvestres no inoculadas y plantas mutantes *Sitiens* tanto inoculadas como no inoculadas (García-Garrido *et al.*, 2010).

De acuerdo a lo anterior, es un hecho claro que las plantas deficientes en ABA poseen alteraciones en el patrón de micorrización que afectan sobre todo a la formación de arbusculos, y a su vez presentan alteraciones transcriptómicas relacionadas con el metabolismo de las GAs. De ahí, que el objetivo de los experimentos realizados en este capítulo fue analizar el papel que desempeñan las GAs en la regulación de la formación de la simbiosis micorrícica en plantas de tomate, y para ello se han utilizado herramientas genéticas, tales como plantas mutantes defectivas en la producción o percepción de esta hormona, en combinación con experimentos de aplicación exógena de ácido giberelico 3 (GA₃) y/o inhibidores de GAs, tales como paclobutrazol y prohexadiona cálcica.

IV.3.1 Activación de genes del metabolismo de GAs durante el proceso de formación de la simbiosis Micorriza Arbuscular

Tal y como se ha mencionado, los resultados previos derivados del análisis transcriptómico entre raíces inoculadas y no inoculadas de plantas de tomate silvestres y mutantes *Sitiens*

deficientes en ABA, mostraron que varios genes relacionados tanto con la ruta biosintética de las GAs (*CPS*, *KO*, *GA20ox1* y *GA3ox1*) como con su catabolismo (*GA2ox1*) incrementaban su expresión en las raíces de las plantas silvestres inoculadas con respecto a las demás. Dicha expresión se representa como valor M (\log_2 de la variación relativa en la expresión) en la Tabla IV.1. Observamos que para los cinco genes analizados en el experimento de transcriptómica hay una mayor expresión en las plantas silvestres inoculadas con respecto a las no inoculadas, encontrándose que aquellos genes donde la diferencia es más acusada son los genes *CPS* y *GA3ox1*, con valor M superior a 2,8. Por otro lado, en las plantas mutantes *Sitiens* deficientes en ABA, sólo hay un incremento en las plantas inoculadas con respecto a las no inoculadas en el gen *CPS*. Y por último, para todos estos genes también hay una mayor expresión en las plantas silvestres inoculadas con respecto a las plantas mutantes *Sitiens* inoculados, siendo esa diferencia mayor en los genes *CPS* y *GA3ox1* (Tabla IV.1).

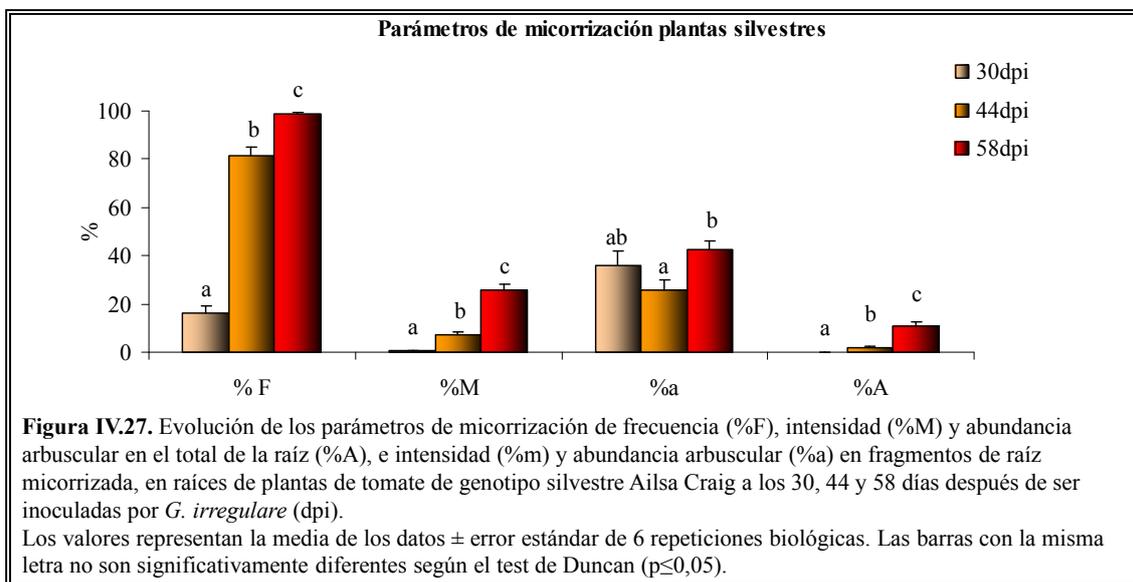
Tabla IV.1. Datos de expresión de genes relacionados con el metabolismo de las GAs obtenidos en un experimento de transcriptómica con cDNA de raíces de plantas silvestres y mutantes *Sitiens* micorrizadas o no.

gen	valor M		
	RheI/RheNI	SitI/SitNI	RheI/SitI
<i>CPS</i>	3,18	1,06	2,36
<i>GA3ox1</i>	2,81	0,85	2,26
<i>KO</i>	1,88	0,38	1,38
<i>GA20ox1</i>	1,67	0,14	1,61
<i>GA2ox1</i>	1,08	-0,05	1

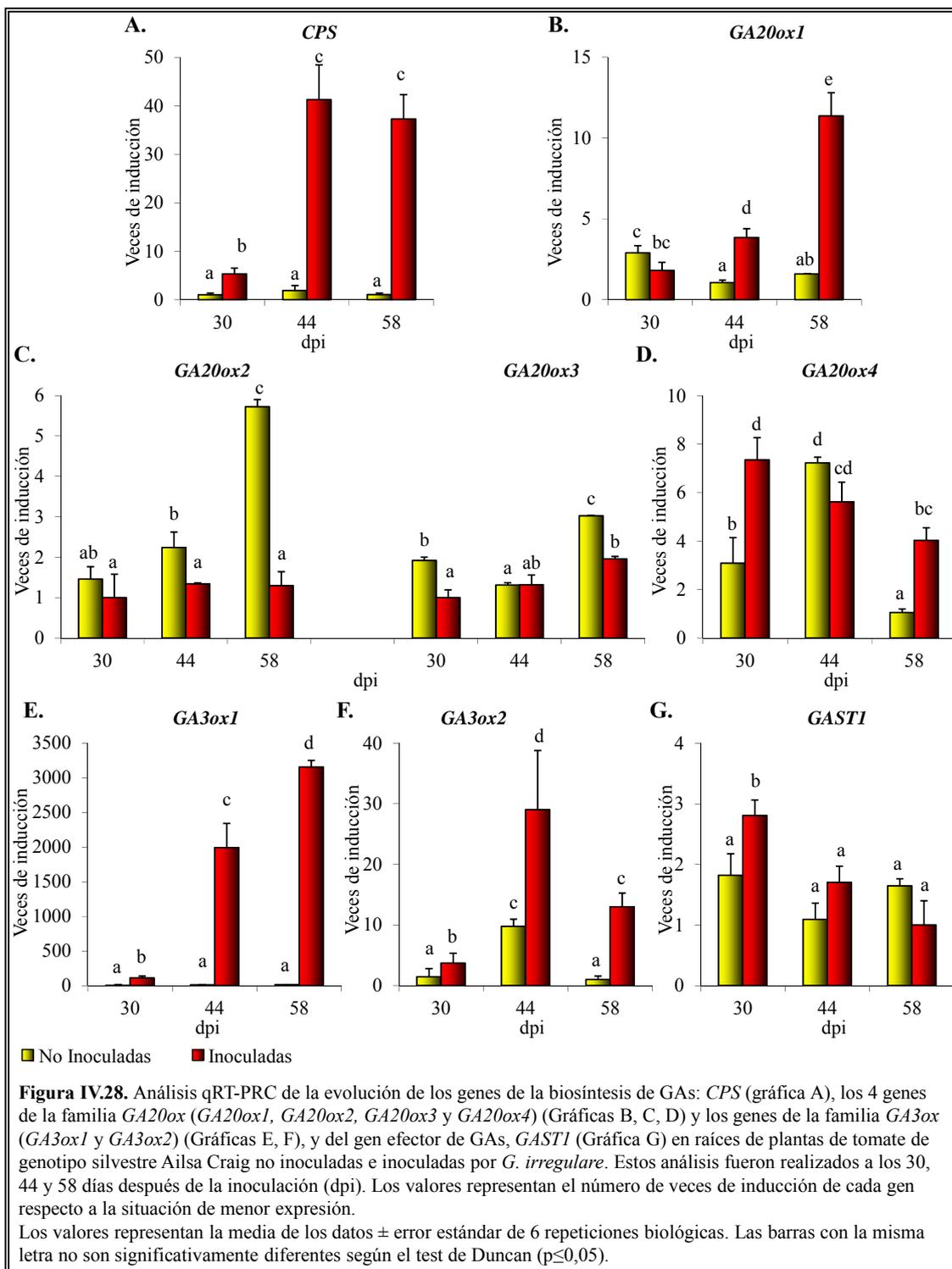
Los datos representan el valor M (\log_2 de la relación), el cual es 0 si no hay cambio y +1 o -1 si hay dos veces inducción o reducción, respectivamente. Los experimentos de hibridación de arrays, se han realizado por triplicado con tres cDNAs obtenidos de experimentos biológicos independientes. Rhe = silvestre Rheinlands Ruhm; Sit = *Sitiens*; I = inoculadas; NI = no inoculadas.

En el presente estudio se ha realizado un análisis de expresión mediante qRT-PCR de varios genes relacionados con el metabolismo de GAs. En los cuales incluimos genes relacionados con la biosíntesis de GAs: *CPS*, *GA20ox1*, *GA20ox2*, *GA20ox3*, *GA20ox4*, *GA3ox1* y *GA3ox2*, genes relacionados con el catabolismo de GAs: *GA2ox1*, *GA2ox2*, *GA2ox3*, *GA2ox4* y *GA2ox5*, genes relacionados con la regulación de las GAs: *GAI* y genes efectores de GAs: *GASTI*. En todos los casos, el nivel de expresión de estos genes se normalizó respecto a la cantidad de ARNm del gen de tomate codificante para el factor de elongación 1α , *LeEfa1*. El nivel de expresión génica de todos estos genes, pertenecientes al metabolismo de GAs en las plantas de tomate, se calculó usando el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$, mostrándose como resultado el valor en veces de inducción en los diferentes tratamientos respecto al tratamiento con menor nivel de expresión.

Se estudió la expresión de los genes en plantas con diferente grado de micorrización. Para ello, se realizó un experimento con plantas de tomate silvestres Ailsa Craig, cosechadas a diferentes tiempos tras la inoculación con el hongo arbuscular. Se utilizaron tanto plantas inoculadas con el hongo micorrícico como plantas no micorrizadas, recolectadas ambas a los 30, 44 y 58 días tras ser inoculadas (dpi). En las plantas micorrizadas se realizó un análisis exhaustivo de la evolución de los parámetros de micorrización en la raíz. Los parámetros de frecuencia (%F) e intensidad de micorrización (%M) incrementaron en función del tiempo de colonización, al igual que ocurrió con la abundancia arbuscular en el total de la raíz (%A). Por el contrario, la abundancia arbuscular en los fragmentos micorrizados (%a) se mantuvo en valores similares a lo largo del tiempo (Figura IV.27).



El análisis de la expresión del gen *CPS* mediante qRT-PCR determinó que en la raíz de plantas no inoculadas existe una expresión basal inalterada durante el periodo de crecimiento y condiciones experimentales ensayadas. Sin embargo, en plantas micorrizadas si se observó un incremento de la expresión, siendo este incremento de 6 veces con respecto al valor obtenido en plantas no micorrizadas en la primera cosecha, y de 40 veces respecto a ese valor tanto en la segunda como tercera cosecha (Gráfica A, figura IV.28).



Con respecto a los genes pertenecientes a la familia multigénica *GA20ox*, cabe destacar la presencia de varios patrones de expresión distintos. El gen *GA20ox1* en plantas no micorrizadas mostró un patrón de expresión según el cual solo hay un leve incremento en la expresión en la

primera cosecha, siendo los valores de la segunda y tercera cosecha iguales e inferiores a los de la primera. En la raíz de plantas micorrizadas se observó un incremento en la expresión respecto a plantas no micorrizadas a partir de la segunda cosecha (4 veces respecto al valor en plantas no micorrizadas) y tercera cosecha (12 veces más respecto al valor de plantas no micorrizadas) (Gráfica B, figura IV.28). Por su parte, los genes *GA20ox2* y *GA20ox3* mostraron entre sí un patrón de expresión parecido, siendo la expresión en plantas micorrizadas igual o menor a la expresión en plantas no micorrizadas. Se observa un incremento de la expresión gradual con el tiempo de cosecha en plantas no micorrizadas y una expresión constante en plantas micorrizadas, salvo un leve incremento en la última cosecha en el gen *GA20ox3* (Gráfica C, figura IV.25). Por último, el gen *GA20ox4* muestra unos niveles de expresión decrecientes con el tiempo de micorrización en plantas micorrizadas, siendo estos niveles, tanto en la primera como tercera cosecha, mayores a los observados en plantas no micorrizadas (Gráfica D, figura IV.28).

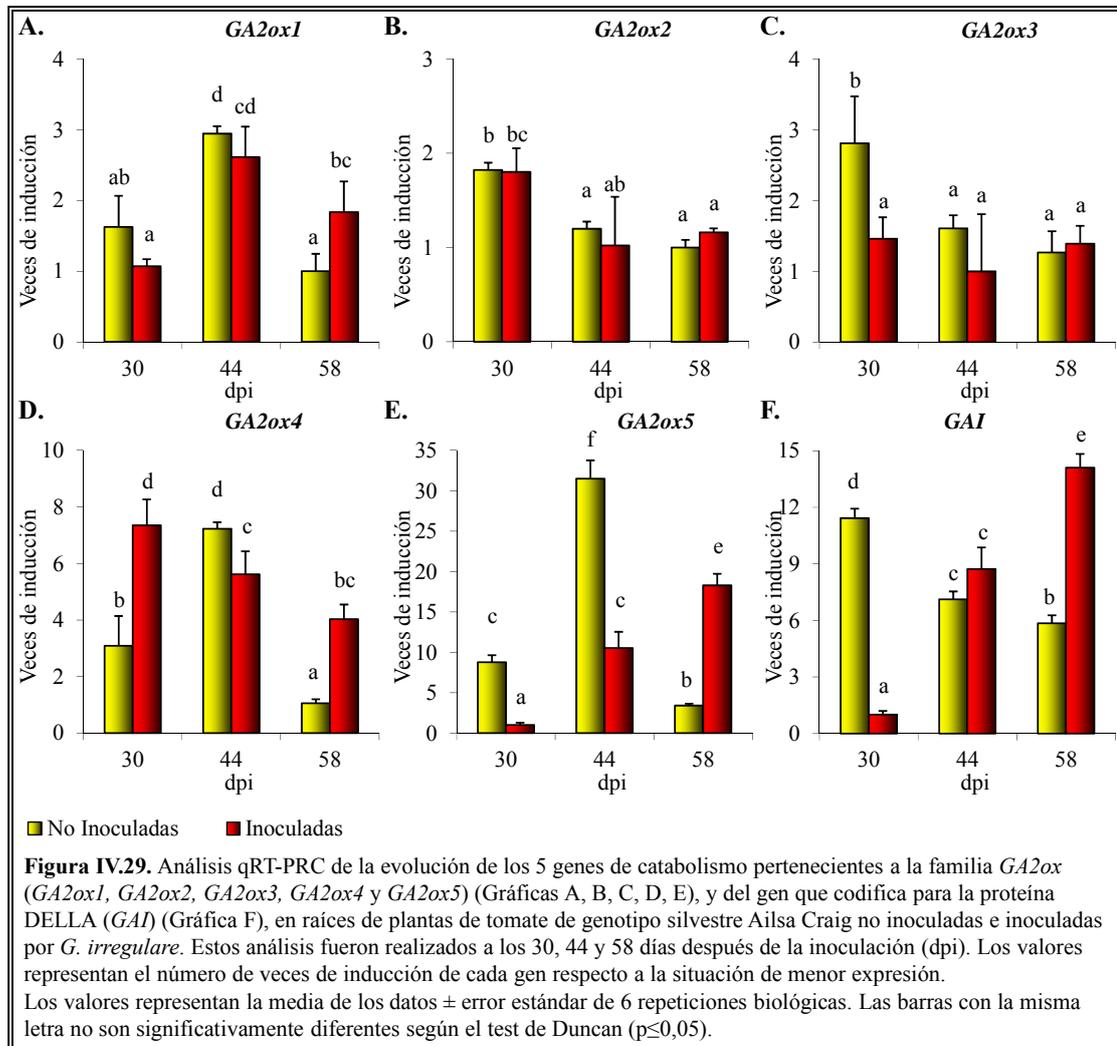
El análisis de la expresión de la familia multigénica *GA3ox*, mostró que el gen *GA3ox1*, al igual que el gen *CPS*, tiene mayor expresión en plantas micorrizadas ya desde la primera cosecha, observándose niveles de expresión de 150, 2000 o 3000 veces mayores en dichas plantas micorrizadas respecto a plantas no micorrizadas a los 30, 44 y 58 días después de la inoculación, respectivamente (Gráfica E, figura IV.28). Por su parte, el gen *GA3ox2* tanto en raíces de plantas micorrizadas como no micorrizadas sigue un patrón similar, con un pico de expresión a los 44 dpi, aunque también siempre se encontró mayor expresión en las raíces de plantas micorrizadas, si bien el incremento no fue superior a las 10 veces con respecto a las plantas no micorrizadas del mismo tiempo de cosecha (Gráfica F, figura IV.28).

Y por último, el gen efector de GAs, *GAST1*, mostró un patrón totalmente diferente al presentado por la mayoría de los genes de biosíntesis (salvo el gen *GA20ox4*), donde encontramos un pico de expresión en las plantas micorrizadas en la primera cosecha, no encontrándose diferencias significativas en el resto de tiempos tanto en las plantas micorrizadas como no micorrizadas (Gráfica G, figura IV.28).

El análisis de expresión de los genes de catabolismo de GAs perteneciente a la familia multigénica *GA2ox* nos reveló un patrón de expresión diferente al observado para la mayoría de los genes de biosíntesis, ya que en líneas generales o no hay diferencias o hay una mayor expresión en las raíces de las plantas no micorrizadas, salvo excepciones puntuales. Así, los genes *GA2ox1*, *GA2ox2* y *GA2ox3* mostraron un patrón de expresión parecido en plantas

micorrizadas y no micorrizadas, caracterizado por una expresión similar y mantenida a lo largo del tiempo, salvo un breve repunte en la expresión del gen *GA2ox1* en plantas micorrizadas a los 58 dpi y un incremento en plantas no micorrizadas para el gen *GA2ox3* en la primera cosecha (Gráficas A, B y C figura IV.29). Curiosamente, el gen de catabolismo *GA2ox4* mostró un patrón de expresión similar al gen de biosíntesis *GA20ox4*, de tal forma que muestra unos niveles de expresión decrecientes con el tiempo de micorrización en plantas micorrizadas, siendo estos niveles, tanto en la primera como tercera cosecha, mayores a los observados en plantas no micorrizadas. Sin embargo, en plantas no micorrizadas aparece un pico de expresión a los 44 dpi que hace que la expresión sea mayor en esta cosecha en estas plantas no micorrizadas respecto a las micorrizadas (Gráfica D, figura IV.29). Por último, el gen *GA2ox5* muestra un patrón de expresión totalmente diferente en plantas micorrizadas y no micorrizadas. En las raíces de plantas no micorrizadas el patrón es igual que en el caso del gen *GA2ox4*, es decir, un incremento considerable y transitorio de la expresión en la cosecha intermedia, que llega a ser de 30 veces el valor de la expresión cuantificada en la última cosecha. Por su parte, en plantas micorrizadas se observa un incremento gradual de la expresión correlativo con el incremento del tiempo de cosecha. Solamente en la última cosecha la expresión en plantas micorrizadas es superior a la expresión en plantas no micorrizadas, siendo en la primera y segunda cosecha superior en las plantas no inoculadas (Gráfica E, figura IV.29).

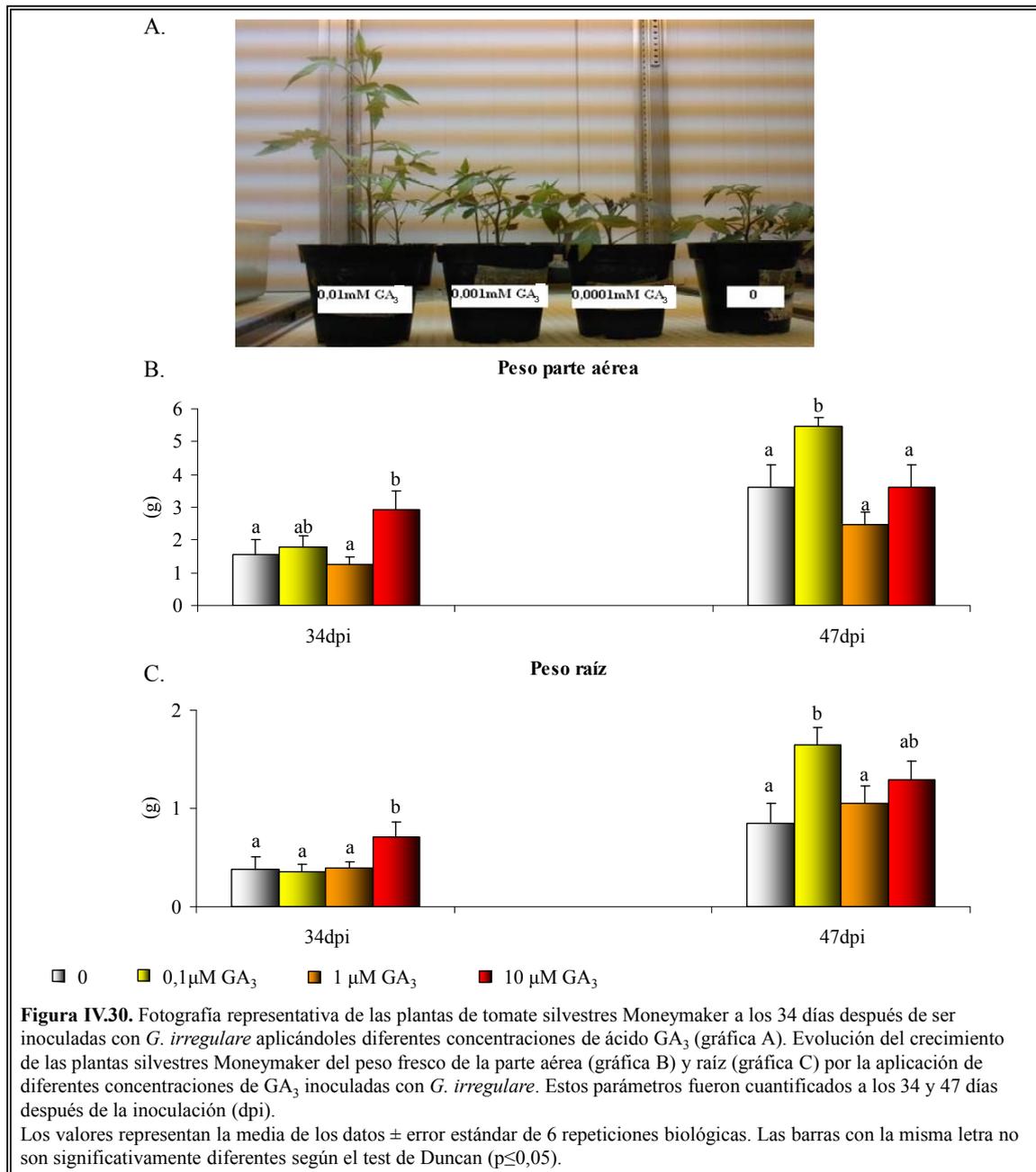
Por último, el estudio del gen *GAI*, que codifica para una proteína DELLA que regula negativamente la respuesta de GAs, mostró que el patrón de expresión es diferente en raíces de plantas micorrizadas y no micorrizadas. En raíces de plantas no micorrizadas la expresión del gen *GAI* va disminuyendo conforme aumenta la edad de la planta, mientras que en raíces de plantas micorrizadas el patrón es totalmente inverso, pues aumenta su expresión conforme aumenta la edad de la planta y consecuentemente su micorrización. En consecuencia, con este patrón de expresión se observa que en la primera cosecha las raíces de plantas micorrizadas reducen su expresión unas 11 veces con respecto a la expresión en las raíces de plantas no micorrizadas, mientras que de forma contraria se incrementa en la última cosecha en raíces de plantas micorrizadas con respecto a las no micorrizadas más de 2 veces, no encontrando diferencias significativas entre ambos tipos de plantas en la segunda cosecha. Por último, en la última cosecha la expresión en raíces de plantas micorrizadas vuelve a incrementar notablemente, y su expresión es de 2 veces superior con respecto a las plantas micorrizadas (Gráfica F, figura IV.29).



Los resultados de este análisis qRT-PCR de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de GA, que muestran alteraciones muy significativas del patrón de expresión en raíces micorrizadas, sugieren que las GAs juegan un papel relevante en la micorrización y en el correcto funcionamiento de la micorriza arbuscular. Por tanto, el siguiente paso en nuestra investigación fue determinar dicho papel y para ello realizamos una serie de experimentos de aplicación exógena tanto de ácido gibereleico 3 (GA_3) como de inhibidores de biosíntesis de GAs (paclobutrazol y prohexadiona cálcica), al objeto de determinar y cuantificar las alteraciones que dicha aplicación origina en el desarrollo de la simbiosis MA.

IV.3.2 Análisis de la micorrización en plantas de tomates tratadas con diferentes concentraciones de GA₃

En un trabajo previo al realizado en nuestro laboratorio, se estudió el efecto sobre la micorrización de la aplicación de ácido gibereleico a plantas de guisantes inoculadas con *G. mosseae*, observando que la abundancia arbuscular disminuía a partir de la aplicación de 0,1 μM de GA₃, y el porcentaje de micorrización empezó a disminuir a partir de 1 μM de GA₃ (El Ghachtouli *et al.*, 1996).

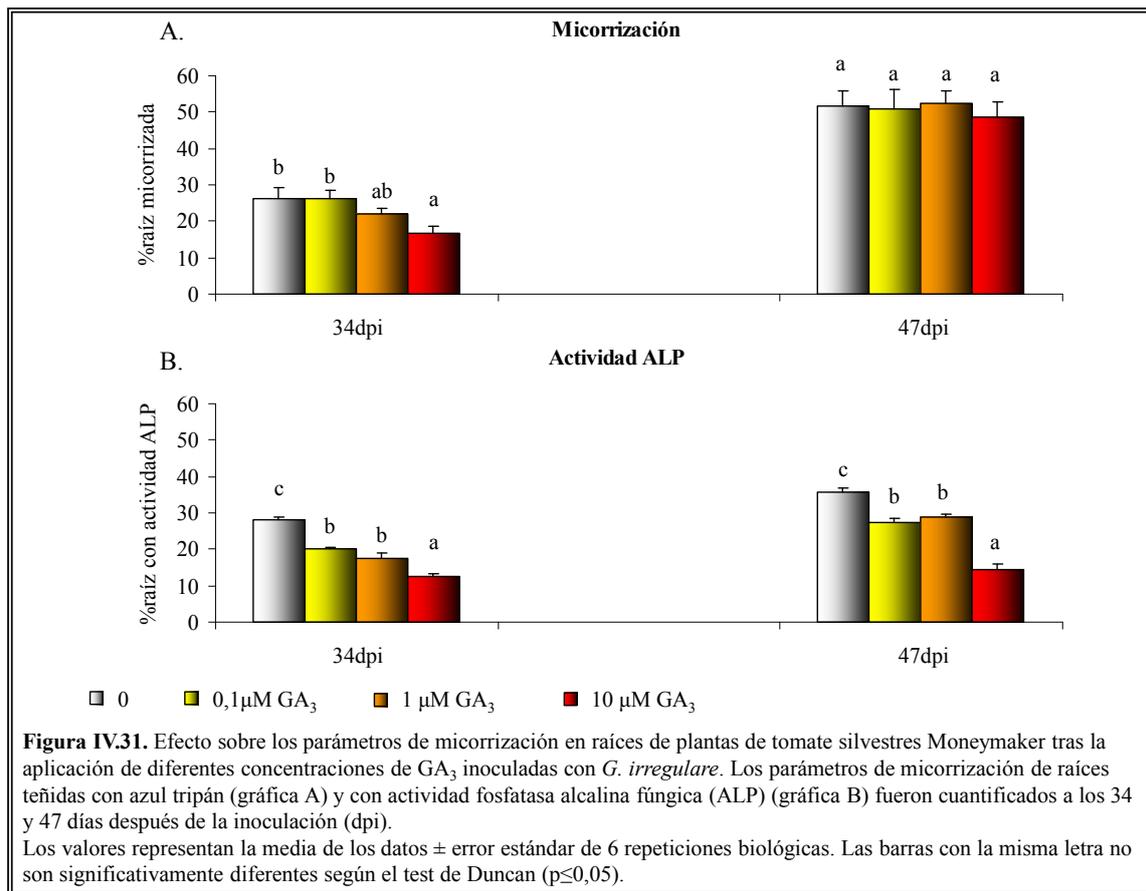


Tomando como referencia los resultados precedentes, se diseñó un experimento de micorrización de plantas silvestres de tomate, variedad MoneyMaker, aplicando las mismas concentraciones crecientes de GA₃ que aplicó El Ghachtouli *et al* en su estudio (0,1, 1 y 10μM de GA₃). La aplicación se realizó en suelo y cada cuatro días, a partir de la primera semana tras la inoculación con *G. irregulare*. Se realizaron dos cosechas, transcurridos 34 y 47 días tras la inoculación, y se realizaron los análisis pertinentes sobre parámetros de micorrización y expresión génica.

La aplicación de 10μM de GA₃, afectó al desarrollo de la planta, sobre todo a los 34 dpi, debido a que las GAs incrementan el crecimiento del tallo y el espacio entre los entrenudos (Azcón-Bieto & Talón, 2000) (Gráfica A, figura IV.30). Este efecto se reflejó en un incremento del crecimiento y del peso fresco de la parte aérea y radicular de las plantas a las cuales se le aplicaron 10μM de GA₃ (Gráfica B y C, figura IV.30). Estas diferencias de peso fresco de la parte aérea y de la raíz desaparecieron en la siguiente cosecha, a los 47 días después de ser inoculadas (Gráfica B y C, figura IV.30).

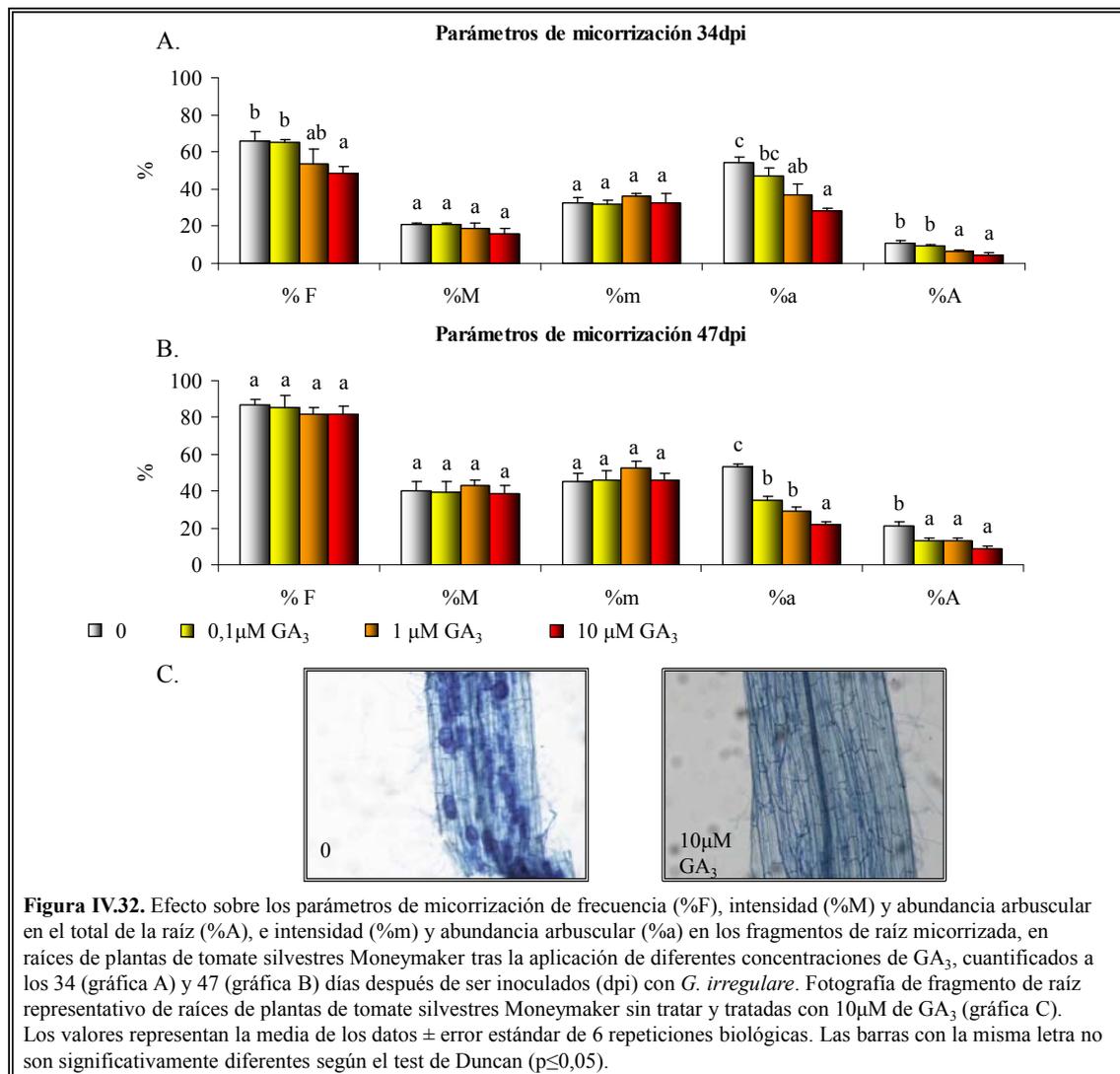
El análisis de la micorrización en estas plantas silvestres mostró resultados interesantes en cuanto a la afectación del porcentaje de raíz colonizada tras la aplicación de las diferentes concentraciones de GA₃. El porcentaje de raíz colonizada se vio afectado negativamente en plantas de 34 dpi tratadas con la concentración mayor de GA₃ (10μM), disminuyendo en un 38% su micorrización (Gráfica A, figura IV.31). Sin embargo, el análisis de plantas en la segunda cosecha mostró que a los 47 dpi no existían diferencias en la micorrización causadas por los tratamientos con GA₃ (Gráfica A, figura IV.31).

Se analizó también la eficiencia fúngica mediante cuantificación del porcentaje de raíz con actividad fosfatasa alcalina fúngica (ALP). En este caso, para ambas cosechas y para todas las concentraciones ensayadas de GA₃, se observaron diferencias respecto a los valores obtenidos en plantas sin tratar. En la primera cosecha, la aplicación de GA₃ en las dosis de 0,1μM y 1μM redujo el porcentaje de actividad ALP en un 30%, y 38% respectivamente, y la dosis de 10μM causó un descenso del 56% del valor ALP (Gráfica B, figura IV.31). De forma similar, en la segunda cosecha, los tratamientos de 0,1 y 1μM de GA₃ redujeron en un 23% el porcentaje de actividad ALP con respecto a las plantas control sin tratamiento, mientras que las plantas tratadas con 10μM de GA₃ redujeron dicho parámetro hasta un 60% (Gráfica B, figura IV.31).



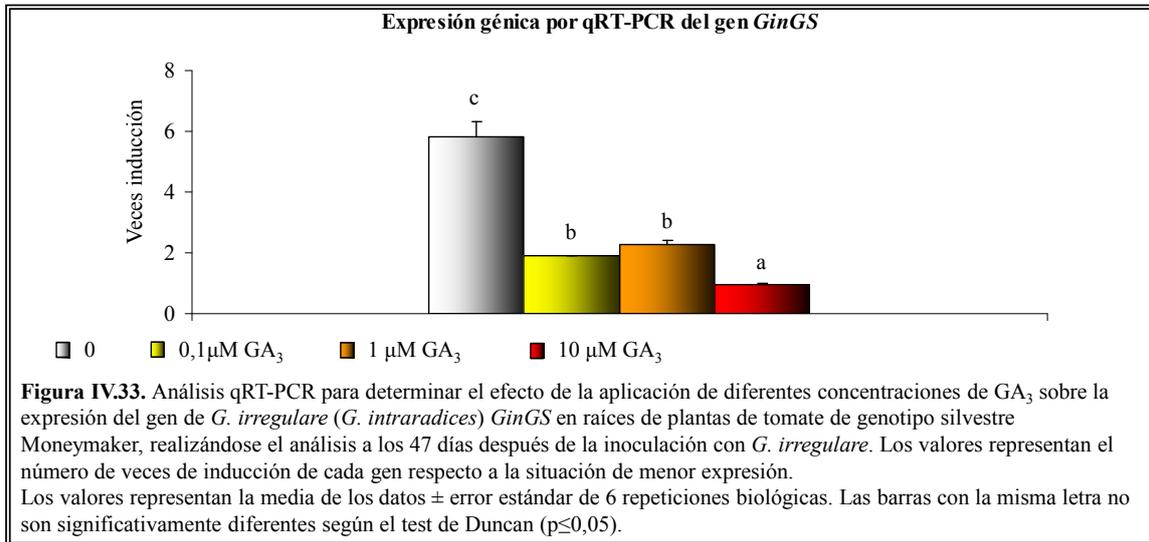
Para determinar de manera más exhaustiva las alteraciones en el proceso de micorrización provocadas por el tratamiento con GA₃, se realizó un estudio más preciso de los parámetros de micorrización en las plantas. Los resultados de la primera cosecha, a los 34 días tras la inoculación, muestran que la frecuencia de micorrización (%F) disminuyó un 18% y 26% respectivamente con las aplicaciones de 1 y 10µM de GA₃. Sin embargo, otros parámetros, como la intensidad de micorrización en el total de la raíz (%M) y en los fragmentos de raíz micorrizada (%m), no se vieron afectados tras la aplicación de GA₃. Por el contrario, en esta primera cosecha, la aplicación de GA₃ afectó de manera considerable y de forma negativa la abundancia arbuscular en las zonas micorrizadas de la raíz (%a) y en el sistema radical (%A), provocando una caída progresiva y proporcional a la dosis de GA₃ aplicada. En concreto, se observaron disminuciones para ambos parámetros del 20%, 35% y 50% con las respectivas dosis de 0,1, 1 y 10µM de GA₃ (Gráfica A, figura IV.32). En la segunda cosecha, a los 47 días tras la inoculación, la aplicación de GA₃ no afectó a la frecuencia (%F) e intensidad de micorrización (%M y %m), pero si se redujo de forma drástica tanto la abundancia arbuscular en fragmentos micorrizados (%a) como

en el total de la raíz (%A). En este caso se midieron reducciones tanto en %a como de %A de un 40% aplicando 0,1 y 1µM de GA₃, llegando a valores de un 59% en las plantas tratadas con 10µM de GA₃ (Gráfica B, figura IV.32). Estos resultados muestran que la aplicación de GA₃ afecta sobre todo a la formación de los arbusculos, y en ese sentido y en plantas tratadas con la dosis más alta de 10µM de GA₃ es frecuente encontrar fragmentos de raíces donde la micorrización es solo por hifas intercelulares, sin ningún arbusculo, a diferencia de las plantas sin tratar, donde es frecuente encontrar tanto hifas como arbusculos (Gráfica C, figura IV.32).



En plantas de 47 dpi es donde se observaron diferencias mayores en los parámetros de abundancia arbuscular entre las raíces de las plantas de tomate silvestres Moneymaker no tratadas y tratadas con GA₃, y por tanto es en estas raíces donde se realizó el estudio de cuantificación de

la colonización fúngica mediante qRT-PCR. Se cuantificó la acumulación de ARNm para el gen glutamina sintetasa de *G. intraradices* (*G. irregulare*) (*GinGS*) como medida de la presencia de arbusculos en la raíz. Los datos para la expresión del gen *GinGS* muestran una dinámica similar a la observada para los parámetros de abundancia arbuscular, cayendo su expresión casi 4 veces en las plantas tratadas con 0,1 y 1 μM de GA_3 , y llegando esa reducción hasta 6 veces cuando se trataron con 10 μM de GA_3 (Figura IV.33).



Como resumen de los experimentos de aplicación de GA_3 a plantas de fenotipo silvestre, podemos concluir que un incremento de GAs mediante la aplicación exógena en suelo de GA_3 provoca un descenso del número de arbusculos formados, siendo este descenso dependiente de la concentración aplicada. También se ha observado en plantas de 34 dpi un descenso significativo en la frecuencia de micorrización tras la aplicación de la dosis más alta de GA_3 .

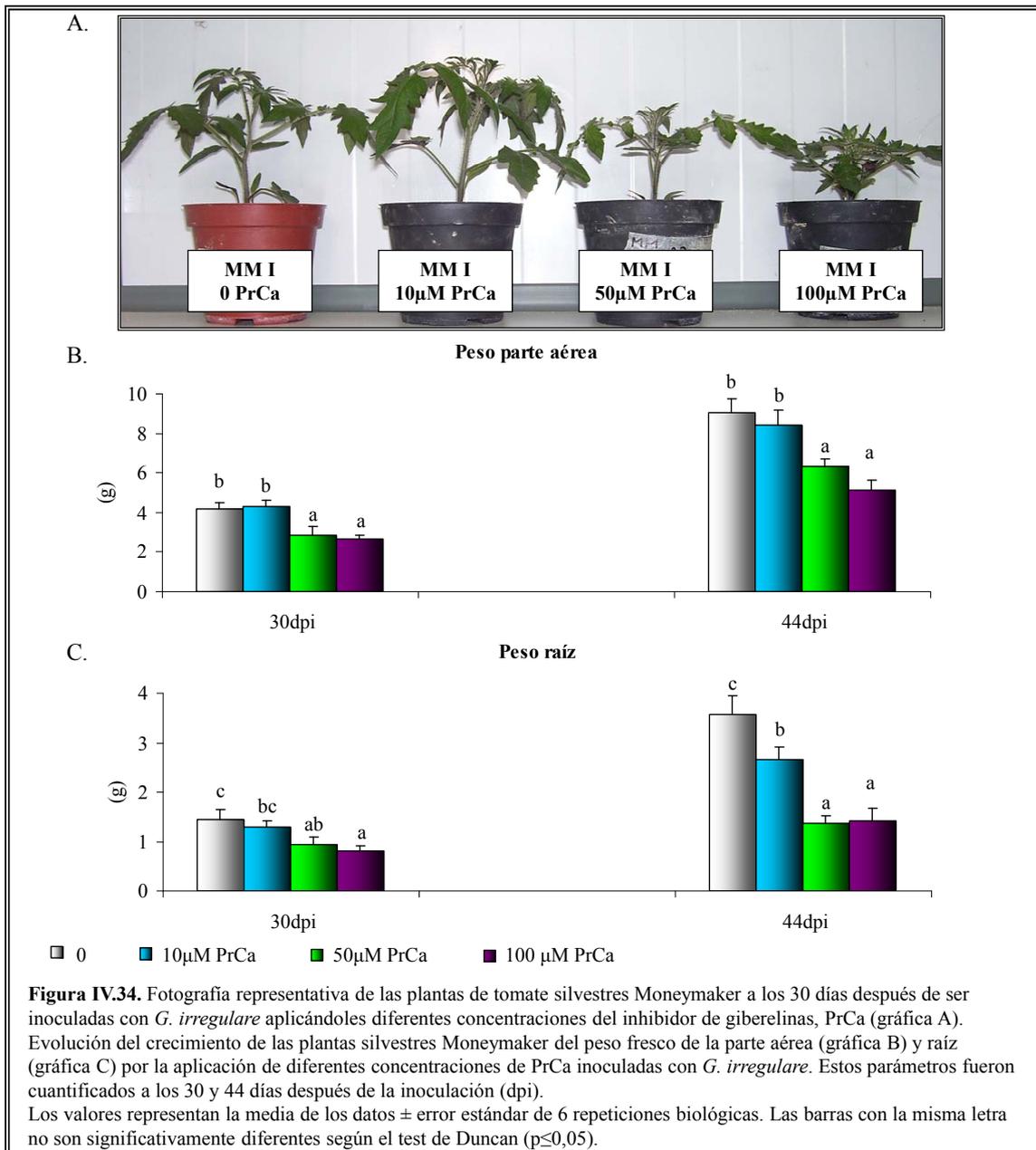
IV.3.3 Análisis de la micorrización en plantas de tomate tratadas con diferentes inhibidores de GAs

En el apartado anterior ha quedado establecido que la aplicación de GAs afecta negativamente a la formación de los arbusculos en plantas de tomate micorrizadas. Por lo tanto, para determinar si por el contrario la inhibición de GAs provoca un incremento en el número de arbusculos en las raíces de las plantas, realizamos experimentos de micorrización donde las plantas de tomate de genotipo silvestre Moneymaker se trataban con un inhibidor de la biosíntesis de GAs, estudiando la repercusión sobre los distintos parámetros de colonización.

La mayoría de los trabajos realizados sobre fisiología y bioquímica vegetal que estudian el efecto de la inhibición de las GAs en diferentes aspectos fisiológicos de las plantas, utilizan el inhibidor de síntesis de GAs paclobutrazol (Serrani *et al.*, 2010; Do *et al.*, 2010). El paclobutrazol es un derivado de los triazoles, que son comúnmente usados como retardantes del crecimiento de las plantas (Fletcher *et al.*, 1986; Graebe, 1987). Todos los triazoles tienen propiedades tanto de reguladoras del crecimiento como de fungicidas, por interferencia con la ruta de los isoprenoides (Hollick *et al.*, 2002). Estos triazoles impiden la síntesis de GAs en plantas por inhibición de la oxidación de *ent*-kaureno a ácido *ent*-kaurenoico, siendo su propiedad fungicida debida a la inhibición de la síntesis de ergosterol (Graebe, 1987; Kende & Zeevaart, 1997). Aunque el paclobutrazol tiene propiedades fungicidas, varios investigadores han mostrado que hay hongos formadores de micorrizas que no disminuyen su capacidad de colonización de la raíz con este compuesto, usado a bajas concentraciones (menores de 20 μ M) (Hollick *et al.*, 2002; Watson, 2006). Por este motivo, en un experimento inicial se comprobó el efecto del paclobutrazol como inhibidor de GAs en plantas de tomate silvestres, añadiéndolo a la semana de ser inoculadas con el hongo micorrícico arbuscular *G. irregulare*. Las plantas se trataron dos veces por semana con diferentes concentraciones de paclobutrazol, en concreto 0, 5, 10 y 20 μ M de paclobutrazol (Hollick *et al.*, 2002; Watson, 2006). Como resultado del experimento no obtuvimos diferencias en los parámetros de micorrización, e incluso se observaba una tendencia a la disminución tanto de la micorrización como de la abundancia arbuscular a partir de la concentración de 10 μ M de paclobutrazol, posiblemente por afectación del desarrollo del hongo micorrícico arbuscular (resultados no presentados).

Otros inhibidores descritos en la bibliografía científica mostraban el problema que bien eran fungicidas o bien además de inhibir las GAs también producían efectos en la síntesis de ABA.

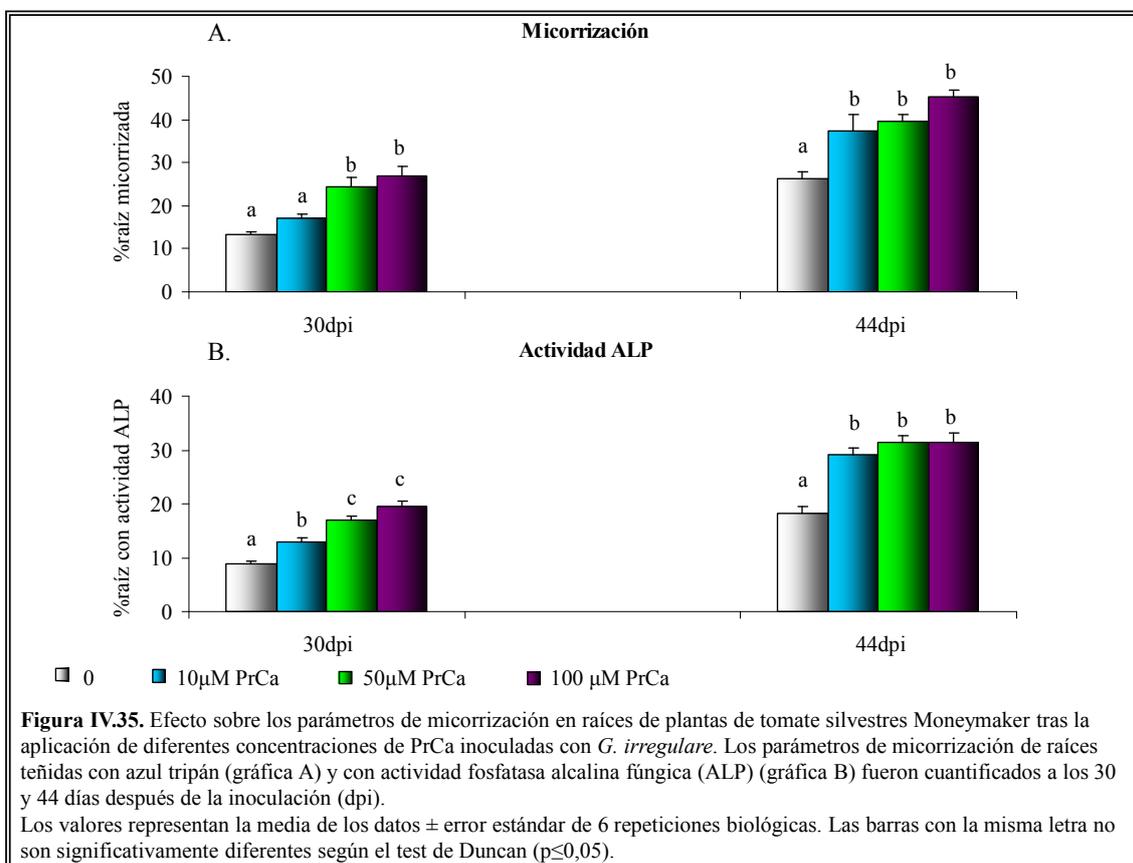
Al final nos decantamos por el uso del Calcio 3-Oxido-4-propionil-5-oxo-3 ciclohexano-carboxilato, denominado como Prohexadiona cálcica (PrCa), que bloquea a nivel de las enzima *GA-3-oxidasa* y *GA-20-oxidasa* que catalizan el último paso de la biosíntesis de GAs fisiológicamente activas (Nakayama *et al.*, 1990a; Nakayama *et al.*, 1990b; Griggs *et al.*, 1991; Adams *et al.*, 1992; Rademacher, 2000). Su acción inhibitoria se debe a que su estructura tiene mucha similitud al 2-oxoglutarato, que es un co-factor esencial para estas enzimas (Nakayama *et al.*, 1990a; Hedden, 1991).



Una vez decidido el uso de PrCa, se realizó un ensayo en plantas de tomate de genotipo silvestre Moneymaker, aplicando diferentes concentraciones de PrCa en función de datos publicados por de otros investigadores, siendo estas de 10, 50 y 100µM de PrCa (Ilias & Rajapakse, 2005; Ilias *et al.*, 2007). La aplicación se hizo en suelo, dos veces por semana, y a partir de la primera semana tras la inoculación con *G. irregulare*. Se realizaron dos cosechas, transcurridos 30 y 44 días tras la inoculación, y se compararon los efectos de dicha aplicación

sobre la micorrización y desarrollo de parámetros de micorrización y expresión de genes marcadores del desarrollo fúngico y del desarrollo de arbusculos.

Como era de esperar, la aplicación de PrCa repercute negativamente en el desarrollo de estas plantas, pero es a partir de la concentración de 50 μ M cuando se aprecia un verdadero retraso en el desarrollo de la planta, observando que las plantas a las que se le aplicaron 50 o 100 μ M de PrCa presentan unas alteraciones opuestas a las plantas a las cuales se le aplicaron GA₃, es decir, en la parte aérea se aprecia que el espacio entrenudos es menor y presentan una mayor ramificación (Gráfica A, figura IV.34). Las plantas tratadas con 50 o 100 μ M de PrCa presentan una reducción de peso fresco bastante significativa con respecto a su control no tratado a los 30 y 44 días después de ser inoculadas, tanto en la parte aérea como en raíz (Gráfica B y C, figura IV.34).



El análisis de la micorrización en las raíces de las plantas de tomate silvestres Moneymaker, tratadas o no con PrCa determinó que la aplicación de concentraciones de 50 y 100 μ M de PrCa

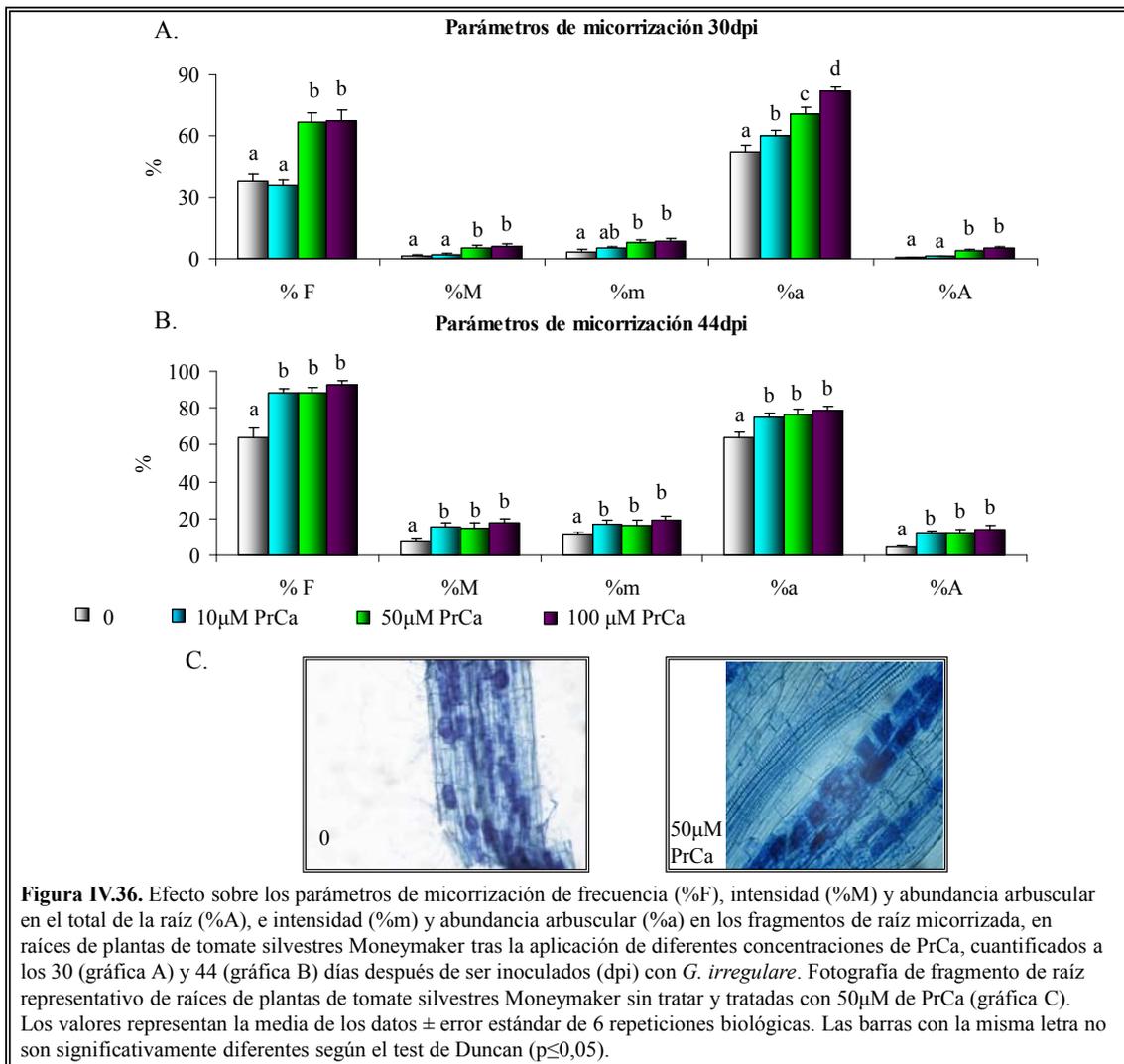
promueve un incremento significativo del porcentaje de longitud de raíz micorrizada, cercano al 50% en etapas iniciales de la micorrización, cuantificada a los 30 días tras ser inoculadas las plantas. En la segunda cosecha el aumento de la micorrización de produjo desde la concentración más baja del inhibidor de GAs ($10\mu\text{M}$ de PrCa) con un incremento similar en los tres tratamientos, alrededor del 35% (Gráfica A, figura IV.35).

Paralelo al análisis del porcentaje de micorrización se realizó un análisis de la eficiencia fúngica determinando la actividad ALP en raíces. Al igual que ocurría con el porcentaje de micorrización en la primera cosecha, la aplicación de PrCa produjo un aumento del porcentaje de raíz con actividad ALP, incrementando linealmente con la concentración de PrCa aplicada, desde un 30% con la concentración más baja a un 55% con la más alta. A los 40 días tras la inoculación, la actividad ALP tuvo un comportamiento muy parecido al porcentaje de longitud de raíz micorrizada, ya que aumentaba por igual con las distintas dosis de PrCa, en aproximadamente un 40% (Gráfica B, figura IV.35).

Un estudio más exhaustivo de los parámetros de micorrización nos permitió observar que la aplicación de las diferentes dosis de PrCa a las raíces de las plantas silvestres, al igual que ocurría con el porcentaje de micorrización actividad ALP fúngica, tuvo un efecto positivo sobre los parámetros de micorrización, tanto en la primera como en la segunda cosecha. En la primera cosecha, las principales diferencias se detectaron a partir de las dosis de $50\mu\text{M}$ de PrCa, pues los parámetros de frecuencia (%F), intensidad de micorrización (%M y %m), y la abundancia arbuscular en el total de la raíz (%A) se incrementaron respectivamente en un 100%, 75%, 55% y 85%, aplicando tanto 50 y $100\mu\text{M}$ de PrCa. La abundancia arbuscular en los fragmentos de raíz micorrizada (%a) si se incrementó con todas las dosis de PrCa aplicadas, observándose un incremento progresivo desde el 12% con la dosis más baja hasta un 55% con la más alta (Gráfica A, figura IV.36). A los 44 días tras la inoculación todos los parámetros de micorrización sufren un incremento similar con las tres dosis de PrCa aplicadas, siendo este incremento del 28%, 50%, 35%, 16% y 63% para la frecuencia (%F), intensidad de micorrización total (%M), intensidad por fragmento micorrizado (%m), abundancia arbuscular en las zonas micorrizadas (%a) y abundancia arbuscular en el sistema radicular (%A), respectivamente (Gráfica B, figura IV.36).

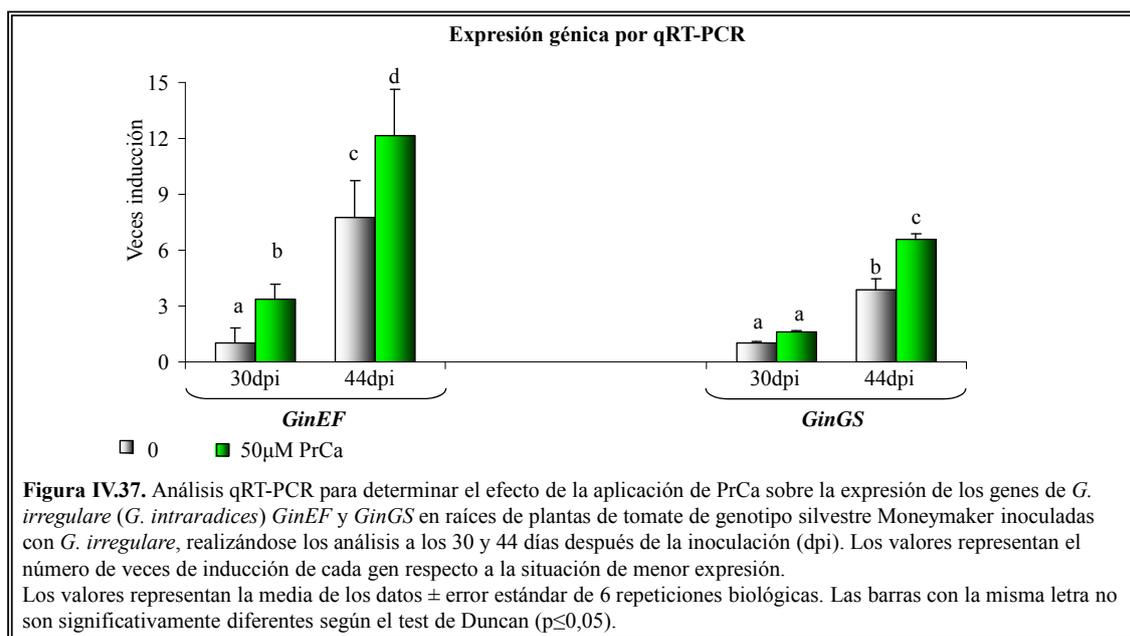
El resultado de este experimento determina que la inhibición de GAs mediante la aplicación de PrCa afecta positivamente tanto a parámetros de frecuencia e intensidad de colonización como al número de arbusculos, siendo frecuente encontrar fragmentos de raíces con abundantes

arbúsculos bien formados, mientras que en las plantas sin tratar encontramos los arbúsculos mas dispersos (Gráfica C, figura IV.36).



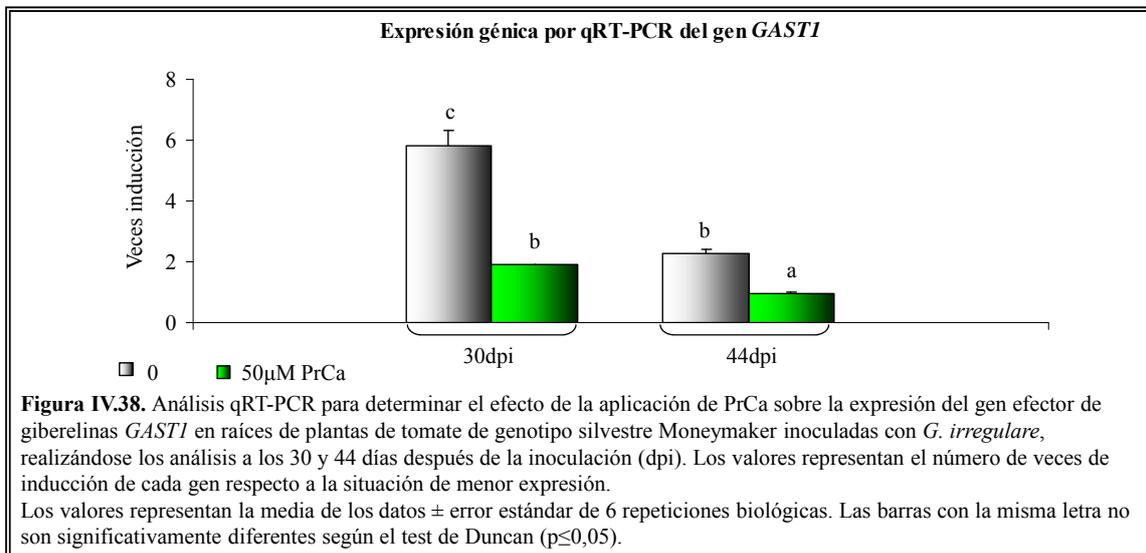
En virtud de los resultados de las determinaciones de los parámetros de micorrización, y en vista de que las plantas tratadas con 50 y 100 µM de PrCa tenían un comportamiento similar y afectación ya desde la primera cosecha, se decidió estudiar la colonización fúngica mediante qRT-PCR solo en las raíces de las plantas silvestres Moneymaker control sin tratamiento y en las tratadas con 50 µM de PrCa. Se cuantificó la acumulación de ARNm para los genes del factor de elongación 1α de *G. intraradices* (*G. irregulare*) (*GinEF*) y glutamina sintetasa de *G. intraradices* (*G. irregulare*) (*GinGS*), para determinar respectivamente la tasa de colonización fúngica y la totalidad de arbúsculos en las raíces micorrizadas. Se observó que el gen *GinEF* tuvo

un incremento de expresión en las plantas que fueron tratadas con 50 μ M de PrCa de 3 y 1,5 veces con respecto a las plantas sin tratar, a los 30 y 44 dpi respectivamente, y tanto las raíces de plantas sin tratar como tratadas con 50 μ M de PrCa muestran una elevación en la expresión de este gen en la segunda cosecha con respecto a la primera cosecha (Figura IV.37). Por el contrario, no se observó un incremento significativo en la acumulación de los transcritos del gen fúngico *GinGS* en la primera cosecha en las plantas tratadas con 50 μ M de PrCa, pero si en la segunda cosecha, donde aumentó aproximadamente 1,6 veces con respecto a las plantas sin tratar. También se observó un incremento debido al tiempo de cosecha en ambos tratamientos (Figura IV.37).



Por último, para determinar si efectivamente las plantas tratadas con PrCa se vieron afectadas en la respuesta a GAs, se cuantificó la acumulación de ARNm para el gen efector de GAs en tomate *GAST1* (de las siglas de su nombre en inglés “gibberellic acid stimulated transcript”), el cual incrementa sus niveles con la aplicación de GA₃ exógeno (Shi & Olszewski, 1998a) y determinar así la diferente respuesta de GAs en plantas silvestres después de la aplicación de PrCa. El análisis de expresión del gen *GAST1* determinó una reducción de la expresión de aproximadamente 1,7 veces tras la aplicación de 50 μ M de PrCa en las dos cosechas (Figura IV.38).

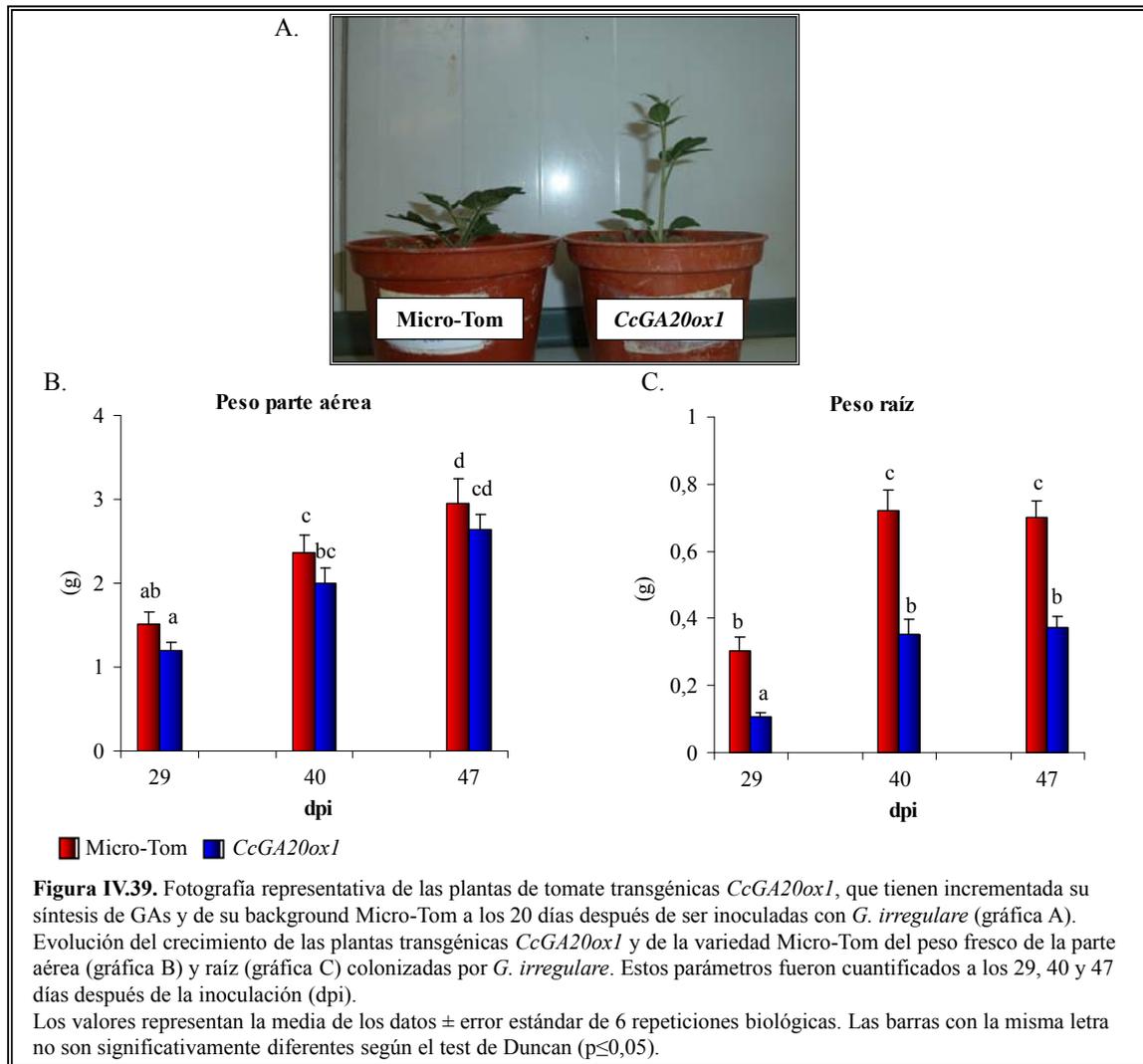
Los resultados obtenidos muestran que una inhibición de la síntesis de GAs y por consiguiente una disminución de la respuesta de la planta a esta hormona provoca un incremento de la colonización fúngica, fundamentalmente sobre la formación de arbusculos, y por tanto puede afectar la eficiencia de estos hongos para el aporte de nutrientes a las plantas colonizadas.



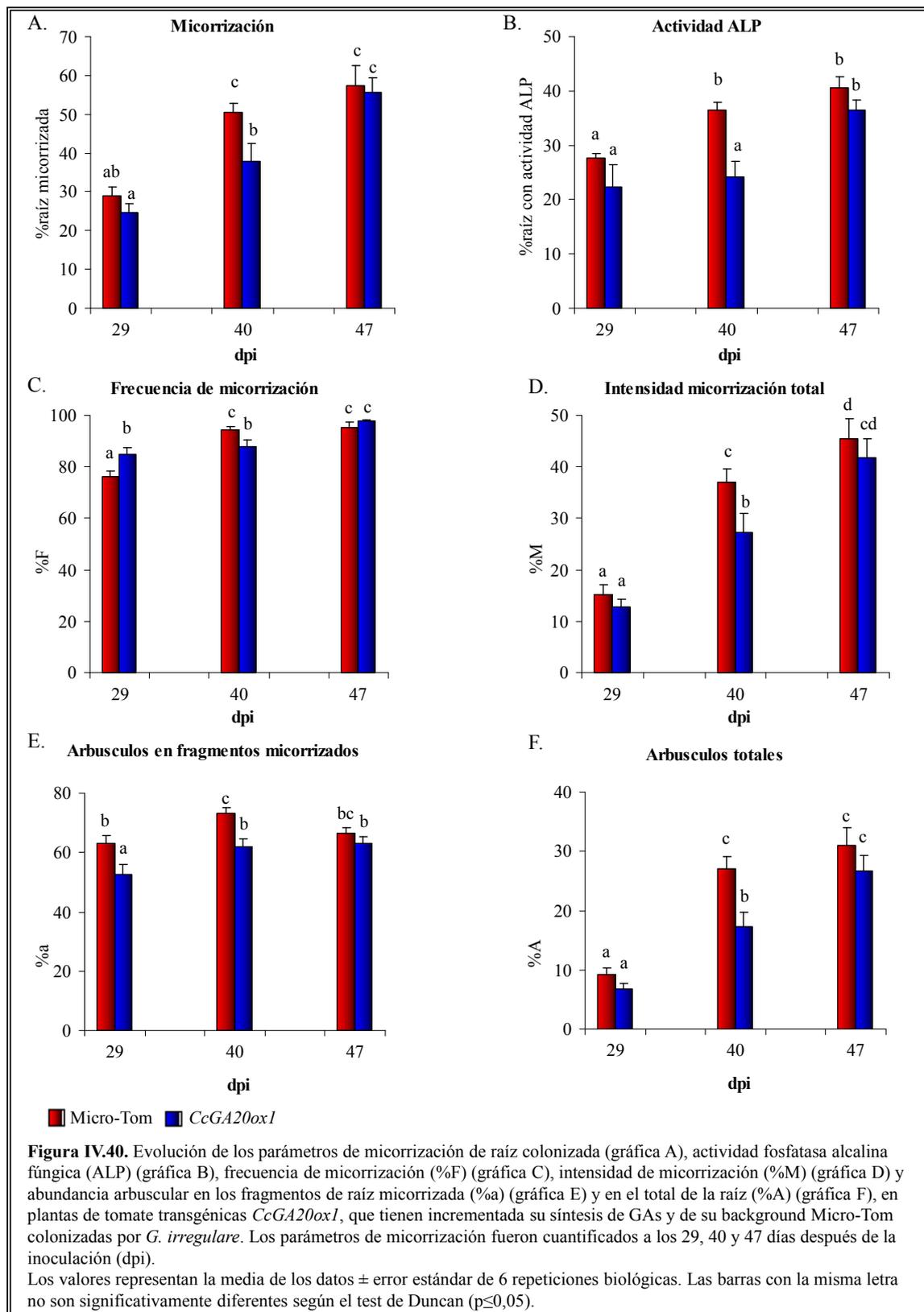
IV.3.4 Afectación de la simbiosis Micorriza Arbuscular en plantas de tomate con activación constitutiva de la síntesis de GAs.

En apartados anteriores hemos determinado que la aplicación de GA_3 de forma exógena, y por consiguiente el incremento de la concentración de GAs en las raíces de las plantas silvestres de tomate, produce un descenso en el número de arbusculos formados. Para corroborar este resultado se realizaron experimentos con la línea transgénica *giberelina-20-oxidasa 1*, cuyos niveles constitutivos de GAs son superiores a los de las variedades silvestres por poseer una activación transcripcional de genes codificantes para una enzima de la síntesis de GAs. Esta línea transgénica de tomate en el cultivar Micro-Tom posee sobreexpresión constitutiva del gen *CcGA20ox1* de cítricos, por lo que sintetizan más GAs, concretamente se incrementa la concentración de GA_4 (García-Hurtado *et al.*, 2012). Las plantas de la variedad Micro-Tom están alteradas en el metabolismo de brasinoesteroides, son enanas y de apariencia arbustiva, y sus hojas son pequeñas, rugosas y de color verde oscuro en comparación con el resto de cultivares de tomate. Estas características fenotípicas son similares a otros mutantes deficientes en brasinoesteroides descritos (Altmann, 1998).

Realizamos un experimento de micorrización de plantas transgénicas *CcGA20ox1* con una mayor concentración de GAs (GA_4 principalmente) y plantas Micro-Tom no transformadas. Estas plantas se cosecharon transcurridos 29, 40 y 47 días tras la inoculación con *G. irregulare* (dpi), realizándose análisis de peso fresco de la parte aérea y radicular, y parámetros de micorrización.



En el caso de estas plantas transgénicas *CcGA20ox1*, el incremento en la producción de GAs conlleva un fenotipo similar al de plantas silvestres tratadas con $10\mu M$ de GA_3 (Gráfica A, figura IV.30), donde en la parte aérea se incrementan los espacios entrenudos, son plantas más altas pero menos ramificadas (Gráfica A, figura IV.39). Pero ese fenotipo de plantas más altas y menos ramificadas no se vio reflejado en un incremento en el peso fresco de la parte aérea (Gráfica B, figura IV.39). Por el contrario, estas plantas transgénicas *CcGA20ox1* mostraron una disminución



del peso fresco de la raíz respecto al cultivar Micro-Tom en los tres tiempos analizados, produciéndose un incremento de la relación del peso fresco parte aérea/parte radicular, un fenotipo característico del alto contenido de GAs (Talón, 2000) (Gráfica C, figura IV.39).

Los primeros análisis se realizaron para determinar tanto el porcentaje de raíz colonizada como el porcentaje de raíz con actividad ALP. En primer lugar, cabe destacar tanto en la primera como en la tercera cosecha, a los 29 y 47 dpi, no hubo diferencias significativas entre las raíces de plantas transgénicas *CcGA20ox1* y plantas de la variedad Micro-Tom. Sin embargo a los 40 dpi, tanto el porcentaje de raíz micorrizada como el de actividad ALP se redujo en las raíces de las plantas transgénicas *CcGA20ox1* un 25% y 34%, respectivamente (Gráficas A y B, figura IV.40). Destacar también que en comparación con experimentos anteriores y otros cultivares silvestres de tomate, las plantas Micro-Tom mostraron una mayor capacidad de micorrización.

Un estudio más exhaustivo del desarrollo de la micorrización, mediante determinación de los parámetros de micorrización al microscopio, nos reveló que no hubo diferencias significativas en el valor de los parámetros de colonización entre plantas transgénicas *CcGA20ox1* y Micro-Tom tanto en la primera como en la tercera cosecha, salvo un leve incremento del 10% en la frecuencia de micorrización (%F) en las plantas transgénicas con respecto a las plantas Micro-Tom en la primera cosecha (Gráfica C, figura IV.40). No obstante, en la segunda cosecha, los parámetros de frecuencia (%F) e intensidad de la micorrización (%M) si presentaron una reducción en las plantas transgénicas *CcGA20ox1* de un 7% y 26%, respectivamente (Gráfica C y D, figura IV.40). La abundancia arbuscular en el total de la raíz (%A), tuvo un comportamiento similar al mostrado por la actividad ALP, no encontrándose diferencias en la primera y tercera cosecha entre las plantas transgénicas *CcGA20ox1* y las plantas Micro-Tom, y sí en la segunda cosecha, donde dicho parámetro disminuyó en las plantas *CcGA20ox1* un 36% respecto al valor en plantas Micro-Tom de la misma edad (Gráfica E, figura IV.40). La abundancia arbuscular en los fragmentos de raíz micorrizada (%a) en las plantas transgénicas *CcGA20ox1* disminuyó tanto en la primera como en la segunda cosecha alrededor de un 16% respecto a las plantas de la variedad Micro-Tom (Gráfica F, figura IV.40). Por tanto, al igual que la aplicación exógena de GA₃, una concentración endógena de GAs más elevada produce una reducción en el número de arbusculos formados en las raíces micorrizadas con el hongo *G. irregulare*. En definitiva, estas plantas que sintetizan mayor cantidad de GAs tienen una alteración similar en los parámetros de micorrización que plantas tratadas con GAs de manera exógena, de modo que ambas muestran

fundamentalmente una reducción de la eficiencia fúngica cuantificada tanto por la abundancia arbuscular como por el porcentaje de actividad ALP.

IV.3.5 Afectación de la simbiosis Micorriza Arbuscular en plantas de tomate con una respuesta constitutiva a GAs.

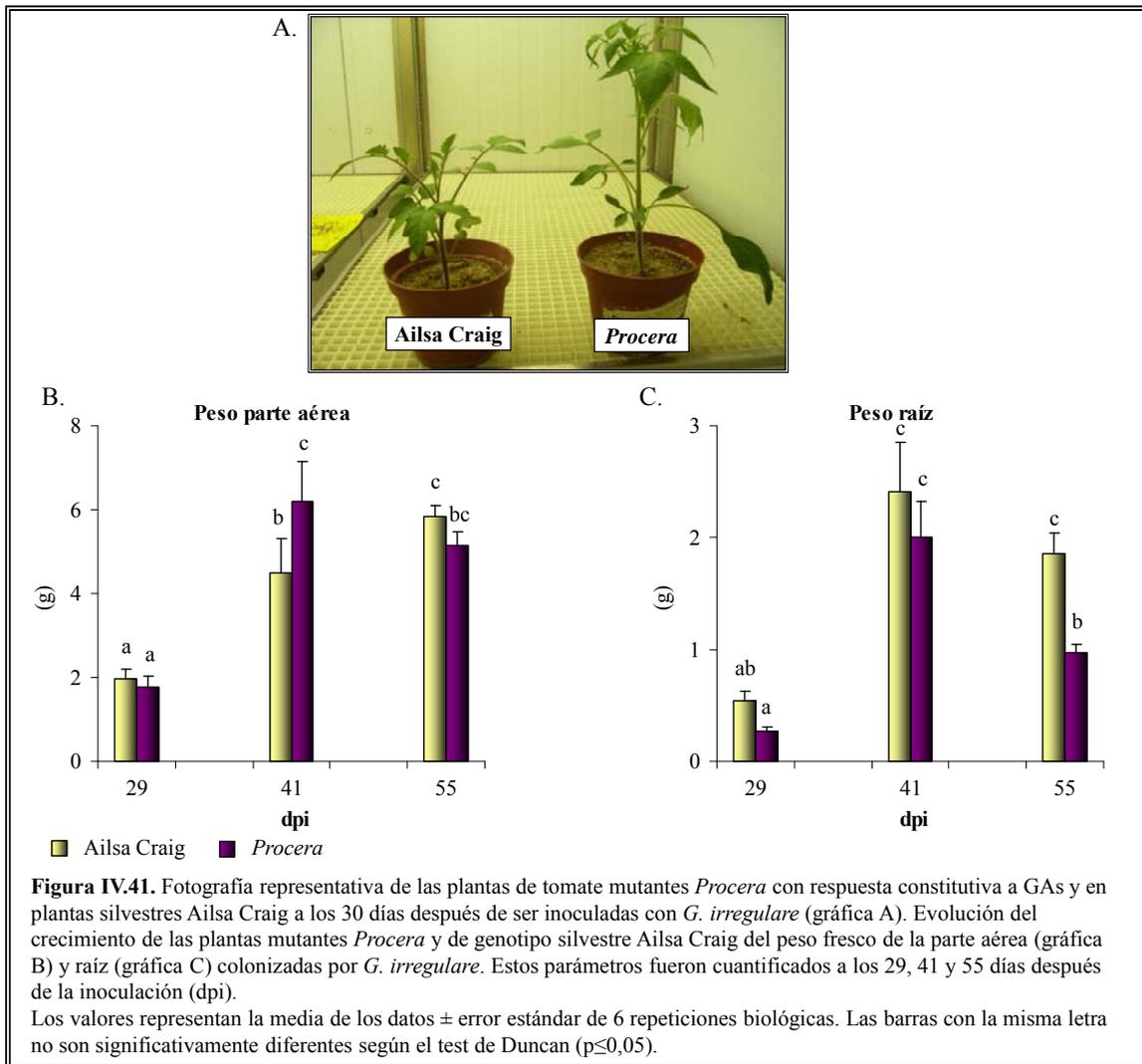
Con la aplicación de GA₃ y el estudio en plantas transgénicas *CcGA20ox1* con elevada concentración de GAs, se ha comprobado que las GAs afectan de forma negativa a la micorrización, y más concretamente a la formación de los arbusculos. Con el fin de determinar si además del efecto de incremento de la concentración de GAs, la activación de la señalización de GAs interfiere en la micorrización, se estudió el impacto sobre la micorrización en plantas de tomate que tienen una respuesta constitutiva a GAs. En concreto hemos utilizado el mutante *Procera*, que contiene una mutación en el gen *LeGAI* codificante para una proteína DELLA, que es un regulador negativo de la respuesta de GAs, resultando en un fenotipo de respuesta constitutiva a GAs bien caracterizado (Bassel *et al.*, 2008).

Se realizó un experimento de micorrización de plantas silvestres Ailsa Craig y mutantes con respuesta constitutiva a GAs (*Procera*), realizando tres cosechas, a los 29, 41 y 55 días tras la inoculación con *G. irregulare* (dpi), procediéndose al análisis de peso fresco de la parte aérea y radicular, parámetros de micorrización y expresión génica.

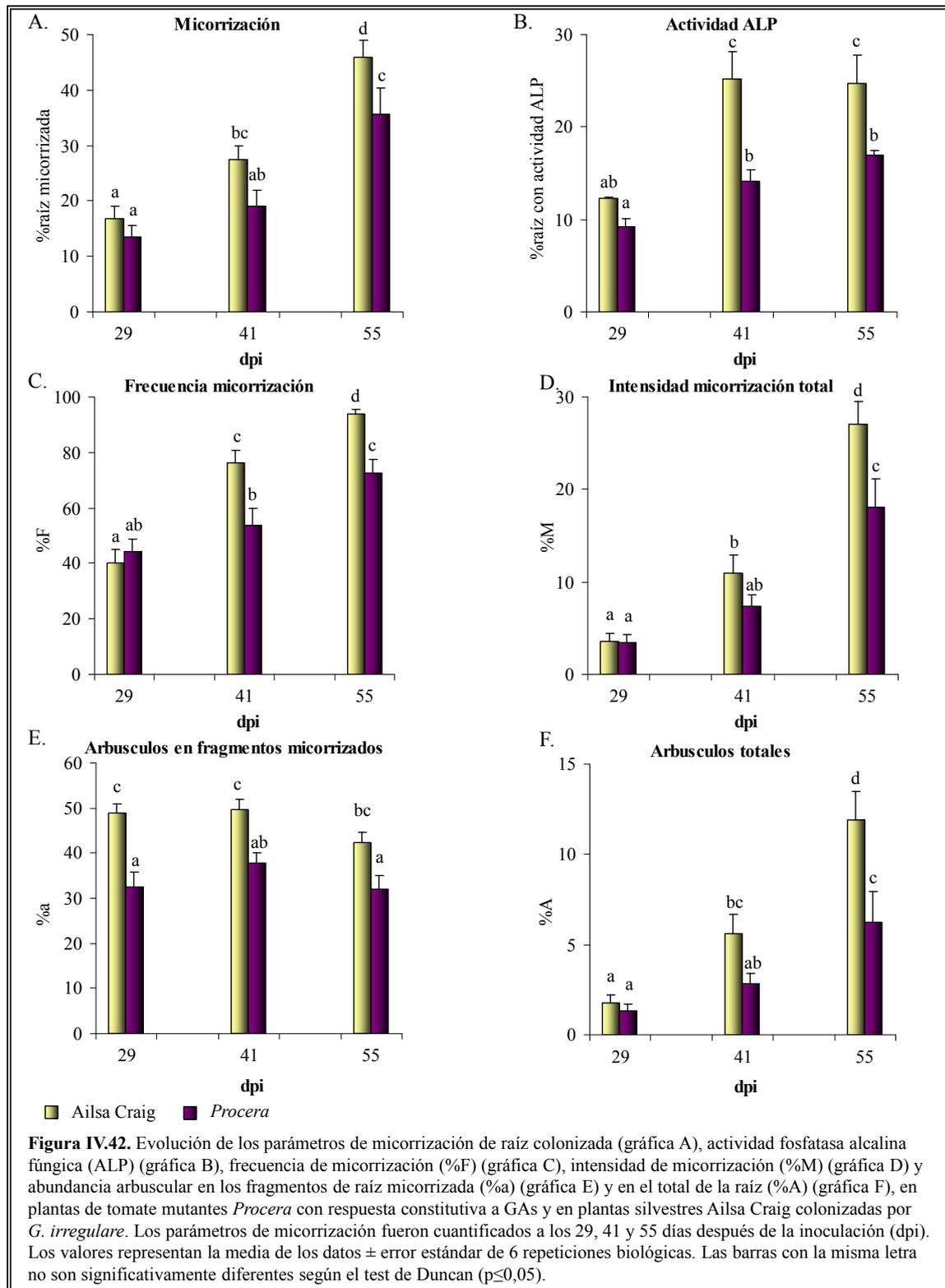
Al igual que las plantas silvestres tratadas con GA₃ y plantas con mayor concentración de GAs (*CcGA20ox1*), los mutantes *Procera* con una respuesta constitutiva a GAs presentaron un fenotipo característico, con una parte aérea más alta, al ser mayor los espacios entrenudos y presentar menos ramificaciones (Gráfica A, figura IV.41). Al igual que en las plantas transgénicas *CcGA20ox1*, la mayor altura de plantas *Procera* no daba lugar a un mayor peso fresco de la parte aérea, salvo en la segunda cosecha, a los 41 dpi, donde se incrementó levemente con respecto al silvestre (Gráfica B, figura IV.41). De igual forma que en plantas transgénicas *CcGA20ox1*, en plantas *Procera* se incrementó la relación parte aérea/parte radicular, ya que tanto en la primera como en la segunda cosecha en las plantas mutantes *Procera* se produjo una reducción del peso fresco de las raíces (Gráfica C, figura IV.41).

La extensión de la micorrización, determinada como porcentaje de raíz colonizada, estuvo reducida en las plantas mutantes *Procera* a partir de la segunda cosecha, disminuyendo en un 30% y un 23% a los 41 y 55 días tras la inoculación (Gráfica A, figura IV.42). Igual ocurrió con

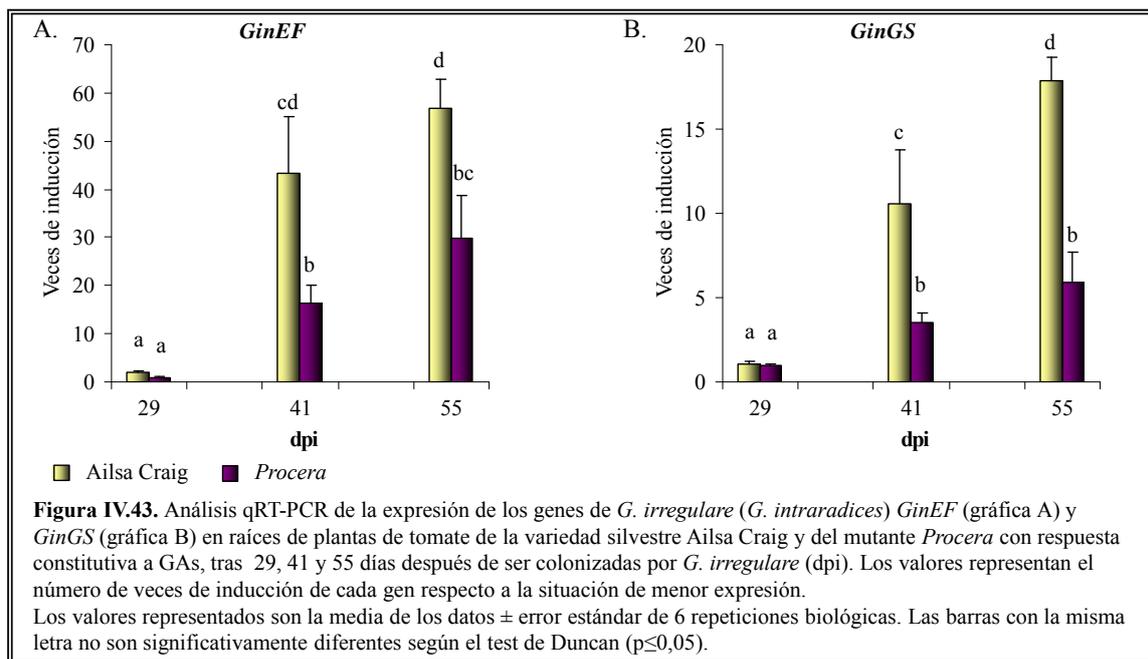
la actividad ALP fúngica en raíz, disminuyendo también en la segunda y tercera cosecha, pero esa reducción fue superior que en la observada en la extensión de la micorrización, ya que disminuyó un 44% y un 31% a los 41 y 55 días tras la inoculación, respectivamente (Gráfica B, figura IV.42).



El análisis de parámetros de micorrización, tales como frecuencia (%F) e intensidad (%M) de la micorrización, mostró que no hubo diferencias significativas entre plantas mutantes *Procera* y silvestres en la primera cosecha. Y tanto en la segunda como en la tercera cosecha, la frecuencia de micorrización se redujo en un 25% en las plantas mutantes *Procera* (Gráfica C, figura IV.42). En ambas cosechas la intensidad de micorrización disminuyó en las plantas



mutantes *Procera* aproximadamente un 33% (Gráfica D, figura IV.39). El estudio de los parámetros de eficiencia fúngica mediante cuantificación de la abundancia arbuscular, mostró que el porcentaje de arbusculos en los fragmentos de raíz micorrizada disminuyó en las plantas de tomate mutantes *Procera* en las tres cosechas, siendo un 33%, 24% y 25% menor que en plantas silvestres a los 29, 41 y 55 días tras la inoculación, respectivamente (Gráfica E, figura IV.42). El porcentaje de arbusculos en el total de la raíz siguió un comportamiento parecido al de la actividad ALP, pues no hubo diferencias en la primera cosecha (29dpi), pero tanto en la segunda como tercera cosecha hubo una reducción en las plantas mutantes *Procera* de casi un 50% respecto al valor de plantas silvestres (Gráfica F, figura IV.42).



Se llevaron a cabo experimentos de expresión génica mediante qRT-PCR en raíces de plantas de tomate mutantes *Procera* y silvestres Ailsa Craig a los 29, 41 y 55 dpi. La tasa de colonización fúngica se determinó cuantificando la acumulación de ARNm para el gen *GinEF* de *G. intraradices* (*G. irregulare*) en las raíces de las plantas de tomate (Gráfica A, figura IV.43). Además se cuantificó la acumulación de transcrito del gen *GinGS* de *G. intraradices* (*G. irregulare*) como medida de la presencia y funcionalidad de los arbusculos en la raíz micorrizada (Gráfica B, figura IV.43). La medida de la expresión del gen *GinEF*, al igual que en los análisis histoquímicos de micorrización en las raíces de estas plantas, mostró que en la primera cosecha (29 dpi) no hubo diferencias entre plantas *Procera* y su silvestre, pero a partir de la segunda

cosecha el mutante *Procera* presentó valores de expresión menores para el gen *GinEF*, reprimiéndose en estas plantas *Procera* 2,6 y 1,9 veces a los 41 y 55 dpi, respectivamente (Gráfica A, figura IV.43). De manera similar, en la primera cosecha no hay diferencias significativas entre plantas *Procera* y Ailsa Craig para el gen específico de arbusculos *GinGS*, disminuyendo la expresión en las plantas *Procera* respecto al silvestre a partir de la segunda cosecha, reduciéndose su expresión 3 veces tanto a los 41 como a los 55 dpi, siendo esta tendencia en la expresión del gen *GinGS* similar a la mostrada para el parámetro de %A (Gráfica B, figura IV.43). Además, tanto en plantas *Procera* como en el silvestre Ailsa, el nivel de expresión de los genes *GinEF* y *GinGS*, tal y como ocurre para los valores de %M y %A, incrementa en paralelo al aumento del tiempo de cosecha (Gráfica A y B, figura IV.43).

En conclusión, las plantas mutantes *Procera* con una respuesta constitutiva de GAs tienen un comportamiento similar al encontrado en plantas de tomate tratadas con GA₃ (10µM de GA₃), y caracterizado por un leve retraso de la colonización fúngica y una mayor afectación de la abundancia de arbusculos.

IV.4. INTERACCIÓN ENTRE EL ÁCIDO ABSCÍSICO Y LAS GIBERELINAS DURANTE EL PROCESO DE FORMACIÓN DE ARBÚSCULOS EN LA SIMBIOSIS MICORRIZA ARBUSCULAR EN TOMATE.

En los apartados anteriores se han mostrado resultados de los estudios realizados tanto sobre la participación del ABA como de GAs en el proceso de colonización de hongos formadores de Micorriza Arbuscular en tomate. Estos resultados sugieren que las GAs tienen importancia para la regulación de la colonización fúngica y en concreto para la formación de los arbusculos, evidenciándose un papel regulador negativo para dicha formación. Por su parte, se ha determinado que el ABA también actúa directamente sobre la formación de los arbusculos, pero en este caso de una forma positiva. Por tanto, estos resultados inducen a pensar en una posible relación antagonista ABA/GAs durante la formación de los arbusculos.

En este sentido, varios estudios han demostrado que las vías de señalización del ABA y las GAs interactúan antagonicamente en múltiples procesos de desarrollo de la planta, y así, el ABA es un regulador positivo de la inducción de la dormancia de la germinación de semillas mientras que las GAs promueven la germinación (Kucera *et al.*, 2005). En cítricos, durante el estrés hídrico, se aumenta el contenido en ABA mientras que la GA₂₀ disminuye, y al contrario la rehidratación reduce el ABA pero aumenta la concentración de GA₂₀ (Mahouachi *et al.*, 2005). También en embriones maduros, se ha demostrado que la inhibición de la síntesis de GAs imita los efectos de la aplicación exógena de ABA, ya que produce supresión de la germinación y la adquisición de pigmentos de antocianina (White *et al.*, 2000).

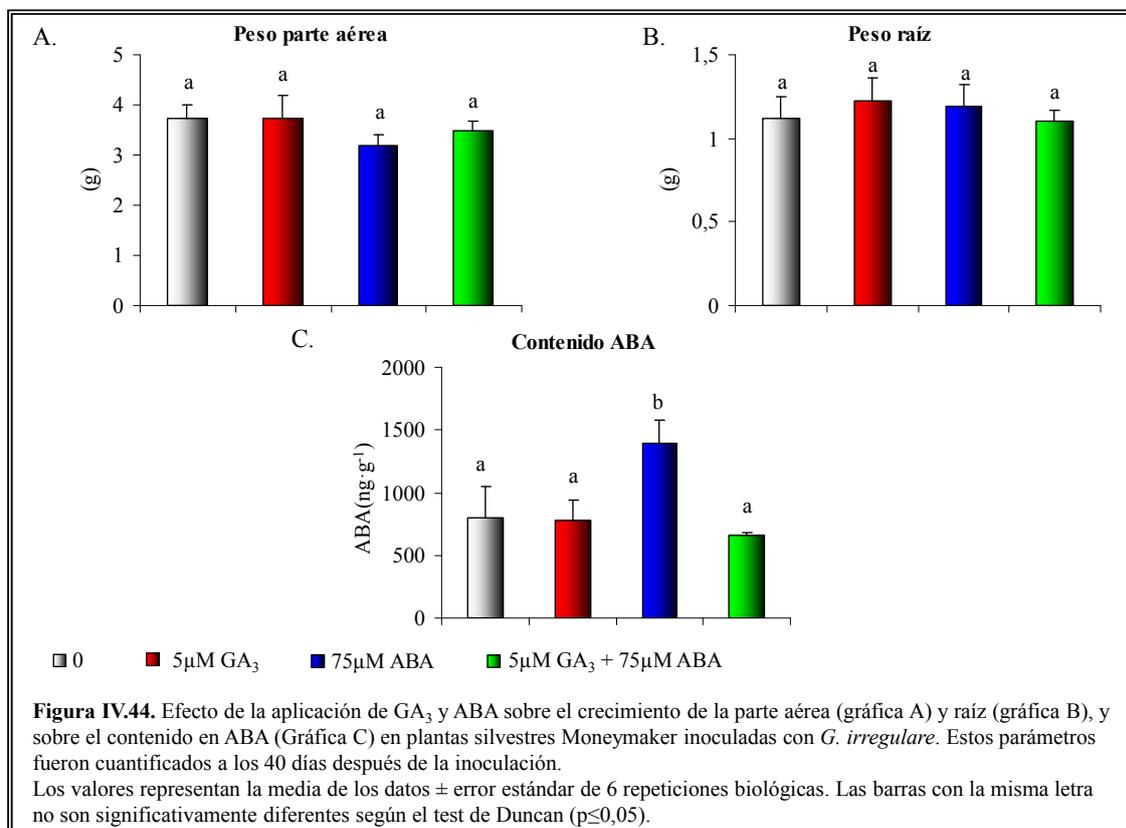
El objetivo de los experimentos realizados en este capítulo fue analizar la interacción entre el ABA y GAs en la regulación de la formación de la simbiosis micorrícica en plantas de tomate, y en concreto en la formación y desarrollo de los arbusculos. Para ello se han utilizado las herramientas genéticas habituales en este trabajo, tales como plantas mutantes defectivas en la producción o percepción de hormonas, en combinación con experimentos de aplicación exógena de GA₃, ABA y el inhibidor de GAs, prohexadiona cálcica (PrCa).

IV.4.1 Relación del ABA y las GAs durante la formación de la Micorrización Arbuscular

Resultados previos han mostrado que la aplicación de GA₃ tiene un efecto negativo sobre la formación de los arbusculos, mientras que el ABA tiene un efecto positivo sobre estas estructuras fúngicas. Por tanto, el primer paso del estudio de la interacción fue investigar si los efectos de las

GA₃ y ABA sobre la formación de los arbusculos son independientes o por el contrario están relacionados.

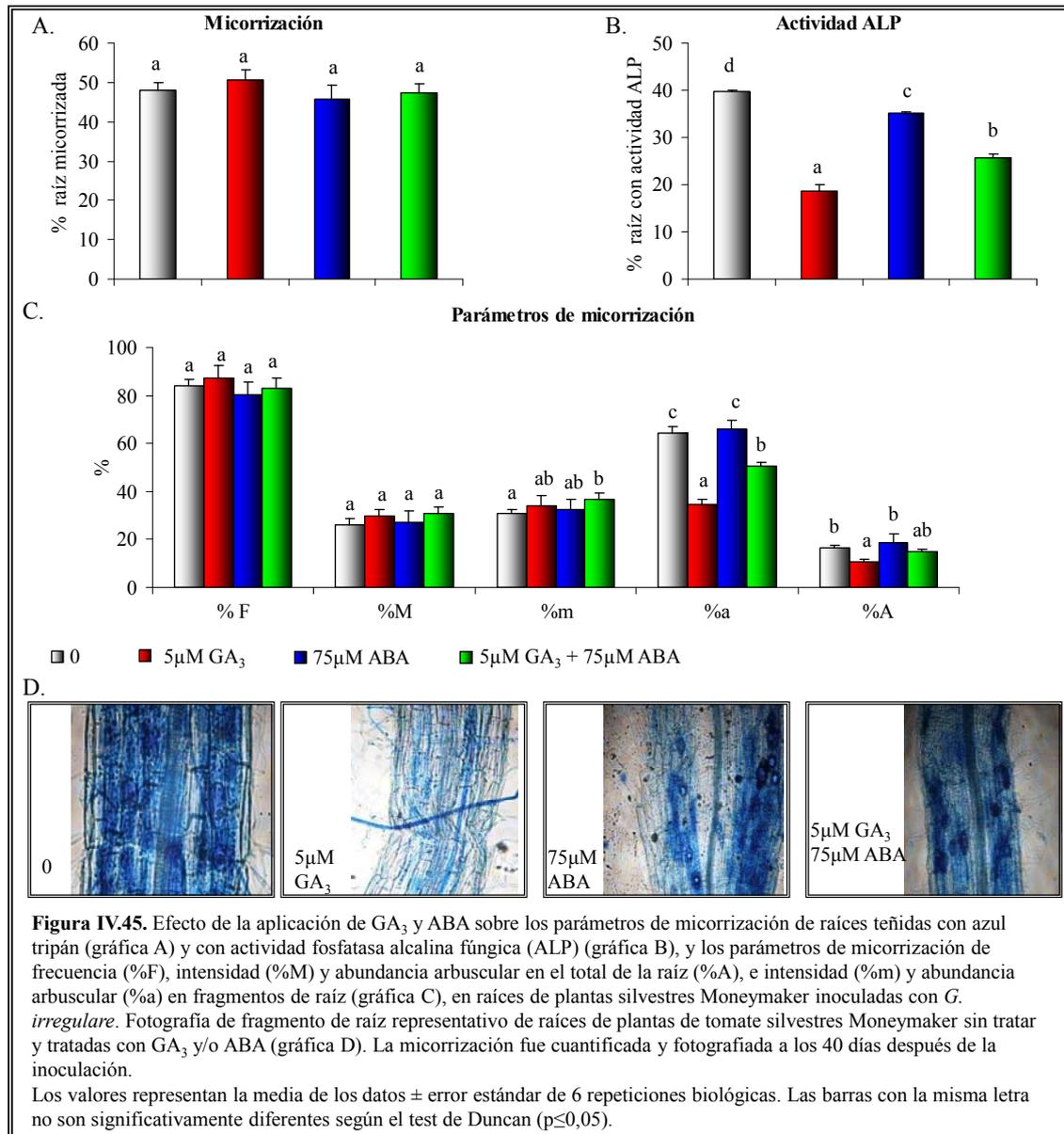
Para confirmar de una forma experimental esa posible interacción hormonal sobre la formación de arbusculos, se realizaron experimentos en plantas de tomate de genotipo silvestre Moneymaker tratadas con GA₃ y/o ABA, comparando los efectos de la aplicación de estos productos sobre la micorrización y desarrollo de parámetros de micorrización, y expresión de genes marcadores del desarrollo fúngico y del desarrollo de arbusculos. Las aplicaciones de 5 μM de GA₃ y 75 μM de ABA de manera individual o conjunta se realizaron en suelo donde crecían plantas de la variedad silvestre Moneymaker, aplicando los compuestos cada cuatro días e iniciando la aplicación a partir de la primera semana tras la inoculación con *G. irregulare*. Estas plantas se cosecharon 40 días tras la inoculación con dicho hongo.



Según los resultados y la experiencia de anteriores estudios, se utilizó una dosis de 5 μM de GA₃, que no afectaba tanto el desarrollo de la planta, y sí los parámetros de micorrización. La aplicación 5 μM de GA₃ no provocó un efecto tan acusado sobre la morfología de la planta como

IV. RESULTADOS

cuando aplicamos 10 μ M de GA₃, no observándose diferencias en el crecimiento, ni en el peso fresco de parte aérea o raíz cuando se aplicaron los tratamientos de 5 μ M de GA₃ y 75 μ M de ABA de manera separada o conjunta (Gráfica A y B, figura IV.44). Se cuantificó el ABA libre en las raíces de las plantas, y se observó que en las plantas tratadas con 75 μ M de ABA se incrementaba en un 42% el nivel de ABA, pero ese incremento fue eliminado cuando se aplicaron conjuntamente 75 μ M de ABA y 5 μ M de GA₃, por lo que parece que la concentración de hormona GA₃ aplicada ejerce un efecto negativo sobre la acumulación de ABA en las raíces de la planta (Gráfica C, figura IV.44).



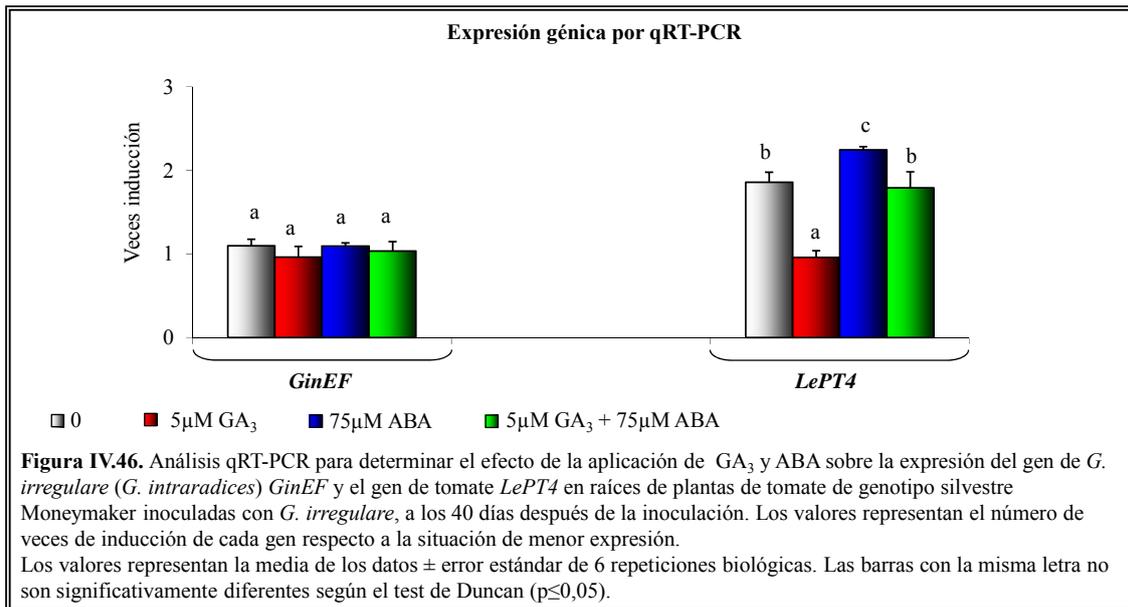
El análisis del porcentaje de longitud de raíz colonizada determinó que, al igual que ocurrió en los experimentos descritos en capítulo anterior, a tiempos de cosecha largos no hubo diferencias tras la aplicación de ABA o GA₃ en el porcentaje de longitud de raíz micorrizada (Gráfica A, figura IV.45). Por el contrario, el estudio de la eficiencia fúngica medida como actividad ALP del hongo, sí determinó diferencias entre los tratamientos. La aplicación de GA₃ provocó una reducción del 53% en dicha actividad ALP, y su aplicación conjunta con ABA permitió que esa reducción no fuera tan drástica alcanzando tan solo una disminución del 35% (Gráfica B, figura IV.45).

Un análisis más detallado de los parámetros de micorrización mostró que ningún tratamiento provocó diferencias en los parámetros de intensidad o frecuencia de colonización, determinados como frecuencia de micorrización (%F) e intensidad de micorrización total (%M) y en los fragmentos de raíz micorrizada (%m) (Gráfica C, figura IV.45). Sin embargo, los parámetros de abundancia arbuscular, al igual que el estudio de la actividad ALP fúngica, sí se afectaron por la aplicación de GA₃ y no por la de ABA, pues los tratamientos con GA₃ mostraron una reducción del porcentaje de arbusculos en los fragmentos de raíz micorrizada (%a) y del total de la raíz (%A) de un 46% y 34%, respectivamente. Cuando aplicamos GA₃ en combinación con ABA se recupera parcialmente el %a y %A, alcanzando reducciones de solo el 21% y 5%, respectivamente (Gráfica C, figura IV.45). Por tanto, tal y como ya habíamos evidenciado, la aplicación exógena de GA₃ seguía afectando negativamente en la formación de arbusculos dando lugar a raíces con pocos arbusculos y muchas hifas fúngicas, sin embargo cuando se aplicaba GA₃ conjuntamente con ABA se rescataba parcialmente la capacidad de formar arbusculos, lo que sugería cierta interferencia funcional entre ABA y GAs. La fotografía D en la figura IV.45 muestra una imagen representativa de las raíces micorrizadas en los distintos tratamientos.

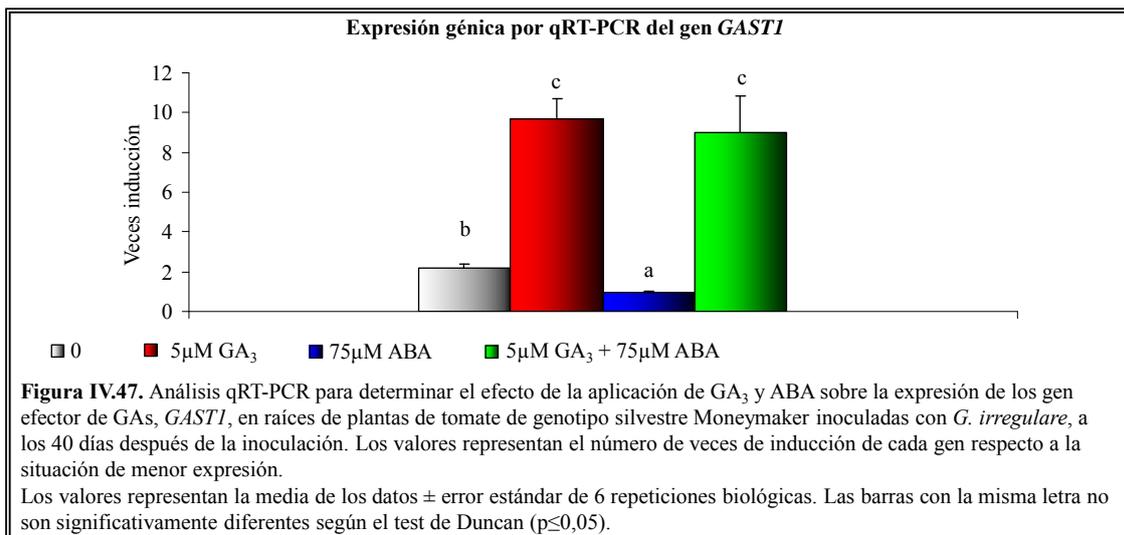
El estado de la micorrización también se cuantificó mediante técnicas qRT-PCR en plantas silvestres MoneyMaker, no tratadas o tratadas con 5 μ M de GA₃ y 75 μ M de ABA, aplicadas de manera individual o conjunta. La medida de la tasa de colonización por el hongo micorrízico arbuscular se cuantificó por la acumulación de ARNm para el gen codificante del factor de elongación 1 α de *G. intraradices* (*G. irregulare*) (*GinEF*) en raíces de tomate. La cantidad de transcrito del gen transportador de fosfato específico de arbusculos de plantas de tomate, *LePT4*, cuya expresión está asociada a las células con arbusculos (Nagy *et al.*, 2005; Gomez *et al.*, 2009) fue indicador de la mayor o menor presencia de arbusculos en la raíz. El nivel de expresión se

IV. RESULTADOS

normalizó respecto a la cantidad de ARNm del gen de tomate codificante para el factor de elongación 1α , *LeEF α 1*. El cambio inducido en la expresión génica de *GinEF* y *LePT4* en las plantas se calculó usando el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$, mostrándose el valor en veces de inducción respecto al tratamiento con menor nivel de expresión. No se observaron cambios en la expresión de *GinEF* para plantas Moneymaker tanto sin tratar como tratadas con GA₃, ABA o GA₃ más ABA (Gráfica A, figura IV.46). Los datos para la expresión del gen *LePT4*, indicador de un intercambio de fosfato activo en las células con arbusculos, mostraron que el tratamiento con GA₃ afecta negativamente la expresión del gen *LePT4* unas 2 veces, si bien esa reducción en la expresión no aparece cuando el GA₃ fue aplicado conjuntamente con ABA (Gráfica B, figura IV.46).



Por último, y para evaluar el efecto de la aplicación de GA₃ y ABA sobre la activación de la señalización mediada por GAs, se cuantificó la acumulación de ARNm para el gen efector de GAs en tomate *GAST1* (de las siglas de su nombre en inglés “gibberellic acid stimulated transcript”), el cual incrementa sus niveles con la aplicación de GA₃ exógeno (Shi & Olszewski, 1998a). Se observó que la aplicación de GA₃, solo o en combinación con ABA produce un incremento significativo en la acumulación de los transcritos del gen de tomate *GAST1* de unas 4-5 veces, mientras que la aplicación de ABA de manera aislada produce una reducción de 2 veces en la expresión de *GAST1* respecto a la situación control de plantas no tratadas (Gráfica A, figura IV.47).



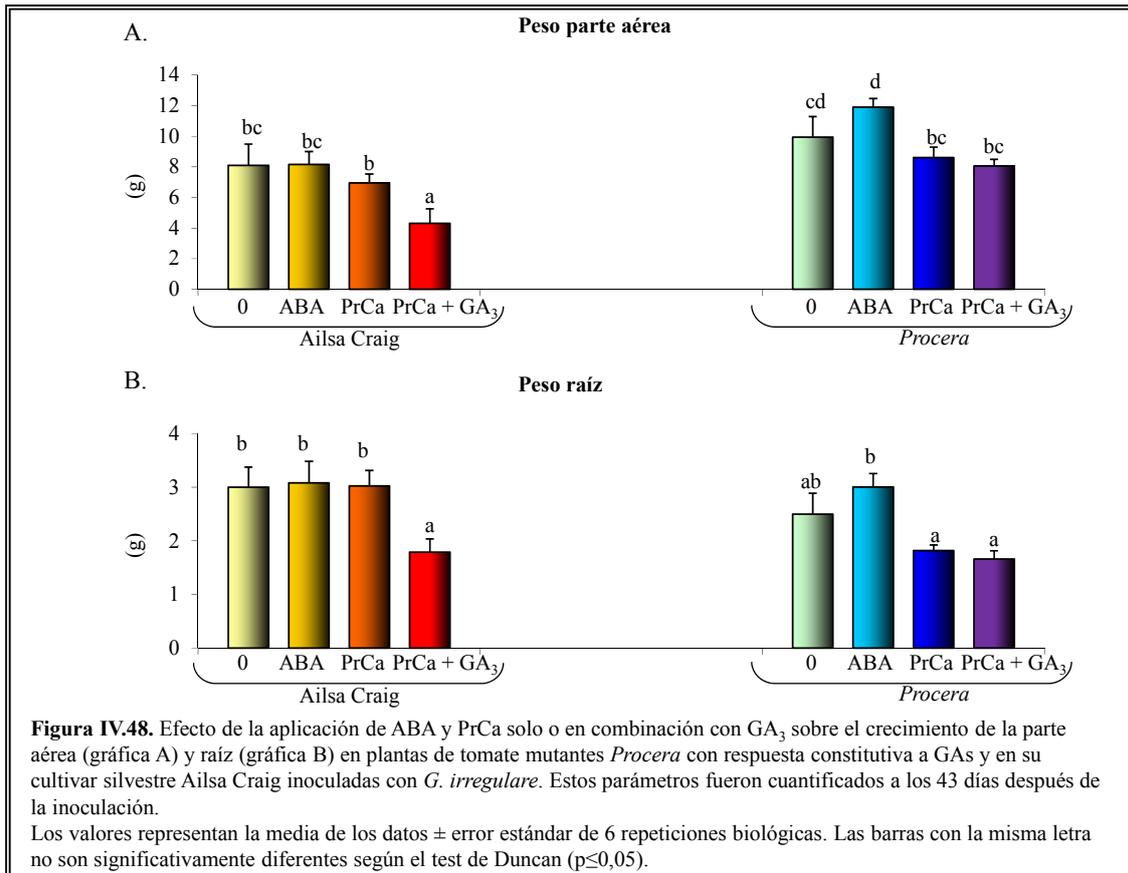
IV.4.2 Efecto del ABA en la micorrización de plantas mutantes *Procera* que exhiben una respuesta constitutiva a GAs.

Los experimentos realizados y los consiguientes resultados obtenidos, descritos en apartados anteriores, sugieren papeles antagonistas para el ABA y las GAs durante el proceso de micorrización, de tal forma que el ABA participa de forma positiva sobre el desarrollo y función de los arbusculos, mientras que las GAs regulan negativamente la formación de estas estructuras.

Para obtener de forma experimental una evidencia más de los papeles antagonistas del ABA y las GAs, se ideó un experimento en plantas silvestres Ailsa Craig y plantas mutantes *Procera* con respuesta constitutiva a GAs, aplicando ABA o prohexadiona cálcica (PrCa) solo o en combinación con GA₃, y comparando los efectos de la aplicación de estos productos sobre la micorrización y desarrollo de parámetros de micorrización, y expresión de genes marcadores del desarrollo fúngico y del desarrollo de arbusculos. Las aplicaciones de 75µM de ABA o 50µM de PrCa solo o conjuntamente con 5µM de GA₃ se realizaron en suelo cada cuatro días, a partir de la primera semana tras la inoculación con *G. irregulare*. El experimento se prolongó hasta los 43 días después de la inoculación con el hongo formador de micorriza arbuscular.

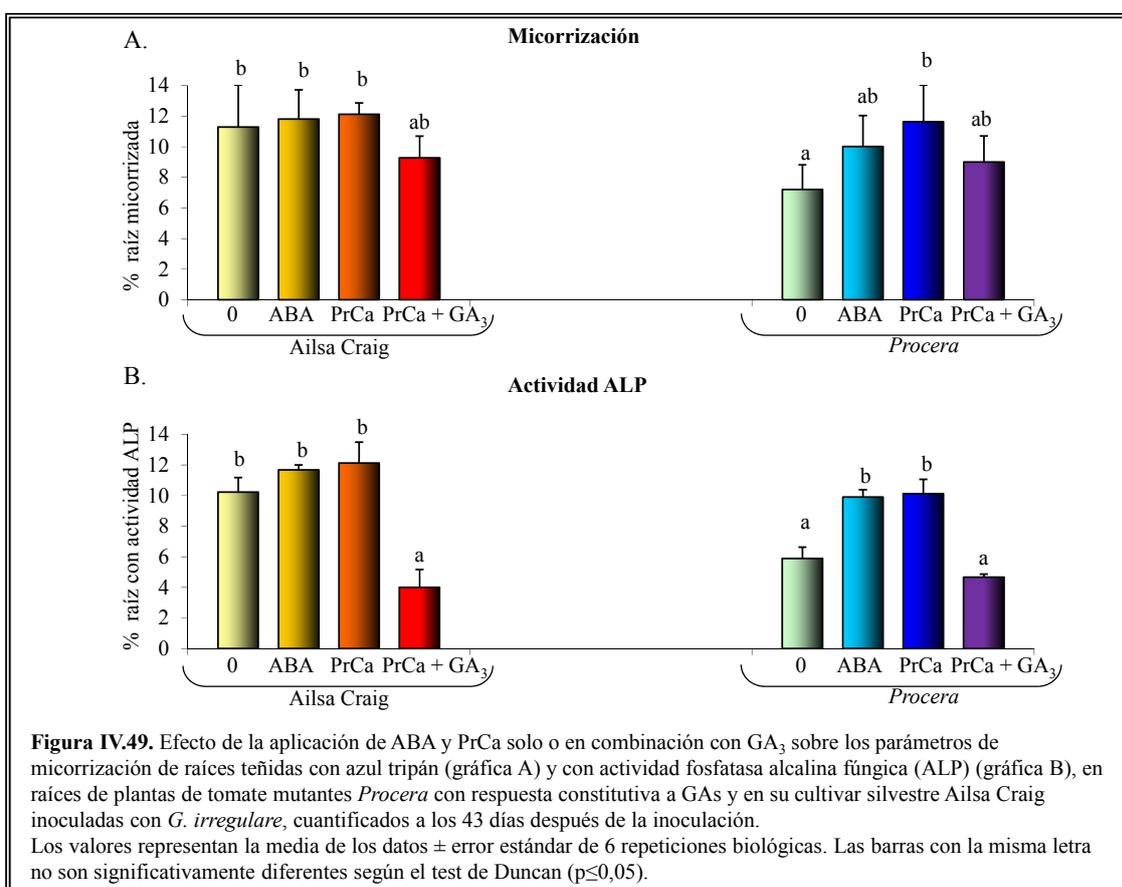
Al igual que en ensayos anteriores, la respuesta constitutiva a GAs en mutantes *Procera* provoca un incremento en el peso fresco de la parte aérea y un decremento en el peso fresco de las raíces, en relación con las plantas silvestres Ailsa Craig (Gráfica A y B, figura IV.48). La

aplicación de ABA no tuvo efectos significativos sobre el crecimiento en plantas silvestres, pero en el mutante *Procera* si produce un incremento de peso tanto de la parte aérea como de raíz. El uso del inhibidor de GAs, PrCa, provoca un descenso no muy acusado en el peso fresco de la parte aérea tanto en las plantas silvestres como en el mutante *Procera*, no afectando este compuesto a las raíces de plantas silvestres, aunque sí disminuye el peso fresco de raíz del mutante *Procera* (Gráfica A y B, figura IV.48). Por último, cuando aplicamos PrCa en combinación con GA₃ tanto en las plantas silvestres como en *Procera* se produce un descenso acusado tanto del peso fresco de la parte aérea como de las raíces (Gráfica A y B, figura IV.48).



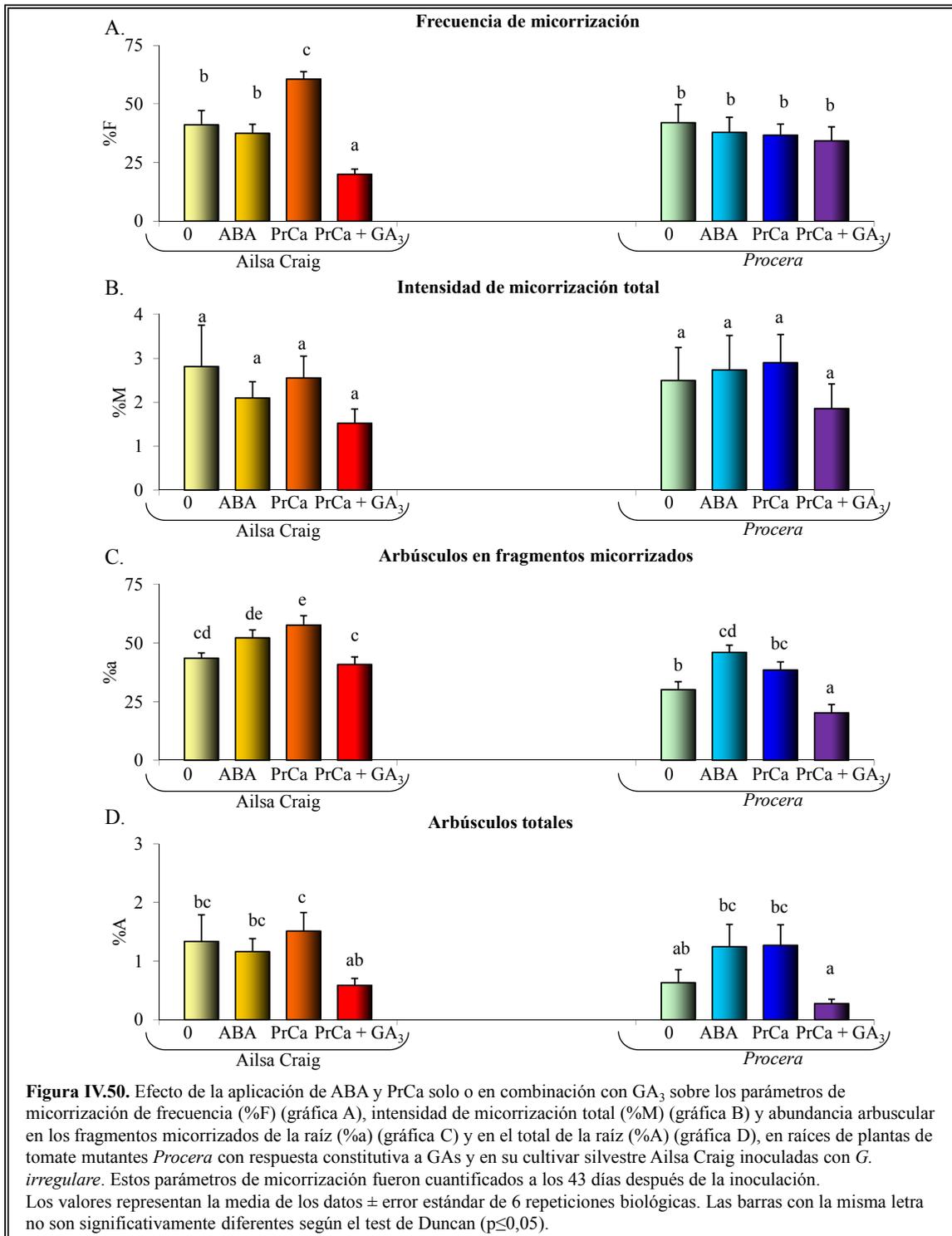
Los primeros análisis de la afectación de la micorrización se realizaron determinando tanto el porcentaje de raíz colonizada como el porcentaje de raíz con actividad ALP fúngica. Como en experimentos anteriores, las plantas mutantes *Procera* presentan un descenso del porcentaje de raíz micorrizada con respecto a plantas de tomate silvestres Ailsa Craig, que en este caso fue de un 36%. La aplicación de ABA o PrCa bien solo o en combinación con GA₃ no afectó significativamente a la micorrización en las plantas silvestres, medida como porcentaje de raíz

colonizada (Gráfica A, figura IV.49). Sin embargo, los mutantes *Procera* si se vieron afectados positivamente por la aplicación de PrCa, si bien los tratamientos de ABA y PrCa + GA₃ no provocaron cambios significativos en la micorrización de estos mutantes (Gráfica A, figura IV.49). Al igual que en raíces teñidas con azul tripán, las plantas *Procera* tienen menor porcentaje de actividad ALP, disminuyendo en un 42% con respecto al cultivar silvestre Ailsa Craig. Mientras que tanto la aplicación de ABA como de PrCa no provocaron cambios significativos en la actividad ALP en las plantas silvestres, si disminuyó a menos de la mitad esta actividad con la aplicación conjunta de PrCa y GA₃ (Gráfica B, figura IV.49). Por el contrario, en el mutante *Procera* la aplicación tanto de ABA como de PrCa produjo un incremento del 40% en los valores registrados, mientras que el tratamiento de PrCa + GA₃ no alteró la actividad ALP del mutante *Procera* (Gráfica B, figura IV.49).



El resultado de la cuantificación pormenorizada de los distintos parámetros de micorrización permitió definir un patrón más exacto de micorrización. Se observó que la frecuencia de micorrización (%F) no sufrió variaciones ni entre genotipos ni entre tratamientos, salvo en

plantas de genotipo silvestre Ailsa Craig, pues la aplicación de PrCa incrementa dicho parámetro en un 32% con respecto a las plantas sin tratar, aunque cuando fue aplicado conjuntamente con GA₃ se produce una extensa reducción del 51% en este parámetro (Gráfica A, figura IV.50). El porcentaje de intensidad de micorrización en el total de la raíz (%M) no sufre cambios ni entre las plantas *Procera* y su cultivar silvestre, ni entre los diferentes tratamientos aplicados (Gráfica B, figura IV.50). En las plantas silvestres Ailsa Craig se observó mayor porcentaje de abundancia arbuscular en los fragmentos micorrizados (%a) que en los mutantes *Procera*, los cuales mostraron una reducción del 60%. La aplicación de ABA a plantas de genotipo silvestre Ailsa Craig no incrementó de forma significativa la abundancia arbuscular en las zonas micorrizadas, mientras que la aplicación de PrCa incrementó este parámetro en un 24%, aunque cuando es aplicado en combinación con GA₃ este incremento desaparece. Por el contrario, en el mutante *Procera*, la aplicación de ABA si incrementó el %a en un 35%, llevando dicho parámetro a valores registrados por el cultivar silvestre, mientras que el tratamiento con PrCa no incrementó el %a de manera significativa, e incluso cuando es aplicado conjuntamente con GA₃ produce una reducción del %a en un 33% (Gráfica C, figura IV.50). El porcentaje de arbusculos totales en las raíces (%A) no se afecta en plantas silvestres salvo por una pequeña reducción en presencia de GA₃. Sin embargo, en las plantas *Procera* sin tratar si se observan una reducción de más de un 50% con respecto a las plantas silvestres no tratadas, y los tratamientos de ABA y PrCa provocan una recuperación casi por completo del nivel de arbusculos totales en estas plantas *Procera* (Gráfica D, figura IV.50). El análisis estadístico de los datos muestra que la frecuencia de micorrización (%F) no está influenciado por el genotipo (Two-Way ANOVA, $F_{1,86} = 0,74$, $P = 0,39$) pero si por el tratamiento (Two-Way ANOVA, $F_{3,86} = 4,72$, $P = 0,0043$), encontrándonos además una interacción significativa entre los factores genotipo y aplicación de los diferentes tratamientos (Two-Way ANOVA, $F_{3,86} = 4,38$, $P = 0,0066$), indicando que el parámetro %F responde de manera diferente a los tratamientos según el genotipo de la planta. Por el contrario, el parámetro de frecuencia de arbusculos en las zonas micorrizadas (%a) está influenciado tanto por el genotipo de la planta (Two-Way ANOVA, $F_{1,86} = 34,69$, $P < 0,0001$) como por los diferentes tratamientos aplicados (Two-Way ANOVA, $F_{3,86} = 13,9$, $P < 0,0001$), pero no existe una interacción significativa entre los factores genotipo y aplicación de diferentes tratamientos (Two-Way ANOVA, $F_{3,86} = 2,88$, $P < 0,0406$), indicando que el efecto de los mismos es similar en ambos tipos de plantas.



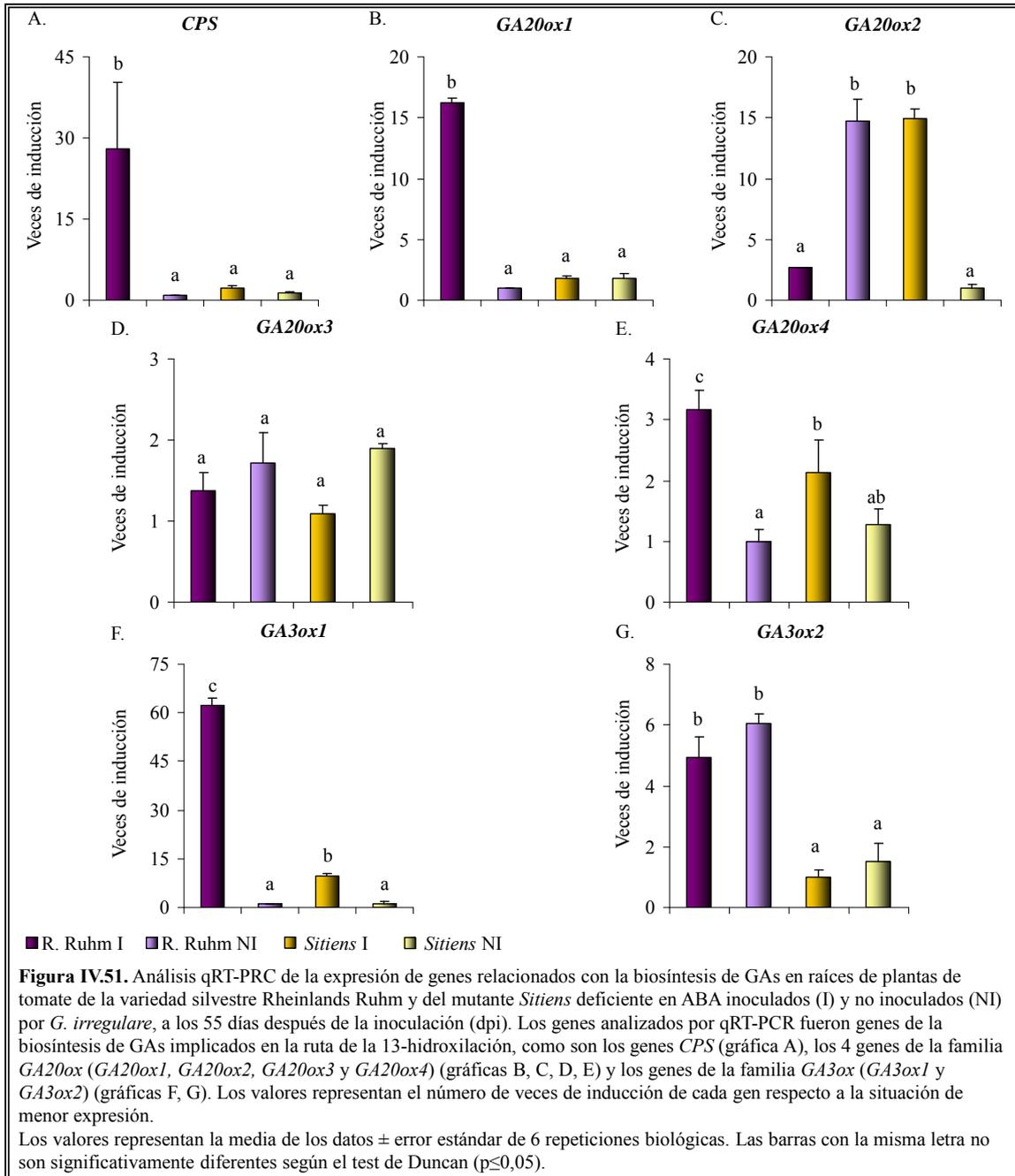
IV.4.3 Participación de las GAs en la simbiosis Micorriza Arbuscular defectuosa en plantas mutantes *Sitiens* deficientes en ABA

El estudio en plantas con respuesta constitutiva activa a GAs y el uso tanto de ABA como del inhibidor de GAs, PrCa, confirma los papeles antagonistas del ABA y las GAs durante el proceso de micorrización, y más concretamente para la formación de los arbusculos. En este sentido, el mutante *Procera*, con un menor número de arbusculos que el cultivar silvestre, incrementó de manera significativa el número de estos cuando se le aplicó ABA exógenamente.

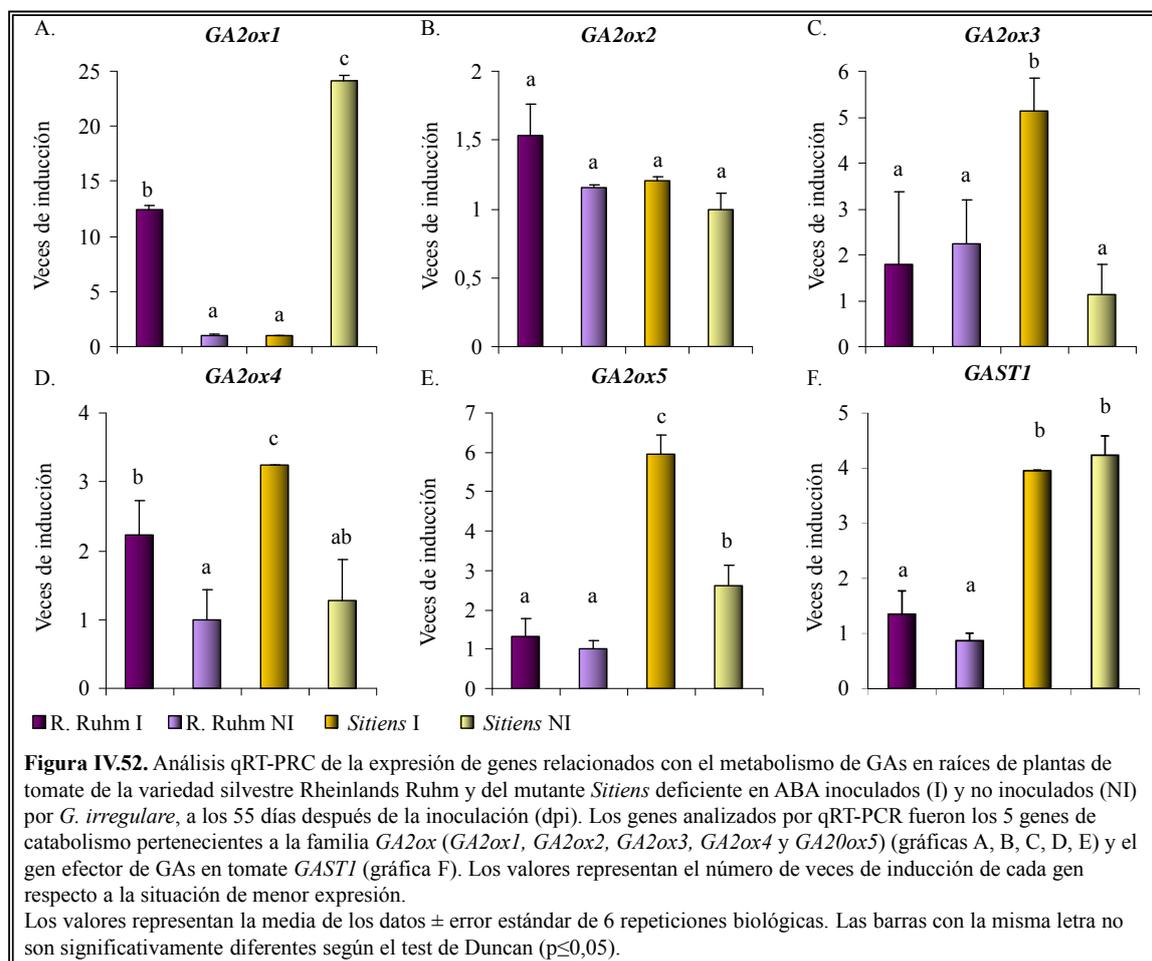
Para complementar los estudios realizados con plantas *Procera*, se decidió llevar a cabo una serie de experimentos de análisis de las alteraciones del proceso infectivo relacionadas con el metabolismo de GAs en plantas mutantes *Sitiens*, deficientes en ABA, y que como ya se mostró en los capítulos I y II tienen una menor capacidad tanto para la formación como para el funcionamiento de los arbusculos.

En primer lugar, en estas plantas *Sitiens*, se realizaron estudios de análisis molecular mediante técnicas de qRT-PCR para determinar la expresión de genes relacionados con el metabolismo de GAs. Como ya se mostró en el capítulo III, en los estudios de transcriptómicas, varios genes del metabolismo de GAS, tiene mayor expresión en las plantas silvestres inoculadas con el hongo micorrícico *G. irregulare* con respecto a plantas *Sitiens* micorrizadas (Tabla IV.1). Por tanto, parece lógico pensar que el metabolismo de GAs está alterado en las plantas *Sitiens* micorrizadas en relación a las plantas silvestres. De ahí que, en estas plantas *Sitiens* y en su cultivar silvestre Rheinlands Ruhm tanto micorrizadas como no micorrizadas, se estudiaran los genes relacionados con la biosíntesis de GAs pertenecientes también a la ruta de la 13-hidroxiclación, tales como el *copalyl difosfato sintasa (CPS)*, los 4 genes de la familia *giberelina-20-oxidasa (GA20ox1, GA20ox2, GA20ox3 y GA20ox4)* y los 2 genes de la familia *giberelina-3-oxidasa (GA3ox1 y GA3ox2)*. El estudio de la expresión de estos genes de biosíntesis de GAs determinó que la mayoría de ellos tienen mayor expresión en la raíz de plantas silvestres inoculadas que en la raíz de otras plantas sometidas a cualquier otro tratamiento, esto es en plantas silvestres no inoculadas y plantas *Sitiens* inoculadas o no. En concreto, en las plantas silvestres Rheinlands Ruhm micorrizadas hay un incremento de la expresión con respecto tanto a plantas silvestres sin micorrizar como a plantas *Sitiens* micorrizadas o no, y para los genes de biosíntesis de GAs: *CPS, GA20ox1, GA20ox4 y GA3ox1* (Gráficas A, B, E y F, figura IV.51). Además, hay una mayor acumulación de transcrito del gen *GA3ox2* en las plantas silvestres, tanto inoculadas como no inoculadas, con respecto a las plantas *Sitiens* (Gráfica G, figura IV.51). Por

último, los genes de biosíntesis de GAs, *GA20ox2* y *GA20ox3* no siguen el patrón mostrado por el resto de genes de biosíntesis, ya que el gen *GA20ox2* presenta una mayor acumulación en las plantas silvestres sin inocular y en las plantas *Sitiens* inoculadas (Gráfica C, figura IV.51) y el gen *GA20ox3* no presenta diferencias significativas en su expresión entre tratamientos (Gráfica D, figura IV.51).



En las plantas *Sitiens* y en su cultivar silvestre Rheinlands Ruhm, también se realizó un estudio de la expresión de los diferentes genes de catabolismo de GAs, en concreto cinco genes pertenecientes a la familia *giberelina-2-oxidasa* (*GA2ox1*, *GA2ox2*, *GA2ox3*, *GA2ox4* y *GA2ox5*). El análisis mediante qRT-PCR determinó un incremento en la expresión en las plantas *Sitiens* inoculadas con *G. irregulare* respecto tanto a las plantas *Sitiens* sin inocular como a plantas silvestres micorrizadas y no micorrizadas, para los genes de catabolismo de GAs: *GA2ox3*, *GA2ox4* y *GA2ox5* (Gráficas C, D y E, figura IV.52). Sin embargo, la expresión de los genes de catabolismo de GAs: *GA2ox1* y *GA2ox2* no siguen el mismo patrón, pues el gen *GA2ox1* incrementa su expresión en plantas silvestres inoculadas y en plantas *Sitiens* sin inocular (Gráfica A, figura IV.52), mientras que el gen *GA2ox2* no presenta diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Gráfica B, figura IV.52).



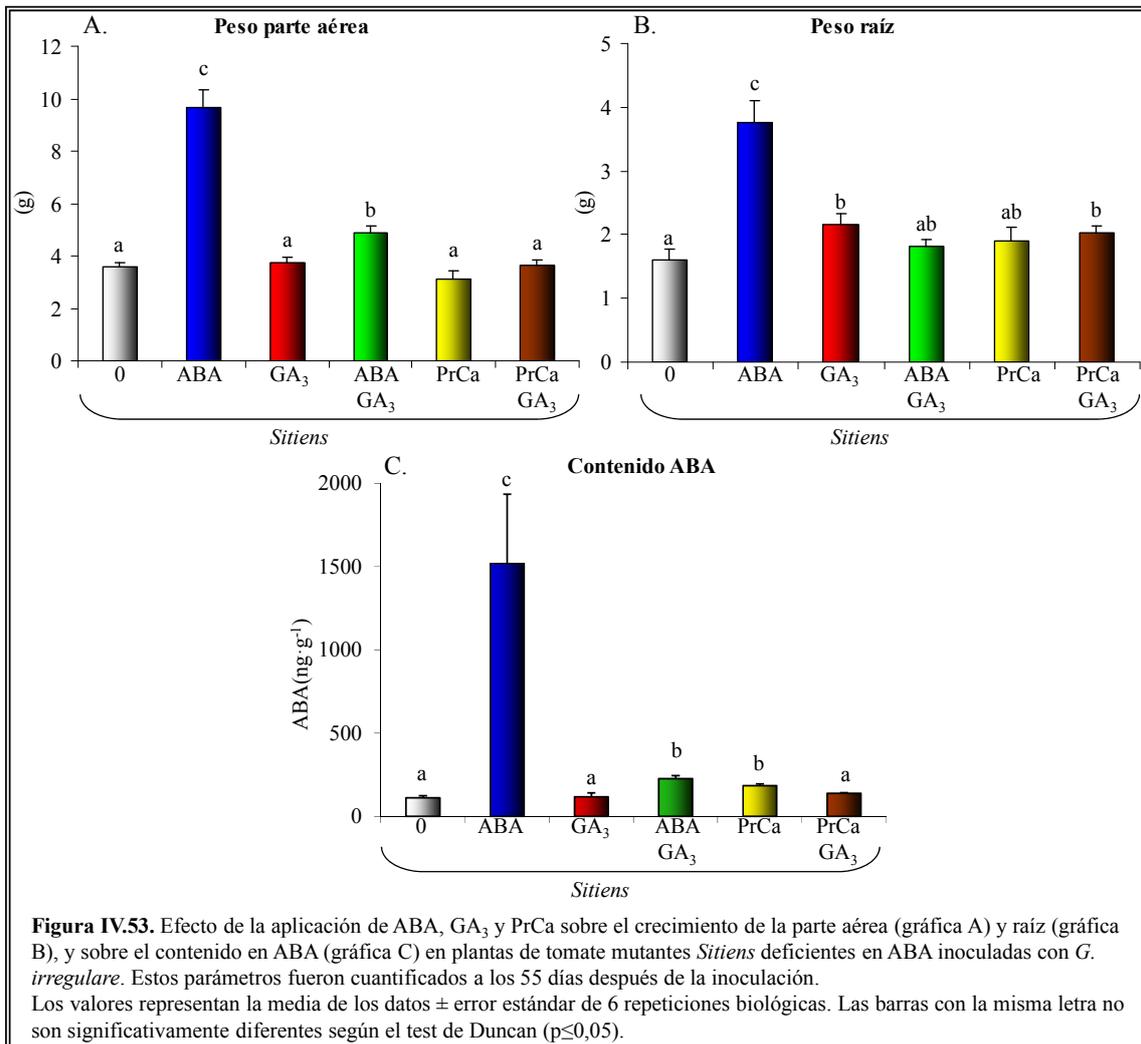
Por último, también se realizó un estudio en estas plantas *Sitiens* y en su cultivar silvestre del gen efector de GAs *GAST1*. Este análisis determinó que *GAST1* se expresa unas cuatro veces más en las raíces de los mutantes *Sitiens* que en las de su cultivar silvestre ya estén inoculados o no inoculados (Gráfica F, figura IV.52).

Una vez analizado el patrón de expresión de genes del metabolismo de GAs en mutantes *Sitiens*, se diseñaron experimentos de aplicación exógena en suelo tanto de ABA, GA₃ y PrCa, en diferentes combinaciones, al objeto de estudiar la posible recuperación de la micorrización en estos mutantes deficientes en ABA. Para ello se utilizaron los siguientes tratamientos: un grupo de plantas constituyeron el tratamiento control y no fueron tratadas con ninguno de estos compuestos, otro grupo fue tratado con 75µM de ABA, otro con 75µM de ABA en combinación con 5µM de GA₃, el siguiente grupo fue tratado solamente con 5µM de GA₃, otro con 50µM de PrCa y el último grupo fue tratado con 5µM de GA₃ conjuntamente con 50µM de PrCa. La aplicación de estos productos se realizó en suelo, cada cuatro días y a partir de la primera semana tras la inoculación con *G. irregulare*. El experimento se prolongó hasta los 55 días después de la inoculación con el hongo arbuscular, donde se cosecharon las plantas y se compararon los efectos de la aplicación de estos productos sobre el contenido de ABA libre en raíz, peso fresco de las plantas, desarrollo de parámetros de micorrización, y expresión de genes marcadores del desarrollo fúngico y del desarrollo de arbusculos.

Al igual que en ensayos anteriores, el retraso en el desarrollo, crecimiento y peso fresco de las plantas deficientes en ABA *Sitiens*, tanto de su parte aérea como radicular, se elimina tras la aplicación de ABA de manera aislada, pues cuando el ABA es aplicado junto con GA₃ solo se observa un leve incremento en el crecimiento tanto de la parte aérea como de raíces. Por otro lado, tanto la aplicación de GA₃ como PrCa no produce cambios significativos en el desarrollo de las plantas (Gráfica A y B, figura IV.53).

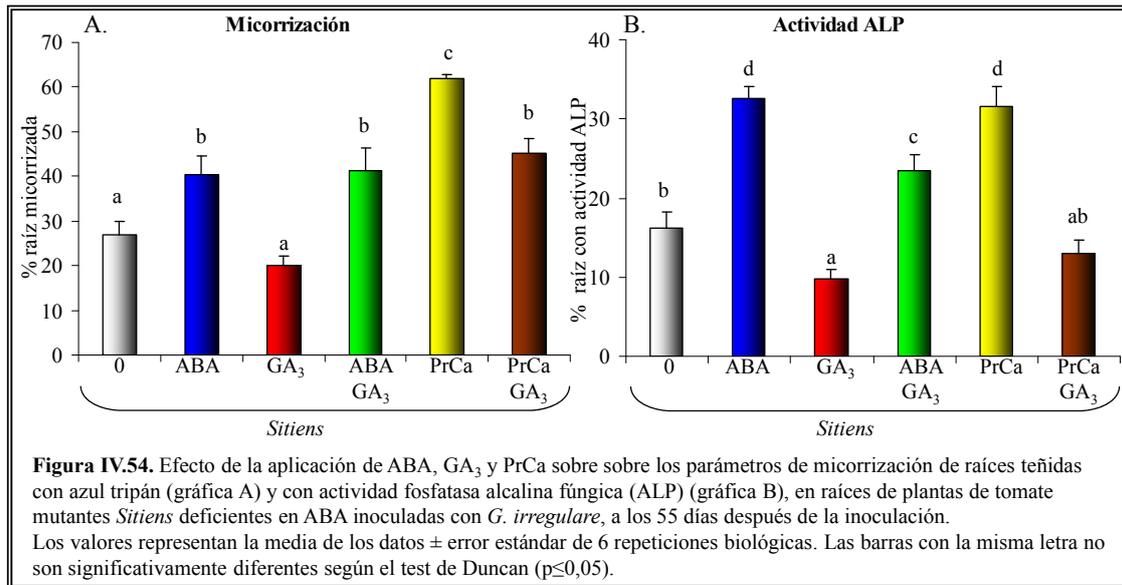
La deficiencia en ABA de las plantas *Sitiens* fue eliminada cuando se aplicó una dosis de 75µM de ABA en suelo, multiplicando por más de 10 veces los valores registrados de ABA libre en raíz. Sin embargo, cuando el ABA fue aplicado conjuntamente con GA₃, aunque si bien se produce un incremento significativo del contenido en ABA en la raíz, este incremento solo fue de 2 veces respecto al contenido de ABA de raíces de las plantas *Sitiens* no tratadas (Gráfica C, figura IV.53). Por otro lado, la aplicación de GA₃ de manera individual o en combinación con el inhibidor de GAs, PrCa, no produce cambios en el contenido en ABA, mientras que el

tratamiento de PrCa llevó a un leve incremento significativo del contenido en ABA de 2 veces (Gráfica C, figura IV.53).



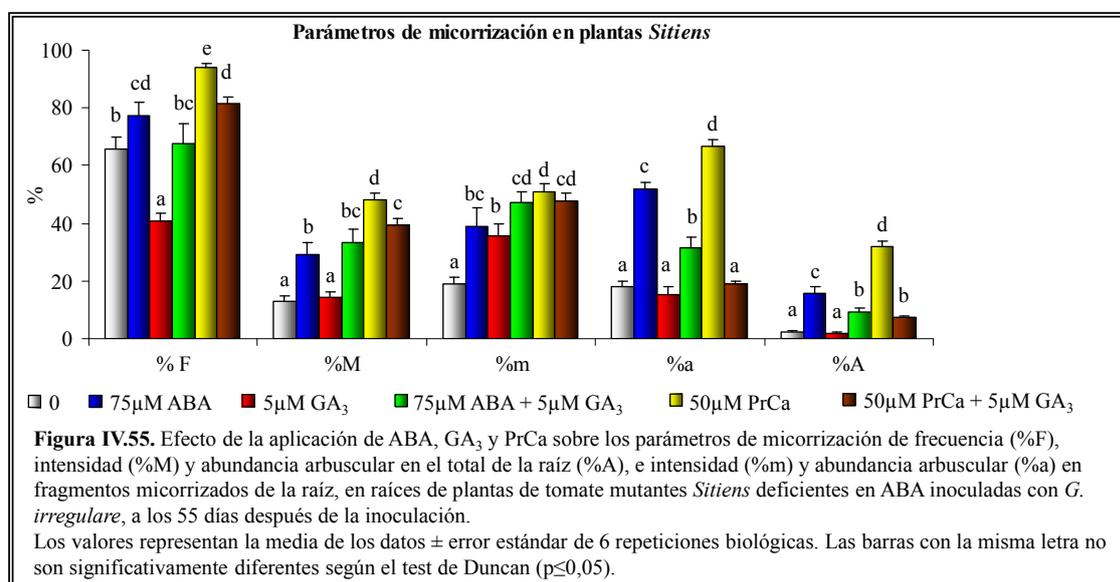
Los primeros análisis sobre la repercusión de los tratamientos en la micorrización de las plantas *Sitiens* se realizaron determinando tanto el porcentaje de raíz colonizada teñida en azul tripán, como el porcentaje de raíz con actividad ALP. De manera similar a la de otros experimentos analizados anteriormente, la aplicación de ABA, solo o en combinación con GA₃, produce un incremento del porcentaje de raíz colonizada de un 34%. Igualmente, la aplicación del inhibidor de GAs, PrCa, incrementa el porcentaje de micorrización en estas plantas mutantes *Sitiens*, ya sea aplicado solo, donde incrementó en más de un 50% el porcentaje de colonización, o junto con GA₃, aumentando en este caso el porcentaje de micorrización en un 40% (Gráfica A,

figura IV.54). En cuanto al porcentaje de actividad ALP fúngica en raíz, como ya se ha comentado en los capítulos I y II, es donde las plantas mutantes *Sitiens* muestran una mayor afectación, ya que están afectadas principalmente en la formación y funcionalidad de los arbusculos y por tanto esta actividad ALP se ve gravemente dañada. El porcentaje de actividad ALP es incrementado en aproximadamente un 50% con la aplicación exógena tanto de ABA como de PrCa, y también se incrementa, aunque solamente un 30%, aplicando conjuntamente ABA y GA₃. La actividad ALP es igual o menor que en los controles no tratados cuando se aplicó GA₃, bien solo o en combinación con PrCa (Gráfica B, figura IV.54).

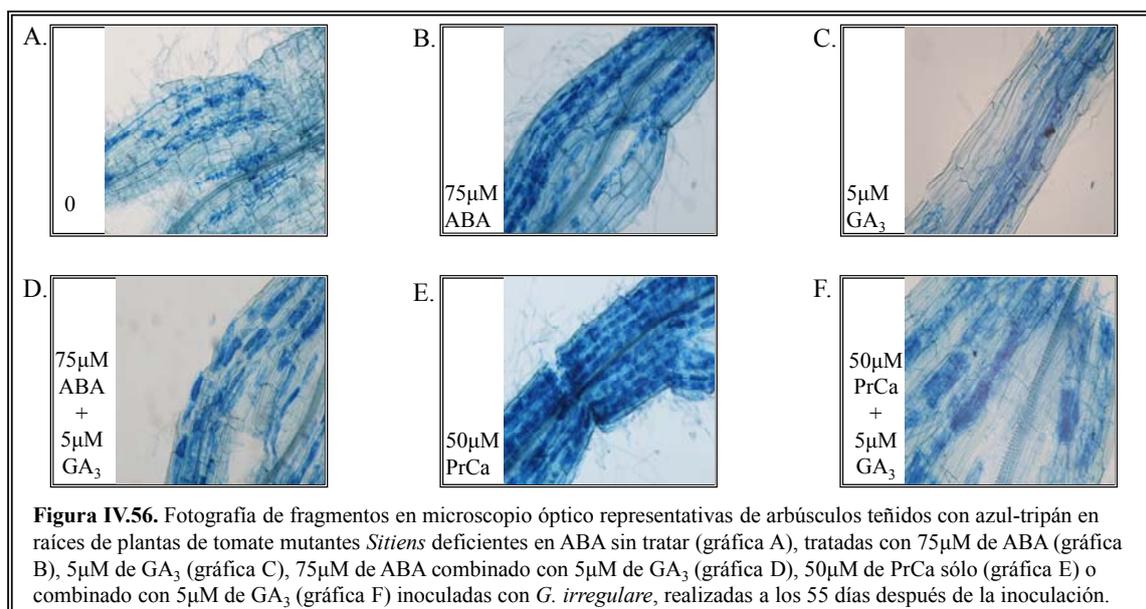


Al objeto de definir de manera más exhaustiva las alteraciones en la micorrización en estas plantas mutantes *Sitiens* sometidas a los diferentes tratamientos, se realizó un estudio más preciso de los parámetros de micorrización. Los resultados muestran que las plantas *Sitiens* cuando son tratadas bien con ABA, PrCa o PrCa+GA₃ muestran un incremento de la frecuencia de micorrización (%F) de un 15%, 30% y 20%, respectivamente. La frecuencia de micorrización disminuye un 38% cuando las plantas *Sitiens* son tratadas con GA₃. El tratamiento con GA₃ reduce el efecto positivo del ABA sobre la frecuencia de micorrización cuando ambos productos son añadidos conjuntamente (Figura IV.55). La intensidad de micorrización en el total de la raíz (%M) incrementó en un 55% y 60% en las plantas *Sitiens* tratadas tanto con ABA solo o en combinación con GA₃, respectivamente. La aplicación de PrCa de manera individual o junto con GA₃ también incrementó la intensidad de micorrización en un 73% y 67%, respectivamente,

mientras que la aplicación exclusiva de GA₃ no produce cambios significativos en el valor de este parámetro (Figura IV.55). Consecuentemente, el parámetro de intensidad de micorrización en los fragmentos de raíz micorrizada (%m) (calculado a partir de los datos de %F y %M) incrementó en las plantas *Sitiens* con todos los tratamientos, siendo los incrementos de un 47% en plantas tratadas con GA₃ hasta un 63% en plantas tratadas con PrCa (Figura IV.55). Curiosamente, el incremento de %m en las plantas *Sitiens* tratadas con GA₃, es debido a una bajada de la frecuencia de micorrización (%F), mientras que en los demás tratamientos dicho incremento se debe a una subida de la intensidad de colonización (%M). Los tratamientos de ABA en solitario o en combinación con GA₃ incrementaron el porcentaje de abundancia arbuscular en los fragmentos de raíz micorrizada (%a) en las plantas *Sitiens*, en un 65% y 43%, respectivamente. También las plantas tratadas con PrCa aumentaron su %a en un 73% respecto a las plantas control no tratadas. Sin embargo, las plantas *Sitiens* tratadas exclusivamente con GA₃ o con GA₃ en combinación con PrCa no sufrieron cambios significativos en el %a (Figura IV.55). Consecuentemente, el parámetro de abundancia arbuscular en el total de la raíz (%A) (calculado a partir de los datos de %a y %M) incrementó bastante en las plantas *Sitiens* tratadas exclusivamente con ABA o PrCa, alcanzando valores de un 70% o hasta un 92% mayores que en los controles no tratados. El GA₃ aplicado junto a ABA o PrCa reduce el efecto positivo de la aplicación independiente de estas sustancias, y aplicado de manera exclusiva no afecta el desarrollo de este parámetro de micorrización en relación a las plantas *Sitiens* control no tratadas (Figura IV.55).

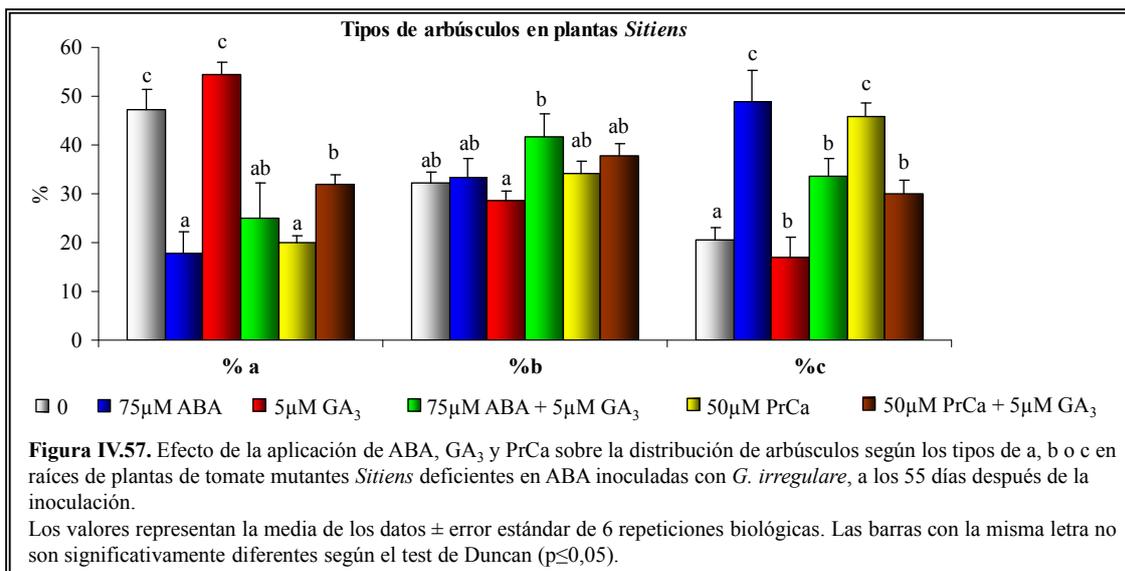


En estudios precedentes realizados en nuestro laboratorio se ha determinado que la mayoría de los arbusculos de las plantas *Sitiens* ocupan parcialmente la célula hospedadora y presentan menos ramificaciones, siendo estas más gruesas y cortas en comparación con las de los arbusculos de su cultivar silvestre Rheinlands Ruhm, el cual posee la mayoría de arbusculos que ocupan la totalidad de la célula cortical, presentando más ramificación y siendo estas ramificaciones más finas (Herrera-Medina *et al.*, 2007). En este trabajo, como se observó en los estudios anteriores mencionados, las plantas *Sitiens* tanto sin tratar (Gráfica A, figura IV.56), como tratadas de manera exclusiva con GA₃ (Gráfica C, figura IV.56), presentaban la mayoría de sus arbusculos menos desarrollados, con pocas ramificaciones. La aplicación tanto de ABA como de PrCa provocó un incremento de la proporción de arbusculos más desarrollados y con mayor número de ramificaciones, similares en aspecto a los que presenta el cultivar silvestre Rheinlands Ruhm (Gráficas B y E, figura IV.56). No obstante, cuando el ABA o PrCa se aplicaban junto con GA₃ se observaban en proporción parecida arbusculos más y menos desarrollados (Gráficas D y F, figura IV.56).



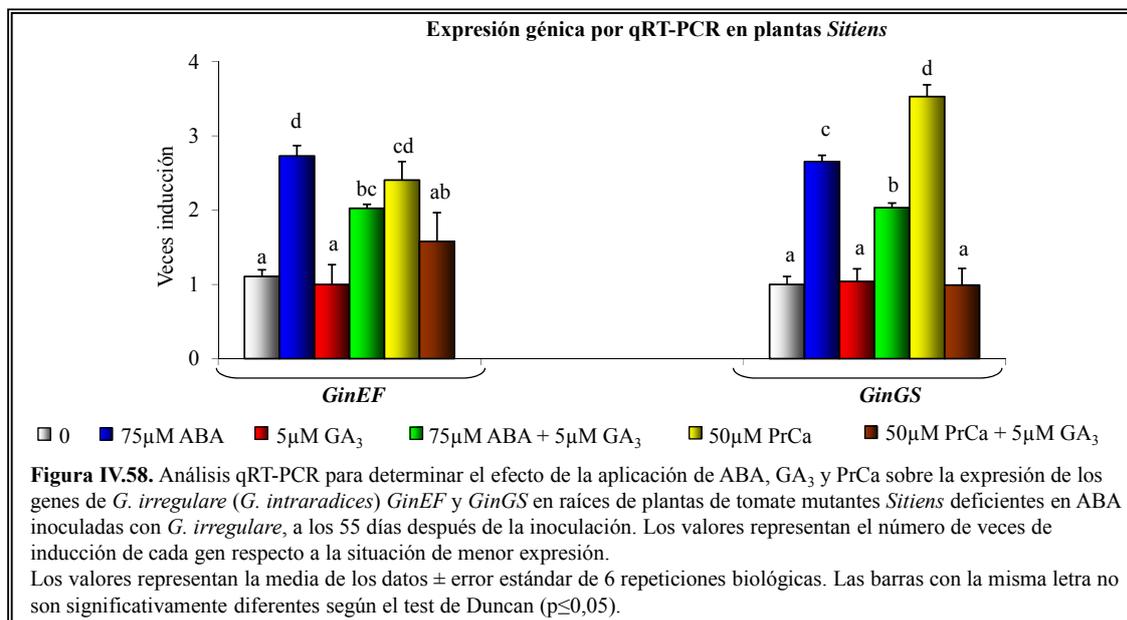
Con objeto de comprobar y cuantificar este efecto sobre la estructura de los arbusculos debido a los diferentes tratamientos químicos, se realizó una cuantificación del número de arbusculos en las raíces de las plantas *Sitiens* sin tratar o tratadas con ABA, GA₃, ABA+GA₃, PrCa o PrCa+GA₃, definiendo para ello tres categorías diferentes de arbusculos, tal y como se describe en el apartado III.3.4. Con esta metodología se determinó el porcentaje de arbusculos

pertenecientes a la clase **a**, **b** o **c** en cada grupo de plantas sometidas a distinto tratamiento. En la “clase **a**” se incluían arbusculos en formación o degradación, poco desarrollados y ramificados y con una ocupación parcial de la célula vegetal; la “clase **b**” la constituían arbusculos medianamente desarrollados, con una ocupación casi total de la célula vegetal; y la “clase **c**” correspondía con arbusculos totalmente desarrollados, con una ocupación completa de la célula vegetal y máxima ramificación. En las plantas *Sitiens* sin tratar, la distribución de arbusculos fue del 47%, 33% y 20% del tipo **a**, **b** y **c** respectivamente, y esta distribución fue similar en plantas tratadas con GA₃, con una distribución de arbusculos del 54%, 29% y 17% (Figura IV.57). Por el contrario, cuando las plantas *Sitiens* se trataron con ABA o PrCa se observó una distribución de arbusculos más parecida al que normalmente presenta un cultivar silvestre (Herrera-Medina *et al.*, 2007). Así, los arbusculos de la clase **a**, **b** y **c** presentaron una representación del 18%, 33% y 48%, respectivamente, en plantas tratadas con ABA, y del 20%, 34% y 46%, respectivamente en plantas tratadas con PrCa (Figura IV.57). Por último, cuando las plantas *Sitiens* fueron tratadas con PrCa o ABA en combinación con GA₃, apareció una distribución similar de las diferentes clases de arbusculos, siendo la distribución de los arbusculos de la clase **a**, **b** y **c** de un 25%, 42% y 33% en las plantas tratadas conjuntamente con ABA y GA₃, y de un 32%, 38% y 30% en las plantas a la cuales se le aplicó PrCa y GA₃ a la vez (Figura IV.57).



Mediante análisis de expresión génica por qRT-PCR se verificó también a nivel molecular la distinta respuesta de plantas *Sitiens* a los tratamientos con ABA, GA₃ y PrCa. Para determinar la tasa de colonización por el hongo arbuscular, se cuantificó la acumulación del transcrito de

ARNm para el gen *GinEF* en raíces de tomate. La cantidad de transcrito del gen *GinGS* se utilizó como medida para determinar el total de arbusculos funcionales en las raíces micorrizadas. En las raíces de plantas de tomate *Sitiens* se observó un incremento en la expresión de *GinEF* en más de 2,7 y 2,4 veces con la aplicación tanto de ABA como de PrCa, respectivamente, mientras que la aplicación de GA₃ no provocó cambios en la cantidad de transcrito de dicho gen, e incluso cuando el GA₃ se aplicó combinado con ABA o PrCa provocó una disminución del efecto positivo sobre la expresión del ABA o PrCa (Figura IV.58). El patrón de expresión del gen *GinEF* fue muy parecido al patrón de comportamiento observado para el parámetro de %M en las plantas. Con respecto a la cantidad de transcrito acumulado del gen *GinGS*, se observó que al igual que con el gen *GinEF*, la aplicación tanto de ABA como de PrCa producen un incremento de la expresión de dicho gen, cuantificada en 2,7 y 3,5 veces, respectivamente. De igual forma, la aplicación de GA₃ no modifica el nivel de expresión del gen *GinGS*, pero si modifica el efecto del ABA o PrCa sobre la expresión del mismo, de tal forma que la aplicación conjunta de GA₃ con ABA y sobre todo con PrCa supone una interferencia sobre los efectos positivos de estas sustancias (Figura IV.58). El patrón de expresión del gen *GinGS* se asemeja al patrón de comportamiento del parámetro de %A determinado en nuestro experimento para las raíces de plantas *Sitiens* sometidas a los distintos tratamientos, y así el coeficiente de correlación lineal entre ambos parámetros fue de $r^2 = 0.95636369$.



Por tanto, en concordancia con los resultados obtenidos, podemos concluir que la ineficiencia en la formación de la Micorriza Arbuscular que presentan las plantas *Sitiens* puede ser paliada tanto por la compensación de su deficiencia en ABA, tal y como se observó en capítulos anteriores, como por la inhibiendo la síntesis de GAs. La inhibición de la síntesis de GAs provoca un incremento significativo tanto de la intensidad de la colonización como de la abundancia arbuscular, incrementando también la proporción de arbusculos funcionales. La aplicación exclusiva de GA₃ no produce efectos negativos significativos en estos mutantes *Sitiens*, debido a que en estas plantas “*per se*” la micorrización ya está demasiado afectada.

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

V.1. IMPORTANCIA DEL ÁCIDO ABSCÍSICO (ABA) EN EL PROCESO DE FORMACIÓN DE LA MICORRIZA ARBUSCULAR: MECANISMO DEPENDIENTE E INDEPENDIENTE DE LA ACCIÓN DE ETILENO

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que el ABA es necesario para una colonización sostenible de la raíz de la planta de tomate durante el establecimiento de la micorrización arbuscular (Herrera-Medina *et al.*, 2007). En este trabajo, y continuando la línea de investigación sobre el papel del ABA durante la micorrización, se ha investigado el comportamiento de diferentes mutantes deficientes en ABA en términos de sus capacidades de micorrización. Como en estudios anteriores sobre el crecimiento y desarrollo de plantas, los mutantes deficientes en la biosíntesis de ABA han sido usados como herramienta para investigar el papel del ABA durante la formación de la micorriza arbuscular. Los mutantes deficientes en ABA *Notabilis*, *Flacca* y *Sitiens* han sido intensivamente estudiados por diferentes autores y bajo diferentes situaciones fisiológicas. Tanto *Flacca* como *Sitiens* son mutantes alterados en su capacidad para convertir Xantoxina a ABA, específicamente tienen impedido el paso de la oxidación del ABA-aldehído para originar ABA (Parry *et al.*, 1988; Sindhu & Walton, 1988; Taylor *et al.*, 1988b). En contraste, las plantas mutantes *Notabilis*, que aunque tienen un defecto en la oxidación del precursor 9-cis xantofila para formar el intermediario C15 xantoxina, paso clave en la biosíntesis de ABA (Burbidge *et al.*, 1999), pueden convertir tanto xantoxina como ABA-aldehído a ABA de manera tan eficiente como el cultivar silvestre (Parry *et al.*, 1988; Sindhu & Walton, 1988; Taylor *et al.*, 1988b). Además, las plantas *Notabilis* han sido caracterizadas por su “permeabilidad”, y a diferencia de las plantas *Flacca* y *Sitiens*, pueden responder al estrés sintetizando cierta cantidad de ABA (Parry *et al.*, 1988). En nuestros experimentos, las plantas *Notabilis* tienen niveles de ABA normales en las raíces cuando fueron comparadas con las plantas de su cultivar silvestre y bajo condiciones óptimas de irrigación y en condiciones experimentales no estresantes, si bien estas plantas mantienen un exceso de etileno, como se ha descrito previamente (Sharp *et al.*, 2000). Las plantas *Sitiens* en nuestros experimentos, y en las mismas condiciones de cultivo que las plantas *Notabilis*, si mostraron niveles inferiores de ABA en las raíces en comparación con su cultivar silvestre, mostrando además, al igual que las plantas *Notabilis*, alto contenido de etileno.

El análisis comparativo de plantas mutantes de tomate deficientes en ABA, *Sitiens* y *Notabilis*, permitió detectar tanto diferencias cuantitativas como cualitativas entre ambos mutantes en el patrón de colonización de la raíz por el hongo formador de micorriza arbuscular. Los mutantes *Sitiens* mostraron una gran limitación en la colonización fúngica (tanto en la intensidad de micorrización como en la formación de arbusculos), bien correlacionada con su incapacidad en la biosíntesis de ABA. Las plantas *Notabilis*, las cuales mantienen niveles normales de ABA en raíces bajo nuestras condiciones experimentales, parecen estar menos afectadas en su capacidad de micorrización, y solamente mostraron un descenso en la intensidad de micorrización al final del periodo de colonización. La correlación entre el contenido de ABA en raíces y la limitación en la colonización fúngica, junto con el hecho que los mutantes *Notabilis* y *Sitiens* muestran un incremento similar en el contenido de etileno en raíces comparado con sus respectivos cultivares silvestres, sugiere que el ABA tiene un papel en la funcionalidad de la simbiosis que es independiente de etileno.

En todos los tiempos cosechados, las plantas *Notabilis* mostraron altos niveles de etileno en comparación con las plantas silvestres, aunque solamente en la última cosecha, a los 65 dpi, la tasa de colonización de las raíces *Notabilis* fue menor que en las raíces de las plantas silvestres. Además, a los 65 dpi, la concentración de etileno en las raíces de las plantas *Notabilis* fue significativamente menor en comparación con la registrada en la primera cosecha, a los 35 dpi. Esta aparente contradicción, descenso en la micorrización en el periodo de menor incremento en la concentración de etileno, podría ser explicada si consideramos que el etileno principalmente afecta al mantenimiento del hongo en la raíz y no al establecimiento, y que la regulación mediada por etileno podría estar relacionada con cierto grado de colonización de las raíces micorrizadas. En este caso, debería ser necesario un cierto umbral de infección para que se active la respuesta de etileno. De hecho, existen algunos indicios a favor de esta hipótesis. Así, hay evidencias experimentales de que otros fenómenos que controlan la propagación de hongos en las raíces, como el mecanismo de autorregulación de la micorrización y el fenómeno de bioprotección de la micorriza contra patógenos fúngicos radiculares están vinculadas con un cierto grado de colonización de las raíces micorrizadas (Vierheilig *et al.*, 2008).

El bloqueo en la formación de ABA tras la aplicación de tungstato resultó en una reducción de la micorrización en plantas de genotipo silvestre. Además, la aplicación de ABA restauró la micorrización en estas plantas silvestres tratadas con tungstato e incrementó la capacidad de micorrización en las plantas *Sitiens*. Estos resultados son pruebas irrefutables de la necesidad de

ABA para una correcta micorrización. Además, la acumulación de transcrito del gen *LePT4* se asoció claramente con el contenido en ABA y el desarrollo de la micorrización en raíces, pues tanto el tratamiento de tungstato en plantas silvestres como la deficiencia inherente de ABA en los mutantes *Sitiens* dan lugar a una completa abolición de su acumulación. De igual forma, el ARN ribosómico 18S de *G. irregulare*, utilizado como marcador molecular de la tasa de colonización del hongo en las raíces, también se corresponde con la tasa de colonización mostrada por estas plantas, ya que disminuye su expresión tanto en las plantas *Sitiens* como en las plantas silvestres tratadas con tungstato, en las cuales se recupera el nivel de expresión al combinarse el tratamiento de tungstato con ABA.

Al igual que en tomate, las plantas de *M. truncatula* inoculadas con *G. irregulare* disminuían su micorrización al reducir su contenido en ABA tras la aplicación de tungstato, que también producía un incremento en sus niveles de etileno. Por tanto, podemos concluir que la disminución del contenido de ABA por el tratamiento con tungstato sódico, con el consiguiente descenso en los niveles de micorrización, es un hecho generalizado en otras especies vegetales además de tomate. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría en tomate, cuando se añadía ABA junto a tungstato no se recuperaba el nivel de micorrización normal ni se disminuía el contenido de etileno, por lo que podemos sugerir que la concentración de tungstato aplicada a plantas de *M. truncatula* tuvo un efecto más acentuado, o afectó a otros enzimas dependientes de molibdeno importantes también para el control de los niveles de etileno y la micorrización.

El patrón de expresión del gen que codifica para el transportador de fosfato de tomate *LePT4* específico de la micorrización ha sido investigado previamente, y su expresión se limita exclusivamente a las células colonizadas que contienen arbusculos (Nagy *et al.*, 2005; Balestrini *et al.*, 2007), siendo por tanto un marcador genético para la funcionalidad de los arbusculos en raíces micorrizadas. Nuestros experimentos de qRT-PCR de expresión del gen *LePT4* mostraron que en plantas *Sitiens* con una proporción en arbusculos similar a la de las plantas silvestres no había expresión *LePT4*, demostrando que los arbusculos en las plantas *Sitiens* son menos funcionales que en las plantas silvestres, confirmando los resultados previos de Herrera-Medina y col. (2007). La expresión de *LePT4* estuvo asociada con el contenido de ABA en raíces y, consecuentemente, la aplicación de ABA restauró también la expresión de *LePT4* en plantas *Sitiens*. Datos previos muestran que la aplicación de ABA también restauró la actividad fúngica fosfatasa alcalina (ALP) (Herrera-Medina *et al.*, 2007). Por tanto, el gen *LePT4* y la actividad

ALP son marcadores moleculares para funcionalidad de los arbusculos, y nuestros resultados sugieren una correlación entre ambos factores y la disponibilidad de ABA en la raíz.

Un reciente análisis transcriptómico se centró en la identificación de genes de *M. truncatula* y *G. irregulare* expresados en células corticales colonizadas y ocupadas por arbusculos (Gómez et al., 2009). En dicho trabajo se identificaron varios genes fúngicos expresados en arbusculos, y entre ellos un gen que codifica para una Glutamina sintetasa (*GinGS*). Utilizando este gen en nuestros experimentos se ha observado que su comportamiento es similar al gen *LePT4*, y además su patrón de expresión se correlaciona bien con el parámetro de abundancia arbuscular en el sistema radicular (%A), tanto en plantas *Sitiens* como en plantas silvestres, y por tanto fue usado en nuestro estudio como un marcador molecular de arbusculos tan válido como el gen *LePT4*.

En plantas *Sitiens*, la expresión de *GinGS*, al igual que la expresión *LePT4* fue muy baja en comparación con la expresión en el cultivar silvestre. Sin embargo, en las plantas *Notabilis* el gen *GinGS* disminuía su expresión respecto a plantas silvestres solo en la última cosecha, mostrando un patrón similar al mostrado por el parámetro de intensidad de micorrización. Como se ha comentado anteriormente, la expresión de *GinGS* suele correlacionarse con la mayor o menor presencia de arbusculos en la raíz. Sin embargo en las plantas *Notabilis*, cuyos niveles de arbusculos fueron siempre similares a los del cultivar silvestre Ailsa Craig, se detectó una disminución de la expresión de *GinGS* en la última cosecha no asociado a disminución de arbusculos. Esta contradicción con lo mostrado en las plantas *Sitiens* podría deberse a que si bien la abundancia arbuscular en los fragmentos micorrizados no cambia en plantas *Notabilis*, si debió disminuir la abundancia total de arbusculos en el sistema radicular en esa cosecha, pues si hubo una disminución de la superficie de raíz micorrizada, y esto quedó reflejado en una disminución de la expresión de *GinGS*.

El patrón de expresión del gen *GinEF* también fue diferente en plantas *Sitiens* y *Notabilis*. En las plantas *Sitiens* tuvo una menor expresión en ambas cosechas en relación a las plantas silvestres. Diferencias que fueron de hasta seis veces menos en los niveles de expresión, corroborando la baja micorrización de *Sitiens* en relación a plantas silvestres. De igual manera en plantas *Notabilis*, donde las diferencias en los niveles de micorrización no fueron muy acusadas, tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de *GinEF*, pues nunca llegaron a ser estas diferencias mayores de 1,5 veces en el nivel de expresión. Estos

resultados sugieren que la medida de la expresión de *GinEF* es un buen marcador molecular para determinar diferencias en micorrización apreciables mediante tinción y determinación histoquímica, y no para determinar diferencias sutiles en los niveles de micorrización.

Una vez determinado y confirmado a nivel histoquímico y molecular la relación entre contenido en ABA y desarrollo de la micorrización, y por tanto el papel directo o indirecto (posiblemente vía etileno) del ABA en el proceso de colonización, se hacía necesario un estudio analítico de determinación de los niveles de ABA en la raíz de plantas micorrizadas, al objeto de conocer si la micorrización suponía una alteración en el contenido normal de ABA en la raíz. Los resultados previos descritos en la bibliografía no muestran un consenso sobre el comportamiento de los niveles de ABA en plantas micorrizadas, más aún hay cierta discrepancia, pues varios investigadores habían descrito un incremento en la concentración de ABA libre en raíz durante la micorrización (Danneberg *et al.*, 1993; Meixner *et al.*, 2005; Ludwig-Müller, 2010), y otros sin embargo no han detectado ninguna alteración (Allen *et al.*, 1982; Danneberg *et al.*, 1993; Meixner *et al.*, 2005; Ludwig-Müller, 2010). Dado que nuestros resultados apuntaban a una relación del ABA con la formación de arbusculos, nos preguntamos si las posibles alteraciones en los niveles de ABA estarían también asociadas a las zonas de la raíz donde se desarrollaban dichas estructuras. De ahí que planteáramos el análisis del contenido en ABA en un experimento de tomate con sistema de raíz compartimentalizada (“splits-roots”), para determinar si la micorrización producía un cambio tanto a nivel local (zonas colonizadas de la raíz) como sistémico (zonas de la raíz de la planta micorrizada no colonizadas).

La primera apreciación interesante derivada de nuestros resultados es que las raíces de plantas micorrizadas, tanto en la zona de la raíz colonizada como en la zona no colonizada con el hongo micorrícico, tienen un mayor contenido de ABA libre que las raíces de plantas no micorrizadas. El hecho de que encontráramos también un mayor contenido de ABA libre en el compartimento sin colonizar de las plantas micorrizadas nos hace pensar que el incremento del contenido en ABA es debido a un incremento generalizado en la raíz y no a un aporte específico en las zonas colonizadas, que en cierta medida pudiera deberse al propio hongo, pues existen evidencias de la capacidad de estos hongos para producir dicho compuesto (Esch *et al.*, 1994).

Por otro lado, nuestros resultados muestran la presencia de ABA y sus catabolitos en las distintas muestras analizadas. La presencia de esos productos del catabolismo de ABA sugiere también que el ABA fue previamente sintetizado y después metabolizado, y que ese metabolismo

fue diferente según el estatus de micorrización de la raíz. En concreto, la principal vía metabólica de ABA fue su conjugación por glucosidación, dando lugar a ABAGE, que fue el metabolito más abundante tanto en raíces de plantas micorrizadas, como no micorrizadas, aunque comparando entre ellas, la cantidad de ABAGE en raíces control no micorrizadas fue de cinco veces superior a la de plantas micorrizadas. Este hecho puede ser debido a que el ABAGE es un metabolito relacionado con el transporte de larga distancia en condiciones de estrés (Sauter *et al.*, 2002), y posiblemente la ausencia de micorriza en estas plantas hace que respondan de forma diferente al estrés que las plantas micorrizadas. Es decir, la distinta capacidad de respuesta y adaptación al estrés abiótico puede ser la causa de esta diferente acumulación de ABAGE. No obstante, con nuestros datos no podemos aventurar mucho más y sería interesante ver la distribución tisular de ABAGE en plantas micorrizadas y no micorrizadas bajo diferentes situaciones de estrés hídrico y/o salino.

En las plantas, la ruta de hidroxilación mayoritaria del ABA es la que hidroxila el carbono 8' (Nambara & Marion-Poll, 2005) dando lugar en primer lugar al ácido faséico (PA), etapa catalizada por una monooxigenasa citocromo P450, codificada por los genes *CYP707*, y cuyo nivel de transcrito es inducido por estrés abiótico, deshidratación y tratamientos de ABA exógenos (Kushiro *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2004). El PA es rápidamente reducido a DPA, que junto al ABAGE y ABA libre fue también compuesto mayoritario en todas las muestras de raíz. El hecho de que los niveles de PA fueran superiores en raíces de plantas no micorrizadas sugiere, al igual que en el caso de ABAGE, que la micorrización está provocando diferencias en el catabolismo del ABA, posiblemente debido a una capacidad distinta de adaptación al estrés. Algunos autores sugieren que el PA exhibe fuerte actividad tipo ABA (Todoroki *et al.*, 1995; Cutler *et al.*, 2000; Todoroki *et al.*, 2004), si bien otros indican que las proteínas de unión a ABA son incapaces de unirse a PA (Zhang *et al.*, 2001; Razem *et al.*, 2004), y por tanto incapaces de desencadenar la respuesta a ABA. La vía minoritaria de hidroxilación en el carbono 9', originando ácido neofaséico (neo-PA), también fue activa en las raíces, encontrándose un ligero incremento de este compuesto en las raíces no micorrizadas, lo que apoya la conclusión general de que la micorrización altera el metabolismo y disminuye la presencia de ciertos catabolitos derivados del ABA en la raíz. La vía de hidroxilación en el carbono 7' es una forma minoritaria de catabolismo de ABA en las plantas, dando lugar al 7'OH-ABA. No obstante, si bien fue el compuesto minoritario, solo pudo ser detectado en las raíces de plantas micorrizadas, mostrando un comportamiento inverso al de otros catabolitos como PA o neo-PA que fueron más abundantes en raíces de plantas no micorrizadas. Este hecho diferencial puede ser importante,

pues si bien varios estudios han mostrado que este compuesto es biológicamente inactivo, también se ha observado que en semillas de cebada el 7'OH-ABA inhibe la acción de giberelinas (GAs), aunque con menor efectividad que el ABA (Hill *et al.*, 1995). Como veremos más adelante, la relación ABA/GAs es de gran importancia en el desarrollo de la micorrización, y existe una relación antagonista entre estos dos compuestos que afecta a muchos procesos fisiológicos. En concreto, la aplicación exógena de GA₃ en semillas de lechuga produce un incremento del catabolismo de ABA, produciendo un mayor contenido de PA y DPA (Gonai *et al.*, 2004). Por tanto, la alteración en el catabolismo de ABA debido a la micorrización observada en nuestros experimentos podría estar también relacionada con una alteración del balance ABA/GAs en la raíz. En conclusión, la micorriza también influye en el metabolismo del ABA tanto en su contenido como ABA libre como en los tipos de metabolitos de ABA en la planta.

Según nuestros resultados, el ABA es importante para una correcta colonización de la planta, tanto para la formación de los arbusculos como para la colonización de la raíz, pero también tenemos indicios de que el papel desempeñado por el ABA en la formación de la micorrización arbuscular podría, al menos en parte, atribuirse a la interacción antagonica con etileno. Por tanto, es necesario determinar si los parámetros que indican el impacto negativo de la micorrización causada por deficiencia de ABA se vieron afectadas por la disminución de ABA o por la acumulación de etileno asociado con la deficiencia de ABA.

Para responder a esta pregunta, se utilizaron dos estrategias alternativas: analizar los efectos sobre el patrón de micorrización como resultado de la inhibición de la biosíntesis de ABA en plantas de tomate transgénicas con la ruta de etileno alterada; y comparar los efectos sobre la micorrización entre plantas *Sitiens* tratadas con el inhibidor de la biosíntesis de etileno, AVG, solo y/o combinado con aplicaciones de ABA. Se utilizaron dos tipos diferentes de líneas de tomate transgénicas con las rutas de etileno alteradas: 1), la línea de plantas que expresan ACCD con incapacidad en la síntesis de etileno (Klee *et al.*, 1991); y 2), las líneas NRO, ETR4-AS y ETR6-AS correspondientes a plantas cuya percepción a etileno está afectada por las alteraciones en la expresión de receptores de etileno (Ciardi *et al.*, 2000; Tieman *et al.*, 2000; Kevany *et al.*, 2008).

Las plantas transgénicas que expresan la 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (plantas ACCD) están sujetas a un déficit en la síntesis de etileno como resultado del catabolismo de su precursor inmediato, ACC, por la acción de la desaminasa bacteriana ACC, cuyo gen fue

clonado e introducido en plantas de tomate (Klee *et al.*, 1991). Se utilizó esta línea de plantas de tomate transgénicas para analizar por separado el efecto tanto de ABA como de etileno. Las plantas ACCD, con un menor contenido de etileno en sus raíces, no mostraron alteración en la capacidad de micorrización. Estas plantas también respondieron a la aplicación de tungstato de una manera similar a sus plantas silvestres UC82B, registrando una reducción de casi un 40% en el contenido de ABA en las raíces. La disminución de la síntesis de etileno en las plantas transgénicas ACCD no causa aparentes anomalías fenotípicas vegetativas, y sólo se han observado algunos retrasos en la maduración del fruto (Klee *et al.*, 1991).

En nuestros experimentos, la aplicación de tungstato alteró selectivamente los parámetros de micorrización de acuerdo con el fenotipo de la planta estudiada. En plantas ACCD, sólo el porcentaje de arbuscúlos en las raíces micorrizadas (%a) se afectó, mientras que en plantas de tipo silvestre UC82B, la aplicación de tungstato afectó a todos los parámetros de micorrización. Los datos histoquímicos se correlacionaron con los resultados de acumulación de transcritos de *GinGS* y *GinEF*. Así, el patrón de acumulación de transcritos para *GinGS* fue paralelo con los datos sobre la abundancia arbuscular (%a, %A) en las raíces micorrizadas. Al igual que estos parámetros, la expresión del gen *GinGS* disminuye tanto en las plantas de tipo silvestre como en plantas ACCD después de la aplicación de tungstato. Por otro lado, el patrón de expresión de *GinEF* se correlacionó estrechamente con los datos de intensidad de micorrización (%M) y su expresión disminuyó solamente en plantas de tipo silvestre después de la aplicación de tungstato.

La reducción en los parámetros de micorrización en las plantas UC82B estuvo asociada con los efectos del menor contenido en ABA y mayor producción de etileno en las raíces, mientras que la reducción en la abundancia arbuscular (%a) observada en las plantas ACCD fue causada principalmente por la disminución en la biosíntesis de ABA pues el tungstato no causa cambios significativos en la producción de etileno ya que estas plantas tienen limitada “per se” dicha producción. En contraste con las plantas silvestre UC82B, no se detectaron cambios en la expresión de los receptores de etileno de tomate *ETR4* o *ETR6* después de la aplicación de tungstato en las plantas ACCD. Estos genes son inducibles por etileno (Kevany *et al.*, 2008), y la ausencia de un incremento en la expresión de estos genes confirma que la respuesta de etileno en plantas ACCD después de la aplicación de tungstato fue ineficaz.

Nuestros resultados revelan que la reducción en la colonización de las raíces por aplicación de tungstato se correlaciona con el aumento de la sensibilidad de las plantas a etileno. Las plantas

NRO, con mayor insensibilidad a etileno como resultado de la sobreexpresión del gen *LeETR3* que codifica para el receptor NR (Ciardi *et al.*, 2000), no estuvieron afectadas por la aplicación de tungstato respecto al porcentaje de intensidad de micorrización de la colonización. Este resultado se correlaciona bien con el hallazgo de que la expresión del gen *GinEF* se mantuvo sin cambios en las raíces micorrizadas de plantas NRO después de la aplicación de tungstato. A la inversa, plantas ETR4-AS y ETR6-AS, con una mayor sensibilidad al etileno como resultado de la inactivación del ARNm *ETR4* y *ETR6* por la sobreexpresión del ARNm antisentido, respectivamente (Tieman *et al.*, 2000; Kevany *et al.*, 2008), se afectaron más en los parámetros de intensidad de micorrización (% M, % m). En estas plantas, además, se disminuyeron los niveles de expresión del gen *GinEF* cuando el tungstato se aplicó, ya sea solo o en combinación con ABA. La reducción en los niveles de ARNm de *LeETR4* y *LeETR6* en las líneas ETR4-AS y ETR6-AS produce fenotipos de maduración temprana que son coherentes con una respuesta de etileno constitutiva (Tieman *et al.*, 2000; Kevany *et al.*, 2008). Nuestros resultados muestran claramente que el efecto de esta reducción en la intensidad de la micorrización en raíces colonizadas, causada por la aplicación de tungstato, está mediado por la vía del etileno. Este resultado está en consonancia con los datos publicados en mutantes *epinastic* (*epi*) que producen mayor cantidad de etileno y tienen la colonización intraradical por *Glomus clarum* altamente inhibida en comparación con el control Micro-Tom (Zsögön *et al.*, 2008).

Por el contrario, la presencia de tungstato disminuyó la abundancia arbuscular en las zonas de las raíces micorrizadas (%a) independientemente de la sensibilidad de la planta al etileno. En este sentido, la reducción en la expresión de genes *GinGS*, un marcador para la presencia de arbuscúlos en las raíces, se observó en todas las variedades de plantas tratadas con tungstato. Los datos de expresión de *GinGS* se correlacionaron con el parámetro de la abundancia de arbuscúlos en el total de la raíz micorrizada (% A), ya que ambos representan los valores de todo el sistema radical. A diferencia del proceso observado para la intensidad de la colonización en las raíces, los resultados muestran claramente que el efecto de la reducción en la abundancia arbuscular en las zonas micorrizadas de las raíces (%a) como consecuencia de la aplicación de tungstato no está mediada por la ruta del etileno.

Nuestros resultados indican que el ABA afecta positivamente a la formación de los arbuscúlos (medido como %a), mientras que el etileno regula principalmente la tasa de colonización (medida como intensidad de micorrización). Para confirmar esta hipótesis se determinó la capacidad tanto del ABA como de un inhibidor de la síntesis de etileno para

rescatar todos los parámetros de micorrización en las plantas *Sitiens*, cuando estas son inoculadas tanto con el hongo micorrícico *G. irregulare*, que utilizamos en todos nuestros experimentos, como por el hongo micorrícico *G. mosseae*. Hemos demostrado claramente aquí que el rescate en los parámetros de micorrización en plantas *Sitiens* depende del compuesto aplicado. Así, los datos muestran un aumento significativo en el desarrollo de la intensidad de la micorrización asociado con la inhibición de la biosíntesis de etileno resultante del tratamiento con AVG (solo o en combinación con ABA), mientras que se rescata la abundancia arbuscular en las raíces *Sitiens* micorrizadas cuando el ABA está presente.

En trabajos anteriores, la mayor tasa de recuperación para la actividad fúngica ALP en los mutante *Sitiens* ocurrió después de las aplicaciones de ABA, pero no con las aplicaciones de tiosulfato de plata, un bloqueador de la percepción de etileno, lo que sugiere que el ABA puede tener un papel adicional en la funcionalidad arbuscular aparte de su función como inhibidor de la producción de etileno (Herrera-Medina *et al.*, 2007). Los resultados mostrados en este estudio están en línea con los datos anteriores, que confirman que las aplicaciones de ABA restauraron la actividad ALP (asociada principalmente con arbusculos) en las raíces de plantas *Sitiens*, aunque no la propagación del hongo, medida como intensidad de micorrización. En nuestros experimentos, tanto con *G. irregulare* como con *G. mosseae*, se observó un aumento similar en el desarrollo de la intensidad de micorrización asociado con la inhibición de la biosíntesis de etileno causada por el tratamiento con AVG. También se evidenció en ambos casos que la abundancia arbuscular en raíces de plantas *Sitiens* micorrizadas fue rescatada cuando el ABA estaba presente. Por tanto, es evidente que, en las raíces de plantas *Sitiens* micorrizadas por el hongo, la aplicación exógenamente de ABA restaura la formación de arbusculos y su capacidad funcional, medida por la actividad ALP (Herrera-Medina *et al.*, 2007), o en términos de rescate en abundancia arbuscular (%a), como se muestra en el presente estudio.

Al igual que en experimentos anteriores, los datos histoquímicos están avalados con la acumulación de transcritos de los genes fúngicos *GinGS* y *GinEF*. Así, el gen *GinGS* expresado principalmente en los arbusculos (Gomez *et al.*, 2009), muestra un patrón de expresión similar al patrón de acumulación de arbusculos totales en las raíces micorrizadas (%A), ya que incrementa su expresión tanto aplicando solo AVG o ABA, y presenta un efecto acumulativo en la expresión con la aplicación conjunta de ambos compuestos. Por tanto, la acumulación de transcrito del gen *GinGS*, al igual que el parámetro de %A, se incrementa cuanto más disminuimos el contenido de etileno y aumentamos el de ABA. Por el contrario, el gen *GinEF*, al igual que la intensidad de

micorrización (%M), solamente incrementa cuando disminuimos la concentración de etileno en las plantas aplicando AVG ya sea solo o con ABA.

Los valores para la producción de etileno en las raíces demuestran que el AVG, aplicado solo y en combinación con ABA, redujo la producción de etileno en plantas *Sitiens* a cantidades similares a las registradas por las plantas silvestres, mientras que la aplicación de ABA no fue muy efectiva en reducir significativamente la cantidad de etileno en las plantas *Sitiens*, posiblemente debido a que solamente se realizaron dos aplicaciones puntuales de ABA en la segunda y cuarta semana después de ser inoculadas las plantas. Cuando el ABA fue aplicado exógenamente a las plantas *Sitiens* se observó un rescate completo de abundancia arbuscular, mientras que la aplicación de AVG no produjo una recuperación total de la intensidad de micorrización aunque estas plantas redujeran sus niveles de etileno a niveles similares de las plantas silvestres. Esto significa una respuesta diferencial a concentraciones de etileno similares en plantas de tipo silvestre y *Sitiens* que podría ser resultado de su diferente sensibilidad a etileno. El efecto de la reducción de la concentración de etileno como resultado de la aplicación exógena de AVG a la planta mutante puede no haber sido suficiente para restaurar todas las deficiencias fisiológicas causadas por la mutación que afecta a la colonización del hongo formador de micorriza arbuscular.

Concluyendo, este estudio muestra un doble mecanismo dependiente e independiente de etileno asociado con la regulación por ABA de la formación de la micorrización arbuscular. El ABA es necesario para la formación de los arbusculos, lo que indica que la deficiencia de ABA tiene un efecto negativo directo sobre el porcentaje de arbusculos en las raíces micorrizadas. Así, la aplicación de ABA a las raíces *Sitiens* micorrizadas condujo a una recuperación de la capacidad de formar arbusculos. También la deficiencia de ABA aumenta el contenido de etileno, que funciona como un regulador negativo de la intensidad de micorrización, limitando por tanto también el desarrollo del hongo en la raíz. Nuestros resultados están en consonancia con datos de estudios anteriores, donde la aplicación exógena de etileno restringía la propagación del hongo micorrícico a lo largo de la longitud del eje de la raíz, pero su movimiento hacia la corteza interior, donde los arbusculos se forman, no estaba impedido (Geil *et al.*, 2001). Además, se ha sugerido que el etileno actúa como regulador negativo en las primeras fases de la interacción simbiótica de *M. truncatula* con hongos micorrícicos (Penmetsa *et al.*, 2008), o en eventos tempranos de la nodulación de plantas leguminosas (Sugawara *et al.*, 2006), lo que estaría en consonancia con nuestros resultados.

V.2. IMPORTANCIA DE LAS GIBERELINAS EN EL PROCESO DE FORMACIÓN DE LA SIMBIOSIS MICORRIZA ARBUSCULAR Y SU INTERACCIÓN CON EL ÁCIDO ABSCÍSICO.

Existen pocos datos sobre el posible papel de la Giberelinas (GAs) en el desarrollo de la simbiosis MA, si bien es cierto que las GAs actúan mediando interacciones simbióticas planta-microorganismos, como en el caso de la nodulación, donde son esenciales en estadios más tardíos de elongación y expansión del desarrollo de los nódulos (Ferguson *et al.*, 2011). Por tanto, y debido a la superposición en la señalización entre la simbiosis con *Rhizobium* y la formación de micorrizas arbusculares (Parniske, 2000), es lógico pensar que las GAs también estén involucradas en la micorrización. Tan solo un estudio previo al presentado aquí describe un efecto negativo de la aplicación de GAs sobre la formación de arbusculos en raíces de guisante micorrizadas (El Ghachtouli *et al.*, 1996). En cuanto a la determinación de contenido de GAs en raíz micorrizada, solo hay una referencia en plantas de tabaco donde se ha observado que las GAs activas de la ruta biosintética de la 13-hidroxiación (GA_1 , GA_8 , GA_{19} y GA_{20}) son más abundantes en la raíz de plantas micorrizadas (Shaul-Keinan *et al.*, 2002).

Con el objetivo de determinar la importancia de las GAs en el establecimiento de la micorrización y su funcionamiento, hemos utilizado tres aproximaciones experimentales bien diferenciadas: 1) análisis de los efectos de la micorrización sobre el patrón de expresión de los genes más relevantes en el metabolismo de GAs en diferentes etapas de la micorrización; 2) análisis del efecto sobre el patrón de micorrización tanto de la aplicación exógena de GA_3 como de un inhibidor de GAs; y 3) el análisis de las alteraciones en el patrón de micorrización de plantas de tomate mutantes y/o transgénicas con la ruta de biosíntesis o señalización de GAs alterada. En este último caso se utilizaron dos tipos diferentes de líneas de tomate con la ruta de GAs alterada: la línea de plantas de tomate transgénicas con sobre-expresión del gen *giberelina-20-oxidasa 1* de cítricos (*CcGA20ox1*) cv Micro-Tom, por lo cual sintetizan más GAs (García-Hurtado *et al.*, 2012), y la línea de plantas mutantes *Procera*, que corresponde a plantas cuyo fenotipo resulta en una respuesta constitutiva a GAs, ya que contienen una mutación en el gen *LeGAI* de la proteína DELLA, que es un regulador negativo de la respuesta de GAs (Bassel *et al.*, 2008).

El estudio de la expresión de los genes del metabolismo de GAs se realizó en plantas silvestres inoculadas y no inoculadas con el hongo micorrícico *G. irregulare*, y cosechadas en

tres etapas bien diferenciadas de micorrización. En una primera etapa la intensidad de micorrización y el porcentaje de arbusculos eran escasos y había solo fragmentos de raíz donde se estaba iniciando la penetración del hongo. En la segunda etapa, las plantas cosechadas presentaban una mayor intensidad de micorrización y mayor contenido de arbusculos, siendo estos más desarrollados y funcionales, y encontrándose la micorrización en su fase exponencial de desarrollo. Y por último, en la última etapa, las plantas habían llegado al máximo de intensidad de micorrización y las raíces presentaban numerosas vesículas y arbusculos en estado de senescencia.

En general, los genes de biosíntesis de GAs estudiados muestran una mayor expresión en las raíces de plantas micorrizadas, y aunque con ligeras diferencias, su patrón de expresión apunta a un incremento en la acumulación de transcrito conforme se incrementa el porcentaje de la micorrización y el contenido de arbusculos en la planta, ya que los tres genes claves en la ruta de biosíntesis de GAs en la planta (*CPS*, *GA3ox1* y *GA20ox1*) tienen una mayor expresión en etapas avanzadas de la micorrización. Destacar que nuestros resultados muestran por primera vez una expresión considerable de los genes de biosíntesis de GAs en raíz, pues en estudios anteriores solamente se había detectado en raíces de tomate el gen *GA3ox1* (Serrani *et al.*, 2007a), posiblemente debido a que los estudios de la expresión de los genes del metabolismo de GAs se habían realizado hasta momento en raíces de plantas sin micorrizar, donde la expresión es baja.

De forma contraria, el patrón de expresión de genes de catabolismo de GAs es diferente y mucho más heterogéneo al de genes de biosíntesis, ya que en líneas generales o no hay diferencias o hay una mayor expresión en las raíces de las plantas no micorrizadas, salvo excepciones puntuales donde se observan incrementos de expresión en plantas micorrizadas. También se detectaron cambios significativos en la expresión del gen *GAI* que codifica para la proteína DELLA, y que actúa como regulador negativo de la respuesta a GAs (Harberd, 2003). En este caso, el gen muestra un incremento de expresión en plantas micorrizadas conforme la micorrización avanza. Por su parte, el gen efector de GAs, *GAST1*, mostró un patrón totalmente diferente al presentado por la mayoría de los genes de biosíntesis y catabolismo, con un pico de expresión en las plantas micorrizadas en la primera cosecha.

En función de los resultados de nuestro estudio, se podría concluir que de la activación de la expresión de genes del metabolismo de GAs, y de respuesta a GAs, tales como *GAI*, sugiere una función relevante de las GAs en el proceso de micorrización. Teniendo en cuenta que los genes

de biosíntesis de GAs, tales como *GA20ox* y *GA3ox* están regulados mediante un mecanismo de retroalimentación negativa por producto final, mientras que los genes *GA2ox* están regulados positivamente por producto final (Yamaguchi & Kamiya, 2000), se puede sugerir que la concentración de GAs disminuye conforme aumenta la colonización fúngica. No obstante, esta hipótesis es muy aventurada y debería ser confirmada con un estudio analítico del contenido de GAs en las raíces de plantas micorrizadas y no micorrizadas en sus diferentes etapas de colonización. Dicho estudio no ha sido posible durante el desarrollo de este trabajo de Tesis, pues todas las tentativas por determinar la concentración de GAs en la raíz de las plantas cultivadas en nuestros ensayos han sido infructuosas ya que los niveles de concentración de GAs en la raíz de tomate han estado siempre por debajo de los límites de detección de los métodos empleados, y todo apunta a que necesitamos implementar una metodología más sensible de determinación. Como única referencia del contenido de GAs en las raíces micorrizadas existe un estudio que atribuye un mayor contenido en GAs en las raíces de tabaco de plantas micorrizadas (Shaul-Keinan *et al.*, 2002). En este sentido, los resultados obtenidos en nuestro trabajo acerca de la expresión del gen *GAI* si sugerirían un mayor contenido de GAs en las raíces con micorrización más avanzada, pues sobre este gen las GAs ejercen un feedback positivo sobre la acumulación de mensajeros (Gallego-Giraldo, 2008; Carrera *et al.*, 2012) debido a la degradación de la proteína en respuesta al incremento de los niveles endógenos de GAs (Hare *et al.*, 2003).

También resulta interesante comparar nuestros resultados de expresión de genes del metabolismo de GAs durante la micorrización de plantas de tomate con los resultados de un reciente estudio de análisis transcriptómico en plantas micorrizadas de *M. truncatula*. En el trabajo con *M. truncatula* se obtienen datos que sugieren una activación de la expresión de ciertos genes de biosíntesis de GAs en estadios iniciales de la micorrización, y los autores relacionan dicha activación como parte de una respuesta de la planta a señales presimbióticas producidas por el hongo (Ortu *et al.*, 2012). En consecuencia, y tal y como se discutirá más adelante, no solo parece haber una participación de GAs en etapas de formación de arbusculos, sino también en etapas iniciales de la interacción.

La segunda estrategia seguida en nuestra investigación sobre el papel de GAs durante la micorrización consistió en un análisis del efecto que sobre la micorrización producía la acumulación o disminución del contenido de GAs en la raíz. Para ello se realizaron aplicaciones de GA₃, y aunque la utilización de GAs produce un incremento del crecimiento del tallo y el espacio entre los entrenudos (Azcón-Bieto & Talón, 2000), este fenotipo solamente se observó

bajo nuestras condiciones experimentales aplicando concentraciones altas de $10\mu\text{M}$ de GA_3 . Aplicando estas concentraciones altas se observaron descensos significativos tanto en la frecuencia de micorrización en etapas más tempranas de la micorrización, como en la proporción de arbusculos en la raíz en etapas tempranas y tardías de la simbiosis. La aplicación de dosis más bajas de GA_3 provocó claramente un descenso tanto del número de arbusculos en la planta como de la actividad ALP, directamente proporcional a la concentración de GA_3 aplicada a las raíces de las plantas, siendo esta reducción más acusada en etapas finales de la micorrización. Este descenso en el porcentaje de arbusculos en el total de la raíz (%A) en las etapas finales de la micorrización se correlacionó perfectamente con la expresión presentada por el gen *GinGS*, expresado en las hifas arbusculares del hongo. Por tanto, puede ocurrir que en las primeras etapas el GA_3 afecte negativamente a la penetración del hongo, pero una vez ha entrado no le impide crecer en la raíz, aunque restringe la capacidad de formar los arbusculos, impidiendo por tanto una correcta funcionalidad en el intercambio de nutrientes entre ambos simbiosis. En este sentido, y tal y como se ha comentado anteriormente, Ortu y col. (2012) han puesto de manifiesto la activación de genes de biosíntesis de GAs en etapas tempranas de la interacción hongo-*M. truncatula*, y cuya expresión responde a señales originadas en el hongo.

A diferencia y de manera inversa a la aplicación de GA_3 , la aplicación del inhibidor PrCa produce un incremento de la micorrización y de la actividad ALP, tanto en etapas iniciales como finales de la micorrización. La utilización del inhibidor de GAs en la planta provoca una reducción del crecimiento del tallo (enanismo) y más ramificación, tanto la parte aérea como de las raíces (Azcón-Bieto & Talón, 2000). Este fenotipo, característico de bajas concentraciones de GAs en la planta, se empieza a detectar en nuestros experimentos a partir de concentraciones de $50\mu\text{M}$ de PrCa, aunque fue a $100\mu\text{M}$ de PrCa cuando los efectos eran más acusados. Los parámetros de la eficiencia fúngica, cuantificados tanto por la actividad ALP como por el contenido de arbusculos, tienen un comportamiento muy parecido a otros parámetros de colonización, ya que en la primera etapa de la micorrización incrementan a partir de la concentración de $50\mu\text{M}$ de PrCa, mientras que en etapas más avanzadas de la micorrización el incremento es proporcional a la concentración aplicada. Estos resultados histoquímicos se comprobaron con los marcadores moleculares, tanto de la colonización fúngica como de la cantidad de arbusculos funcionales, observándose una correlación entre los valores de los parámetros histoquímicos y de expresión de los genes *GinEF* y *GinGS*.

Está claro, por tanto, que el balance de GAs en la raíz afecta el estatus de micorrización, especialmente la proporción de arbusculos, que decrece tras aplicación de GA₃ y se incrementa cuando se aplica el inhibidor PrCa. Este efecto de reducción/incremento de la abundancia arbuscular es dosis dependiente y confirma las observaciones de El Ghachtouli et al. (1996) en relación a plantas de guisante tratadas con diferentes dosis de GAs, y por tanto sugiere un papel generalizado y directo de las GAs en el proceso de micorrización.

Para comprobar y determinar que efectivamente las GAs influyen negativamente en el desarrollo correcto de la micorrización, especialmente de los arbusculos, se realizaron estudios de micorrización en plantas con un mayor contenido en GAs. Concretamente usamos la línea de plantas de tomate transgénicas con sobreexpresión del gen *GA20ox1* de cítricos (plantas *CcGA20ox1*), que mantienen un alto contenido de GAs (García-Hurtado et al., 2012). El incremento de la síntesis de GAs en las plantas transgénicas *CcGA20ox1* causa algunas aparentes anomalías fenotípicas, similares a diversas especies de plantas que también sobreexpresan otras *GA20ox* (Eriksson et al., 2000; Vidal et al., 2001; Phillips, 2010), como hipocótilos y raíces más largos, y plantas más altas con entrenudos más largos y finos (García-Hurtado et al., 2012), además de observarse hojas sin bordes dentados, efecto típico de plantas tratadas con GA₃ (Martí et al., 2006; García-Hurtado et al., 2012). Bajo nuestras condiciones experimentales también se observó un incremento del tallo y entrenudos más largos, aunque ese incremento en la longitud del tallo no se materializó en un incremento en el peso fresco de la parte aérea. Las raíces si ven reducido su peso fresco en estas plantas transgénicas. En nuestros experimentos, durante la etapa intermedia de la curva de colonización, en la fase exponencial de micorrización, es donde se encontraron las mayores diferencias entre plantas de fenotipo normal y transgénicas *CcGA20ox1*, ya que en estas últimas disminuyen tanto los parámetros de colonización (micorrización, frecuencia e intensidad de micorrización) como de eficiencia fúngica (fosfatasa alcalina, arbusculos en los fragmentos micorrizados y arbusculos en el total de la raíz). En la etapa final de la micorrización los valores tanto de colonización como de eficiencia fúngica en las raíces de plantas *CcGA20ox1* son similares a los registrados por las plantas Micro-Tom. Estos resultados confirman la afectación negativa sobre la micorrización de las GAs, si bien los efectos observados en las plantas transgénicas son transitorios y están más diluidos que en los experimentos de aplicación exógena de GA₃, donde la presión de la acción de GAs es constante y mantenida.

También estudiamos la micorrización en plantas *Procera*, que tienen mutada la región GRAS del gen *SIDELLA*, un represor de la señalización de GAs y por tanto presentan un fenotipo de respuesta de GAs bien caracterizado (Bassel *et al.*, 2008). Estas plantas *Procera* mimetizan el efecto de plantas silvestres de tomate tratadas con GAs, ya que ambas son elongadas e incrementa el número de internudos, con hojas más delgadas, y reducción de lóbulos de las hojas principales (Jones, 1987). Los mutantes *Procera* también copian el fenotipo de las plantas tratadas con GAs a nivel celular en términos de disminución de la actividad peroxidasa (Jupe & Scott, 1992) y la respuesta a fusicoccina (Woodhead *et al.*, 1997). Además, al igual que se da en otros mutantes de respuesta constitutiva a GAs, el mutante *Procera* contiene concentraciones reducidas de GAs a pesar de su constante respuesta a esta hormona (Jupe *et al.*, 1988; Van Tuinen *et al.*, 1999). En nuestros experimentos, el patrón de micorrización de plantas *Procera* muestra una dinámica de colonización típica, aunque con valores por debajo de los encontrados en las plantas silvestres. De acuerdo a su fenotipo que recuerda a plantas tratadas con GAs, los mutantes *Procera* disminuyeron todos sus parámetros de micorrización, tanto de colonización como de eficiencia fúngica a partir de la etapa intermedia de la micorrización, siendo el parámetro de abundancia arbuscular el más dependiente del efecto genotipo, lo que sugiere su relación con la ruta de señalización de GAs. Además, este resultado se correlaciona bien con el hallazgo de que la expresión del gen *GinEF* y *GinGS* se mantuvo con igual expresión que en las plantas silvestres en la primera etapa de la micorrización, y disminuyó bastante en la etapa intermedia y final de la micorrización.

Parece demostrado pues que un alto contenido de GAs en la planta, ya sea bien por aporte exógeno de GA₃, por un incremento en su biosíntesis en plantas transgénicas *CcGA20oxidasa*, o por la activación sistémica de la respuesta a GAs en plantas mutantes *Procera*, inhibe la formación de arbusculos en las raíces de plantas de tomate inoculadas con el hongo micorrícico *G. irregulare*, además de presentar una menor frecuencia de raíces micorrizadas. Por el contrario, la inhibición de la síntesis de GAs por la aplicación exógena de PrCa, conduce a un mayor contenido de arbusculos y a una aceleración en la micorrización en raíces de plantas de tomate. En conclusión, nuestros resultados sugieren un papel regulador de las GAs durante la micorrización, con una incidencia negativa de los incrementos en la concentración de GAs sobre la frecuencia de micorrización y más claramente sobre el desarrollo de los arbusculos.

No obstante, las hormonas vegetales actúan normalmente en combinación, y el balance hormonal es crucial para el desarrollo de respuestas fisiológicas en la planta. En este sentido,

distintos trabajos han mostrado que las GAs interactúan con el ABA de manera antagónica en multitud de procesos de desarrollo vegetal. Así, por ejemplo, varias investigaciones han demostrado que en diferentes especies de plantas y bajo condiciones de estrés hídrico se incrementan los niveles de ABA y disminuyen los de GAs, los cuales están involucrados en la tasa de transpiración, agua e flujo de iones (Figueiredo *et al.*, 2008; Ilyas & Bano, 2010; Ilyas & Bano, 2010; Son *et al.*, 2010; Majeed *et al.*, 2011). Además, usando un inhibidor de GAs (uniconazol) se induce la tolerancia al estrés por déficit de agua en plantas de soja (Zhang *et al.*, 2007).

En este contexto nosotros estudiamos la relación entre ABA y GAs durante el desarrollo de la micorrización en tomate, con la hipótesis de partida de una posible interacción antagonista. Para dilucidar esta hipótesis se hicieron tres tipos de experimentos bien diferenciados. En el primer grupo se analizó el efecto sobre la micorrización de la aplicación separada y conjunta de ABA y GA₃ en plantas de genotipo silvestre Moneymaker. En segundo lugar se determinó el efecto sobre la micorrización del ABA y del inhibidor de GAs, PrCa, en líneas de plantas mutantes *Procera*, que exhiben una respuesta constitutiva a GAs (Bassel *et al.*, 2008). Y por último, se compararon los efectos sobre la micorrización en plantas *Sitiens* deficientes en ABA (Taylor *et al.*, 1988b) tratadas con ABA, GAs y el inhibidor de GAs, aplicados por separado o en forma combinada.

Como en experimentos anteriores, la aplicación de GA₃ a plantas Moneymaker produce una reducción en el contenido de arbusculos (%a y %A, y expresión del gen *LePT4*). La aplicación de GA₃ estuvo asociada a un incremento de la respuesta a GAs, ya que aumentó la acumulación de transcrito del gen efector de GAs en tomate, *GASTI* (Shi & Olszewski, 1998a). De manera interesante se observó que el porcentaje de arbusculos se recuperó parcialmente cuando se aplica GA₃ conjuntamente con ABA, lo que significa que el ABA interfiere en la acción negativa del GA₃ sobre los arbusculos, y por tanto se evidencia una interacción antagonista entre ambas hormonas. Pero además, se pudo comprobar una acción directa del GA₃ aplicado sobre la capacidad de acumulación de ABA en la raíz, de tal forma que las plantas tratadas con ABA + GA₃ no fueron capaces de acumular ABA libre en la raíz en igual concentración que las plantas solo tratadas con ABA, lo que sugiere que la presencia de altas concentraciones de GA₃ desvían el metabolismo del ABA hacia formas distintas al ABA libre, que podrían ser las encargadas de tamponar el efecto negativo de las GAs. Este hecho se ha observado, por ejemplo, en semillas de lechuga donde la presencia de GAs acelera la formación de PA y DPA (Gonai *et al.*, 2004). No

obstante, el ABA aplicado con GA₃ si bien no se acumuló en la raíz como ABA libre, si fue suficiente para generar una recuperación en la formación de arbusculos. Por tanto, el efecto positivo del ABA sobre los arbusculos no se debe a un acumulo en forma de ABA libre, y así plantas tratadas únicamente con ABA aunque dupliquen su contenido en ABA no incrementan su porcentaje de arbusculos respecto a plantas en condición control.

Por otra parte, la aplicación de ABA en los mutantes *Procera* supuso un incremento del parámetro de %a, que alcanzó los valores registrados por las plantas silvestres, lo que hace pensar que un mayor contenido de ABA compensa el efecto negativo sobre la formación de arbusculos ocasionado por la activación de la ruta de señalización de la respuesta a GAs en estas plantas mutantes. Sin embargo, en estos mutantes *Procera* la aplicación de PrCa no produjo un incremento tan acusado del %a como en plantas silvestres, posiblemente porque en este mutante la cantidad de GAs es baja (Jupe *et al.*, 1988; Van Tuinen *et al.*, 1999), y por tanto su reducción por aplicación del inhibidor no es tan acusada como en plantas silvestres. Además, el efecto de activación de la señalización de GAs en mutantes *Procera* no es por un exceso en su contenido sino por una activación constitutiva de la respuesta a esta hormona, y por tanto aunque disminuya la concentración de GAs por aplicación de PrCa, la activación de la respuesta a GAs sigue siendo efectiva.

Los resultados de aplicación de ABA en combinación con GA₃ o aplicación de ABA a mutantes *Procera* sugieren que el ABA regula positivamente la formación de los arbusculos y las GAs negativamente. Por tanto y para confirmar esta hipótesis de regulación de la formación de arbusculos mediante un balance del contenido de estas dos hormonas, se determinó como afectaban las GAs al desarrollo de micorrización en plantas mutantes *Sitiens*, deficientes en ABA, en las cuáles dicha deficiencia provoca directamente una reducción de su contenido en arbusculos, e indirectamente, al aumentar su contenido en etileno, una disminución de la propagación del hongo en la raíz.

Los resultados obtenidos muestran claramente que los efectos de recuperación de la micorrización en las plantas *Sitiens* son similares tras la aplicación de ABA o PrCa. Esto indicaría que hay una relación antagonista del ABA y las GAs durante la micorrización, pues el mismo efecto de incremento de la proporción de arbusculos se obtiene añadiendo ABA a los mutantes deficientes, como inhibiendo la síntesis de GAs en dichos mutantes. Además, la aplicación de GA₃ junto a ABA o PrCa atenúa ese efecto de recuperación, lo que demuestra que

la incapacidad de formar arbusculos en plantas *Sitiens* está relacionada con el balance ABA/GAs en la raíz. Nuestros resultados sobre la recuperación de la morfología típica de los arbusculos y el incremento de la expresión del gen *GinGS* en plantas *Sitiens* tratadas con diferentes compuestos confirman que tanto el ABA como el PrCa tienen el mismo impacto positivo sobre la recuperación de los arbusculos en las raíces micorrizadas de las plantas deficientes en ABA. Así, se observó además una fuerte correlación lineal entre el parámetro de abundancia arbuscular en las raíces micorrizadas (%A), el porcentaje de arbusculos muy ramificados con intensa tinción y las mediciones de la expresión del gen *GinGS*.

Además, igual que ocurre en las plantas de fenotipo silvestre, la aplicación de PrCa a plantas *Sitiens* tuvo un efecto positivo sobre la frecuencia de micorrización y la aplicación de GA₃ redujo este parámetro. Este hecho confirma que las GAs tienen un papel durante las etapas iniciales de micorrización, complementario a su papel sobre la formación de arbusculos. Curiosamente, la aplicación de ABA no tuvo ese efecto positivo sobre la frecuencia determinado para PrCa, lo que significa que el efecto negativo de las GAs sobre la frecuencia de micorrización, al contrario de lo que ocurre con la abundancia arbuscular, no está relacionado con los niveles de ABA en la raíz.

También la aplicación de ABA y PrCa tuvo efectos positivos sobre la intensidad de micorrización, que no se eliminaron cuando se aplicó GA₃ junto a estos compuestos. Este hecho puede explicarse por la relación inversa entre el parámetro de intensidad de micorrización y la concentración de etileno. El PrCa es un inhibidor de enzimas dependientes de ácido ascórbico/ácido oxoglutarico que incluye enzimas de la síntesis de GAs, pero también de la síntesis de etileno (Rademacher et al., 2006), y la aplicación de ABA reduce la producción de etileno, tal y como hemos demostrado en este trabajo. Por tanto, la aplicación de ambos compuestos (ABA y PrCa) probablemente causó un descenso en los niveles de etileno en la raíz y consecuentemente un incremento en la intensidad de micorrización, independientemente de la aplicación o no de GA₃. No obstante, aunque si tenemos evidencias en este trabajo de que la aplicación de ABA reduce los niveles de etileno, no hemos medido esos niveles en raíz tras aplicación de PrCa. Nuestra hipótesis es que el parámetro de intensidad de micorrización es más dependiente de la relación ABA/etileno, y el parámetro de abundancia arbuscular depende del balance ABA/GAs.

Nuestro estudio sugiere una relación antagonista entre el ABA y las GAs durante el desarrollo de la micorrización, con especial incidencia en el proceso de formación de arbusculos. Prueba de ello, y tal y como hemos discutido anteriormente, es que los efectos negativos de la aplicación de GAs se recuperan con la aplicación de ABA, y los efectos negativos de la deficiencia de ABA se recuperan mediante inhibición de la síntesis de GAs. Además, hemos demostrado que la aplicación de GA₃ exógeno repercute en la capacidad de acumulación de ABA libre en la raíz, lo que sugiere que el GA₃ aplicado afecta el metabolismo del ABA, y por tanto sugiere una interacción directa ABA/GAs. Aún más, el hecho de que las plantas *Sitiens* tengan alterado el patrón de expresión de genes de biosíntesis y catabolismo de GAs en relación a plantas silvestres también sugiere una alteración del balance ABA/GAs en estos mutantes que sería la causa de la deficiente formación de arbusculos en los mismos. En este sentido, los resultados de expresión génica mencionados apuntan a un incremento de los niveles de GAs en plantas *Sitiens*. Dado que los genes de biosíntesis tienen una regulación negativa por GAs, mientras que los genes de catabolismo y *GASTI* están regulados positivamente por GAs (Yamaguchi & Kamiya, 2000), y que en las raíces de plantas *Sitiens* micorrizadas hay una reducción en los niveles de expresión de genes de biosíntesis y una activación de la expresión de genes de catabolismo y de respuesta a GAs, como *GASTI*, sugerimos un incremento en los niveles de GAs que podría explicar dicho patrón de expresión. No obstante, y como ya se ha comentado, hasta el momento nos ha sido imposible determinar el nivel de GAs en raíz de tomate, y por tanto corroborar estas suposiciones con datos experimentales.

Pero, realmente, ¿cuáles serían las funciones del ABA y las GAs durante la micorrización y formación de arbusculos? En este sentido se sabe que tanto ABA como GAs tienen un papel antagonista en el control del debilitamiento y relajación enzimática de la pared celular del endospermo de semillas de tomate, siendo este fenómeno promovido por GAs y atenuado por ABA (Karssen *et al.*, 1989; Groot & Karssen, 1992; Ni & Bradford, 1993). Además, también el ABA y las GAs tienen papeles opuestos en los fenómenos de redistribución de asimilados hacia los órganos sumidero (Zhang *et al.*, 2007). Con tales premisas, y en virtud de nuestros resultados, es posible aventurar la hipótesis de que el ABA y las GAs puedan afectar la formación de arbusculos tanto por su influencia sobre la regulación del proceso de debilitamiento de la pared celular como sobre la redistribución y asignación de carbono en las células de la raíz de plantas micorrizadas durante la formación de los arbusculos. No obstante, si bien esta hipótesis necesita de confirmación experimental y por esta vía continua la investigación dentro del grupo de trabajo, si es cierto que nuestros resultados sugieren que estas hormonas tienen funciones

solapadas durante el proceso de micorrización y que el conocimiento de dichas funciones y el mecanismo que las regula supondría un gran avance en nuestra comprensión de la formación y funcionamiento de la asociación simbiótica Micorriza Arbuscular, y abriría las puertas a posibles estrategias de intervención dirigidas a mejorar la eficiencia simbiótica mediante manipulación de la formación y actividad de los arbusculos.

VI. CONCLUSIONES

- 1.- El mantenimiento de niveles fisiológicos de Acido Abscísico (ABA) es condición necesaria para una correcta formación de Micorriza Arbuscular en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*).
2. La formación de Micorriza Arbuscular en tomate altera el metabolismo del ABA en la raíz, disminuyendo la presencia de ABA-glucosidado y catabolitos derivados de la hidroxilación C8' y C9' del ABA, e incrementando los niveles de ABA libre y 7'-OH-ABA, derivado de la hidroxilación en C7'.
3. Existe un doble mecanismo, dependiente e independiente de la acción del etileno, asociado con la función del ABA durante la formación de la Micorriza Arbuscular en tomate. El ABA es necesario para la formación de arbusculos, y la deficiencia de ABA tiene un efecto negativo directo sobre el porcentaje de arbusculos. A su vez, la deficiencia de ABA incrementa el contenido en etileno que funciona como un regulador negativo de la intensidad de la micorrización.
4. Las Giberelinas (GAs) son compuestos reguladores de la formación de la Micorriza Arbuscular en tomate. El grado y tipo de alteración de los parámetros de micorrización debido a la alteración en la percepción o concentración de GAs en la raíz, sugiere una acción reguladora negativa de GAs sobre la abundancia arbuscular y la frecuencia de micorrización.
5. La formación de Micorriza Arbuscular en tomate altera el patrón de expresión de genes del metabolismo y genes efectores de la acción de GAs en la raíz. De manera generalizada la micorrización promueve la expresión de genes de biosíntesis y respuesta a GAs, y disminuye la expresión de genes del catabolismo de GAs.
6. La regulación de la formación de los arbusculos en raíces de plantas de *S. lycopersicum* colonizadas por *G. irregulare* depende de la interacción entre ABA y GAs, de tal forma que coexisten efectos antagonistas y dependientes de la acción de estas hormonas, correlacionándose la incapacidad para formar los arbusculos con el desequilibrio en la relación ABA/GAs de la raíz.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abrams SR, Nelson K, Ambrose SJ. 2003.** Deuterated abscisic acid analogs for mass spectrometry and metabolism studies. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **46**: 273-283.
- Acosta-Echeverría M, Sánchez-Bravo J, Bañón-Arnao M. 2000.** Auxinas. In: Azcón-Bieto J, Talón M, eds. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Barcelona, España: 305-323.
- Adams DO, Yang SF. 1979.** Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**: 170-174.
- Adams R, Kerber E, Pfister K, Weiler EW. 1992.** Studies on the new growth retardant CGA 163,935 (Cimectacarb). In: Karssen CM, van Loon LC, Vreugdenhil D, eds. *Progress in Plant growth regulation*. Kluwer, Dordrecht: 818-827.
- Agrawal GK, Yamazaki M, Kobayashi M, Hirochika R, Miyao A, Hirochika H. 2001.** Screening of the Rice Viviparous Mutants Generated by Endogenous Retrotransposon Tos17 Insertion. Tagging of a Zeaxanthin Epoxidase Gene and a Novel *OsTATC* Gene. *Plant Physiology* **125**: 1248-1257.
- Ait-Ali T, Swain SM, Reid JB, Sun Tp, Kamiya Y. 1997.** The LS locus of pea encodes the gibberellin biosynthesis enzyme *ent*-kaurene synthase A. *The Plant Journal* **11**: 443-454.
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. 2005.** Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**: 824-827.
- Al Babili S, Huguency P, Schledz N, Welsch R, Frohnmeyer H, Laule O, Beyer P. 2000.** Identification of a novel gene coding for neoxanthin synthase from *Solanum tuberosum*. *FEBS Letters* **485**: 168-172.
- Albinsky D, Masson JE, Bogucki A, Afsar K, Vass I, Nagy F, Paszkowski J. 1999.** Plant responses to genotoxic stress are linked to an ABA/salinity signaling pathway. *Plant Journal* **17**: 73-82.
- Alexander I, Selosse MA. 2009.** Mycorrhizas in tropical forests: a neglected research imperative. *New Phytologist* **182**: 14-16.
- Allen MF, Moore J, Christensen M. 1982.** Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular–arbuscular mycorrhizae. II. Altered levels of gibberellin-like substances and abscisic acid in the host plant. *Canadian Journal of Botany* **60**: 468-471.

- Altmann T. 1998.** A tale of dwarfs and drugs: brassinosteroids to the rescue. *Trends in Genetics* **14**: 490-495.
- Anderson JP, Badruzaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, Ehlert C, Maclean DJ, Ebert PR, Kazan K. 2004.** Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 3460-3479.
- Arai S, Todoroki Y, Ibaraki S, Naoe Y, Hirai N, Ohigashi H. 1999.** Synthesis and biological activity of 3'-chloro-, -bromo-, and -iodoabscisic acids, and biological activity of 3'-fluoro-8'-hydroxyabscisic acid. *Phytochemistry* **52**: 1185-1193.
- Arfan M, Athar HR, Ashraf M. 2007.** Does exogenous application of salicylic acid through the rooting medium modulate growth and photosynthetic capacity in two differently adapted spring wheat cultivars under salt stress? *Journal of Plant Physiology* **164**: 685-694.
- Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM. 2007.** How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *New Phytologist* **173**: 808-816.
- Arriagada CA, Herrera MA, Ocampo JA. 2007.** Beneficial effect of saprobe and arbuscular mycorrhizal fungi on growth of *Eucalyptus globulus* co-cultured with Glycine max in soil contaminated with heavy metals. *Journal of Environmental Management* **84**: 93-99.
- Assmann SM. 2004.** Plant G Proteins, Phytohormones, and Plasticity: Three Questions and a Speculation. *Science Signaling* **2004**: re20.
- Audenaert K, De Meyer GB, Hofte MM. 2002.** Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiology* **128**: 491-501.
- Augé RM, Stodola AJW, Tims JE, Saxton AM. 2001.** Moisture retention properties of a mycorrhizal soil. *Plant and Soil* **230**: 87-97.
- Avio L, Pellegrino E, Bonari E, Giovannetti M. 2006.** Functional diversity of arbuscular mycorrhizal fungal isolates in relation to extraradical mycelial networks. *New Phytologist* **172**: 347-357.
- Ayling SM, Smith SE, Smith FA. 2000.** Transmembrane electric potential difference of germ tubes of arbuscular mycorrhizal fungi responds to external stimuli. *New Phytologist* **147**: 631-639.
- Azcon-Aguilar C, Bago B, Barea JM, Hock B, Varma A. 1998.** Saprophytic growth of arbuscular-mycorrhizal fungi. In: *Mycorrhiza*. Heidelberg: Springer-Verlag: 391-408.

- Azcón-Aguilar C, Jaizme-Vega MC, Calvet C. 2002.** The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens. In: Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter K, eds. *Mycorrhizal technology in agriculture*. Birkhäuser, Switzerland: 187-197.
- Azcón-Aguilar C, Rodríguez-Navarro DN, Barea JM. 1981.** Effects of etrel on the formation and responses to VA mycorrhiza in *Medicago* and *Triticum*. *Plant and Soil* **60**: 461-468.
- Azcón-Bieto J, Talón M. 2000.** Giberelinas. In: Azcón-Bieto J, Talón M, eds. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Barcelona, España: 325-341.
- Baar J. 2008.** From production to application of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural systems: requirements and needs. In: Varma A, ed. *Mycorrhiza*. Berlin: 361-373.
- Bago B, Azcón-Aguilar C, Goulet A, Piché Y. 1998a.** Branched absorbing structures (BAS): A feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **139**: 375-388.
- Bago B, Azcón-Aguilar C, Piché Y. 1998b.** Architecture and developmental dynamics of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions. *Mycologia* **90**: 52-62.
- Bago B, Pfeffer PE, Abubaker J, Jun J, Allen JW, Brouillette J, Douds DD, Lammers PJ, Shachar-Hill Y. 2003.** Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiology* **131**: 1496-1507.
- Bago B, Pfeffer PE, Douds DD, Jr., Brouillette J, Becard G, Shachar-Hill Y. 1999a.** Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiology* **121**: 263-272.
- Bago B, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. 2000.** Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology* **124**: 949-958.
- Bago B, Zipfel W, Williams RM, Jun J, Arreola R, Lammers PJ, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. 2002.** Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* **128**: 108-124.
- Bago B, Zipfel W, Williams RM, Piche Y. 1999b.** Nuclei of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi as revealed by in vivo two-photon microscopy. *Protoplasma* **209**: 77-89.
- Baier MC, Keck M, Gödde V, Niehaus K, Küster H, Hohnjec N. 2010.** Knockdown of the symbiotic sucrose synthase MtSucS1 affects arbuscule maturation and maintenance in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **152**: 1000-1014.
- Balestrini R, Bonfante P. 2005.** The interface compartment in arbuscular mycorrhizae: A special type of plant cell wall? *Plant Biosystems* **139**: 8-15.

- Balestrini R, Gómez-Ariza J, Lanfranco L, Bonfante P. 2007.** Laser microdissection reveals that transcripts for five plant and one fungal phosphate transporter genes are contemporaneously present in arbusculated cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 1055-1062.
- Balestrini R, Romera C, Puigdomenech P, Bonfante P. 1994.** Location of a cell-wall hydroxyproline-rich glycoprotein, cellulose and beta-1,3-glucans in apical and differentiated regions of maize mycorrhizal roots. *Planta* **195**: 201-209.
- Balsevich JJ, Cutler AJ, Lamb N, Friesen LJ, Kurz EU, Perras MR, Abrams SR. 1994a.** Response of Cultured Maize Cells to (+)-Abscisic Acid, (-)-Abscisic Acid, and Their Metabolites. *Plant Physiology* **106**: 135-142.
- Balsevich JJ, Abrams SR, Lamb N, Konigt WA. 1994b.** Identification of unnatural phaseic acid as a metabolite derived from exogenously added (-)-abscisic acid in a maize cell suspension culture. *Phytochemistry* **36**: 647-650.
- Bano A, Harper JE. 2002.** Plant growth regulators and phloem exudates modulate root nodulation of soybean. *Functional Plant Biology* **29**: 1299-1307.
- Bano A, Harper JE, Auge RM, Neuman DS. 2002.** Changes in phytohormone levels following inoculation of two soybean lines differing in nodulation. *Functional Plant Biology* **29**: 965-974.
- Bao-Cai T, Kenneth C, Donald RM. 2001.** Localization and targeting of the VP14 epoxy-carotenoid dioxygenase to chloroplast membranes. *The Plant Journal* **27**: 373-382.
- Bao-Cai T, Leina MJ, Wen-Tao D, Lijuan L, Qin-Bao L, Kenneth C, Donald RM. 2003.** Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. *The Plant Journal* **35**: 44-56.
- Barazani O, Von Dahl CC, Baldwin IT. 2007.** *Sebacina vermifera* promotes the growth and fitness of *Nicotiana attenuata* by inhibiting ethylene signaling. *Plant Physiology* **144**: 1223-1232.
- Barea JM. 1986.** Importance of hormones and root exudates in mycorrhizal phenomena. In: Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S, eds. *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. INRA, Paris: 177-187.
- Barea JM. 2000.** Rhizosphere and mycorrhiza of field crops. In: Toutant JP, Balazs E, Galante E, Lynch JM, Schepers JS, Werry PA, eds. *Biological Resource Management Connecting Science and Policy*. Springer.
- Barea JM, Azcón-Aguilar C. 1982.** Production of plant growth regulating substances by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Applied and Environmental Microbiology* **43**: 810-813.
- Barea JM, Azcon-Aguilar C. 1983.** Mycorrhizas and their Significance in Nodulating Nitrogen-Fixing Plants. In: *Advances in Agronomy*. 1-54.

- Barea JM, Azcon-Aguilar C, Ocampo JA, Azcón R. 1991.** Morfología, anatomía y citología de las micorrizas vesículo-arbusculares. In: Olivares J, Barea JM, eds. *Fijación y Movilización biológica de Nutrientes*. CSIC, Madrid: 149-173.
- Bari R, Jones JDG. 2009.** Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* **69**: 473-488.
- Barker SJ, Tagu D. 2000.** The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**: 144-154.
- Bassel GW, Mullen RT, Bewley JD. 2008.** Procera is a putative DELLA mutant in tomato (*Solanum lycopersicum*): effects on the seed and vegetative plant. *Journal of Experimental Botany* **59**: 585-593.
- Beaudoin N, Serizet C, Gosti F, Giraudat J. 2000.** Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* **12**: 1103-1115.
- Bécard G, Doner LW, ROLIN DB, Doude DD, Pfeffer PE. 1991.** Identification and quantification of trehalose in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi by in vivo ¹³C NMR and HPLC analyses*. *New Phytologist* **118**: 547-552.
- Bécard G, Fortin J. 1988.** Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist* **108**: 211-218.
- Bécard G, Pfeffer PE. 1993.** Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. *Protoplasma* **174**: 62-68.
- Beilby J. 1980.** Fatty acid and sterol composition of ungerminated spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora laevis*. *Lipids* **15**: 949-952.
- Benabdellah K, Merlos MA, Azcon-Aguilar C, Ferrol N. 2009.** *GintGRX1*, the first characterized glomeromycotan glutaredoxin, is a multifunctional enzyme that responds to oxidative stress. *Fungal Genetics and Biology* **46**: 94-103.
- Bensen RJ, Johal GS, Crane VC, Tossberg JT, Schnable PS, Meeley RB, Briggs SP. 1995.** Cloning and characterization of the maize *An1* gene. *The Plant Cell Online* **7**: 75-84.
- Besmer YL, Koide RT. 1999.** Effect of mycorrhizal colonization and phosphorus on ethylene production by snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) flowers. *Mycorrhiza* **9**: 161-166.
- Besserer A, Bécard G, Jauneau A, Roux C, Séjalon-Delmas N. 2008.** GR24, a synthetic analog of strigolactones, stimulates the mitosis and growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* by boosting its energy metabolism. *Plant Physiology* **148**: 402-413.
- Besserer A, Bécard G, Roux C, Séjalon-Delmas N. 2009.** Role of mitochondria in the response of arbuscular mycorrhizal fungi to strigolactones. *Plant Signaling and Behavior* **4**: 75-77.

- Besserer A, Puech-Pages V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, Portais JC, Roux C, Becard G, Sejalon-Delmas N. 2006.** Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology* **4**: e226.
- Beyrle H. 1995.** The role of phytohormones in the function and biology of mycorrhizas. In: Varma A, Hock B, eds. *Mycorrhiza structure, function, molecular biology and biotechnology*. Berlin: springer-Verlag: 365-390.
- Bi HH, Song YY, Zeng RS. 2007.** Biochemical and molecular responses of host plants to mycorrhizal infection and their roles in plant defence. *Allelopathy Journal* **20**: 15-28.
- Bidartondo MI, Redecker D, Hijri I, Wiemken A, Bruns TD, Dominguez L, Sersic A, Leake JR, Read DJ. 2002.** Epiparasitic plants specialized on arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **419**: 389-392.
- Biswas B, Chan PK, Gresshoff PM. 2009.** A novel ABA insensitive mutant of *Lotus japonicus* with a wilted phenotype displays unaltered nodulation regulation. *Molecular plant* **2**: 487-499.
- Bittner F, Oreb M, Mendel RR. 2001.** ABA3 Is a Molybdenum Cofactor Sulfurase Required for Activation of Aldehyde Oxidase and Xanthine Dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 40381-40384.
- Blee KA, Anderson AJ. 1998.** Regulation of arbuscule formation by carbon in the plant. *Plant Journal* **16**: 523-530.
- Blilou I, Bueno P, Ocampo JA, Garcia-Garrido JM. 2000a.** Induction of catalase and ascorbate peroxidase activities in tobacco roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal *Glomus mosseae*. *Mycological Research* **104**: 722-725.
- Blilou I, Ocampo JA, García-Garrido JM. 1999.** Resistance of pea roots to endomycorrhizal fungus or *Rhizobium* correlates with enhanced levels of endogenous salicylic acid. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1663-1668.
- Blilou I, Ocampo JA, García-Garrido JM. 2000b.** Induction of LTP (lipid transfer protein) and Pal (phenylalanine ammonia-lyase) gene expression in rice roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1969-1977.
- Bonanomi A, Oetiker JH, Guggenheim R, Boller T, Wiemken A, Vögeli-Lange R. 2001.** Arbuscular mycorrhiza in mini-mycorrhizotrons: First contact of *Medicago truncatula* roots with *Glomus intraradices* induces chalcone synthase. *New Phytologist* **150**: 573-582.
- Bonfante P, Perotto S. 1995.** Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytologist* **130**: 3-21.
- Bonfante-Fasolo P. 1984.** Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: Powel CL, Bagyaraj DJ, eds. *VA Mycorrhiza*. CRC Press, Boca Raton, Florida: 35-46.

- Bothe H, Klingner A, Kaldorf M, Schmitz O, Esch H, Hundeshagen B, Kernebeck H. 1994.** Biochemical approaches to the study of plant-fungal interactions in arbuscular mycorrhiza. *Experientia* **50**: 919-925.
- Bouvier F, D'Harlingue A, Backhaus RA, Kumagai MH, Camara B. 2000.** Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog. *European Journal of Biochemistry* **267**: 6346-6352.
- Bouvier F, D'Harlingue A, Hugueney P, Marin E, Marion-Poll A, Camara B. 1996.** Xanthophyll biosynthesis. Cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of beta-cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*). *Journal of Biological Chemistry* **271**: 28861-28867.
- Bouwmeester HJ, Roux C, Lopez-Raez JA, Becard G. 2007.** Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends in Plant Science* **12**: 224-230.
- Boyer GL, Zeevaart JAD. 1982.** Isolation and Quantitation of β -D-Glucopyranosyl Abscisate from Leaves of *Xanthium* and Spinach. *Plant Physiology* **70**: 227-231.
- Braunberger PG, Abbott LK, Robson AD. 1996.** Infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi after wetting and drying. *New Phytologist* **134**: 673-684.
- Bray EA, Zeevaart JAD. 1985.** The Compartmentation of Abscisic Acid and β -D-Glucopyranosyl Abscisate in Mesophyll Cells. *Plant Physiology* **79**: 719-722.
- Brechenmacher L, Weidmann S, Van Tuinen D, Chatagnier O, Gianinazzi S, Franken P, Gianinazzi-Pearson V. 2004.** Expression profiling of up-regulated plant and fungal genes in early and late stages of *Medicago truncatula*-*Glomus mosseae* interactions. *Mycorrhiza* **14**: 253-262.
- Breuninger M, Requena N. 2004.** Recognition events in AM symbiosis: analysis of fungal gene expression at the early appressorium stage. *Fungal Genetics and Biology* **41**: 794-804.
- Breuninger M, Trujillo CG, Serrano E, Fischer R, Requena N. 2004.** Different nitrogen sources modulate activity but not expression of glutamine synthetase in arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Genetics and Biology* **41**: 542-552.
- Bucher M. 2007.** Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist* **173**: 11-26.
- Bücking H, Shachar-Hill Y. 2005.** Phosphate uptake, transport and transfer by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is stimulated by increased carbohydrate availability. *New Phytologist* **165**: 899-911.

- Buee M, Rossignol M, Jauneau A, Ranjeva R, Bécard G. 2000.** The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 693-698.
- Burbidge A, Grieve TM, Jackson A, Thompson A, McCarty DR, Taylor IB. 1999.** Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize Vp14. *Plant Journal* **17**: 427-431.
- Caba JM, Centeno ML, Fernández B, Gresshoff PM, Ligeró F. 2000.** Inoculation and nitrate alter phytohormone levels in soybean roots: Differences between a supernodulating mutant and the wild type. *Planta* **211**: 98-104.
- Campos-Soriano L, Gomez-Ariza J, Bonfante P, San Segundo B. 2011.** A rice calcium-dependent protein kinase is expressed in cortical root cells during the presymbiotic phase of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC Plant Biology* **11**: 90.
- Cao FY, Yoshioka K, Desveaux D. 2011.** The roles of ABA in plant-pathogen interactions. *Journal of Plant Research* **124**: 489-499.
- Cappellazzo G, Lanfranco L, Fitz M, Wipf D, Bonfante P. 2008.** Characterization of an Amino Acid Permease from the Endomycorrhizal Fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiology* **147**: 429-437.
- Carrera E, Ruiz-Rivero O, Peres LEP, Atares A, García-Martínez JL. 2012.** Characterization of the procera Tomato Mutant Shows Novel Functions of the SIDELLA Protein in the Control of Flower Morphology, Cell Division and Expansion, and the Auxin-Signaling Pathway during Fruit-Set and Development. *Plant Physiology* **160**: 1581-1596.
- Cavagnaro TR, Gao LL, Smith FA, Smith SE. 2001.** Morphology of arbuscular mycorrhizas is influenced by fungal identity. *New Phytologist* **151**: 469-475.
- Chabaud M, Genre A, Sieberer BJ, Faccio A, Fournier J, Novero M, Barker DG, Bonfante P. 2011.** Arbuscular mycorrhizal hyphopodia and germinated spore exudates trigger Ca²⁺ spiking in the legume and nonlegume root epidermis. *New Phytologist* **189**: 347-355.
- Chalot M, Blaudez D, Brun A. 2006.** Ammonia: a candidate for nitrogen transfer at the mycorrhizal interface. *Trends in Plant Science* **11**: 263-266.
- Chaudhary VB, Lau MK, Johnson NC. 2008.** Macroecology of microbes-biogeography of the Glomeromycota. In: Varma A, ed. *Mycorrhiza*. Berlin: 529-563.
- Chebotar GO, Chebotar SV. 2011.** Gibberellin-signaling pathways in plants. *Cytology and Genetics* **45**: 259-268.
- Chen Z, Silva H, Klessig DF. 1993.** Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* **262**: 1883-1886.

- Cheong JJ, Choi YD. 2003.** Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in Genetics* **19**: 409-413.
- Ciardi JA, Tieman DM, Lund ST, Jones JB, Stall RE, Klee HJ. 2000.** Response to *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria in tomato involves regulation of ethylene receptor gene expression. *Plant Physiology* **123**: 81-92.
- Clapp JP, Rodriguez A, Dodd JC. 2001.** Inter- and intra-isolate rRNA large subunit variation in *Glomus coronatum* spores. *New Phytologist* **149**: 539-554.
- Coenen C, Lomax TL. 1998.** The diageotropica gene differentially affects auxin and cytokinin responses throughout development in tomato. *Plant Physiology* **117**: 63-72.
- Cohen JD. 1984.** Convenient apparatus for the generation of small amounts of diazomethane. *Journal of Chromatography A* **303**: 193-196.
- Conforth J, Milborrow B, Ryback G, Wareing P. 1965a.** Chemistry and Physiology of Dormins In Sycamore: Identity of Sycamore Dormin with Abscisin II. *Nature* **205**: 1269-1270.
- Conforth JW, Milborrow BF, Ryback G. 1965b.** Synthesis of (+/-)-Abscisin II. *Nature* **206**: 715.
- Copetta A, Lingua G, Berta G. 2006.** Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. *Genovese*. *Mycorrhiza* **16**: 485-494.
- Cordier C, Pozo MJ, Barea JM, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V. 1998.** Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 1017-1028.
- Covacevich F, Echeverría HE, Aguirrezabal LAN. 2007.** Soil available phosphorus status determines indigenous mycorrhizal colonization of field and glasshouse-grown spring wheat from Argentina. *Applied Soil Ecology* **35**: 1-9.
- Cracker LE, Abeles FB. 1969.** Abscission: Role of Absciscic Acid. *Plant Physiology* **44**: 1144-1149.
- Cruz AF, Ishii T, Kadoya K. 2000.** Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on tree growth, leaf water potential, and levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and ethylene in the roots of papaya under water-stress conditions. *Mycorrhiza* **10**: 121-123.
- Cutler AJ, Krochko JE. 1999.** Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science* **4**: 472-478.
- Cutler AJ, Rose PA, Squires TM, Loewen MK, Shaw AC, Quail JW, Krochko JE, Abrams SR. 2000.** Inhibitors of Absciscic Acid 8'-Hydroxylase. *Biochemistry* **39**: 13614-13624.

- Danielson RM. 1984.** Ectomycorrhiza formation by the operculate discomycete *Sphaerosporella brunnea* (Pezizales). *Mycologia* **76**: 454-461.
- Danneberg G, Latus C, Zimmer W, Hundeshagen B, Schneider-Poetsch H, Bothe H. 1993.** Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on phytohormone balances in maize (*Zea mays L.*). *Journal of Plant Physiology* **141**: 33-39.
- David R, Itzhaki H, Ginzberg I, Gafni Y, Galili G, Kapulnik Y. 1998.** Suppression of tobacco basic chitinase gene expression in response to colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 489-497.
- Davidson SE, Elliott RC, Helliwell CA, Poole AT, Reid JB. 2003.** The Pea Gene *NA* Encodes a Kaurenoic Acid Oxidase. *Plant Physiology* **131**: 335-344.
- De La Providencia IE, De Souza FA, Fernández F, Delmas NS, Declerck S. 2005.** Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenetic groups. *New Phytologist* **165**: 261-271.
- de Los Santos RT, Vierheilig H, Ocampo JA, García-Garrido JM. 2011.** Altered pattern of Arbuscular mycorrhizal formation in tomato ethylene mutants. *Plant Signaling and Behavior* **6**: 755-758.
- de Vleeschauwer D, van Buyten E, Satoh K, Balidion J, Mauleon R, Choi IR, Vera-Cruz C, Kikuchi S, Höfte M. 2012.** Brassinosteroids antagonize gibberellin- and salicylate-mediated root immunity in rice. *Plant Physiology* **158**: 1833-1846.
- Debeaujon I, Koornneef M. 2000.** Gibberellin Requirement for *Arabidopsis* Seed Germination Is Determined Both by Testa Characteristics and Embryonic Abscisic Acid. *Plant Physiology* **122**: 415-424.
- Declerck S, Strullu DG, Plenchette C. 1998.** Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus sp.* isolated from a tropical ecosystem: A proposed methodology for germplasm collection. *Mycologia* **90**: 579-585.
- DeMars BG, Boerner RE. 1995.** Mycorrhizal status of *Deschampsia antarctica* in the Palmer Station area, Antarctica. *Mycologia* **87**: 451-453.
- Dickson S. 2004.** The Arum-Paris continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* **163**: 187-200.
- Dietz KJ, Sauter A, Wichert K, Messdaghi D, Hartung W. 2000.** Extracellular β -glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. *Journal of Experimental Botany* **51**: 937-944.

- Ding Y, Kalo P, Yendrek C, Sun J, Liang Y, Marsh JF, Harris JM, Oldroyd GED. 2008.** Abscisic acid coordinates nod factor and cytokinin signaling during the regulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **20**: 2681-2695.
- Dixon RK, Garrett HE, Cox GS. 1988.** Cytokinins in the root pressure exudate of *Citrus jambhiri* Lush. colonized by vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Tree Physiology* **4**: 9-18.
- Do MA, Mouco C, Ono EO, Rodrigues JD. Mango flower induction in the brazilian northeast Semi-arid with gibberellin synthesis inhibitors. 884, 591-596. 2010.
- Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- Dodd JC, Boddington CL, Rodriguez A, Gonzalez-Chavez C, Mansur I. 2000.** Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from different genera: Form, function and detection. *Plant and Soil* **226**: 131-151.
- Dolatabadian A, Sanav SAMM, Sharif M. 2009.** Effect of salicylic acid and salt on wheat seed germination. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science* **59**: 456-464.
- Douds J. 1997.** A procedure for the establishment of *Glomus mosseae* in dual culture with Ri T-DNA-transformed carrot roots. *Mycorrhiza* **7**: 57-61.
- Douds J, Schenck NC. 1991.** Germination and hyphal growth of vsm fungi during and after storage in soil at five matric potentials. *Soil Biology and Biochemistry* **23**: 177-183.
- Drazic G, Mihailovic N. 2005.** Modification of cadmium toxicity in soybean seedlings by salicylic acid. *Plant Science* **168**: 511-517.
- Drissner D, Kunze G, Callewaert N, Gehrig P, Tamasloukht M, Boller T, Felix G, Amrhein N, Bucher M. 2007.** Lyso-phosphatidylcholine is a signal in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Science* **318**: 265-268.
- Duddridge JA, Read DJ. 1982.** An Ultrastructural Analysis of the Development of Mycorrhizas in *Monotropa hypopitys* L. *New Phytologist* **92**: 203-214.
- Dugassa GD, von Alten H, Schönbeck F. 1996.** Effects of arbuscular mycorrhiza (AM) on health of *Linum usitatissimum* L. infected by fungal pathogens. *Plant and Soil* **185**: 173-182.
- Eason WR, Newman EI, Chuba PN. 1991.** Specificity of interplant cycling of phosphorus: The role of mycorrhizas. *Plant and Soil* **137**: 267-274.
- Ehneß R, Roitsch T. 1997.** Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in *Chenopodium rubrum* by cytokinins. *Plant Journal* **11**: 539-548.
- El Ghachtouli N, Martin-Tanguy J, Paynot M, Gianinazzi S. 1996.** First report of the inhibition of arbuscular mycorrhizal infection of *Pisum sativum* by specific and irreversible inhibition of polyamine biosynthesis or by gibberellic acid treatment. *FEBS Letters* **385**: 189-192.

- Elliott R, Smith JJ, Lester D, Reid J, Ross JJ. 2001.** Feed-forward regulation of gibberellin deactivation in pea. *Journal of Plant Growth Regulation* **20**: 87-94.
- Ellouze W, Hanson K, Nayyar A, Perez JC, Hamel C. 2008.** Intertwined existence: the life of plant symbiotic fungi in agricultural soils. In: Varma A, ed. *Mycorrhiza*. Berlin: 507-528.
- Eriksson ME, Israelsson M, Olsson O, Moritz T. 2000.** Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. *Nat Biotech* **18**: 784-788.
- Esch H, Hundeshagen B, Schneider-Poetsch H, Bothe H. 1994.** Demonstration of abscisic acid in spores and hyphae of the arbuscular-mycorrhizal fungus *Glomus* and in the N₂-fixing cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Plant Science* **99**: 9-16.
- Evelin H, Kapoor R, Giri B. 2009.** Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: A review. *Annals of Botany* **104**: 1263-1280.
- Ezawa T, Cavagnaro TR, Smith SE, Smith FA, Ohtomo R. 2004.** Rapid accumulation of polyphosphate in extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus as revealed by histochemistry and a polyphosphate kinase/luciferase system. *New Phytologist* **161**: 387-392.
- Ezawa T, Smith SE, Smith FA. 2002.** P metabolism and transport in AM fungi. *Plant and Soil* **244**: 221-230.
- Facelli E, Smith SE, Facelli JM, Christophersen HM, Andrew Smith F. 2010.** Underground friends or enemies: Model plants help to unravel direct and indirect effects of arbuscular mycorrhizal fungi on plant competition. *New Phytologist* **185**: 1050-1061.
- Fan LM, Zhao Z, Assmann SM. 2004.** Guard cells: a dynamic signaling model. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 537-546.
- Fang Y, Hirsch AM. 1998.** Studying early nodulin gene *ENOD40* expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa. *Plant Physiology* **116**: 53-68.
- Feddermann N, Finlay R, Boller T, Elfstrand M. 2010.** Functional diversity in arbuscular mycorrhiza-the role of gene expression, phosphorus nutrition and symbiotic efficiency. *Fungal Ecology* **3**: 1-8.
- Fellbaum CR, Gachomo EW, Beesetty Y, Choudhari S, Strahan GD, Pfeffer PE, Kiers ET, Bücking H. 2012.** Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 2666-2671.
- Ferguson BJ, Foo E, Ross JJ, Reid JB. 2011.** Relationship between gibberellin, ethylene and nodulation in *Pisum sativum*. *New Phytologist* **189**: 829-842.

- Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin MH, Lin YH, Reid DE, Gresshoff PM. 2010.** Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**: 61-76.
- Ferguson BJ, Ross JJ, Reid JB. 2005.** Nodulation phenotypes of gibberellin and brassinosteroid mutants of pea. *Plant Physiology* **138**: 2396-2405.
- Fester T, Strack D, Hause B. 2001.** Reorganization of tobacco root plastids during arbuscule development. *Planta* **213**: 864-868.
- Feys BJF, Benedetti CE, Penfold CN, Turner JG. 1994.** *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* **6**: 751-759.
- Figueiredo MVB, Burity HA, Martínez CR, Chanway CP. 2008.** Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Applied Soil Ecology* **40**: 182-188.
- Finkelstein RR, Rock CD. 2002.** Abscisic Acid Biosynthesis and Response. *The Arabidopsis Book* e0058.
- Fleet CM, Sun Tp. 2005.** A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 77-85.
- Fletcher RA, Hofstra G, Gao JG. 1986.** Comparative fungitoxic and plant growth regulating properties of triazole derivatives. *Plant and Cell Physiology* **27**: 367-371.
- Fortin J, Bécard G, Declerck S, Dalpe Y, St Arnaud M, Coughlan AP, Piché Y. 2002.** Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Canadian Journal of Botany* **80**: 1-20.
- Frank B. 1885.** Über die auf Wurzelsymbiosen beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. In: *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. Berlin: 128-145.
- Franken P. 2010.** Molecular Physiological Aspects of the AM Symbiosis Post Penetration Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function. In: Koltai H, Kapulnik Y, eds. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Springer Netherlands, 93-116.
- Fuchs B, Haselwandter K. 2008.** Arbuscular mycorrhiza of endangered plant species: potential impacts on restoration strategies. In: Varma A, ed. *Mycorrhiza*. Berlin: 565-579.
- Fujii H, Verslues PE, Zhu JK. 2007.** Identification of Two Protein Kinases Required for Abscisic Acid Regulation of Seed Germination, Root Growth, and Gene Expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* **19**: 485-494.
- Gachomo E, Allen JW, Pfeffer PE, Govindarajulu M, Douds DD, Jin H, Nagahashi G, Lammers PJ, Shachar-Hill Y, Bucking H. 2009.** Germinating spores of *Glomus intraradices*

- can use internal and exogenous nitrogen sources for de novo biosynthesis of amino acids. *New Phytologist* **184**: 399-411.
- Gadkar V, Rillig MC. 2006.** The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalalin is a putative homolog of heat shock protein 60. *FEMS Microbiology Letters* **263**: 93-101.
- Gallaud J. 1905.** Étude sur les mycorrhizes endotrophes. *Rev Gen Botany* **17**: 5-48.
- Gallego-Giraldo L. 2008.** Efecto de la sobreexpresión y del silenciamiento de genes del metabolismo de giberelinas sobre el desarrollo de tabaco.
- Galpaz N, Ronen G, Khalfa Z, Zamir D, Hirschberg J. 2006.** A Chromoplast-Specific Carotenoid Biosynthesis Pathway Is Revealed by Cloning of the Tomato white-flower Locus. *The Plant Cell Online* **18**: 1947-1960.
- Gamalero E, Berta G, Massa N, Glick BR, Lingua G. 2008.** Synergistic interactions between the ACC deaminase-producing bacterium *Pseudomonas putida* UW4 and the AM fungus *Gigaspora rosea* positively affect cucumber plant growth. *FEMS Microbiology Ecology* **64**: 459-467.
- Gao Y, Zeng Q, Guo J, Cheng J, Ellis BE, Chen JG. 2007.** Genetic characterization reveals no role for the reported ABA receptor, GCR2, in ABA control of seed germination and early seedling development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **52**: 1001-1013.
- Gao Z, Chen YF, Randlett MD, Zhao XC, Findell JL, Kieber JJ, Schaller GE. 2003.** Localization of the Raf-like Kinase CTR1 to the Endoplasmic Reticulum of *Arabidopsis* through Participation in Ethylene Receptor Signaling Complexes. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 34725-34732.
- García-Garrido JM, León-Morcillo RJ, Martín-Rodríguez JA, Ocampo-Bote JA. 2010.** Variations in the mycorrhization characteristics in roots of wild-type and ABA-deficient tomato are accompanied by specific transcriptomic alterations. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**: 651-664.
- García-Garrido JM, Ocampo JA. 2002.** Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal Experimental Botany* **53**: 1377-1386.
- García-Garrido JM, Ocampo JA. 2002.** Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal Experimental Botany* **53**: 1377-1386.
- García-Hurtado N, Carrera E, Ruiz-Rivero O, López-Gresa MP, Hedden P, Gong F, García-Martínez JL. 2012.** The characterization of transgenic tomato overexpressing *gibberellin 20-oxidase* reveals induction of parthenocarpic fruit growth, higher yield, and alteration of the gibberellin biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany*.

- García-Rodríguez S, Azcón-Aguilar C, Ferrol N. 2007.** Transcriptional regulation of host enzymes involved in the cleavage of sucrose during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Physiologia Plantarum* **129**: 737-746.
- Garriock ML, Peterson RL, Ackerley CA. 1989.** Early Stages in Colonization of *Allium porrum* (Leek) Roots by the Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungus, *Glomus versiforme*. *New Phytologist* **112**: 85-92.
- Gay G, Debaud JC. 1987.** Genetic study on indole-3-acetic acid production by ectomycorrhizal *Hebeloma* species: inter- and intraspecific variability in homo- and dikaryotic mycelia. *Applied Microbiology and Biotechnology* **26**: 141-146.
- Gay G, Normand L, Marmeisse R, Sotta B, Debaud JC. 1994.** Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi have increased mycorrhizal activity. *New Phytologist* **128**: 645-657.
- Geil RD, Guinel FC. 2002.** Effects of elevated substrate-ethylene on colonization of leek (*Allium porrum*) by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus aggregatum*. *Canadian Journal of Botany* **80**: 114-119.
- Geil RD, Peterson RL, Guinel FC. 2001.** Morphological alterations of pea (*Pisum sativum* cv. *Sparkle*) arbuscular mycorrhizas as a result of exogenous ethylene treatment. *Mycorrhiza* **11**: 137-143.
- Genre A, Chabaud M, Faccio A, Barker DG, Bonfante P. 2008.** Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *Plant Cell* **20**: 1407-1420.
- Genre A, Chabaud M, Timmers T, Bonfante P, Barker DG. 2005.** Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell* **17**: 3489-3499.
- Genre A, Ivanov S, Fendrych M, Faccio A, Zársky V, Bisseling T, Bonfante P. 2012.** Multiple exocytotic markers accumulate at the sites of perifungal membrane biogenesis in arbuscular mycorrhizas. *Plant and Cell Physiology* **53**: 244-255.
- Genre A, Ortu G, Bertoldo C, Martino E, Bonfante P. 2009.** Biotic and abiotic stimulation of root epidermal cells reveals common and specific responses to arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology* **149**: 1424-1434.
- George E. 2000.** Nutrient uptake. In: Kapulnik Y dDe, ed. *Arbuscular mycorrhizas: physiology ad function*. Kluwer, Dordrecht: 307-343.
- Gerdemann JW, Trappe JM. 1975.** Taxonomy of the Endogonaceae. In: Sanders FE, Mosse B, Tinker PB, eds. *Endomycorrhizas*. London, UK: 35-51.

- Ghassemian M, Nambara E, Cutler S, Kawaide H, Kamiya Y, McCourt P. 2000.** Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 1117-1126.
- Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S. 1978.** Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza II. Soluble alkaline phosphatase specific to mycorrhizal infection in onion roots. *Physiological Plant Pathology* **12**: 45-53.
- Gillard DF, Walton DC. 1976.** Abscisic Acid Metabolism by a Cell-free Preparation from *Echinocystis lobata* Liquid Endoserum. *Plant Physiology* **58**: 790-795.
- Ginzberg I, David R, Shaul O, Elad Y, Wininger S, Ben Dor B, Badani H, Fang Y, Van Rhijn P, Li Y, Hirsch AM, Kapulnik Y. 1998.** *Glomus intraradices* colonization regulates gene expression in tobacco roots. *Symbiosis* **25**: 145-157.
- Giovannetti M. 2008.** Structure, extent and functional significance of belowground arbuscular. In: Varma A, ed. *Mycorrhiza*. Berlin Heidelberg: 59-72.
- Giovannetti M, Avio L, Sbrana C. 2010.** Fungal Spore Germination and Pre-symbiotic Mycelial Growth - Physiological and Genetic Aspects. In: Koltai H, Kapulnik Y, eds. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Springer Netherlands, 3-32.
- Giovannetti M, Avio L, Sbrana C, Citerinesi AS. 1993.** Factors Affecting Appressorium Development in the Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. and Trappe. *New Phytologist* **123**: 115-122.
- Giovannetti M, Mosse B. 1980.** An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* **84**: 489-500.
- Giovannetti M, Fortuna P, Citerinesi AS, Morini S, Nuti MP. 2001.** The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist* **151**: 717-724.
- Gollotte A, L'Haridon F, Chatagnier O, Wettstein G, Arnould C, Van Tuinen A, Gianinazzi-Pearson V. 2006.** Repetitive DNA sequences include retrotransposons in genomes of the Glomeromycota. *Genetica* **128**: 455-469.
- Gomez SK, Javot H, Deewatthanawong P, Torres-Jerez I, Tang Y, Blancaflor EB, Udvardi MK, Harrison MJ. 2009.** *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC Plant Biology* **9**.
- Gómez-Roldán V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pages V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais JC, Bouwmeester H, Becard G, Beveridge CA, Rameau C, Rochange SF. 2008.** Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**: 189-194.

- Gómez-Roldán V, Roux C, Girard D, Bécard G, Puech-Pagès V. 2007.** Strigolactones: Promising plant signals. *Plant Signaling and Behavior* **2**: 163-164.
- Gonai T, Kawahara S, Tougou M, Satoh S, Hashiba T, Hirai N, Kawaide H, Kamiya Y, Yoshioka T. 2004.** Abscisic acid in the thermoinhibition of lettuce seed germination and enhancement of its catabolism by gibberellin. *Journal of Experimental Botany* **55**: 111-118.
- González-Guerrero M, Azcón-Aguilar C, Mooney M, Valderas A, MacDiarmid CW, Eide DJ, Ferrol N. 2005.** Characterization of a *Glomus intraradices* gene encoding a putative Zn transporter of the cation diffusion facilitator family. *Fungal Genetics and Biology* **42**: 130-140.
- González-Guzmán M, Abia D, Salinas J, Serrano R, Rodríguez PL. 2004.** Two New Alleles of the abscisic aldehyde oxidase 3 Gene Reveal Its Role in Abscisic Acid Biosynthesis in Seeds. *Plant Physiology* **135**: 325-333.
- González-Guzmán M, Apostolova N, Bellés JM, Barrero JM, Piqueras P, Ponce MR, Micol JL, Serrano R, Rodríguez PL. 2002.** The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell* **14**: 1833-1846.
- Govindarajulu M, Pfeffer PE, Jin H, Abubaker J, Douds DD, Allen JW, Bucking H, Lammers PJ, Shachar-Hill Y. 2005.** Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* **435**: 819-823.
- Grabov A, Blatt MR. 1998.** Membrane voltage initiates Ca^{2+} waves and potentiates Ca^{2+} increases with abscisic acid in stomatal guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 4778-4783.
- Grace EJ, Cotsaftis O, Tester M, Smith FA, Smith SE. 2009.** Arbuscular mycorrhizal inhibition of growth in barley cannot be attributed to extent of colonization, fungal phosphorus uptake or effects on expression of plant phosphate transporter genes. *New Phytologist* **181**: 938-949.
- Graeb JE. 1987.** Gibberellin biosynthesis and control. *Annual Review of Plant Physiology* **38**: 419-465.
- Graham JH. 2000.** Assessing costs of arbuscular mycorrhizal symbiosis agroecosystems fungi. In: Podila GK, Douds Jr DD, eds. *Current Advances in Mycorrhizae Research*. St. Paul: APS Press: 127-140.
- Griggs DL, Hedden P, Temple-Smith KE, Rademacher W. 1991.** Inhibition of gibberellin 2 β -hydroxylases by acylcyclohexanedione derivatives. *Phytochemistry* **30**: 2513-2517.
- Groot SPC, Karssen CM. 1992.** Dormancy and germination of abscisic acid-deficient tomato seeds: Studies with the sitiens mutant. *Plant Physiology* **99**: 952-958.

- Grunwald U, Guo W, Fischer K, Isayenkov S, Ludwig-Müller J, Hause B, Yan X, Küster H, Franken P. 2009.** Overlapping expression patterns and differential transcript levels of phosphate transporter genes in arbuscular mycorrhizal, Pi-fertilised and phytohormone-treated *Medicago truncatula* roots. *Planta* **229**: 1023-1034.
- Gryndler M, Hrselova H, Chvatalova I, Jansa J. 1998.** The effect of selected plant hormones on in vitro proliferation of hyphae of *Glomus fistulosum*. *Biologia Plantarum* **41**: 255-263.
- Guether M, Neuhäuser B, Balestrini R, Dynowski M, Ludewig U, Bonfante P. 2009.** A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Plant Physiology* **150**: 73-83.
- Guinel FC, Geil RD. 2002.** A model for the development of the rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses in legumes and its use to understand the roles of ethylene in the establishment of these two symbioses. *Canadian Journal of Botany* **80**: 695-720.
- Gusta LV, Ewan B, Reaney MJT, Abrams SR. 1992.** The effect of abscisic acid and abscisic acid metabolites on the germination of cress seed. *Canadian Journal of Botany* **70**: 1550-1555.
- Gutjahr C, Casieri L, Paszkowski U. 2009.** *Glomus intraradices* induces changes in root system architecture of rice independently of common symbiosis signaling. *New Phytologist* **182**: 829-837.
- Gutjahr C, Paszkowski U. 2009.** Weights in the balance: Jasmonic acid and Salicylic acid signaling in root-biotroph interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 763-772.
- Gutjahr C, Radovanovic D, Geoffroy J, Zhang Q, Siegler H, Chiapello M, Casieri L, An K, An G, Guiderdoni E, Kumar CS, Sundaresan V, Harrison MJ, Paszkowski U. 2012.** The half-size ABC transporters STR1 and STR2 are indispensable for mycorrhizal arbuscule formation in rice. *Plant Journal* **69**: 906-920.
- Guttenberger M. 2000.** Arbuscules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi inhabit an acidic compartment within plant roots. *Planta* **211**: 299-304.
- Hampson CR, Reaney MJT, Abrams GD, Abrams SR, Gusta LV. 1992.** Metabolism of (+)-abscisic acid to (+)-7^l-hydroxyabscisic acid by bromegrass cell cultures. *Phytochemistry* **31**: 2645-2648.
- Hanlon MT, Coenen C. 2011.** Genetic evidence for auxin involvement in arbuscular mycorrhiza initiation. *New Phytologist* **189**: 701-709.
- Hansen H, Grossmann K. 2000.** Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. *Plant Physiology* **124**: 1437-1448.
- Hansen H, Dörffling K. 1999.** Changes of free and conjugated abscisic acid and phaseic acid in xylem sap of drought-stressed sunflower plants. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1599-1605.

- Hao JH, Wang XL, Dong CJ, Zhang ZG, Shang QM. 2011.** Salicylic acid induces stomatal closure by modulating endogenous hormone levels in cucumber cotyledons. *Russian Journal of Plant Physiology* **58**: 906-913.
- Harberd NP. 2003.** Relieving DELLA Restraint. *Science* **299**: 1853-1854.
- Hare PD, Seo HS, Yang JY, Chua NH. 2003.** Modulation of sensitivity and selectivity in plant signaling by proteasomal destabilization. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 453-462.
- Harley JL, Smith SE. 1983.** *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press Inc. London and New York.
- Harrier LA, Wright F, Hooker JE. 1998.** Isolation of the 3-phosphoglycerate kinase gene of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerdemann & Trappe. *Current Genetics* **34**: 386-392.
- Harrison MJ. 1996.** A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *The Plant Journal* **9**: 491-503.
- Harrison MJ. 2005.** Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology* **59**: 19-42.
- Harrison MJ, Dewbre GR, Liu J. 2002.** A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* **14**: 2413-2429.
- Harrison MJ, Van Buuren ML. 1995.** A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* **378**: 626-629.
- Hartung W, Sauter A, Hose E. 2002.** Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *Journal of Experimental Botany* **53**: 27-32.
- Hause B, Maier W, Miersch O, Kramell R, Strack D. 2002.** Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiology* **130**: 1213-1220.
- Hause B, Mrosk C, Isayenkov S, Strack D. 2007.** Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry* **68**: 101-110.
- Hause B, Schaarschmidt S. 2009.** The role of jasmonates in mutualistic symbioses between plants and soil-born microorganisms. *Phytochemistry* **70**: 1589-1599.
- Hawkes CV, DeAngelis KM, Firestone MK. 2007.** Root interactions with soil microbial communities and processes. In: Elsevier Academic Press, ed. *The Rhizosphere and Ecological Perspective*. New York: 1-31.
- Hawkins HJ, Johansen A, George E. 2000.** Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **226**: 275-285.

- Hayman DS. 1982.** Influence of soils and fertility on activity and survival of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytopathology* **72**: 1119-1125.
- Hayward A, Stirnberg P, Beveridge C, Leyser O. 2009.** Interactions between auxin and strigolactone in shoot branching control. *Plant Physiology* **151**: 400-412.
- He ZL, Yang XE, Stoffella PJ. 2005.** Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **19**: 125-140.
- Hedden P. 1991.** Gibberellin biosynthetic enzymes: regulation of gibberellin concentration. In: Takahashi N, Phinney BO, MacMillan J, eds. *Gibberellins*. Springer, New York: 94-105.
- Hedden P, Phillips AL. 2000.** Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science* **5**: 523-530.
- Hedden P, Proebsting WM. 1999.** Genetic Analysis of Gibberellin Biosynthesis. *Plant Physiology* **119**: 365-370.
- Helber N, Wippel K, Sauer N, Schaarschmidt S, Hause B, Requena N. 2011.** A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus sp* is crucial for the symbiotic relationship with plants. *Plant Cell* **23**: 3812-3823.
- Helliwell CA, Sullivan JA, Mould RM, Gray JC, Peacock J, Dennis ES. 2001.** A plastid envelope location of *Arabidopsis ent*-kaurene oxidase links the plastid and endoplasmic reticulum steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Plant Journal* **28**: 201-208.
- Helliwell CA, Sheldon CC, Olive MR, Walker AR, Zeevaart JAD, Peacock WJ, Dennis ES. 1998.** Cloning of the *Arabidopsis ent*-kaurene oxidase gene *GA3*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 9019-9024.
- Hepper CM. 1984.** Regulation of spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora laevis* by soil pH. *Transactions of the British Mycological Society* **83**: 154-156.
- Herde O, Pena CH, Wasternack C, Willmitzer L, Fisahn J. 1999.** Electric signaling and pin2 gene expression on different abiotic stimuli depend on a distinct threshold level of endogenous abscisic acid in several abscisic acid-deficient tomato mutants. *Plant Physiology* **119**: 213-218.
- Herrera Medina MJ, Gagnon H, Piché Y, Ocampo JA, García-Garrido JM, Vierheilig H. 2003.** Root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi is affected by the salicylic acid content of the plant. *Plant Science* **164**: 993-998.
- Herrera-Medina MJ. 2008.** *Estudio sobre la participación y función de moléculas señal en la regulación de la simbiosis micorriza arbuscular.*

- Herrera-Medina MJ, Steinkellner S, Vierheilig H, Ocampo Bote JA, García-Garrido JM. 2007.** Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist* **175**: 554-564.
- Herrera-Medina MJ, Tamayo MI, Vierheilig H, Ocampo JA, García-Garrido JM. 2008.** The jasmonic acid signalling pathway restricts the development of the arbuscular mycorrhizal association in tomato. *Journal of Plant Growth Regulation* **27**: 221-230.
- Hijikata N, Murase M, Tani C, Ohtomo R, Osaki M, Ezawa T. 2010.** Polyphosphate has a central role in the rapid and massive accumulation of phosphorus in extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* **186**: 285-289.
- Hijri M, Sanders IR. 2004.** The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is haploid and has a small genome size in the lower limit of eukaryotes. *Fungal Genetics and Biology* **41**: 253-261.
- Hildebrandt U, Janetta K, Bothe H. 2002.** Towards growth of arbuscular mycorrhizal fungi independent of a plant host. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1919-1924.
- Hildebrandt U, Regvar M, Bothe H. 2007.** Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* **68**: 139-146.
- Hill RD, Liu JH, Durnin D, Lamb N, Shaw A, Abrams SR. 1995.** Abscisic Acid Structure-Activity Relationships in Barley Aleurone Layers and Protoplasts (Biological Activity of Optically Active, Oxygenated Abscisic Acid Analogs). *Plant Physiology* **108**: 573-579.
- Hisamatsu T, Koshioka M, Kubota S, Fujime Y, King RW, Mander LN. 2000.** The role of gibberellin biosynthesis in the control of growth and flowering in *Matthiola incana*. *Physiologia Plantarum* **109**: 97-105.
- Hodge A, Campbell CD, Fitter AH. 2001.** An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature* **413**: 297-299.
- Hodge A, Fitter AH. 2010.** Substantial nitrogen acquisition by arbuscular mycorrhizal fungi from organic material has implications for N cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 13754-13759.
- Hogekamp C, Arndt D, Pereira PA, Becker JD, Hohnjec N, Küster H. 2011.** Laser microdissection unravels cell-type-specific transcription in arbuscular mycorrhizal roots, including CAAT-Box transcription factor gene expression correlating with fungal contact and spread. *Plant Physiology* **157**: 2023-2043.
- Hohnjec N, Perlick AM, Pühler A, Küster H. 2003.** The *Medicago truncatula* sucrose synthase gene *MtSucSI* is activated both in the infected region of root nodules and in the cortex of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 903-915.

- Hohnjec N, Vieweg MF, Pühler A, Becker A, Küster H. 2005.** Overlaps in the transcriptional profiles of *Medicago truncatula* roots inoculated with two different *Glomus* fungi provide insights into the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* **137**: 1283-1301.
- Holford ICR. 1997.** Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *Soil Research* **35**: 227-240.
- Hollick P, Senaratna T, McComb J, Bunn E, Dixon K. 2002.** Response to paclobutrazol of symbiotic mycorrhizal fungi and dropper (tuber stalk) formation of host orchid seedlings. *Plant Growth Regulation* **36**: 31-39.
- Hosny M, Gianinazzi-Pearson V, Dulieu H. 1998.** Nuclear DNA content of 11 fungal species in *Glomales*. *Genome* **41**: 422-428.
- Huang Y, Li H, Hutchison CE, Laskey J, Kieber JJ. 2003.** Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **33**: 221-233.
- Huttly AK, Phillips AL. 1995.** Gibberellin-regulated plant genes. *Physiologia Plantarum* **95**: 310-317.
- Ilias I, Ouzounidou G, Giannakoula A, Papadopoulou P. 2007.** Effects of gibberellic acid and prohexadione-calcium on growth, chlorophyll fluorescence and quality of okra plant. *Biologia Plantarum* **51**: 575-578.
- Ilias I, Rajapakse N. 2005.** Prohexadione-calcium affects growth and flowering of petunia and impatiens grown under photosensitive films. *Scientia Horticulturae* **106**: 190-202.
- Ilyas N, Bano A. 2010.** *Azospirillum* strains isolated from roots and rhizosphere soil of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under different soil moisture conditions. *Biology and Fertility of Soils* **46**: 393-406.
- Isayenkov S, Mrosk C, Stenzel I, Strack D, Hause B. 2005.** Suppression of allene oxide cyclase in hairy roots of *Medicago truncatula* reduces jasmonate levels and the degree of mycorrhization with *Glomus intraradices*. *Plant Physiology* **139**: 1401-1410.
- Ishii T, Shrestha YH, Matsumoto I, Kadoya K. 1996.** Effect of Ethylene on the Growth of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi and on the Mycorrhizal Formation of Trifoliolate Orange Roots. *Journal Japan Society Horticulture Science* **65**: 525-529.
- Israelsson M, Mellerowicz E, Chono M, Gullberg J, Moritz T. 2004.** Cloning and Overproduction of Gibberellin 3-Oxidase in Hybrid Aspen Trees. Effects on Gibberellin Homeostasis and Development. *Plant Physiology* **135**: 221-230.

- Israelsson M, Siegel RS, Young J, Hashimoto M, Iba K, Schroeder JI. 2006.** Guard cell ABA and CO₂ signaling network updates and Ca²⁺ sensor priming hypothesis. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 654-663.
- Itoh H, Tatsumi T, Sakamoto T, Otomo K, Toyomasu T, Kitano H, Ashikari M, Ichihara S, Matsuoka M. 2004.** A rice semi-dwarf gene, Tan-Ginbozu (D35), encodes the gibberellin biosynthesis enzyme, *ent*-kaurene oxidase. *Plant Molecular Biology* **54**: 533-547.
- Iuchi S, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2000.** A Stress-Inducible Gene for 9-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase Involved in Abscisic Acid Biosynthesis under Water Stress in Drought-Tolerant Cowpea. *Plant Physiology* **123**: 553-562.
- Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, Tabata S, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2001.** Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **27**: 325-333.
- Jakobsen I. 2004.** Hyphal fusion to plant species connections - Giant mycelia and community nutrient flow. *New Phytologist* **164**: 4-7.
- James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung GH, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schussler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossman AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lucking R, Budel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin DJ, Spatafora JW, Vilgalys R. 2006.** Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* **443**: 818-822.
- Jansa J, Mozafar A, Frossard E. 2003.** Long-distance transport of P and Zn through the hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus in symbiosis with maize. *Agronomie* **23**: 481-488.
- Jansa J, Smith FA, Smith SE. 2008.** Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? *New Phytologist* **177**: 779-789.
- Jany JL, Pawlowska TE. 2010.** Multinucleate spores contribute to evolutionary longevity of asexual Glomeromycota. *The American Naturalist* **175**: 424-435.
- Javot H, Penmetsa RV, Breuillin F, Bhattarai KK, Noar RD, Gomez SK, Zhang Q, Cook DR, Harrison MJ. 2011.** *Medicago truncatula* *mtpt4* mutants reveal a role for nitrogen in the

- regulation of arbuscule degeneration in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Journal* **68**: 954-965.
- Javot H, Penmetsa RV, Terzaghi N, Cook DR, Harrison MJ. 2007a.** A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of National Academy of Sciences of the U.S.A* **104**: 1720-1725.
- Javot H, Pumplin N, Harrison MJ. 2007b.** Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: Transport properties and regulatory roles. *Plant, Cell and Environment* **30**: 310-322.
- Jeffries P, Barea JM. 2001.** Arbuscular mycorrhiza- A key component of sustainable plant-soil ecosystems. In: Hock B, ed. *The Mycota, Vol. IX: Fungal associations*. Berlin: 95-113.
- Jentschel K, Thiel D, Rehn F, Ludwig-Müller J. 2007.** Arbuscular mycorrhiza enhances auxin levels and alters auxin biosynthesis in *Tropaeolum majus* during early stages of colonization. *Physiologia Plantarum* **129**: 320-333.
- Jiang F, Hartung W. 2008.** Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *Journal of Experimental Botany* **59**: 37-43.
- Jin H, Pfeffer PE, Douds DD, Piotrowski E, Lammers PJ, Shachar-Hill Y. 2005.** The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* **168**: 687-696.
- Joernvall H, Persson B, Krook M, Atrian S, Gonzalez-Duarte R, Jeffery J, Ghosh D. 1995.** Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* **34**: 6003-6013.
- Jolicoeur M, Germette S, Gaudette M, Perrier M, Bécard G. 1998.** Intracellular pH in Arbuscular Mycorrhizal Fungi: A Symbiotic Physiological Marker. *Plant Physiology* **116**: 1279-1288.
- Jones GM. 1987.** Gibberellins and the procera mutant of tomato. *Planta* **172**: 280-284.
- Jupe S, Causton DR, Scott I. 1988.** Cellular basis of the effects of gibberellin and the pro gene on stem growth in tomato. *Planta* **174**: 106-111.
- Jupe S, Scott I. 1992.** Gibberellin and the pro Gene Suppress Peroxidase Activity in Elongating Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Stem Tissues. *Annals of Botany* **69**: 33-37.
- Kabir Z. 2005.** Tillage or no-tillage: Impact on mycorrhizae. *Canadian Journal of Plant Science* **85**: 23-29.
- Kaldorf M, Ludwig-Müller J. 2000.** AM fungi might affect the root morphology of maize by increasing indole-3-butyric acid biosynthesis. *Physiologia Plantarum* **109**: 58-67.
- Kaldorf M, Schmelzer E, Bothe H. 1998.** Expression of maize and fungal nitrate reductase genes in arbuscular mycorrhiza. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 439-448.

- Kang J, Hwang JU, Lee M, Kim YY, Assmann SM, Martinoia E, Lee Y. 2010.** PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 2355-2360.
- Karimi A, Khodaverdiloo H, Sepehri M, Sadaghiani MR. 2011.** Arbuscular mycorrhizal fungi and heavy metal contaminated soils. *African Journal of Microbiology Research* **5**: 1571-1576.
- Karssen CM, Zagorski S, Kepczynski J, Groot SPC. 1989.** Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination. *Annals of Botany* **63**: 71-80.
- Kato-Noguchi H, Tanaka Y. 2003.** Allelopathic potential of citrus fruit peel and abscisic acid-glucose ester. *Plant Growth Regulation* **40**: 117-120.
- Kende H, Zeevaart JAD. 1997.** The five 'classical' plant hormones. *Plant Cell* **9**: 1197-1210.
- Kevany BM, Taylor MG, Klee HJ. 2008.** Fruit-specific suppression of the ethylene receptor LeETR4 results in early-ripening tomato fruit. *Plant Biotechnology Journal* **6**: 295-300.
- Khaosaad T, García-Garrido JM, Steinkellner S, Vierheilig H. 2007.** Take-all disease is systemically reduced in roots of mycorrhizal barley plants. *Soil Biology and Biochemistry* **39**: 727-734.
- Kharshiing EV, Kumar GP, Ditengou FA, Li X, Palme K, Sharma R. 2010.** The polycotyledon (pct1-2) mutant of tomato shows enhanced accumulation of PIN1 auxin transport facilitator protein. *Plant Biology* **12**: 224-228.
- Kitagawa Y, Yamamoto H, Oritani T. 1995.** Biosynthesis of Abscisic Acid in the Fungus *Cercospora cruenta*: Stimulation of Biosynthesis by Water Stress and Isolation of a Transgenic Mutant with Reduced Biosynthetic Capacity. *Plant and Cell Physiology* **36**: 557-564.
- Klee HJ. 2002.** Control of ethylene-mediated processes in tomato at the level of receptors. *Journal of Experimental Botany* **53**: 2057-2063.
- Klee HJ, Hayford MB, Kretzmer KA, Barry GF, Kishore GM. 1991.** Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *Plant Cell* **3**: 1187-1193.
- Kobayashi M, MacMillan J, Phinney B, Gaskin P, Spray CR, Hedden P. 2000.** Gibberellin biosynthesis: metabolic evidence for three steps in the early 13-hydroxylation pathway of rice. *Phytochemistry* **55**: 317-321.
- Koltai H, Lekkala SP, Bhattacharya C, Mayzlish-Gati E, Resnick N, Winger S, Dor E, Yoneyama K, Yoneyama K, Hershenhorn J, Joel DM, Kapulnik Y. 2010.** A tomato strigolactone-impaired mutant displays aberrant shoot morphology and plant interactions. *Journal of Experimental Botany* **61**: 1739-1749.

- Kosuta S, Chabaud M, Loughon G, Gough C, Denarie J, Barker DG, Becard G. 2003.** A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific *MtENOD11* expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **131**: 952-962.
- Kosuta S, Hazledine S, Sun J, Miwa H, Morris RJ, Downie JA, Oldroyd GED. 2008.** Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 9823-9828.
- Kretschmar T, Kohlen W, Sasse J, Borghi L, Schlegel M, Bachelier JB, Reinhardt D, Bours R, Bouwmeester HJ, Martinoia E. 2012.** A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature* **483**: 341-344.
- Krochko JE, Abrams GD, Loewen MK, Abrams SR, Cutler AJ. 1998.** (+)-Abscisic Acid 8'-Hydroxylase Is a Cytochrome P450 Monooxygenase. *Plant Physiology* **118**: 849-860.
- Krüger M, Krüger C, Walker C, Stockinger H, Schüßler A. 2012.** Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytologist* **193**: 970-984.
- Krüger M, Stockinger H, Krüger C, Schüßler A. 2009.** DNA-based species level detection of Glomeromycota: One PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **183**: 212-223.
- Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G. 2005.** Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research* **15**: 281-307.
- Kuhn H, Küster H, Requena N. 2010.** Membrane steroid-binding protein 1 induced by a diffusible fungal signal is critical for mycorrhization in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* **185**: 716-733.
- Kuromori T, Miyaji T, Yabuuchi H, Shimizu H, Sugimoto E, Kamiya A, Moriyama Y, Shinozaki K. 2010.** ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 2361-2366.
- Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T, Hirai N, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E. 2004.** The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J* **23**: 1647-1656.
- Lanfranco L, Delpero M, Bonfante P. 1999.** Intrasporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Molecular Ecology* **8**: 37-45.
- Larose G, Chênevert R, Moutoglis P, Gagné S, Piché Y, Vierheilig H. 2002.** Flavonoid levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Plant Physiology* **159**: 1329-1339.

- Leake JR. 1994.** The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist* **127**: 171-216.
- Lee DJ, Zeevaart JAD. 2005.** Molecular Cloning of *GA 2-Oxidase3* from Spinach and Its Ectopic Expression in *Nicotiana sylvestris*. *Plant Physiology* **138**: 243-254.
- Lee KH, Piao HL, Kim HY, Choi SM, Jiang F, Hartung W, Hwang I, Kwak JM, Lee IJ, Hwang I. 2006.** Activation of Glucosidase via Stress-Induced Polymerization Rapidly Increases Active Pools of Abscisic Acid. *Cell* **126**: 1109-1120.
- Lehmann H, Glund K. 1986.** Abscisic acid metabolism-vacuolar/extravacuolar distribution of metabolites. *Planta* **168**: 559-562.
- Lehmann H, Vlasov P. 1988.** Plant Growth and Stress-The Enzymic Hydrolysis of Abscisic Acid Conjugate. *Journal of Plant Physiology* **132**: 98-101.
- Leigh J, Hodge A, Fitter AH. 2009.** Arbuscular mycorrhizal fungi can transfer substantial amounts of nitrogen to their host plant from organic material. *New Phytologist* **181**: 199-207.
- Lenzemo VW, Kuyper TW, Matusova R, Bouwmeester HJ, Van Ast A. 2007.** Colonization by arbuscular mycorrhizal fungi of sorghum leads to reduced germination and subsequent attachment and emergence of *Striga hermonthica*. *Plant Signaling and Behavior* **2**: 58-62.
- Lenzemo VW, Kuyper T, Kropff MJ, Van Ast A. 2005.** Field inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi reduces *Striga hermonthica* performance on cereal crops and has the potential to contribute to integrated *Striga* management. *Field Crops Research* **91**: 51-61.
- Leung J, Giraudat J. 1998.** Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 199-222.
- Li H, Smith SE, Ophel-Keller K, Holloway RE, Smith FA. 2008.** Naturally occurring arbuscular mycorrhizal fungi can replace direct P uptake by wheat when roots cannot access added P fertiliser. *Functional Plant Biology* **35**: 124-130.
- Li H, Shen JJ, Zheng ZL, Lin Y, Yang Z. 2001.** The Rop GTPase Switch Controls Multiple Developmental Processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**: 670-684.
- Liang Y, Mitchell DM, Harris JM. 2007.** Abscisic acid rescues the root meristem defects of the *Medicago truncatula* latd mutant. *Developmental Biology* **304**: 297-307.
- Linderman RG. 1992.** Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. In: Bethlenfalvay GJ, Linderman RG, eds. *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. ASA, madison, Wisconsin, USA: 45-70.
- Liu X, Yue Y, Li B, Nie Y, Li W, Wu WH, Ma L. 2007.** A G Protein-Coupled Receptor Is a Plasma Membrane Receptor for the Plant Hormone Abscisic Acid. *Science* **315**: 1712-1716.

- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Logi C, Sbrana C, Giovannetti M. 1998.** Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 3473-3479.
- López-Pedrosa A, González-Guerrero M, Valderas A, Azcón-Aguilar C, Ferrol N. 2006.** *GintAMT1* encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*. *Fungal Genetics and Biology* **43**: 102-110.
- López-Raéz JA, Charnikhova T, Fernández I, Bouwmeester H, Pozo MJ. 2011.** Arbuscular mycorrhizal symbiosis decreases strigolactone production in tomato. *Journal of Plant Physiology* **168**: 294-297.
- López-Raéz JA, Charnikhova T, Gómez-Roldán V, Matusova R, Kohlen W, De Vos R, Verstappen F, Puech-Pages V, Bécard G, Mulder P, Bouwmeester H. 2008.** Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytologist* **178**: 863-874.
- López-Raéz JA, Verhage A, Fernández I, García JM, Azcón-Aguilar C, Flors V, Pozo MJ. 2010.** Hormonal and transcriptional profiles highlight common and differential host responses to arbuscular mycorrhizal fungi and the regulation of the oxylipin pathway. *Journal of Experimental Botany* **61**: 2589-2601.
- Ludwig-Müller J. 2000.** Hormonal balance in plants during colonization by Mycorrhizal fungi. In: Kapulnik Y, Douds DD, eds. *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers: 263-285.
- Ludwig-Müller J. 2010.** Hormonal Responses in Host Plants Triggered by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. In: Koltai H, Kapulnik Y, eds. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Springer Netherlands, 169-190.
- Ludwig-Müller J, Bennett RN, García-Garrido JM, Piché Y, Vierheilig H. 2002.** Reduced arbuscular mycorrhizal root colonization in *Tropaeolum majus* and *Carica papaya* after jasmonic acid application can not be attributed to increased glucosinolate levels. *Journal of Plant Physiology* **159**: 517-523.
- Ludwig-Müller J, Kaldorf M, Sutter EG, Epstein E. 1997.** Indole-3-butyric acid (IBA) is enhanced in young maize (*Zea mays L.*) roots colonized with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Plant Science* **125**: 153-162.
- Ludwig-Müller J, Schubert B, Pieper K. 1995.** Regulation of IBA synthetase from maize (*Zea mays L.*) by drought stress and ABA. *Journal of Experimental Botany* **46**: 423-432.

- Lund ST, Stall RE, Klee HJ. 1998.** Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell* **10**: 371-382.
- Lutzoni F, Kauff F, Cox CJ, McLaughlin D, Celio G, Dentinger B, Padamsee M, Hibbett D, James TY, Baloch E, Grube M, Reeb V, Hofstetter V, Schoch C, Arnold AE, Miadlikowska J, Spatafora J, Johnson D, Hambleton S, Crockett M, Shoemaker R, Sung GH, Lucking R, Lumbsch T, O'Donnell K, Binder M, Diederich P, Ertz D, Gueidan C, Hansen K, Harris RC, Hosaka K, Lim YW, Matheny B, Nishida H, Pfister D, Rogers J, Rossman A, Schmitt I, Sipman H, Stone J, Sugiyama J, Yahr R, Vilgalys R. 2004.** Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany* **91**: 1446-1480.
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E, Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E. 2009.** Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. *Science* **324**: 1064-1068.
- MacMillan J, Takahashi N. 1968.** Proposed Procedure for the Allocation of Trivial Names to the Gibberellins. *Nature* **217**: 170-171.
- MacMillan J. 1997.** Biosynthesis of the gibberellin plant hormones. *Natural Product Reports* **14**: 221-243.
- Maekawa T, Maekawa-Yoshikawa M, Takeda N, Imaizumi-Anraku H, Murooka Y, Hayashi M. 2009.** Gibberellin controls the nodulation signaling pathway in *Lotus japonicus*. *Plant Journal* **58**: 183-194.
- Mahouachi J, Gómez-Cadenas A, Primo-Millo E, Talon M. 2005.** Antagonistic changes between abscisic acid and gibberellins in citrus fruits subjected to a series of different water conditions. *Journal of Plant Growth Regulation* **24**: 179-187.
- Maillet F, Poinot V, Aptroot A, Puech-Pagès V, Haouy A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Formey D, Niebel A, Martínez EA, Driguez H, Bécard G, Dénarié J. 2011.** Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* **469**: 58-64.
- Majeed A, Salim M, Bano A, Asim M, Hadees M. 2011.** Physiology and productivity of rice crop influenced by drought stress induced at different developmental stages. *African Journal of Biotechnology* **10**: 5121-5136.
- Maksimov IV. 2009.** Abscisic acid in the plants-pathogen interaction. *Russian Journal of Plant Physiology* **56**: 742-752.
- Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR, Harrison MJ. 2001.** A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *glomus intraradices* is regulated

- in response to phosphate in the environment. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 1140-1148.
- Malty JDS, Siqueira JO, Souza Moreira FM. 2006.** Effects of glyphosate on soybean symbiotic microorganisms, in culture media and in greenhouse. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **41**: 285-291.
- Margis-Pinheiro M, Zhou XR, Zhu QH, Dennis ES, Upadhyaya NM. 2005.** Isolation and characterization of a *Ds*-tagged rice (*Oryza sativa* L.) GA-responsive dwarf mutant defective in an early step of the gibberellin biosynthesis pathway. *Plant Cell Reports* **23**: 819-833.
- Marin E, Nussaume L, Quesada A, Gonneau M, Sotta B, Hugueney P, Frey A, Marion-Poll A. 1996.** Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO Journal* **15**: 2331-2342.
- Martí E, Gisbert C, Bishop GJ, Dixon MS, García-Martínez JL. 2006.** Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *Journal of Experimental Botany* **57**: 2037-2047.
- Martin DN, Proebsting WM, Parks TD, Dougherty WG, Lange T, Lewis MJ, Gaskin P, Hedden P. 1996.** Feed-back regulation of gibberellin biosynthesis and gene expression in *Pisum sativum* L. *Planta* **200**: 159-166.
- Martin F, Gianinazzi-Pearson V, Hijri M, Lammers P, Requena N, Sanders IR, Shachar-Hill Y, Shapiro H, Tuskan GA, Young JPW. 2008.** The long hard road to a completed *Glomus intraradices* genome. *New Phytologist* **180**: 747-750.
- Martín-Rodríguez JA, León-Morcillo RJ, Vierheilig H, Ocampo-Bote JA, Ludwig-Müller J, García-Garrido JM. 2010.** Mycorrhization of the *notabilis* and *sitiens* tomato mutants in relation to abscisic acid and ethylene contents. *Journal of Plant Physiology* **167**: 606-613.
- Martín-Rodríguez JA, León-Morcillo RJ, Vierheilig H, Ocampo-Bote JA, Ludwig-Müller J, García-Garrido JM. 2011.** Ethylene-dependent/ethylene-independent ABA regulation of tomato plants colonized by arbuscular mycorrhiza fungi. *New Phytologist* **190**: 193-205.
- Matusova R, Rani K, Verstappen FW, Franssen MC, Beale MH, Bouwmeester HJ. 2005.** The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanchae spp.* are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiology* **139**: 920-934.
- Mauch-Mani B, Mauch F. 2005.** The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 409-414.
- McArthur DAJ, Knowles NR. 1992.** Resistance responses of potato to vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under varying abiotic phosphorus levels. *Plant Physiology* **100**: 341-351.

- McCarty DR. 1995.** Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**: 71-93.
- McGinnis KM, Thomas SG, Soule JD, Strader LC, Zale JM, Sun Tp, Steber CM. 2003.** The *Arabidopsis* *SLEEPY1* Gene Encodes a Putative F-Box Subunit of an SCF E3 Ubiquitin Ligase. *The Plant Cell Online* **15**: 1120-1130.
- Meixner C, Ludwig-Muller J, Miersch O, Gresshoff P, Staehelin C, Vierheilig H. 2005.** Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant nts1007. *Planta* **222**: 709-715.
- Meixner C, Vegvari G, Ludwig-Müller J, Gagnon H, Steinkellner S, Staehelin C, Gresshoff P, Vierheilig H. 2007.** Two defined alleles of the LRR receptor kinase GmNARK in supernodulating soybean govern differing autoregulation of mycorrhization. *Physiologia Plantarum* **130**: 261-270.
- Merlot S, Mustilli AC, Genty B, North H, Lefebvre V, Sotta B, Vavasseur A, Giraudat J. 2002.** Use of infrared thermal imaging to isolate *Arabidopsis* mutants defective in stomatal regulation. *The Plant Journal* **30**: 601-609.
- Mikkelsen BL, Rosendahl S, Jakobsen I. 2008.** Underground resource allocation between individual networks of mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **180**: 890-898.
- Milborrow BV. 2001.** The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *Journal Experimental Botany* **52**: 1145-1164.
- Milborrow BV, Carrington NJ, Vaughan GT. 1988.** The cyclization of 8'-hydroxy abscisic acid to phaseic acid in vivo. *Phytochemistry* **27**: 757-759.
- Miller RM, Jastrow JD. 2000.** Mycorrhizal fungi influence soil structure. In: Kapulnik Y, Douds DD, eds. *Arbuscular mycorrhizae: molecular biology and physiology*. Kluwer, Dordrecht: 3-18.
- Mitchum MG, Yamaguchi S, Hanada A, Kuwahara A, Yoshioka Y, Kato T, Tabata S, Kamiya Y, Sun Tp. 2006.** Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in *Arabidopsis* development. *The Plant Journal* **45**: 804-818.
- Mohammadi-Goltapeh E, Rezaee-Danesh Y, Prasad R, Varma A. 2008.** Mycorrhizal fungi: what we know and what should we know? In: Varma A, ed. *Mycorrhiza*. Berlin: 3-28.
- Mohr P, Cahill D. 2007.** Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in *Arabidopsis*; infected with *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Functional & Integrative Genomics* **7**: 181-191.

- Morton JB, Benny GL. 1990.** Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, glomales, two new suborders, *Glominae* and *Gigasporineae*, and two new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an emendation of *Glomaceae*. *Mycotaxon* **37**: 471-491.
- Morton JB, Msiska Z. 2010.** Phylogenies from genetic and morphological characters do not support a revision of Gigasporaceae (Glomeromycota) into four families and five genera. *Mycorrhiza* **20**: 483-496.
- Mosse B, Stribley DP, Le Tacon F. 1981.** Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi. In: *Advances in microbial ecology*. New York: 137-209.
- Müller AH, Hansson M. 2009.** The Barley Magnesium Chelatase 150-kD Subunit Is Not an Abscisic Acid Receptor. *Plant Physiology* **150**: 157-166.
- Nagy R, Karandashov V, Chague V, Kalinkevich K, Tamasloukht M, Xu G, Jakobsen I, Levy AA, Amrhein N, Bucher M. 2005.** The characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species. *Plant Journal* **42**: 236-250.
- Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, Kim YC, Park SH, Ueguchi-Tanaka M, Suzuki H, Katoh E, Iuchi S, Kobayashi M, Maeda T, Matsuoka M, Yamaguchi I. 2006.** Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *The Plant Journal* **46**: 880-889.
- Nakayama I, Kamiya Y, Kobayashi M, Abe H, Sakurai A. 1990a.** Effects of a Plant-Growth Regulator, Prohexadione, on the Biosynthesis of Gibberellins in Cell-Free Systems Derived from Immature Seeds. *Plant and Cell Physiology* **31**: 1183-1190.
- Nakayama I, Miyazawa T, Kobayashi M, Kamiya Y, Abe H, Sakurai A. 1990b.** Effects of a New Plant Growth Regulator Prohexadione Calcium (BX-112) on Shoot Elongation Caused by Exogenously Applied Gibberellins in Rice (*Oryza sativa* L.) Seedlings. *Plant and Cell Physiology* **31**: 195-200.
- Nambara E, Marion-Poll A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. 56, 165-185. 2005.
- Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- Navarro L, Bari R, Achard P, Lisón P, Nemri A, Harberd NP, Jones JDG. 2008.** DELLAs Control Plant Immune Responses by Modulating the Balance of Jasmonic Acid and Salicylic Acid Signaling. *Current Biology* **18**: 650-655.
- Newman EI. 1966.** A method of estimating the total length of root in a sample. *Journal of Applied Ecology* **3**: 139.

- Newsham KK, Upson R, Read DJ. 2009.** Mycorrhizas and dark septate root endophytes in polar regions. *Fungal Ecology* **2**: 10-20.
- Ni BR, Bradford KJ. 1993.** Germination and dormancy of abscisic acid- and gibberellin-deficient mutant tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds: Sensitivity of germination to abscisic acid, gibberellin, and water potential. *Plant Physiology* **101**: 607-617.
- Niyogi KK, Grossman AR, Bjorkman O. 1998.** *Arabidopsis* Mutants Define a Central Role for the Xanthophyll Cycle in the Regulation of Photosynthetic Energy Conversion. *The Plant Cell Online* **10**: 1121-1134.
- North HM, Almeida A, Boutin JP, Frey A, To A, Botran L, Sotta B, Marion-Poll A. 2007.** The *Arabidopsis* ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *The Plant Journal* **50**: 810-824.
- Novero M, Faccio A, Genre A, Stougaard J, Webb KJ, Mulder L, Parniske M, Bonfante P. 2002.** Dual requirement of the *LjSym4* gene for mycorrhizal development in epidermal and cortical cells of *Lotus japonicus* roots. *New Phytologist* **154**: 741-749.
- Novikova G, Stepanchenko N, Nosov A, Moshkov I. 2009.** At the beginning of the route: ABA perception and signal transduction in plants. *Russian Journal of Plant Physiology* **56**: 727-741.
- Oehl F, Da Silva GA, Goto BT, Sieverding E. 2011a.** Glomeromycota: Three new genera and glomoid species reorganized. *Mycotaxon* **116**: 75-120.
- Oehl F, Sieverding E, Mader P, Dubois D, Ineichen K, Boller T, Wiemken A. 2004.** Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia*. **138**: 574-583.
- Oehl F, Silva GAd, nchez-Castro I, Goto BT, Maia LC, Vieira HE, Barea J, Sieverding E, Palenzuela J. Revision of Glomeromycetes with entrophosporoid and glomoid spore formation with three new genera. *Mycotaxon* 117[1], 297-316. 2011b.
- Ref Type: Abstract
- Ohkuma K, Addicott FT, Smith OE. 1965.** W.E.T: The structure of abscisin II. *Tetrahedron Letter* **6**: 2529-2535.
- Ohtomo R, Saito M. 2005.** Polyphosphate dynamics in mycorrhizal roots during colonization of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* **167**: 571-578.
- Okamoto M, Min X, Seo M, Nakabayashi K, Kamiya Y. 2002.** Complementation of a tomato ABA-deficient *Sitiens* mutant by an *Arabidopsis* aldehyde oxidase gene, *AAO3*. *Plant and Cell Physiology* **43**: S42.

- Oláh B, Brière C, Bécard G, Dénarié J, Gough C. 2005.** Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *Plant Journal* **44**: 195-207.
- Oldroyd GED, Engstrom EM, Long SR. 2001.** Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **13**: 1835-1849.
- Olszewski N, Sun Tp, Gubler F. 2002.** Gibberellin Signaling. *The Plant Cell Online* **14**: S61-S80.
- Op den Camp R, Streng A, De Mita S, Cao Q, Polone E, Liu W, Ammiraju JS, Kudrna D, Wing R, Untergasser A, Bisseling T, Geurts R. 2011.** LysM-type mycorrhizal receptor recruited for *Rhizobium* symbiosis in nonlegume *Parasponia*. *Science* **331**: 909-912.
- Oritani T, Kiyota H. 2003.** Biosynthesis and metabolism of abscisic acid and related compounds. *Natural Product Reports* **20**: 414-425.
- Ortu G, Balestrini R, Pereira PcA, Becker JD, Küster H, Bonfante P. 2012.** Plant Genes Related to Gibberellin Biosynthesis and Signaling Are Differentially Regulated during the Early Stages of AM Fungal Interactions. *Molecular plant* **5**: 951-954.
- Overvoorde P, Fukaki H, Beekman T. 2010.** Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**.
- Page-Degivry MT, Bidard JN, Rouvier E, Bulard C, Lazdunski M. 1986.** Presence of abscisic acid, a phytohormone, in the mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**: 1155-1158.
- Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow Tf, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR. 2009.** Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science* **324**: 1068-1071.
- Parniske M. 2000.** Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? *Curr Opin Plant Biol* **3**: 320-328.
- Parniske M. 2004.** Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion Plant Biology* **7**: 414-421.
- Parniske M. 2008.** Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Review Microbiology* **6**: 763-775.
- Parry AD, Neill SJ, Horgan R. 1988.** Xanthoxin levels and metabolites in the wild type and wilty mutants of tomato. *Planta* **173**: 397-404.

- Paszkowski U. 2006.** A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* **172**: 35-46.
- Paszkowski U, Kroken S, Roux C, Briggs SP. 2002.** Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**: 13324-13329.
- Pawlowska TE, Taylor JW. 2004.** Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **427**: 733-737.
- Penmetza RV, Cook DR. 1997.** A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science* **275**: 527-530.
- Penmetza RV, Uribe P, Anderson J, Lichtenzveig J, Gish JC, Nam YW, Engstrom E, Xu K, Sckisel G, Pereira M, Baek JM, Lopez-Meyer M, Long SR, Harrison MJ, Singh KB, Kiss GB, Cook DR. 2008.** The *Medicago truncatula* ortholog of *Arabidopsis* *EIN2*, sickle, is a negative regulator of symbiotic and pathogenic microbial associations. *The Plant Journal* **55**: 580-595.
- Pérez-Tienda J, Testillano PS, Balestrini R, Fiorilli V, Azcón-Aguilar C, Ferrol N. 2011.** GintAMT2, a new member of the ammonium transporter family in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Fungal Genetics and Biology* **48**: 1044-1055.
- Perotto S, Brewin NJ, Bonfante P. 1994.** Colonization of pea roots by the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* and by *Rhizobium* bacteria: Immunological comparison using monoclonal antibodies as probes for plant cell surface components. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**: 91-98.
- Peterson R, Massicotte HB, Melville LH. 2004.** *Mycorrhizas: anatomy and cell biology*. Ottawa.
- Peterson RL, Uetake Y, Zelmer C. 1998.** Fungal symbioses with orchid protocorms. *Symbiosis* **25**: 29-55.
- Pfeffer PE, Douds Jr DD, Becard G, Shachar-Hill Y. 1999.** Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* **120**: 587-598.
- Pharis RP, King RW. 1985.** Gibberellins and Reproductive Development in Seed Plants. *Annual Review of Plant Physiology* **36**: 517-568.
- Phillips AL, Ward DA, Uknes S, Appleford NEJ, Lange T, Huttly AK, Gaskin P, Graebe JE, Hedden P. 1995.** Isolation and Expression of Three Gibberellin 20-Oxidase cDNA Clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **108**: 1049-1057.
- Phillips A. 2010.** Genetic and Transgenic Approaches to Improving Crop Performance. In: Davies P, ed. *Plant Hormones*. Springer Netherlands, 618-645.

- Phillips DA. 1971.** Abscisic acid inhibition of root nodule initiation in *Pisum sativum*. *Planta* **100**: 181-190.
- Phillips JM, Hayman DS. 1970.** Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycology Society* **55**: 158-161.
- Pietikäinen A, Kytöviita MM. 2007.** Defoliation changes mycorrhizal benefit and competitive interactions between seedlings and adult plants. *Journal of Ecology* **95**: 639-647.
- Pirozynski KA, Malloch DW. 1975.** The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *Biosystems* **6**: 153-164.
- Pivato B, Offre P, Marchelli S, Barbonaglia B, Mougél C, Lemanceau P, Berta G. 2009.** Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza* **19**: 81-90.
- Porcel R, Ruiz-Lozano JM. 2004.** Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *Journal Experimental Botany* **55**: 1743-1750.
- Pozo MJ, Azcon-Aguilar C. 2007.** Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 393-398.
- Pozo MJ, Cordier C, Dumas-Gaudot E, Gianinazzi S, Barea JM, Azcon-Aguilar C. 2002.** Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *J.Exp.Bot.* **53**: 525-534.
- Preuss CP, Huang CY, Gilliham M, Tyerman SD. 2010.** Channel-like characteristics of the low-affinity barley phosphate transporter PHT1;6 when expressed in *Xenopus oocytes*. *Plant Physiology* **152**: 1431-1441.
- Pumplin N, Harrison MJ. 2009.** Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in *Medicago truncatula* roots during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* **151**: 809-819.
- Pumplin N, Mondo SJ, Topp S, Starker CG, Gantt JS, Harrison MJ. 2010.** *Medicago truncatula* Vapyrin is a novel protein required for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Journal* **61**: 482-494.
- Purin S, Morton J. 2011.** In situ analysis of anastomosis in representative genera of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **21**: 505-514.
- Pysh LD, Wysocka-Diller JW, Camilleri C, Bouchez D, Benfey PN. 1999.** The GRAS gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *The Plant Journal* **18**: 111-119.

- Qin X, Zeevaart JAD. 1999.** The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 15354-15361.
- Rademacher W. 2000.** Growth retardants: Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 501-531.
- Rademacher W. 2004.** Prohexadione-Ca induces resistance to fireblight and other diseases1. *EPPO Bulletin* **34**: 383-388.
- Rademacher W, Spinelli F, Costa G. 2006.** Prohexadione-Ca: modes of action of a multifunctional plant bioregulator for fruit tress. *Acta horticulture (ISHS)* **727**: 97-106.
- Rambelli A. 1973.** The Rhizosphere of mycorrhizae. In: Marks GL, Kolowski TT, eds. *Ectomycorrhizae*. New York: 299-343.
- Ramos AC, Façanha AR, Feijó JA. 2008.** Proton (H⁺) flux signature for the presymbiotic development of the arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **178**: 177-188.
- Rao MV, Davis KR. 2001.** The physiology of ozone induced cell death. *Planta* **213**: 682-690.
- Rasmussen HN. 2002.** Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil* **244**: 149-163.
- Rasmussen N, Lloyd DC, Ratcliffe RG, Hansen PE, Jakobsen I. 2000.** 31P NMR for the study of P metabolism and translocation in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **226**: 245-253.
- Razem FA, El Kereamy A, Abrams SR, Hill RD. 2006.** The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* **439**: 290-294.
- Razem FA, Luo M, Liu JH, Abrams SR, Hill RD. 2004.** Purification and Characterization of a Barley Aleurone Abscisic Acid-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 9922-9929.
- Rea PA. 2007.** Plant ATP-Binding Cassette Transporters. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 347-375.
- Rebers M, Kaneta T, Kawaide H, Yamaguchi S, Yang YY, Imai R, Sekimoto H, Kamiya Y. 1999.** Regulation of gibberellin biosynthesis genes during flower and early fruit development of tomato. *The Plant Journal* **17**: 241-250.
- Redecker D, Kodner R, Graham LE. 2000.** *Glomalean* fungi from the Ordovician. *Science* **289**: 1920-1921.
- Regvar M, Gogala N, Zalar P. 1996.** Effects of jasmonic acid on mycorrhizal *Allium sativum*. *New Phytologist* **134**: 703-707.

- Regvar M, Vogel-Mikus K, . 2008.** Arbuscular Mycorrhiza in Metal hyperaccumulating plants. In: Varma A, ed. *Mycorrhiza*. Berlin: 261-280.
- Reinhardt D. 2007.** Programming good relations--development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 98-105.
- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H. 1994.** Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**: 11841-11843.
- Requena N, Mann P, Franken P. 2000.** A homologue of the cell cycle check point TOR2 from *Saccharomyces cerevisiae* exists in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Protoplasma* **212**: 89-98.
- Requena N, Mann P, Hampp R, Franken P. 2002.** Early developmentally regulated genes in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*: Identification of *GmGIN1*, a novel gene with homology to the C-terminus of metazoan hedgehog proteins. *Plant and Soil* **244**: 129-139.
- Requena N, Serrano E, Ocon A, Breuninger M. 2007.** Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry* **68**: 33-40.
- Reynolds HL, Hartley AE, Vogelsang KM, Bever JD, Schultz PA. 2005.** Arbuscular mycorrhizal fungi do not enhance nitrogen acquisition and growth of old-field perennials under low nitrogen supply in glasshouse culture. *New Phytologist* **167**: 869-880.
- Riedel T, Groten K, Baldwin IT. 2008.** Symbiosis between *Nicotiana attenuata* and *Glomus intraradices*: Ethylene plays a role, jasmonic acid does not. *Plant, Cell and Environment* **31**: 1203-1213.
- Rillig MC, Steinberg PD. 2002.** Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: A mechanism of habitat modification? *Soil Biology and Biochemistry* **34**: 1371-1374.
- Rillig MC, Wright SF, Nichols KA, Schmidt WF, Torn MS. 2001.** Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant and Soil* **233**: 167-177.
- Risk JM, Macknight RC, Day CL. 2008.** FCA does not bind abscisic acid. *Nature* **456**: E5-E6.
- Robert N, Merlot S, N'Guyen V, Boisson-Dernier A, Schroeder JI. 2006.** A hypermorphic mutation in the protein phosphatase 2C HAB1 strongly affects ABA signaling in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* **580**: 4691-4696.
- Rochange SF. 2010.** Strigolactones and Their Role in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. In: Koltai H, Kapulnik Y, eds. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Bet Dagan, Israel: Springer Netherlands, 73-90.
- Rock CD. 2000.** Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytologist* **148**: 357-396.

- Ronen G, Carmel-Goren L, Zamir D, Hirschberg J. 2000.** An alternative pathway to β -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 11102-11107.
- Rook F, Corke F, Munz G, Smith C, Bevan MW. 2001.** Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. *The Plant Journal* **26**: 421-433.
- Ross ARS, Ambrose SJ, Cutler AJ, Allan Feurtado J, Kermode AR, Nelson K, Zhou R, Abrams SR. 2004.** Determination of endogenous and supplied deuterated abscisic acid in plant tissues by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring. *Analytical Biochemistry* **329**: 324-333.
- Ross JJ, Reid JB, Swain SM. 1995.** Genetic regulation of gibberellin deactivation in *Pisum*. *Plant Journal* **7**: 513-523.
- Ross JJ, Murfet IC, Reid JB. 1997.** Gibberellin mutants. *Physiologia Plantarum* **100**: 550-560.
- Ruiz-Lozano JM, Roussel H, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V. 1999.** Defense genes are differentially induced by a mycorrhizal fungus and *Rhizobium sp.* in wild-type and symbiosis-defective pea genotypes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**: 976-984.
- Ryan MH, McCully ME, Huang CX. 2007.** Relative amounts of soluble and insoluble forms of phosphorus and other elements in intraradical hyphae and arbuscules of arbuscular mycorrhizas. *Functional Plant Biology* **34**: 457-464.
- Ryerson E, Li A, Young JP, Heath MC. 1993.** Changes in abscisic acid levels in bean leaves during the initial stages of host and non-host reactions to rust fungi. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **43**: 265-273.
- Sagi M, Scazzocchio C, Fluhr R. 2002.** The absence of molybdenum cofactor sulfuration is the primary cause of the flacca phenotype in tomato plants. *The Plant Journal* **31**: 305-317.
- Saito M. 1995.** Enzyme activities of the internal hyphae and germinated spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall. *New Phytologist* **129**: 425-431.
- Saito M, Marumoto T. 2002.** Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi: The status quo in Japan and the future prospects. *Plant and Soil* **244**: 273-279.
- Saito S, Hirai N, Matsumoto C, Ohigashi H, Ohta D, Sakata K, Mizutani M. 2004.** *Arabidopsis* CYP707As Encode (+)-Abscisic Acid 8'-Hydroxylase, a Key Enzyme in the Oxidative Catabolism of Abscisic Acid. *Plant Physiology* **134**: 1439-1449.
- Sakamoto T, Miura K, Itoh H, Tatsumi T, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Agrawal GK, Takeda S, Abe K, Miyao A, Hirochika H, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka**

- M. 2004.** An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiology* **134**: 1642-1653.
- Salzer P, Corbière H, Boller T. 1999.** Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. *Planta* **208**: 319-325.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989.** *Molecular cloning a laboratory manual*. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanders FE, Tinker PB. 1973.** Phosphate flow into mycorrhizal roots. *Pesticide Science* **4**: 385-395.
- Sannazzaro AI, Alvarez CL, Menendez AB, Pieckenstain FL, Alberto EO, Ruiz OA. 2004.** Ornithine and arginine decarboxylase activities and effect of some polyamine biosynthesis inhibitors on *Gigaspora rosea* germinating spores. *FEMS Microbiology Letter* **230**: 115-121.
- Sauter A, Dietz KJ, Hartung W. 2002.** A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signalling. *Plant, Cell & Environment* **25**: 223-228.
- Sauter A, Hartung W. 2000.** Radial transport of abscisic acid conjugates in maize roots: its implication for long distance stress signals. *Journal of Experimental Botany* **51**: 929-935.
- Saxena PK, Rashid A. 1980.** Differentiation of bud-cell on the protonema of the moss *Anoectanquium fhomsonii*. Effect of aspirin and salicylic acid. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie* **99**: 187-189.
- Scervino JM, Ponce MA, Erra-Bassells R, Bompadre MJ, Vierheilig H, Ocampo JA, Godeas A. 2006.** Glycosidation of apigenin results in a loss of its activity on different growth parameters of arbuscular mycorrhizal fungi from the genus *Glomus* and *Gigaspora*. *Soil Biology and Biochemistry* **38**: 2919-2922.
- Scervino JM, Sampedro I, Ponce MA, Rodriguez MA, Ocampo JA, Godeas A. 2008.** Rhodotorulic acid enhances root colonization of tomato plants by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi due to its stimulatory effect on the pre-symbiotic stages of the AM fungi. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 2474-2476.
- Schaarschmidt S, González MC, Roitsch T, Strack D, Sonnewald U, Hause B. 2007.** Regulation of arbuscular mycorrhization by carbon. The symbiotic interaction cannot be improved by increased carbon availability accomplished by root-specifically enhanced invertase activity. *Plant Physiology* **143**: 1827-1840.
- Schaarschmidt S, Roitsch T, Hause B. 2006.** Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Journal of Experimental Botany* **57**: 4015-4023.

- Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM. 1998.** Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. *Plant Physiology* **116**: 447-453.
- Schliemann W, Ammer C, Strack D. 2008.** Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* **69**: 112-146.
- Schüßler A, Martin H, Cohen D, Fitz M, Wipf D. 2006.** Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi. *Nature* **444**: 933-936.
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C. 2001.** A new fungal phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution. *Mycological Research* **105**: 1413-1421.
- Schüßler A, Walker C. The Glomeromycota: a species list with new families and new genera. Schüßler, A., Walker, C., and Gloucester. Published in libraries at Royal Botanic Garden Edinburgh, Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University; freely available online at www.amf-phylogeny.com. 2010.
- Ref Type: Electronic Citation
- Schwartz SH, Qin X, Loewen MC. 2004.** The Biochemical Characterization of Two Carotenoid Cleavage Enzymes from *Arabidopsis* Indicates That a Carotenoid-derived Compound Inhibits Lateral Branching. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 46940-46945.
- Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JAD. 2003.** Elucidation of the Indirect Pathway of Abscisic Acid Biosynthesis by Mutants, Genes, and Enzymes. *Plant Physiology* **131**: 1591-1601.
- Schwartz SH, Tan BC, Gage DA, Zeevaart JAD, McCarty DR. 1997.** Specific Oxidative Cleavage of Carotenoids by *VP14* of Maize. *Science* **276**: 1872-1874.
- Schwarzott D, Walker C, Schussler A. 2001.** *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **21**: 190-197.
- Segura J. 2000a.** Citoquininas. In: Azcón-Bieto J, Talón M, eds. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Barcelona, España: 343-360.
- Segura J. 2000b.** Introducción al desarrollo. Concepto de hormona vegetal. In: Azcón-Bieto J, Talón M, eds. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Barcelona, España: 285-303.
- Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K. 2007.** Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 296-302.
- Seo M, Peeters AJM, Koiwai H, Oritani T, Marion-Poll A, Zeevaart JAD, Koornneef M, Kamiya Y, Koshiba T. 2000a.** The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 12908-12913.

- Seo M, Aoki H, Koiwai H, Kamiya Y, Nambara E, Koshihara T. 2004.** Comparative Studies on the *Arabidopsis* Aldehyde Oxidase (AAO) Gene Family Revealed a Major Role of AAO3 in ABA Biosynthesis in Seeds. *Plant and Cell Physiology* **45**: 1694-1703.
- Seo M, Koiwai H, Akaba S, Komano T, Oritani T, Kamiya Y, Koshihara T. 2000b.** Abscisic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **23**: 481-488.
- Serrani JC, Carrera E, Ruiz-Rivero O, Gallego-Giraldo L, Peres LEP, García-Martínez JL. 2010.** Inhibition of auxin transport from the ovary or from the apical shoot induces parthenocarpic fruit-set in tomato mediated by gibberellins. *Plant Physiology* **153**: 851-862.
- Serrani JC, Sanjuán R, Ruiz-Rivero O, Fos M, García-Martínez JL. 2007a.** Gibberellin regulation of fruit set and growth in tomato. *Plant Physiology* **145**: 246-257.
- Serrani JC, Ruiz-Rivero O, Fos M, García-Martínez JL. 2008.** Auxin-induced fruit-set in tomato is mediated in part by gibberellins. *The Plant Journal* **56**: 922-934.
- Serrani JC, Sanjuán R, Ruiz-Rivero O, Fos M, García-Martínez JL. 2007b.** Gibberellin Regulation of Fruit Set and Growth in Tomato. *Plant Physiology* **145**: 246-257.
- Shachar-Hill Y, Pfeffer PE, Douds D, Osman SF, Doner LW, Ratcliffe RG. 1995.** Partitioning of Intermediary Carbon Metabolism in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Leek. *Plant Physiology* **108**: 7-15.
- Sharp RE, LeNoble ME, Else MA, Thorne ET, Gherardi F. 2000.** Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1575-1584.
- Shaul-Keinan O, Gadkar V, Ginzberg I, Grünzweig JM, Chet I, Elad Y, Winer S, Belausov E, Eshed Y, Ben Tal Y, Kapulnik Y. 2002.** Hormone concentrations in tobacco roots change during arbuscular mycorrhizal colonization with *Glomus intraradices*. *New Phytologist* **154**: 501-507.
- Shekoofeh E, Sepideh H, Roya R. 2012.** Role of mycorrhizal fungi and salicylic acid in salinity tolerance of *Ocimum basilicum* resistance to salinity. *African Journal of Biotechnology* **11**: 2223-2235.
- Shen YY, Wang XF, Wu FQ, Du SY, Cao Z, Shang Y, Wang XL, Peng CC, Yu XC, Zhu SY, Fan RC, Xu YH, Zhang DP. 2006.** The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* **443**: 823-826.
- Sheng PP, Li M, Liu RJ. 2011.** Effects of agricultural practices on community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural ecosystem: A review. *Chinese Journal of Applied Ecology* **22**: 1639-1645.

- Shi L, Olszewski NE. 1998a.** Gibberellin and abscisic acid regulate *GAST1* expression at the level of transcription. *Plant Molecular Biology* **38**: 1053-1060.
- Shi L, Olszewski NE. 1998b.** Gibberellin and abscisic acid regulate *GAST1* expression at the level of transcription. *Plant Molecular Biology* **38**: 1053-1060.
- Siciliano V, Genre A, Balestrini R, Cappellazzo G, DeWit PJGM, Bonfante P. 2007.** Transcriptome analysis of arbuscular mycorrhizal roots during development of the prepenetration apparatus. *Plant Physiology* **144**: 1455-1466.
- Silberbush M, Barber S. 1983.** Sensitivity of simulated phosphorus uptake to parameters used by a mechanistic-mathematical model. *Plant and Soil* **74**: 93-100.
- Simon L, Bousquet J, Levesque RC, Lalonde M. 1993.** Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* **362**: 67-69.
- Sindhu RK, Walton DC. 1988.** Xanthoxin metabolism in cell-free preparations from wild type and wilted mutants of tomato. *Plant Physiology* **88**: 178-182.
- Singh R, Adholeya A, Mukerji KG. 2000.** Mycorrhiza in control of soil-borne pathogens. In: Mukerji KG, Chamola BP, Singh J, eds. *Mycorrhizal biology*. Kluwer, New York: 173-196.
- Sirrenberg A, Göbel C, Grond S, Czempinski N, Ratzinger A, Karlovsky P, Santos P, Feussner I, Pawlowski K. 2007.** *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. *Physiologia Plantarum* **131**: 581-589.
- Sisler EC, Serek M. 2003.** Compounds interacting with the ethylene receptor in plants. *Plant Biology* **5**: 473-480.
- Smith MW, Yamaguchi S, Ait-Ali T, Kamiya Y. 1998.** The First Step of Gibberellin Biosynthesis in Pumpkin Is Catalyzed by at Least Two Copalyl Diphosphate Synthases Encoded by Differentially Regulated Genes. *Plant Physiology* **118**: 1411-1419.
- Smith SE, Read DJ. 1997.** *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press. San Diego.
- Smith SE, Read DJ. 2008.** *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd ed. New York.
- Smith SE, Smith FA. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: New paradigms from cellular to ecosystem scales. 62, 227-250. 2011.
- Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I. 2003.** Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiology* **133**: 16-20.
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I. 2004.** Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: The contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytologist* **162**: 511-524.

- Solaiman M, Saito M. 1997.** Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry. *New Phytologist* **136**: 533-538.
- Son O, Hur YS, Kim YK, Lee HJ, Kim S, Kim MR, Nam KH, Lee MS, Kim BY, Park J, Park J, Lee SC, Hanada A, Yamaguchi S, Lee IJ, Kim SK, Yun DJ, Sderman E, Cheon CI. 2010.** ATHB12, an ABA-inducible homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) protein of arabidopsis, negatively regulates the growth of the inflorescence stem by decreasing the expression of a gibberellin 20-oxidase gene. *Plant and Cell Physiology* **51**: 1537-1547.
- Splivallo R, Fischer U, Göbel C, Feussner I, Karlovsky P. 2009.** Truffles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene. *Plant Physiology* **150**: 2018-2029.
- Sponsel VM. 1995.** Gibberellins biosynthesis and metabolism. Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. In: Davies PJ, ed. *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrech, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 66-97.
- St-Arnaud M, Hamel C, Vimard B, Caron M, Fortin J. 1996.** Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an in vitro system in the absence of host roots. *Mycological Research* **100**: 328-332.
- St-Arnaud M, Vujanovic V. 2007.** Effect of the arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant diseases and pests. In: Mamel C, Plenchette C, eds. *Mycorrhizae in crop production: applying knowledge*. Haworth, Binghampton, New York.
- Stockinger H, Walker C, Schussler A. 2009a.** 'Glomus intraradices DAOM197198', a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New Phytologist* **183**: 1176-1187.
- Stockinger H, Walker C, Schussler A. 2009b.** 'Glomus intraradices DAOM197198', a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New Phytologist* **183**: 1176-1187.
- Strack D, Fester T. 2006.** Isoprenoid metabolism and plastid reorganization in arbuscular mycorrhizal roots. *New Phytologist* **172**: 22-34.
- Stürmer SL. 2012.** A history of the taxonomy and systematics of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the phylum *Glomeromycota*. *Mycorrhiza* **22**: 247-258.
- Sugawara M, Okazaki S, Nukui N, Ezura H, Mitsui H, Minamisawa K. 2006.** Rhizobitoxine modulates plant-microbe interactions by ethylene inhibition. *Biotechnology Advances* **24**: 382-388.
- Sun TP, Kamiya Y. 1994.** The Arabidopsis *GAI* locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *The Plant Cell Online* **6**: 1509-1518.

- Sun Z, Hans J, Walter MH, Matusova R, Beekwilder J, Verstappen FW, Ming Z, van Echtelt E, Strack D, Bisseling T, Bouwmeester HJ. 2008.** Cloning and characterisation of a maize carotenoid cleavage dioxygenase (ZmCCD1) and its involvement in the biosynthesis of apocarotenoids with various roles in mutualistic and parasitic interactions. *Planta* **228**: 789-801.
- Suzuki A, Akune M, Kogiso M, Imagama Y, Osuki KI, Uchiumi T, Higashi S, Han SY, Yoshida S, Asami T, Abe M. 2004.** Control of nodule number by the phytohormone abscisic acid in the roots of two leguminous species. *Plant and Cell Physiology* **45**: 914-922.
- Takeda N, Sato S, Asamizu E, Tabata S, Parniske M. 2009.** Apoplastic plant subtilases support arbuscular mycorrhiza development in *Lotus japonicus*. *The Plant Journal* **58**: 766-777.
- Talón M. 2000.** Giberelinas. In: Azcón-Bieto J, Talón M, eds. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Barcelona, España: 325-341.
- Tamasloukht M, Sejalon-Delmas N, Kluever A, Jauneau A, Roux C, Becard G, Franken P. 2003.** Root factors induce mitochondrial-related gene expression and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Plant Physiologist* **131**: 1468-1478.
- Tan BC, Schwartz SH, Zeevaart JAD, McCarty DR. 1997.** Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 12235-12240.
- Tanaka N, Matsuoka M, Kitano H, Asano T, Kaku H, Komatsu S. 2006.** gid1, a gibberellin-insensitive dwarf mutant, shows altered regulation of probenazole-inducible protein (PBZ1) in response to cold stress and pathogen attack. *Plant, Cell and Environment* **29**: 619-631.
- Tanaka YOK, Yano KAT. 2005.** Nitrogen delivery to maize via mycorrhizal hyphae depends on the form of N supplied. *Plant, Cell & Environment* **28**: 1247-1254.
- Tawaraya K, Watanabe S, Vierheilig H, Wagatsuma T. 2007.** Formation of appressoria by the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* on roots of *Allium cepa* is linked with root age. *Mycoscience* **48**: 305-308.
- Taylor I, Linfoth RS, Al Naieb R, Bowman W, Marples B. 1988a.** The wilty tomato mutants *flacca* and *sitiens* are impaired in the oxidation of ABA-aldehyde to ABA. *Plant, Cell & Environment* **11**: 739-745.
- Taylor IB, Linfoth RS, Al Naieb R, Bowman W, Marples B. 1988b.** The wilty tomato mutants *flacca* and *sitiens* are impaired in the oxidation of ABA-aldehyde to ABA. *Plant, Cell & Environment* **11**: 739-745.
- Taylor TN, Remy W, Haas H, Kerp H. 1995.** Fossil arbuscular mycorrhizae from the early Devonian. *Mycologia* **87**: 560-573.

- Tehler A, Little DP, Farris JS. 2003.** The full-length phylogenetic tree from 1551 ribosomal sequences of chitinous fungi, *Fungi. Mycological Research* **107**: 901-916.
- Tejeda-Sartorius M, Martínez De La Vega O, Délano-Frier JP. 2008.** Jasmonic acid influences mycorrhizal colonization in tomato plants by modifying the expression of genes involved in carbohydrate partitioning. *Physiologia Plantarum* **133**: 339-353.
- Thaler JS, Bostock RM. 2004.** Interactions between abscisic-acid-mediated responses and plant resistance to pathogens and insects. *Ecology* **85**: 48-58.
- Thomas SG, Rieu I, Steber CM. Gibberellin Metabolism and Signaling. 72, 289-338. 2005.
Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- Thomas SG, Phillips AL, Hedden P. 1999.** Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 4698-4703.
- Thomas SG, Sun Tp. 2004.** Update on Gibberellin Signaling. A Tale of the Tall and the Short. *Plant Physiology* **135**: 668-676.
- Thornton TM, Swain SM, Olszewski NE. 1999.** Gibberellin signal transduction presents the SPY who O-GlcNAc'd me. *Trends in Plant Science* **4**: 424-428.
- Tian C, Kasiborski B, Koul R, Lammers PJ, Bucking H, Shachar-Hill Y. 2010.** Regulation of the nitrogen transfer pathway in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: Gene characterization and the coordination of expression with nitrogen flux. *Plant Physiology* **153**: 1175-1187.
- Tieman DM, Taylor MG, Ciardi JA, Klee HJ. 2000.** The tomato ethylene receptors NR and LeETR4 are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 5663-5668.
- Tirichine L, Imaizumi-Anraku H, Yoshida S, Murakami Y, Madsen LH, Miwa H, Nakagawa T, Sandal N, Albrechtsen AS, Kawaguchi M, Downie A, Sato S, Tabata S, Kouchi H, Parniske M, Kawasaki S, Stougaard J. 2006.** Deregulation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* **441**: 1153-1156.
- Tisserant B, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S, Gollotte A. 1993.** In planta histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycological Research* **97**: 245-250.
- Tisserant E, Kohler A, Dozolme-Seddas P, Balestrini R, Benabdellah K, Colard A, Croll D, Da Silva C, Gomez SK, Koul R, Ferrol N, Fiorilli V, Formey D, Franken P, Helber N, Hijri M, Lanfranco L, Lindquist E, Liu Y, Malbreil M, Morin E, Poulain J, Shapiro H, Van Tuinen D, Waschke A, Azcón-Aguilar C, Bécard G, Bonfante P, Harrison MJ, Küster H,**

- Lammers P, Paszkowski U, Requena N, Rensing SA, Roux C, Sanders IR, Shachar-Hill Y, Tuskan G, Young JPW, Gianinazzi-Pearson V, Martin F. 2012.** The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytologist* **193**: 755-769.
- Tobar RJ, Azcón R, Barea JM. 1994.** Improved nitrogen uptake and transport from ¹⁵N-labelled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water-stressed conditions. *New Phytologist* **126**: 119-122.
- Todoroki Y, Hirai N, Koshimizu K. 1995.** 8',8'-Difluoro- and 8',8',8'-trifluoroabscisic acids as highly potent, long-lasting analogues of abscisic acid. *Phytochemistry* **38**: 561-568.
- Todoroki Y, Sawada M, Matsumoto M, Tsukada S, Ueno K, Isaka M, Owaki M, Hirai N. 2004.** Metabolism of 5' α ,8'-cycloabscisic acid, a highly potent and long-lasting abscisic acid analogue, in radish seedlings. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **12**: 363-370.
- Tominaga A, Nagata M, Futsuki K, Abe H, Uchiumi T, Abe M, Kucho KI, Hashiguchi M, Akashi R, Hirsch A, Arima S, Suzuki A. 2010.** Effect of abscisic acid on symbiotic nitrogen fixation activity in the root nodules of *Lotus japonicus*. *Plant Signaling and Behavior* **5**: 440-443.
- Tommerup IC. 1983.** Temperature relations of spore germination and hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Transactions of the British Mycological Society* **81**: 381-387.
- Ton J, Van Pelt JA, van Loon LC, Pieterse CMJ. 2002.** Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**: 27-34.
- Torelli A, Trotta A, Acerbi L, Arcidiacono G, Berta G, Branca C. 2000.** IAA and ZR content in leek (*Allium porrum L.*), as influenced by P nutrition and arbuscular mycorrhizae, in relation to plant development. *Plant and Soil* **226**: 29-35.
- Toyomasu T, Kawaide H, Sekimoto H, von Numer C, Phillips AL, Hedden P, Kamiya Y. 1997.** Cloning and characterization of a cDNA encoding gibberellin 20-oxidase from rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiologia Plantarum* **99**: 111-118.
- Trappe JM. 1986.** Mycorrhizal fungi as determinants of plant successional patterns. *American Journal of Botany* **73**: 694.
- Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V. 1986.** Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. Paris, France: 217-221.

- Trouvelot S, van Tuinen D, Hijri M, Gianinazzi-Pearson V. 1999.** Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of *glomalean* fungi by fluorescence in situ hybridization. *Mycorrhiza* **8**: 203-206.
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow Ty, Hsing Yi, Kitano H, Yamaguchi I, Matsuoka M. 2005.** GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437**: 693-698.
- Ueguchi-Tanaka M, Nakajima M, Motoyuki A, Matsuoka M. 2007.** Gibberellin Receptor and Its Role in Gibberellin Signaling in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 183-198.
- Ueno O. 1998.** Induction of kranz anatomy and C4-like biochemical characteristics in a submerged amphibious plant by abscisic acid. *Plant Cell* **10**: 571-583.
- Ullah H, Chen JG, Young JC, Im KH, Sussman MR, Jones AM. 2001.** Modulation of Cell Proliferation by Heterotrimeric G Protein in *Arabidopsis*. *Science* **292**: 2066-2069.
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kyojuka J, Yamaguchi S. 2008.** Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**: 195-200.
- Umezawa T, Sugiyama N, Mizoguchi M, Hayashi S, Myouga F, Yamaguchi-Shinozaki K, Ishihama Y, Hirayama T, Shinozaki K. 2009.** Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 17588-17593.
- Vadassery J, Ritter C, Venus Y, Camehl I, Varma A, Shahollari B, Novák O, Strnad M, Ludwig-Müller J, Oelmüller R. 2008.** The role of auxins and cytokinins in the mutualistic interaction between *Arabidopsis* and *Piriformospora indica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 1371-1383.
- Valentine AJ, Osborne BA, Mitchell DT. 2001.** Interactions between phosphorus supply and total nutrient availability on mycorrhizal colonization, growth and photosynthesis of cucumber. *Scientia Horticulturae* **88**: 177-189.
- Valot B, Negroni L, Zivy M, Gianinazzi S, Dumas-Gaudot E. 2006.** A mass spectrometric approach to identify arbuscular mycorrhiza-related proteins in root plasma membrane fractions. *Proteomics* **6 Suppl 1**: S145-S155.
- Van Aarle IM, Olsson PA. 2003.** Fungal Lipid Accumulation and Development of Mycelial Structures by Two Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 6762-6767.
- van Loon LC, Bakker PA, Pieterse CM. 1998.** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **36**: 453-483.

- Van Tuinen A, Peters AHLJ, Kendrick RE, Zeevaart JAD, Koornneef M. 1999.** Characterisation of the procer mutant of tomato and the interaction of gibberellins with end-of-day far-red light treatments. *Physiologia Plantarum* **106**: 121-128.
- Varbanova M, Yamaguchi S, Yang Y, McKelvey K, Hanada A, Borochoy R, Yu F, Jikumaru Y, Ross J, Cortes D, Ma CJ, Noel JP, Mander L, Shulaev V, Kamiya Y, Rodermel S, Weiss D, Pichersky E. 2007.** Methylation of Gibberellins by Arabidopsis GAMT1 and GAMT2. *The Plant Cell Online* **19**: 32-45.
- Varma Penmetsa R, Uribe P, Anderson J, Lichtenzveig J, Gish JC, Nam YW, Engstrom E, Xu K, Sckisel G, Pereira M, Baek JM, Lopez-Meyer M, Long SR, Harrison MJ, Singh KB, Kiss GB, Cook DR. 2008.** The *Medicago truncatula* ortholog of Arabidopsis EIN2, sickle, is a negative regulator of symbiotic and pathogenic microbial associations. *Plant Journal* **55**: 580-595.
- Vick BA, Zimmerman DC. 1983.** The biosynthesis of jasmonic acid: A physiological role for plant lipoxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **111**: 470-477.
- Vidal AM, Gisbert C, Talón M, Primo-Millo E, López-Díaz I, García-Martínez JL. 2001.** The ectopic overexpression of a citrus gibberellin 20-oxidase enhances the non-13-hydroxylation pathway of gibberellin biosynthesis and induces an extremely elongated phenotype in tobacco. *Physiologia Plantarum* **112**: 251-260.
- Viereck N, Hansen PE, Jakobsen I. 2004.** Phosphate pool dynamics in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* studied by in vivo ³¹P NMR spectroscopy. *New Phytologist* **162**: 783-794.
- Vierheilig H. 2004a.** Further root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in already mycorrhizal plants is suppressed after a critical level of root colonization. *Journal of Plant Physiology* **161**: 339-341.
- Vierheilig H. 2004b.** Regulatory mechanisms during the plant - Arbuscular mycorrhizal fungus interaction. *Canadian Journal of Botany* **82**: 1166-1176.
- Vierheilig H, Alt M, Mohr U, Boller T, Weimken A. 1994.** Ethylene biosynthesis and activities of chitinase and beta-1, 3-glucanase in the roots of host and non-host plants of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after inoculation with *Glomus mosseae*. *Journal of Plant Physiology* **143**: 337-343.
- Vierheilig H, Lerat S, Piché Y. 2003.** Systemic inhibition of arbuscular mycorrhiza development by root exudates of cucumber plants colonized by *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* **13**: 167-170.

- Vierheilig H, Piché Y. Signalling in arbuscular mycorrhiza: Facts and hypotheses. 505, 23-39. 2002.
- Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- Vierheilig H, Steinkellner S, Khaosaad T, García-Garrido JM. 2008.** The biocontrol effect of mycorrhization on soilborne fungal pathogens and the autoregulation of the AM symbiosis: one mechanism, two effects? In: Varma A, ed. *Mycorrhiza*. Berlin: 307-320.
- Vierheilig H, Iseli B, Alt M, Raikhel N, Wiemken A, Boller T. 1996.** Resistance of *Urtica dioica* to mycorrhizal colonization: a possible involvement of *Urtica dioica* agglutinin. *Plant and Soil* **183**: 131-136.
- von Alten H, Lindemann A, Schönbeck F. 1993.** Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza by fungicides or rhizosphere bacteria. *Mycorrhiza* **2**: 167-173.
- Vos C, Geerinckx K, Mkandawire R, Panis B, de Waele D, Elsen A. 2012.** Arbuscular mycorrhizal fungi affect both penetration and further life stage development of root-knot nematodes in tomato. *Mycorrhiza* **22**: 157-163.
- Walker C. 1995.** AM or VAM? what's in a word? In: Varma A, Hock B, eds. *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer, Berlin, Germany: 25-26.
- Walker C, Schüßler A. 2004.** Nomenclatural clarifications and new taxa in the *Glomeromycota pacispora*. *Mycological Research* **108**: 981-982.
- Walker-Simmons MK, Rose PA, Hogge LR, Abrams SR. 2000.** Abscisic acid. ABA immunoassay and gas chromatography/mass spectrometry verification. *Methods Molecular Biology* **141**: 33-47.
- Walter MH, Floss DS, Hans J, Fester T, Strack D. 2007.** Apocarotenoid biosynthesis in arbuscular mycorrhizal roots: contributions from methylerythritol phosphate pathway isogenes and tools for its manipulation. *Phytochemistry* **68**: 130-138.
- Walters DR, McRoberts N. 2006.** Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? *Trends in Plant Science* **11**: 581-586.
- Wan MT, Rahe JE. 1998.** Impact of azadirachtin on *Glomus intraradices* and vesicular-arbuscular mycorrhiza in root inducing transferred DNA transformed roots of *Daucus carota*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**: 2041-2050.
- Wang XQ, Ullah H, Jones AM, Assmann SM. 2001.** G Protein Regulation of Ion Channels and Abscisic Acid Signaling in *Arabidopsis* Guard Cells. *Science* **292**: 2070-2072.
- Wasilewska A, Vlad F, Sirichandra C, Redko Y, Jammes F, Valon C, Frey NF, Leung J. 2008.** An Update on Abscisic Acid Signaling in Plants and More. *Molecular plant* **1**: 198-217.

- Wasternack C, Hause B. 2002.** Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **72**: 165-221.
- Watson GW. 2006.** The effect of paclobutrazol treatment on starch content, mycorrhizal colonization, and fine root density of white oaks (*Quercus alba L.*). *Arboriculture and Urban Forestry* **32**: 114-117.
- Weidmann S, Sanchez L, Descombin J, Chatagnier O, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V. 2004.** Fungal elicitation of signal transduction-related plant genes precedes mycorrhiza establishment and requires the *dmi3* gene in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 1385-1393.
- Wells G, Huston C. 1995.** High-resolution selected ion monitoring in a quadrupole ion trap mass spectrometer. *Analytical Chemistry* **67**: 3650-3655.
- Weston DE, Elliott RC, Lester DR, Rameau C, Reid JB, Murfet IC, Ross JJ. 2008.** The pea DELLA proteins LA and CRY are important regulators of gibberellin synthesis and root growth. *Plant Physiology* **147**: 199-205.
- White CN, Proebsting WM, Hedden P, Rivin CJ. 2000.** Gibberellins and seed development in maize. I. Evidence that gibberellin/abscisic acid balance governs germination versus maturation pathways. *Plant Physiology* **122**: 1081-1088.
- Wilkinson S, Davies WJ. 1997.** Xylem Sap pH Increase: A Drought Signal Received at the Apoplastic Face of the Guard Cell That Involves the Suppression of Saturable Abscisic Acid Uptake by the Epidermal Symplast. *Plant Physiology* **113**: 559-573.
- Wilkinson S, Davies WJ. 2002.** ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell & Environment* **25**: 195-210.
- Williams LE, Lemoine R, Sauer N. 2000.** Sugar transporters in higher plants--a diversity of roles and complex regulation. *Trends in Plant Science* **5**: 283-290.
- Woodhead M, Jupe S, Scott I. 1997.** The pro Gene Causes an Enhanced Cell Expansion Response to Fusicoccin in Tomato. *J Plant Growth Regul* **16**: 69-71.
- Wright DP, Scholes JD, Read DJ. 1998.** Effects of VA mycorrhizal colonization on photosynthesis and biomass production of *Trifolium repens L.* *Plant, Cell & Environment* **21**: 209-216.
- Wright SF, Green VS, Cavigelli MA. 2007.** Glomalin in aggregate size classes from three different farming systems. *Soil and Tillage Research* **94**: 546-549.
- Wu PH, Huang DD, Chang DCN. 2011.** Mycorrhizal symbiosis enhances *Phalaenopsis* orchid's growth and resistance to *Erwinia chrysanthemi*. *African Journal of Biotechnology* **10**: 10095-10100.

- Wulfsohn D, Nyengaard JR. 1999.** Simple stereological procedure to estimate the number and dimensions of root hairs. *Plant and Soil* **209**: 129-136.
- Xavier LJC, Boyetchko SM. 2004.** Arbuscular mycorrhizal fungi in plant disease control. In: Arora DK, ed. *Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications*. Dekker, New York: 183-194.
- Xie X, Yoneyama K, Harada Y, Fusegi N, Yamada Y, Ito S, Yokota T, Takeuchi Y, Yoneyama K. 2009.** Fabacyl acetate, a germination stimulant for root parasitic plants from *Pisum sativum*. *Phytochemistry* **70**: 211-215.
- Xing Y, Jia W, Zhang J. 2008.** AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H₂O₂ production via AtMPk6-coupled signaling in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **54**: 440-451.
- Xiong L, Lee H, Ishitani M, Zhu JK. 2002.** Regulation of Osmotic Stress-responsive Gene Expression by the LOS6/ABA1 Locus in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 8588-8596.
- Xiong L, Zhu JK. 2003.** Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis. *Plant Physiology* **133**: 29-36.
- Xu GH, Chague V, Melamed-Bessudo C, Kapulnik Y, Jain A, Raghothama KG, Levy AA, Silber A. 2007.** Functional characterization of LePT4: A phosphate transporter in tomato with mycorrhiza-enhanced expression. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2491-2501.
- Yamaguchi S. 2008.** Gibberellin Metabolism and its Regulation. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 225-251.
- Yamaguchi S, Kamiya Y. 2000.** Gibberellin Biosynthesis: Its Regulation by Endogenous and Environmental Signals. *Plant and Cell Physiology* **41**: 251-257.
- Yamaguchi S, Saito T, Abe H, Yamane H, Murofushi N, Kamiya Y. 1996.** Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the gibberellin biosynthetic enzyme *ent*-kaurene synthase B from pumpkin (*Cucurbita maxima* L.). *The Plant Journal* **10**: 203-213.
- Yamaguchi S, Sun Tp, Kawaide H, Kamiya Y. 1998.** The *GA2* Locus of *Arabidopsis thaliana* Encodes *ent*-Kaurene Synthase of Gibberellin Biosynthesis. *Plant Physiology* **116**: 1271-1278.
- Yang DL, Li Q, Deng YW, Lou YG, Wang MY, Zhou GX, Zhang YY, He ZH. 2008.** Altered disease development in the *eui* mutants and *Eui* overexpressors indicates that gibberellins negatively regulate rice basal disease resistance. *Molecular plant* **1**: 528-537.
- Yano K, Yamauchi A, Kono Y. 1996.** Localized alteration in lateral root development in roots colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycorrhiza* **6**: 409-415.
- Yendrek CR, Lee YC, Morris V, Liang Y, Pislariu CI, Burkart G, Meckfessel MH, Salehin M, Kessler H, Wessler H, Lloyd M, Lutton H, Teillet A, Sherrier DJ, Journet EP, Harris**

- JM, Dickstein R. 2010.** A putative transporter is essential for integrating nutrient and hormone signaling with lateral root growth and nodule development in *Medicago truncatula*. *Plant Journal* **62**: 100-112.
- Yoneyama K, Xie X, Kusumoto D, Sekimoto H, Sugimoto Y, Takeuchi Y, Yoneyama K. 2007.** Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystrigol, the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. *Planta* **227**: 125-132.
- Yoneyama K, Xie X, Sekimoto H, Takeuchi Y, Ogasawara S, Akiyama K, Hayashi H, Yoneyama K. 2008.** Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants. *New Phytologist* **179**: 484-494.
- Yu TE, Egger KN, Peterson LR. 2001.** Ectendomycorrhizal associations - Characteristics and functions. *Mycorrhiza* **11**: 167-177.
- Zacarías L, Lafuente MT. 2000.** Etileno, ácido abscísico y otros reguladores del desarrollo. In: Azcón-Bieto J, Talón M, eds. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Barcelona, España: 361-376.
- Zaharia LI, Galka MM, Ambrose SJ, Abrams SR. 2005.** Preparation of deuterated abscisic acid metabolites for use in mass spectrometry and feeding studies. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **48**: 435-445.
- Zeevaart JAD, Creelman RA. 1988.** Metabolism and Physiology of Abscisic Acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**: 439-473.
- Zhang DP, Chen SE, Peng YB, Shen YY. 2001.** Abscisic acid-specific binding sites in the flesh of developing apple fruit. *Journal of Experimental Botany* **52**: 2097-2103.
- Zhang J, Jia W, Yang J, Ismail AM. 2006.** Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research* **97**: 111-119.
- Zhang M, Duan L, Tian X, He Z, Li J, Wang B, Li Z. 2007.** Uniconazole-induced tolerance of soybean to water deficit stress in relation to changes in photosynthesis, hormones and antioxidant system. *Journal of Plant Physiology* **164**: 709-717.
- Zhang Q, Blaylock LA, Harrison MJ. 2010.** Two *Medicago truncatula* half-ABC transporters are essential for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Cell* **22**: 1483-1497.
- Zhou R, Cutler AJ, Ambrose SJ, Galka MM, Nelson KM, Squires TM, Loewen MK, Jadhav AS, Ross ARS, Taylor DC, Abrams SR. 2004.** A New Abscisic Acid Catabolic Pathway. *Plant Physiology* **134**: 361-369.
- Zhu Y, Nomura T, Xu Y, Zhang Y, Peng Y, Mao B, Hanada A, Zhou H, Wang R, Li P, Zhu X, Mander LN, Kamiya Y, Yamaguchi S, He Z. 2006.** ELONGATED UPPERMOST

INTERNODE Encodes a Cytochrome P450 Monooxygenase That Epoxidizes Gibberellins in a Novel Deactivation Reaction in Rice. *The Plant Cell Online* **18**: 442-456.

Zocco D, Fontaine J, Lozanova E, Renard L, Bivort C, Durand R, Grandmougin-Ferjani A, Declerck S. 2008. Effects of two sterol biosynthesis inhibitor fungicides (fenpropimorph and fenhexamid) on the development of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycological Research* **112**: 592-601.

Zou J, Abrams GD, Barton DL, Taylor DC, Pomeroy MK, Abrams SR. 1995. Induction of Lipid and Oleosin Biosynthesis by (+)-Abscisic Acid and Its Metabolites in Microspore-Derived Embryos of *Brassica napus* L.cv Reston (Biological Responses in the Presence of 8'-Hydroxyabscisic Acid). *Plant Physiology* **108**: 563-571.

Zsögön A, Lambais MR, Benedito VA, Figueira AVDO, Peres LEP. 2008. Reduced arbuscular mycorrhizal colonization in tomato ethylene mutants. *Scientia Agricola* **65**: 259-267.