



Estudio del papel del ácido jasmónico (JA) como señal reguladora del proceso de micorrización arbuscular en Solanáceas

**Rafael Jorge León Morcillo
Granada, 2013**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autor: Rafael Jorge León Morcilla

ISBN: 978-84-9083-353-7

URI: <http://hdl.handle.net/10481/48527>



Universidad de Granada
Facultad de Ciencias
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

TESIS DOCTORAL

Estudio del papel del ácido jasmónico (JA) como señal reguladora del proceso de micorrización arbuscular en Solanáceas

Memoria presentada por D. Rafael Jorge León Morcillo, Licenciado en Ciencias Ambientales, para optar al grado de Doctor

Fdo.: **Rafael Jorge León Morcillo**

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
Junio, 2013

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”), de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC).

Para la realización del siguiente trabajo, el Ldo. Rafael Jorge León Morcillo fue financiado por las siguientes fuentes:

- Beca Predoctoral del Programa de Junta de Ampliación de Estudios (JAE) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), disfrutada desde el 1 de septiembre de 2008 hasta el 31 de agosto de 2012.
- Proyectos de Investigación del Plan Nacional del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) (AGL2008-00742/AGR) y de la Junta de Andalucía (Grupo de Investigación BIO 260).
- Beca de movilidad JAE para estancias breves del CSIC, disfrutada en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) (Departamento de Genética Molecular de Plantas), bajo la supervisión de la Dra. Salomé Prat Monguio. Realizada del 10 de Enero al 4 de Abril de 2011.

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

- **García-Garrido, J.M., León Morcillo, R.J., Martín-Rodríguez, J.A. and Ocampo Bote, J.A. (2010).** Variations in the Mycorrhization Characteristics in Roots of Wild-Type and ABA-Deficient Tomato Are Accompanied by Specific Transcriptomic Alterations. *Plant-Microbe Interactions*. **23 (5)**: 651-664.
- **León Morcillo, R.J., Martín-Rodríguez, J.A., Vierheiling, H., Ocampo Bote, J.A. and García-Garrido, J.M. (2012).** Late activation of the 9-oxylipin pathway during arbuscular mycorrhiza formation in tomato and its regulation by jasmonate-signalling. *Journal of Experimental Botany*. **63 (10)**: 3545-3558.
- **León Morcillo, R.J., Ocampo Bote, J.A. and García-Garrido, J.M. (2012).** 9-LOX oxylipin metabolism in response to arbuscular micorrhiza. *Plant Signaling and Behaviour*. **7 (12)**: 1584-1588.

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: Comunicación oral.
- 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.
- 3rd meeting of Efficient plant-AM interaction (Évora – Portugal, Julio de 2010). Tipo de participación: Comunicación oral.
- XI Reunión de Biología Molecular de Plantas (Segovia, Junio de 2012). Tipo de participación: Póster.

El doctorando Rafael Jorge León Morcillo y el director de la tesis D. José Manuel García Garrido Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada a 29 de Mayo de 2013

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.:

Fdo.:

I. INTERÉS Y OBJETIVOS EL TRABAJO.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	5
1. LAS MICORRIZAS.....	7
2. MICORRIZAS ARBUSCULARES.....	9
2.1 Efectos beneficiosos de la simbiosis MA.....	10
2.2 Micorrizas arbusculares como agentes biológicos.....	12
2.3 Factores determinantes en la simbiosis micorriza arbuscular.....	13
2.4 Clasificación filogenética de hongos formadores de micorrizas arbusculares.....	15
2.5 Formación de la simbiosis micorriza arbuscular.....	16
2.5.1 Fase presimbiótica.....	18
2.5.2 Fase simbiótica.....	19
2.6 <i>Glomus intraradices</i>	23
3. DIÁLOGO MOLECULAR EN LA INTERACCIÓN PLANTA-HONGO MA..	25
3.1 Fase presimbiótica.....	25
3.1.1 Germinación de esporas.....	25
3.1.2 Crecimiento y ramificación de las hifas.....	26
3.1.3 Formación del apresorio.....	28
3.2 Fase simbiótica.....	29
3.2.1 Penetración de la hifa radical.....	29
3.2.2 Desarrollo intracelular de las hifas.....	30
3.2.3 Formación de los arbusculos.....	31
4. REGULACIÓN DE LA MICORRIZACIÓN.....	34
4.1 Participación del fósforo en la regulación de la micorrización.....	34
4.2 Regulación de la respuesta defensiva en plantas micorrizadas.....	38
4.2.1 Inducción de la respuesta defensiva en las plantas durante la Micorrización.....	39
4.2.2 Supresión de la respuesta defensiva de las plantas durante la Micorrización.....	40
4.3 Participación de las hormonas vegetales en la regulación de la Micorrización.....	42
4.3.1 Auxinas.....	42
4.3.2 Citoquininas.....	45

4.3.3 Giberelinas.....	46
4.3.4 Estrigolactonas.....	48
4.3.5 Etileno.....	49
4.3.6 Ácido abscísico.....	51
4.3.7 Ácido Salicílico.....	54
5. PARTICIPACIÓN DE LAS OXILIPINAS EN LA REGULACIÓN DE LA MICORRIZACIÓN.....	55
5.1 Ruta de biosíntesis de oxilipinas.....	57
5.1.1 Ruta de biosíntesis de 9 y 13-LOX-CYP74 oxilipinas en plantas.....	59
5.1.2 Ruta de señalización de los jasmonatos (rama AOS de la vía 13-LOX)	62
5.2 Funciones de las oxilipinas en plantas.....	65
5.2.1 Funciones en plantas derivadas de la actividad enzimática de Dioxigenasas.....	65
5.2.2 Funciones de jasmonatos en plantas.....	66
5.2.3 Funciones en planta de otras oxilipinas de la vía 13-LOX-CYP74.....	72
5.2.4 Funciones en planta de oxilipinas de la vía 9-LOX.....	73
5.3 Participación de las oxilipinas en otras interacciones simbióticas mutualistas en plantas.....	76
5.4 Participación de las oxilipinas en la regulación de la micorrización.....	78
5.4.1 Participación de los jasmonatos en la regulación de la micorrización...	78
5.4.2 Participación de la vía 9-LOX en la regulación de la micorrización....	81
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	83
1. VARIEDADES DE PLANTAS EMPLEADAS.....	85
1.1 Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	85
1.2 Patata (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	86
2. CONDICIONES DE CULTIVO.....	86
2.1 Esterilización de las semillas de tomate.....	86
2.2 Selección de semillas jai1/jai1.....	87
2.3 Cultivo in vitro.....	88
2.4 Sustrato y condiciones de cultivo.....	89
2.5 Tratamientos hormonales.....	91
2.5.1 Tratamientos con metil jasmonato (MeJA).....	91
2.5.2 Tratamiento con ácido abscísico (ABA).....	92

2.5.3 Tratamiento con ethephon (ácido 2-cloroetilfosfónico, Et).....	92
2.5.4 Tratamiento con giberelinas (GA ₃).....	92
2.5.5 Tratamiento con ácido salicílico (SA).....	92
2.5.6 Control en los tratamientos de aplicación hormonal.....	92
2.6 Sistema de cultivo de raíces compartimentalizadas.....	93
3. DETERMINACIÓN DE NIVELES DE HORMONAS EN RAÍCES.....	94
3.1 Extracción y cuantificación de etileno en raíces de tomate.....	94
3.2 Extracción y cuantificación de ácido abscísico en raíces de tomate.....	96
3.3 Extracción y cuantificación de oxilipinas en raíces de tomate.....	97
4. MATERIAL FÚNGICO.....	98
5. DETERMINACIÓN DE LA COLONIZACIÓN DEL HONGO MICORRÍCICO.....	99
5.1 Tinción con azul de tripán	99
5.2 Tinción de la actividad fosfatasa alcalina (ALP).....	100
5.3 Determinación de los parámetros de micorrización.....	101
6. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	102
6.1 Extracción de ARN de raíces.....	102
6.2 Extracción de ADN.....	104
6.3 Cuantificación de ácidos nucleicos.....	106
6.4 Síntesis de ADN complementario.....	106
6.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	106
6.5.1 PCR semicuantitativa.....	107
6.5.2 PCR cuantitativa.....	107
6.5.3 Cebadores utilizados.....	109
6.6 Electroforesis en gel de agarosa.....	111
7. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO.....	112
7.1 Extracción de ARN.....	112
7.2 Síntesis de ARNc biotilado.....	112
7.3 Hibridación.....	113
7.4 Análisis de datos.....	113
8. CONSTRUCCIÓN GÉNICA.....	114
8.1 Sistema de clonación y amplificación del gen.....	114
8.2 Purificación del producto de PCR.....	114

8.3 Ligación en vector primario pENTR™/D-TOPO®	115
8.4 Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	115
8.5 Transformación de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	117
8.6 Aislamiento y purificación del ADN plasmídico	117
8.7 Digestión de ADN mediante enzimas de restricción	118
8.8 Secuenciación	118
8.9 Ligación en vector de clonación binario	119
8.10 Preparación de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	119
8.11 Transformación de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	121
9. PRODUCCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE PATATA	122
9.1 Preparación de células de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformadas	122
9.2 Procedimiento de transformación	122
9.3 Análisis de plantas transformadas	125
9.3.1 Extracción de AND genómico	125
9.3.2 Amplificación por PCR de secuencias específicas de T-DNA	127
9.3.3 Análisis del nivel de expresión del gen clonado	127
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	128
IV. RESULTADOS	129
1. ANÁLISIS DEL PERFIL TRANSCRIPTÓMICO ASOCIADO AL PROCESO DE MICORRIZACIÓN EN PLANTAS DE TOMATE	131
1.1 Análisis transcriptómico de la expresión génica según el contenido de ABA en la raíz	132
1.2 Anotación, identificación y asignación de funciones de los genes seleccionados	135
1.2.1 Inducción de genes de respuesta defensiva y metabolismo de la pared celular asociada a la micorrización de mutantes <i>sitiens</i> deficientes en ABA	139
1.2.2 Inducción de genes relacionados con el metabolismo de isoprenoides en plantas de tomate silvestres micorrizadas	140
1.3 Activación de genes implicados en el metabolismo de oxilipinas durante la simbiosis micorriza arbuscular	143
1.4 Análisis mediante qRT-PCR de genes representativos	144

1.5 Análisis de respuesta a tratamientos con fitohormonas de genes representativos.....	146
1.6 Análisis de la expresión génica de los genes implicados en el metabolismo de oxilipinas en diferentes etapas del desarrollo de la simbiosis micorriza arbuscular.....	148
2. PARTICIPACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN EL METABOLISMO 9-LOX DE OXILIPINAS DURANTE EL PROCESO DE MICORRIZACIÓN...	153
2.1 Análisis del patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 9-LOX durante el proceso de formación de Micorriza Arbuscular en plantas de tomate.....	154
2.2 Análisis del posible efecto sistémico sobre la expresión de genes involucrados en el metabolismo 9-LOX debido a la formación de Micorriza Arbuscular en plantas de tomate.....	158
2.3 Análisis de la expresión de genes involucrados en el metabolismo 9-LOX en respuesta a tratamientos con fitohormonas en plantas de tomate.....	163
2.4 Análisis de micorrización y del patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 9-LOX en plantas mutantes de tomate alteradas en la vía de señalización del JA.....	166
2.4.1 Micorrización y análisis del patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 9-LOX en plantas mutantes de tomate alteradas en la biosíntesis de JA.....	166
2.4.2 Micorrización y análisis del patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 9-LOX en plantas mutantes de tomate alteradas en la percepción de JA.....	171
2.4.3 Efectos sobre la micorrización y el patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 9-LOX debidos a la aplicación exógena de MeJA en plantas mutantes de tomate <i>spr-2</i>	177
3. PARTICIPACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN EL METABOLISMO 13-LOX DE OXILIPINAS DURANTE EL PROCESO DE MICORRIZACIÓN...	180
3.1 Análisis del patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX durante el proceso de micorrización en plantas de tomate.....	181
3.2 Análisis del posible efecto sistémico sobre la expresión de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX debido a la formación de	

Micorriza Arbuscular en plantas de tomate.....	184
3.3 Análisis de la expresión de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX en respuesta a tratamientos con fitohormonas en plantas de tomate.....	187
3.4 Análisis del patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX en plantas mutantes de tomate alteradas en la vía de señalización del JA.....	190
3.4.1 Análisis del patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX en plantas mutantes de tomate alteradas en la biosíntesis de JA.....	191
3.4.2 Análisis del patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX en plantas mutantes de tomate alteradas en la percepción de JA.....	194
3.4.3 Efectos sobre la micorrización y el patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX debidos a la aplicación exógena de MeJA en plantas mutantes de tomate <i>spr-2</i>	197
3.5 Análisis del patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX en plantas mutantes de tomate alteradas en la síntesis de ABA.....	199
4. EFECTO DE LA ALTERACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN EL METABOLISMO DE OXILIPINAS SOBRE LA MICORRIZACIÓN ARBUSCULAR EN PLANTAS DE PATATA TRANSFORMADAS.....	203
4.1 Clonación y caracterización del gen <i>LeAos3</i> en plantas de tomate.....	203
4.1.1 Análisis teórico de la secuencia promotora del gen <i>LeAOS3</i>	207
4.1.2 Estudio del patrón de expresión del gen <i>LeAOS3</i> por órganos.....	210
4.2 Estudio de la función de <i>AOS3</i> en plantas de patata micorrizadas mediante pérdida de su expresión.....	211
4.2.1 Obtención de líneas mutantes mediante silenciamiento génico por ARN interferente.....	211
4.2.2 Análisis del efecto sobre la micorrización de la pérdida de función de <i>StAOS3</i> y del patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo de oxilipinas en plantas de patata.....	212
V. DISCUSIÓN.....	217
1. ANÁLISIS DEL PERFIL TRANSCRIPTÓMICO ASOCIADO AL PROCESO	

DE MICORRIZACIÓN EN PLANTAS DE TOMATE.....	219
1.1 Activación de la vía 9-LOX de oxilipinas en plantas micorrizadas.....	221
1.2 Inducción de genes relacionados con el metabolismo de isoprenoides en plantas de tomate silvestres micorrizadas.....	224
1.3 Inducción de genes de respuesta defensiva y metabolismo de la pared celular asociada a la micorrización de mutantes <i>sitiens</i> deficientes en ABA	228
2. PARTICIPACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN EL METABOLISMO DE OXILIPINAS DURANTE EL PROCESO DE MICORRIZACIÓN.....	231
VI. CONCLUSIONES.....	243
VII. ANEXOS.....	247
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	257

INTERÉS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

I. INTERÉS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

La simbiosis micorriza arbuscular (MA) es un tipo de relación mutualista que se establece entre la raíz de la mayoría de plantas superiores y los hongos del suelo del phylum *Glomeromycota*. Esta asociación se inicia con la colonización de la raíz por hifas provenientes de otras raíces o de esporas que se encuentran en el suelo. Tras la colonización de la raíz, el hongo forma dentro de la misma estructuras especializadas en el intercambio de nutrientes, denominadas arbusculos. El hongo formador de la micorriza arbuscular es un simbiote obligado que extrae la mayor parte de sus nutrientes de la raíz de la planta en forma de carbohidratos. A cambio, la simbiosis otorga importantes beneficios para la planta hospedadora. Así, el hongo micorrícico mejora la nutrición mineral de la planta hospedadora, principalmente fosforada, y participa en la mejora y conservación de las características físico-químicas del suelo. También se ha comprobado como las plantas micorrizadas ofrecen mayor resistencia a estreses abióticos, como el estrés hídrico o los cambios de pH o temperatura. Estas características convierten a la micorriza arbuscular en una potente alternativa al uso de numerosos compuestos agroquímicos, como pesticidas y abonos, que favorecerían la transformación del sistema de cultivo intensivo que se practica actualmente en otro más sostenibles, productivo y compatible con el medio ambiente.

Una de las claves de la compatibilidad y funcionamiento en beneficio mutuo de la asociación reside, posiblemente, en la capacidad de la planta para discriminar las características positivas del hongo, permitiendo su entrada en la raíz, aunque restringiendo su desarrollo y controlando la expansión de la infección. En este sentido, se han descrito tanto procesos de inducción como de supresión de mecanismos de defensa durante el proceso de colonización de la raíz por hongos arbusculares y posiblemente la relación entre inducción/supresión de defensa de la planta frente al hongo arbuscular constituye un elemento clave de la compatibilidad de la asociación.

Las señales moleculares que modulan el proceso de inducción/supresión de mecanismos de defensa de la planta micorrizada son desconocidas, existiendo indicios de que sean las mismas señales que las que intervienen en interacciones planta-patógeno, tal y como se ha evidenciado en nuestro laboratorio. En este sentido, muchas de las señales que participan de la regulación de las interacciones bien patogénicas o bien mutualistas de

microorganismos con plantas son de tipo hormonal, principalmente etileno, ácido jasmónico, ácido salicílico y ácido abscísico.

En el caso del ácido jasmónico (JA) se han sugerido diversos mecanismos de actuación por los cuales este compuesto podría participar en la regulación de la micorrización. Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados al respecto están basados en medidas de concentración de JA 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 del JA y otras oxilipinas en cada una de las distintas etapas de la formación de la simbiosis MA.

El objetivo general de la investigación, presentada en esta Tesis doctoral, es avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la regulación y respuesta a la infección por hongos formadores de micorriza arbuscular en Solanáceas, prestando especialmente interés al ácido jasmónico y otras oxilipinas, durante la formación y el desarrollo de la simbiosis. Con el fin de conseguir este objetivo general se han planteado los siguientes objetivos parciales:

1. Obtener una visión de conjunto sobre las modificaciones transcripcionales ocurridas en la raíz de tomate en respuesta al estado de micorrización y búsqueda de genes marcadores del desarrollo de la simbiosis MA, especialmente de genes involucrados en la modulación de la respuesta defensiva de la planta, mediada por JA, durante la interacción simbiótica.

2. Determinar la participación del ácido jasmónico y otras oxilipinas como reguladores del establecimiento y desarrollo de la simbiosis micorriza arbuscular.

3. Evaluar el efecto sobre la micorrización arbuscular de la alteración de genes involucrados en el metabolismo de oxilipinas.

INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

1. LAS MICORRIZAS

En el medio natural, el desarrollo de las plantas se ve afectado por multitud de factores de tipo biótico y abiótico. La mayoría de estos factores interactúan a nivel de la rizosfera, que es la parte del suelo próxima a las raíces e influenciada por los exudados de las mismas. Los microorganismos presentes en la rizosfera pueden establecer interacciones tanto beneficiosas como perjudiciales con las plantas. Entre las relaciones beneficiosas destacan: microorganismos antagonistas del desarrollo de patógenos, bacterias promotoras del crecimiento vegetal, microorganismos inductores de resistencia, rizobacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, microorganismos solubilizadores de fosfato y hongos micorrícicos, entre otros.

Los hongos formadores de micorrizas son hongos que se asocian de manera simbiótica con la raíz de plantas proporcionándole beneficios a éstas. El hongo coloniza la raíz de la planta y le proporciona nutrientes y agua que capta del suelo por medio de su red externa de hifas, mientras que la planta le proporciona productos carbonados para su desarrollo (Harrison, 1999; Govindarajulu y col., 2005; Javot y col., 2007). Se trata de una simbiosis prácticamente universal, no solo porque casi todas las especies vegetales son susceptibles de ser micorrizadas, sino también porque pueden establecerse en la mayoría de los ecosistemas terrestres, incluso en condiciones altamente adversas (Mosse y col., 1981; Hayman, 1982). Se conoce la existencia de las micorrizas desde hace más 400 millones de años, estimándose que el 97% de las plantas superiores establecen este tipo de simbiosis con algún tipo de hongo micorrícico, y es considerada un paso clave en la evolución de las plantas hacia el medio terrestre (Smith y Read, 2008).

Dentro de las micorrizas existen diferentes grupos que se han clasificado siguiendo criterios estructurales, funcionales y taxonómicos. En un primer momento, se dividieron en dos grandes grupos: ectomicorrizas y endomicorrizas (Smith y Read, 2008). Las ectomicorrizas se caracterizan por la formación de un manto y una compleja red de hifas, denominada red de Harting, que limitan su desarrollo a los espacios intercelulares del córtex, sin penetrar en las células vegetales. Los hongos que forman este tipo de micorrizas pertenecen al phylum Basidiomycota, aunque también algunos

están clasificados en el Ascomycota. En cuanto a las endomicorrizas, se caracterizan por la formación de parte de las estructuras fúngicas dentro de las células del córtex y/o epidermis de la raíz. Son las más extendidas en la naturaleza y agrupa a la gran mayoría de especies fúngicas y vegetales que establecen una simbiosis micorrícica. Dentro de las endomicorrizas se pueden distinguir seis subgrupos:

Ectendomicorrizas: presenta características comunes a las ectomicorrizas y endomicorrizas. El micelio fúngico crea un manto y una red de Harting alrededor de la raíz de la planta a partir del cual se desarrolla el micelio extraradical pero a diferencia de las ectomicorrizas, el micelio intraradical es capaz de penetrar en el interior de las células del córtex y la epidermis. Son las menos extendidas, siendo los hongos que la forman pertenecientes al phylum Basidiomycota y las plantas fundamentalmente arbutoides o monotropales (Yu y col., 2001; Gutiérrez y col., 2003).

Ericoides: las forman algunas especies de la familia Ericáceas caracterizadas por la falta de un crecimiento radicular secundario. La simbiosis se produce con algunos hongos de los phylum Ascomycota o Basidiomycota que desarrollan un micelio extraradical e intraradical, este último sólo entre las células de la epidermis formando un complejo de hifas ramificadas.

Orquideoides: son características de la familia Orquidáceas. Estas plantas necesitan establecer una asociación previa con el hongo para la germinación de las semillas (Rasmussen, 2002). Tras penetrar el hongo en las células de la raíz, las hifas forman un *ovillo* dentro la célula hospedadora previa invaginación de la membrana plasmática.

Arbutoides: las plantas que forman este tipo de asociación pertenecen a las familias Ericáceas y Piroláceas del orden Ericales. Estructuralmente son muy parecidas a las ectendomicorrizas. Sin embargo, el hecho de ser específicas de otras especies vegetales las hacen dividirse en otro grupo aparte (Peterson y col., 2004).

Monotropoides: se forma entre plantas de la familia Monotropáceas del orden Ericales y hongos formadores de ectomicorrizas. Estructuralmente son similares a las ectendomicorrizas presentando una característica exclusiva de este grupo consistente en una hifa corta con forma de gancho que penetra en las células epidérmicas (Duddridge y Read, 1982). Las plantas que forman esta simbiosis son heterotróficas siendo por tanto

necesario el aporte de nutrientes del hongo para la elaboración de los productos carbonados.

Arbusculares: son las más extendidas tanto a nivel geográfico como dentro del Reino Vegetal (Smith y Read, 2008). Las forman hongos del phylum *Glomeromycota* con plantas angiospermas, gimnospermas, helechos y briofitos (Schüßler y col., 2001). Se caracterizan fundamentalmente por la formación de hifas intraradicales, arbusculos (estructuras de intercambio de nutrientes intracelulares) y micelio extraradical donde se forman las esporas.

2. MICORRIZAS ARBUSCULARES

Las micorrizas arbusculares (MA) son las de mayor distribución entre las plantas, se estima que están presentes en el 80% de las especies vegetales, principalmente en angiospermas pero, como se dijo anteriormente, también en gimnospermas, helechos y briofitos. Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (AMF) son microscópicos, a diferencia de las otras especies de hongos formadores de micorrizas. Su principal característica morfológica es la formación de una estructura fúngica intraradical e intracelular denominada arbusculo (Gallaud, 1905), encargada del intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta. Además de esto, el hongo micorrízico arbuscular desarrolla un micelio inter e intraradical y un micelio extraradical donde se forman posteriormente las esporas.

Los hongos micorrízico arbusculares son biotrofos obligados, esto es, necesitan de las plantas hospedadoras para completar su ciclo de vida (Shachar-Hill y col., 1995; Solaiman y Saito, 1997). Probablemente, este rasgo identificativo de los AMF se deba, en parte, a su origen ancestral ya que se han propuesto como asistentes de las plantas en la colonización de la tierra (Simon y col., 1993). Este hecho se fundamenta en el descubrimiento de fósiles de estructuras fúngicas de hongos micorrízicos arbusculares datados del Devónico y del Ordovicio, coincidiendo con las primeras plantas terrestres (Remy y col., 1994; Redecker y col., 2000). Otro carácter importante derivado de la antigüedad de esta simbiosis es la ubicuidad de las micorrizas arbusculares en el Reino Vegetal, presentándose, como se indicó anteriormente, en la gran mayoría de

ecosistemas terrestres y estableciéndose en un porcentaje amplio de las especies vegetales. Por otra parte, las asociaciones micorrícicas arbusculares se consideran no específicas, existiendo un número de plantas hospedadoras muy superior al de especies de AMF. Si bien, aunque cualquier hongo puede colonizar gran variedad de plantas receptivas, existe una preferencia o compatibilidad entre determinadas parejas de hongos y plantas hospedadoras. Existen también casos especiales como los de *Eucaliptus*, *Arbutus*, *Cupressus* o *Juniperus* en el que la total inespecificidad asociativa hace que estas especies estén colonizadas al mismo tiempo por formaciones tan distintas como ectomicorrizas y endomicorrizas (Meyer, 1973).

2.1 Efectos beneficiosos de la simbiosis MA.

El aspecto fundamental de la simbiosis es el intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta, sin embargo, son muchos los beneficios asociados a la simbiosis micorrícico arbuscular:

Intercambio de nutrientes: la planta cede al hongo productos carbonados procedentes de la fotosíntesis, mientras que éste proporciona a la planta nutrientes minerales, especialmente aquellos menos asequibles para la planta como son el fósforo y el nitrógeno, debido principalmente a la mayor accesibilidad del micelio extraradical a zonas del suelo más distantes de la raíz y, por tanto, menos agotadas (George, 2000). Las hifas fúngicas funcionan de forma similar a los pelos radiculares, poseyendo un diámetro comparable, sin embargo, la longitud que las hifas pueden alcanzar en el suelo es entre 10 y 100 veces superior a la de la raíz y por tanto el volumen de suelo explotable es mucho mayor (Miller y col., 1995; Dodd y col., 2000). Además, existen evidencias sobre la producción de fosfatasas extracelulares secretadas por los AMF capaces de mineralizar el fósforo orgánico (Joner y col., 2000; Koide y Kabir, 2000), no obstante, la actividad fosfatasa de los hongos micorrícicos es relativamente inferior a la producida por otros microorganismos del suelo (Joner y col., 2000).

Captación de micronutrientes: la planta necesita de pequeñas cantidades de determinados nutrientes existentes en el suelo, como cobre, cinc, magnesio, manganeso y cobalto, para su correcto crecimiento y desarrollo, ya que forman parte de algunas

moléculas vegetales esenciales como enzimas o pigmentos. Los hongos micorrícicos arbusculares pueden ayudar a la planta en la captación de estos micronutrientes al aumentar la zona de adquisición de dichos elementos en el suelo más allá de donde puede hacerlo la raíz (Tinker, 1978).

Resistencia frente a estreses abióticos: las micorrizas arbusculares son capaces de aumentar la resistencia de las plantas frente a diferentes situaciones de estrés abiótico como son: salinidad, bajas temperaturas (Aroca y col., 2007), estrés hídrico (Hetrick y col., 1987; Ruiz-Lozano y col., 2003), o exceso de metales pesados y otros micronutrientes tóxicos a elevadas concentraciones (Cooper y Tinker, 1978; Arriagada y col., 2007; Hildebrandt y col., 2007).

Resistencia frente a patógenos: las plantas pueden desarrollar un estado de mayor capacidad de defensa frente al ataque de patógenos tras la colonización de las raíces por AMF. Esta resistencia sistémica inducida por la formación de la simbiosis micorrícica es efectiva frente a un amplio espectro de patógenos, así se ha descrito un efecto bioprotector de los hongos micorrícicos frente a hongos (Singh y col., 2000; Azcón-Aguilar y col., 2002; Xavier y Boyetchko 2004; Pozo y Azcón-Aguilar 2007), bacterias (García-Garrido y Ocampo, 1988) y nematodos (Elsen y col., 2001).

Mejora de la estructura del suelo: las hifas fúngicas de los AMF pueden mejorar la estructura del suelo por medio de la formación de agregados más estables mediante la segregación de una glicoproteína denominada glomalina, capaz de unir partículas del suelo haciéndolas más estables frente a la erosión hídrica (Miller y Jastrow, 2000). Esto es especialmente importante en suelos degradados como las dunas (Clough y Sutton, 1976).

Favorecimiento de la diversidad vegetal: las micorrizas arbusculares favorecen la diversidad de las comunidades de plantas y la sucesión vegetal, ya que cada planta muestra un nivel de compatibilidad mayor con determinados ecotipos de hongos micorrícicos, por lo que la conservación de la diversidad de estos hongos beneficia la diversidad y sucesión de las plantas (Rilling, 2004).

Aumento de la capacidad competitiva en el medio: se ha demostrado que las plantas colonizadas por AMF son más competitivas en el medio que plantas no colonizadas (Allen y col., 1989). Este hecho puede fundamentarse en diversos factores,

entre ellos el mejoramiento del enraizamiento de las plantas mediante la acumulación en la raíces de fitohormonas como citoquininas o giberelinas (Barea 1986), o un mejor desarrollo de las semillas (Pietikainen y Kytoviita, 2007).

2.2 Micorrizas arbusculares como agentes biológicos.

Además de la relación simbiótica que establecen con las plantas, los hongos formadores de micorrizas arbusculares son capaces de interactuar con otros microorganismos del suelo, siendo estas relaciones importantes para el mantenimiento y la diversidad de las comunidades vegetales y microbianas (Johansson y col., 2004; Hart y Klironomos, 2002; Maherali y Klironomos, 2007). Así, se puede considerar que las micorrizas arbusculares desempeñan un papel vital tanto en los ecosistemas naturales como en los sistemas agrícolas. En este sentido, los AMF representan un factor clave en estrategias de repoblación de ecosistemas degradados, puesto que tienen un papel sustancial en las primeras etapas del establecimiento de las plantas, sobre todo en suelos sometidos a condiciones de estrés como zonas desérticas (Saito y Marumoto, 2002) o en la revegetación con especies autóctonas (Barea y col., 2007). En cuanto a los sistemas agrarios, las micorrizas arbusculares se presentan como una herramienta fundamental para la agricultura sostenible (Bethlenfalvay y Linderman, 1992), ya que su abundante micelio intra y extraradical constituye un enlace o puente entre las plantas y el suelo, influyendo y conectando los componentes bióticos y abióticos del suelo entre sí (Bethlenfalvay, 1992). Sin embargo, en sistemas agrarios tradicionales los AMF carecen de esa importancia pues la práctica de métodos como el arado, el barbecho (Ocampo, 1980; Bever y col, 1996) y la utilización de pesticidas (Shcreiner and Bethlenfalvay, 1997) y fertilizantes no biológicos (McGonigle y Miller, 1996) reducen el efecto beneficioso sobre sus plantas hospedadoras (Mäder y col., 2000).

2.3 Factores determinantes en la simbiosis micorriza arbuscular.

2.3.1 Factores bióticos.

En el correcto establecimiento de la simbiosis micorriza arbuscular intervienen diversos factores relacionados, no solo con la interacción de los organismos participantes de la simbiosis con otros organismos presentes en el medio, sino también factores genéticos y morfológicos característicos de ambos simbioses.

Genotipo de la planta hospedadora: la eficiencia de colonización de los hongos MA puede variar considerablemente entre diferentes especies de plantas hospedadoras, siendo ésta más eficaz con unas especies que con otras (Lambert y col., 1980), incluso dentro de una misma especie puede variar según el cultivar (Hall, 1978). Se ha propuesto que esta diferencia en la eficiencia de colonización entre distintas especies y cultivares puede deberse a la capacidad de las mismas para la absorción de fósforo en distintos ambientes, siendo más susceptibles a la colonización aquellas con menor capacidad de absorción (Menge y col., 1978). Sin embargo, existen otros parámetros de carácter fisiológico y anatómico determinantes en la eficiencia de colonización, como son la anatomía de las raíces vegetales o la presencia o no de pelos radiculares (Baylis, 1975; Janos, 1975).

Interacciones con otros microorganismos: existen evidencias de microorganismos capaces de interactuar negativamente con los hongos MA, alimentándose de sus hifas o esporas, o inhibiendo la germinación de sus esporas por fungistasis (Tommerup, 1985). Sin embargo, más importantes parecen ser las interacciones sinérgicas que los AMF son capaces de establecer con otros microorganismos del suelo que promueven el crecimiento de la planta hospedadora, como son las bacterias fijadoras de nitrógeno libre (Fitter y Garbays, 1994; Amora-Lazcano y col., 1998), rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Meyer y Linderman, 1986), bacterias solubilizadoras de fosfato (Toro y col., 1998), actinomicetos-*Frankia* fijadores de nitrógeno (Rose y Youngberg, 1981) e incluso hongos saprofitos como los del género *Trichoderma* (Calvet y col., 1993). La interacción de estos microorganismos con los AMF favorece su colonización e interacción con la planta, de tal modo que se les ha denominado microorganismos auxiliares de la micorrización (Deoliveira y Garbaye, 1989).

2.3.2 Factores abióticos.

Los factores climáticos y físico-químicos del suelo en el que crece la planta hospedadora determinan fuertemente el desarrollo y establecimiento de la simbiosis micorriza arbuscular.

Luz: el hongo MA depende del suministro de productos carbonados de la planta para la obtención de su energía, por tanto, la luz como factor determinante de la capacidad fotosintética de la planta, juega un papel importante en el establecimiento de la simbiosis. En este sentido, Furlan y Forlin (1977) demostraron que la luz estimula el desarrollo de la micorriza arbuscular, mientras que la falta de la misma reduce la colonización y la producción de esporas.

Temperatura: se ha descrito que la temperatura del suelo es capaz de influir en la germinación de las esporas, la penetración de las hifas fúngicas en las raíces y en la extensión del hongo en el interior de las mismas. Sin embargo, el rango óptimo de temperatura para cada especie fúngica es variable (Schenck y col., 1975), siendo también un factor importante la textura del suelo (Bowen, 1980).

pH del suelo: el pH del suelo afecta a la geminación y desarrollo de las esporas fúngicas de los AMF (Daniels y Trape, 1980; Angle y Heckmen, 1986). Hayman y Mosse (1971) consiguieron colonizar y estimular el crecimiento de plantas micorrizadas en suelos de pH entre 5.6 y 7, sin embargo, a pH inferiores las plantas no se micorrizaron. La relación entre pH del suelo y micorriza arbuscular es muy compleja y depende del tipo de planta y de suelo, así como de las formas de fósforo presentes y las especies de AMF implicadas.

Salinidad: el aumento de la salinidad en el suelo reduce la capacidad de formación de propágulos y de colonización de hongos micorrícicos arbusculares. Sin embargo, son muchos los estudios que indican que el uso eficiente de los hongos MA mejoran el crecimiento de las plantas en una amplia variedad de condiciones de estrés salino (Ruiz-Lozano y col., 1996; Singh y col., 1997; Azcón-Aguilar y Barea, 1997; Al-Karaki y col., 2001).

2.4 Clasificación filogenética de hongos formadores de micorrizas arbusculares.

En un primer momento, los hongos formadores de micorrizas se incluyeron dentro del phylum *Zygomycota*, debido a las similitudes morfológicas que presentan las esporas de éstos con las del género *Endogone*, perteneciente a dicho phylum (*Zygomycota*). Sin embargo, Morton y Benny (1990), tras un estudio más profundo de sus características morfológicas, reclasificaron a los AMF en un nuevo orden, *Glomerales*, manteniéndolo dentro de la división *Zygomycota*. No es hasta el uso de técnicas moleculares, basadas en el análisis filogenético de la subunidad pequeña (SSU) del ARN ribosómico, cuando los hongos formadores de micorrizas se clasifican en un grupo monofilético denominado *Glomeromycota* (Schüßler y col., 2001) que comparte procedencia con los phylum *Ascomycota* y *Basidiomycota* (Tehler y col., 2003; Lutzoni y col., 2004; James y col., 2006) (figura I).

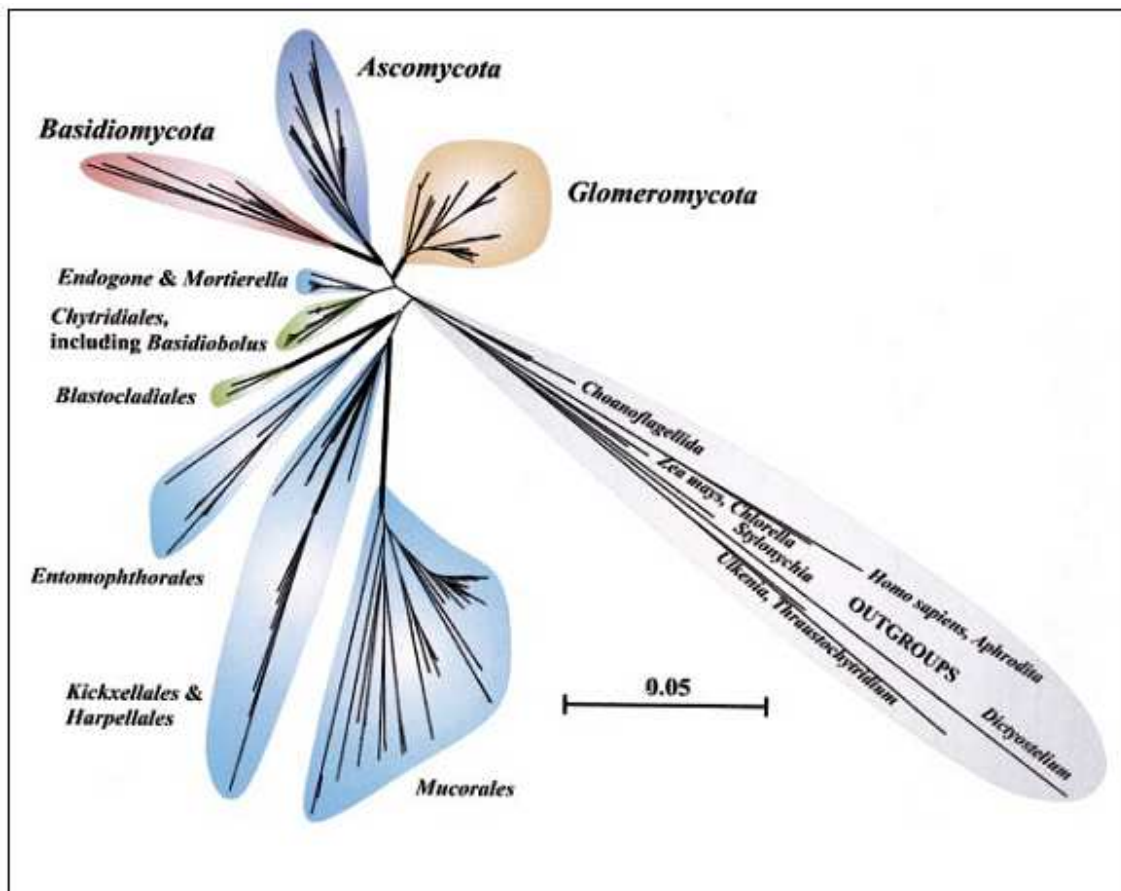


Figura I: Árbol filogenético de hongos basado en el análisis de la SSU del ARNr. Extraído de Schüßler y col. 2001.

Dentro del phylum *Glomeromycota* Schüßler y colaboradores (2001) distinguieron nueve familias repartidas en cuatro órdenes (*Paraglomerales*, *Archaeosporales*, *Diversisporales* y *Glomerales*). *Glomus*, clasificado dentro del orden *Glomerales*, es el género que engloba más especies y durante mucho tiempo ha sido considerado como un grupo polifilético, distinguiéndose, en un principio, tres clados mayoritarios: A, B y C. Posteriormente, el clado C fue dividido y reubicado en las familias *Diversiporaceae* (Walker y Schüssler, 2004) y *Pacisporaceae* (Oehl y Sieverding, 2004), dentro del orden *Diversisporales* junto a las familias *Acaulosporaceae* y *Gigasporaceae*. Recientemente, los otros dos clados pertenecientes a *Glomus* (A y B) han sido separados y renombrados en dos familias *Glomeraceae* (anteriormente *Glomus* grupo A) y *Claroideoglomeraceae* (anteriormente *Glomus* grupo B) dentro del orden *Glomerales* (Krüger y col., 2012). Sin embargo, es posible esperar más cambios dentro de la clasificación, debido a que realizar estudios de filogenia en los hongos MA implica serias dificultades derivadas de la alta variabilidad genética, incluso dentro de la misma especie (Kuhn y col., 2001; Pawlowska y Taylor, 2004), causada por la naturaleza asexual y el carácter multinucleado de los miembros de este phylum (figura II).

2.5 Formación de la simbiosis micorriza arbuscular.

Debido a la naturaleza de simbiote obligado de los hongos formadores de micorrizas arbusculares, éstos necesitan de la asociación de una planta huésped para completar su ciclo de vida. Tanto es así que los AMF son capaces de producir esporas que germinan en el suelo en ausencia de señales originadas por las plantas hospedadoras (Mosse, 1959; Hepper y Smith, 1976; Giovannetti, 2000), pero son incapaces de producir un micelio extenso sin establecer una simbiosis funcional con las mismas. Cuando las esporas germinan en el suelo, y si no encuentran una planta hospedadora, el crecimiento de las hifas se detiene y se produce una reasignación de los recursos que permite el mantenimiento a largo plazo de la viabilidad y la capacidad de infección de las mismas (Logi y col., 1998). La baja especificidad, o amplio rango de plantas hospedadoras, que muestran los AMF para el establecimiento de la simbiosis representa

una estrategia eficaz para aumentar la probabilidad de encuentro entre los esporofitos fúngicos y una raíz huésped.

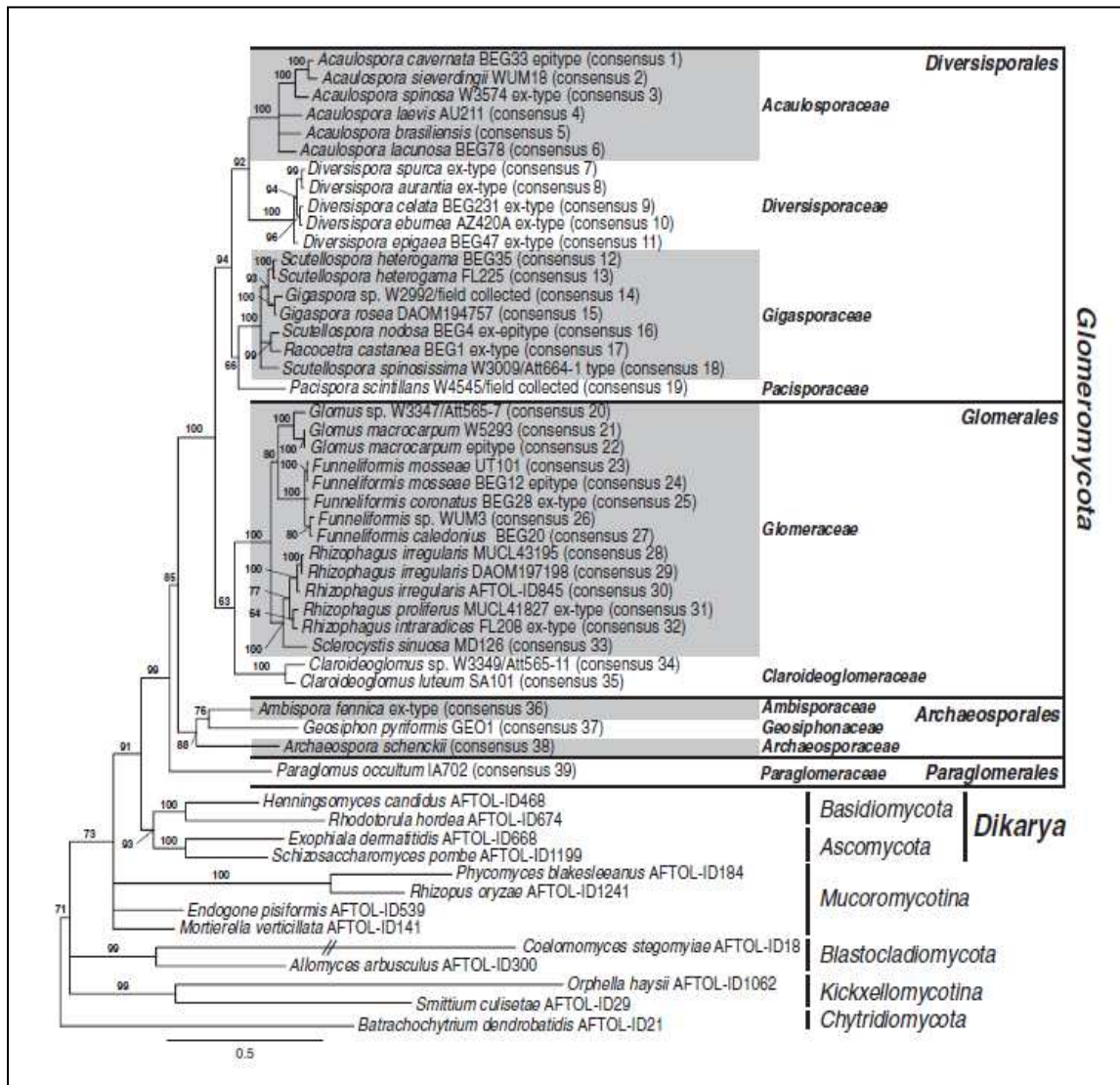


Figura II: Árbol filogenético del phylum *Glomeromycota* basado en el análisis de la SSU del ARNr. Extraído de Krüger y col. 2012. ,

Además, el micelio presimbótico y simbiótico de los hongos MA posee la habilidad de formar anastomosis compatibles con otros micelios de AMF formando de esta manera una amplia red de micelio que aumenta la probabilidad de encontrar una raíz hospedadora (Giovannetti y col., 1999; Giovannetti, 2001). Una vez se produce el contacto entre ambos simbiontes comienza el proceso de colonización. Sin embargo, la complejidad de las etapas presimbóticas hace necesario dividir el ciclo de vida de los hongos micorrícicos arbusculares en dos fases diferenciadas:

Fase presimbiótica: transcurre antes de la colonización de la planta hospedadora por parte del hongo y en ella se pueden distinguir varias etapas: germinación de las esporas, crecimiento y desarrollo de las hifas en busca de la raíz de la planta huésped y la penetración en la raíz mediante la formación de un apresorio.

Fase simbiótica: comienza tras la penetración de la hifa en la raíz de la planta hasta la formación de nuevas esporas. Se divide en: fase de crecimiento intracelular de las hifas, formación de arbusculos, formación de vesículas, desarrollo del micelio extraradical y esporulación.

2.5.1 Fase presimbiótica.

- **Germinación de las esporas:**

Las esporas son la forma de resistencia y propagación más común de los hongos y, por tanto, de los hongos formadores de micorrizas, sin embargo no es la única pues restos de micelio y vesículas son capaces de actuar como propágulos fúngicos. La pared de las esporas de los hongos MA está constituida por un número variable de capas, la última de las cuales suele ser distinta entre los diferentes géneros y especies del grupo, habiéndose llegado a utilizar como criterio taxonómico, si bien, como se ha visto con anterioridad, a veces no es suficiente para su clasificación. En su interior, las esporas poseen numerosos cuerpos lipídicos, vacuolas, núcleos y retículo endoplasmático. La germinación de la espora se produce mediante la producción de una hifa estrecha, multinucleada y no tabicada que se denomina tubo germinativo. Si bien la germinación de las esporas es un proceso independiente de la planta, si existen factores abióticos (luz, temperatura, humedad, pH, etc.) y bióticos (exudados vegetales, compuestos microbianos, etc.) que lo influyen.

- **Crecimiento y desarrollo de las hifas:**

Tras la germinación de la espora el tubo germinativo se desarrolla en busca de una planta hospedadora. Durante este periodo la hifa se alimenta de las reservas de triacilglicéridos de la espora, siendo poco necesaria la presencia de nutrientes carbonados o nitrogenados en el medio para su desarrollo (Hepper, 1979). Antes de penetrar en la planta hospedadora la hifa se ramifica intensamente para aumentar la probabilidad de contacto con la raíz de la planta y encontrar un lugar susceptible de

penetración (Buee y col., 2000; Nagahashi y Douds, 2000). Por su parte, la raíz sufre una serie de cambios tras el reconocimiento del hongo simbiote destinados a facilitar la entrada del mismo. Estos cambios son de carácter morfológico, como la formación de pelos radiculares o raíces secundarias para crear nuevas zonas susceptibles para la entrada del hongo (Olah y col., 2005); y fisiológico, relacionados con cambios en la composición de exudados radiculares que favorecen el desarrollo del hongo (Larose y col., 2002).

- **Penetración en la raíz:**

La penetración se produce, generalmente, por raíces secundarias o pelos radiculares jóvenes (Tawaraya y col., 2007). Cuando el hongo entra en contacto con la planta hospedadora forma una estructura de penetración denominada apresorio (Bonfante-Fasolo, 1984) o hifopodio (Bastmeyer y col., 2002), el cual se caracteriza por tener forma aplanada, ser multinucleado y tener gran abundancia de vacuolas en su interior. A partir de esta estructura la hifa penetra hacia el interior de la raíz atravesando las células epidérmicas o el espacio intercelular existente entre ellas. A la zona de la raíz donde se forma el apresorio y penetra la hifa dentro de la misma se le denomina punto de entrada. Una vez formado el apresorio, se produce una fuerte reorganización de las células epidérmicas de la raíz, formándose lo que se conoce como el aparato de pre-penetración (PPA). La formación del PPA se inicia con la aproximación del núcleo de la célula vegetal hacia la zona de contacto del apresorio. Desde ahí, el núcleo se desplaza hacia el otro extremo de la célula dejando un canal citoplasmático, compuesto por microtúbulos, microfilamentos y retículo endoplasmático, por el que se forma el PPA y que define el camino que seguirá la hifa para la penetración de la célula (Genre y col., 2008). La hifa penetra en la raíz mediante presión mecánica y activando procesos de desorganización de la pared celular de la célula vegetal (Parniske, 2004).

2.5.2 Fase simbiótica.

- **Desarrollo intracelular de las hifas:**

Después de la penetración de las hifas en la raíz de la planta hospedadora éstas se dirigen hacia las células del córtex donde formarán los arbusculos y vesículas. Genre y colaboradores (2008) demostraron que las células vegetales del córtex también forman

el PPA con el objeto de guiar el desarrollo fúngico dentro de la raíz. Se diferencian dos tipos morfológicos de MA en base al modo de penetración de las hifas desde la epidermis hasta las células corticales: *Arum* y *Paris* (Gallaud, 1905; Smith y Smith, 1997). La diferencia entre los dos tipos consiste en la forma de penetración de las hifas hacia el córtex, las MA de tipo *Arum* pueden desarrollarse atravesando las células o a través del espacio intercelular, sin embargo las MA de tipo *Paris* sólo son capaces de penetrar hacia las células corticales atravesando las células de la raíz y no por el espacio intercelular. Esto hace que las MA de tipo *Arum* se desarrollen más rápido que las de tipo *Paris*. Cuando las hifas penetran en las células vegetales éstas nunca penetran en el protoplasto celular. De ese modo, se produce una invaginación de la membrana plasmática que queda rodeando a la hifa formándose un espacio o matriz interfacial que la separa de la membrana vegetal. Este espacio interfacial está constituido por derivados de la pared celular de las células de la planta como poligalacturanos no esterificados, pectinas, xiloglucanos, arabinogalactanos, ramnogalacturonanos, glucoproteínas ricas en hidroxilprolina y homogalacturonanos (Balestrini y col., 1994; Bonfante y Perotto, 1995).

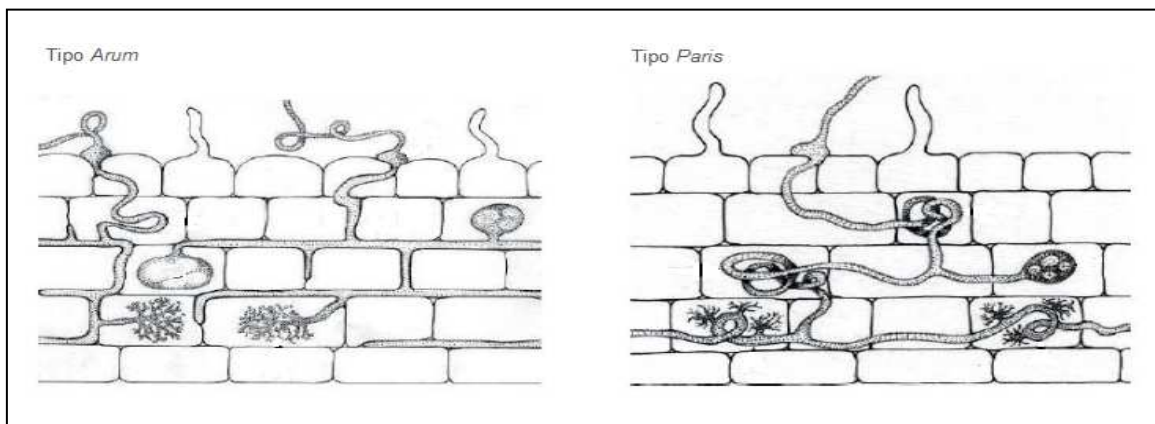


Figura III: Tipos de asociación micorriza arbuscular: tipo *Arum*, caracterizado por el crecimiento intercelular de las hifas; tipo *Paris*, caracterizado por el crecimiento intracelular de las hifas.

- **Formación de los arbuscúlos:**

Cuando las hifas llegan hasta las células más internas del córtex forman los arbuscúlos, estructuras de intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo características de esta simbiosis. La hifa penetra en la célula cortical y se ramifica dicotómicamente hasta dar lugar a una estructura en forma de árbol que ocupa casi toda la célula. La matriz interfacial y la membrana vegetal se hacen más finas aquí

facilitando el intercambio de nutrientes entre ambos simbioses (Bonfante y Perotto, 1995) y se aumenta la actividad metabólica (Smith y Smith, 1990). En las MA de tipo *Paris*, el arbusculo se forma a partir de una ramificación secundaria procedente de los ovillos que se generan en la penetración de la hifa en la célula vegetal, mientras que en las MA de tipo *Arum*, la hifa penetra un poco en la célula cortical formando una hifa troncal a partir de la que se ramifica repetidamente formando los arbusculos.

Los arbusculos completan su desarrollo en cuatro o cinco días (Brundett y col., 1985) y poseen una vida limitada de cuatro a diez días, pasados los cuales el arbusculo se colapsa y pierde su actividad (Sanders y col., 1977; Alexander y col., 1988). Una vez se degrada éste, la célula corticoide recupera su morfología, siendo capaz de acoger nuevamente la formación de otro arbusculo (Alexander y col., 1988).

- **Formación de vesículas:**

Muchos de los hongos formadores de micorrizas, excepto los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora*, son capaces de formar vesículas. Estas se forman generalmente en los extremos de las hifas de los hongos y pueden producirse a lo largo de todo el parénquima cortical. Se desarrollan en los espacios intercelulares o en el interior de alguna célula cortical ocupando prácticamente todo el volumen celular, llegando, en ocasiones, a producir un ensanchamiento y deformación de las paredes celulares. Las vesículas son estructuras de reserva de las MA de morfología globosa y que no se desarrollan hasta la formación de los arbusculos (Cooper y Losel, 1978), por lo que se cree que es necesario la aportación de nutrientes carbonados procedentes de la planta para su formación. Se componen fundamentalmente de lípidos, siendo el 58% de su peso de naturaleza lipídica. Aunque su principal función es de reserva, se ha demostrado que también pueden actuar como estructuras de propagación (Declerck y col., 1998).

- **Desarrollo extraradical:**

Una vez se han formado los arbusculos, las hifas del hongo salen de la raíz de la planta hospedadora y se desarrollan en el exterior. Estas hifas se extienden por el suelo aumentando la superficie de absorción y alcanzando zonas a las que las raíces no pueden acceder por ser más gruesas (Rhodes y Gerdemann, 1975; Jakobsen y col., 1992). En el suelo, las hifas extraradicales crecen hasta ramificarse en hifas secundarias

más finas que se ramifican a su vez varias veces dando lugar a unas estructuras parecidas a los arbúsculos encargadas de la absorción de los nutrientes. Estas estructuras se denominan BAS por sus siglas en inglés *Branched Absorbing Structures* (Bago y col., 1998). Los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora*, que no forman vesículas en el interior de la raíz de la planta hospedadora, son capaces de producir vesículas a partir del micelio extrarradical, denominadas vesículas auxiliares. Se generan a partir de la ramificación de una hifa exterior y en su extremo se forma la vesícula que, generalmente, posee paredes ornamentales.

Además de la captación de nutrientes a través de los BAS, el micelio extrarradical aporta otros beneficios a la planta, especialmente relacionados con la estabilidad y mejora de los parámetros físico-químicos del suelo (Miller y Jastrow, 2000), mediante la formación de agregados más estables capaces de mantener la humedad del suelo que favorecen el desarrollo de la planta hospedadora en situaciones de estrés hídrico (Auge y col., 2001).

- **Esporulación:**

Las esporas se desarrollan al final del ciclo de vida del hongo, tras la formación de los BAS, por lo que se relacionan con la absorción de nutrientes. Pueden crecer de forma aislada, en racimo o en estructuras globosas denominadas esporocarpos. Las esporas de resistencia pueden permanecer inalteradas en el suelo por mucho tiempo, mientras que las hifas del hongo se colapsan tras una permanencia en el suelo de 2 a 4 semanas si no encuentran una raíz hospedadora (Bolan y Abbott, 1983).

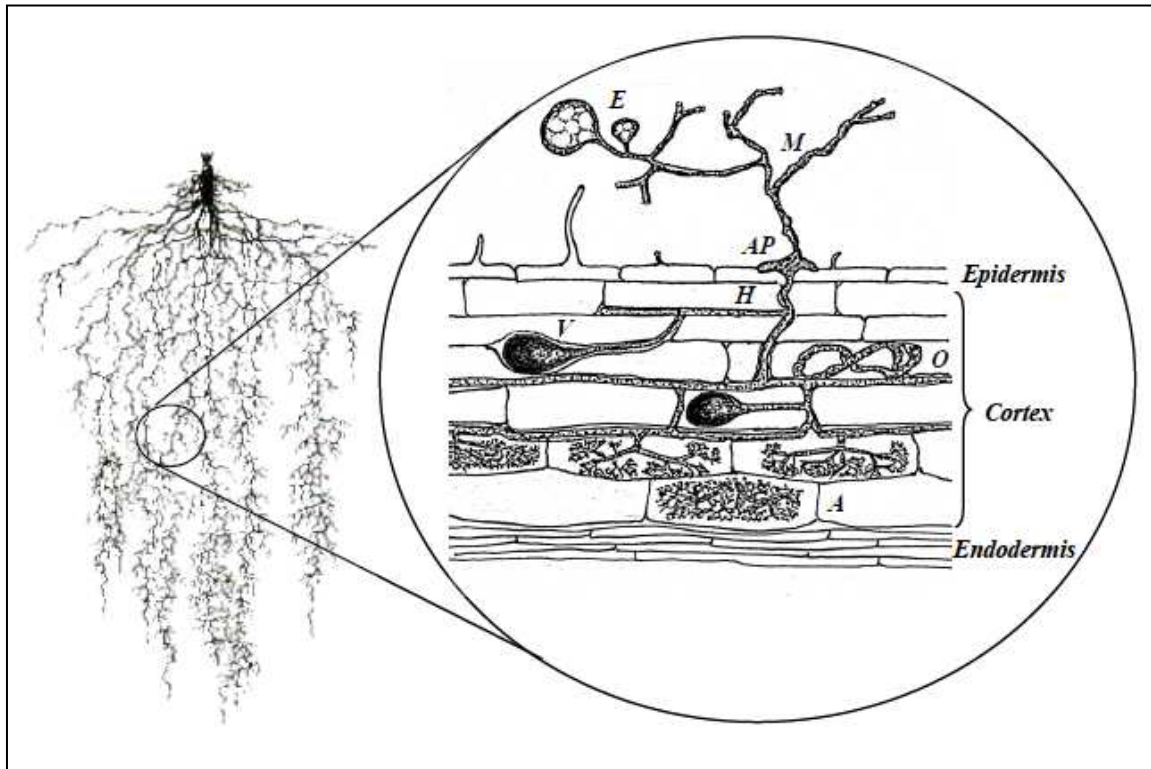


Figura IV: Ciclo de vida de las micorrizas arbusculares. A: arbusculo; AP: apresorio; E: espora; H: hifa intercelular; M: micelio extrarradical; O: ovillo; V: vesícula. Extraído de Palenzuela y Barea, 2002.

2.6 *Glomus intraradices*.

El hongo *Glomus intraradices* (DAOM 197198), reclasificado como *Glomus irregulare* por Stockinger y colaboradores (2009), y recientemente como *Rhizophagus irregularis* (Krüger y col. 2012), es uno de los hongos formadores de micorriza más estudiado. Su frecuente uso para el estudio de la simbiosis planta-hongo MA se debe no solo a su alta capacidad infectiva, sino también a haber sido el primer hongo micorrícico capaz de cultivarse *in vitro* en asociación con raíces vegetales (Chabot y col., 1992). Pertenece a la familia *Glomeraceae* (antiguo grupo A del género *Glomerales*) y se caracteriza por formar esporas redondeadas (40-190 micras de diámetro) y vesículas en el interior de la raíz de la planta hospedadora. La pared es de tipo amorfo, presentando una capa externa evanescente y una o dos capas internas laminadas de color más oscuro. El grosor de la pared varía entre 3 y 15 micras y se extiende hacia el pedúnculo de la espora en forma de tubo. El color de la espora puede variar desde amarillo hasta marrón claro. Las esporas, como las vesículas, se forman en el interior de la raíz de la planta

hospedadora, sin embargo, pueden encontrarse libremente en el suelo, provenientes de restos de otras raíces colonizadas (Schenck y Smith, 1982).

G. irregulare es un hongo asexual, como todos los hongos micorrícicos, cuyas esporas e hifas son multinucleadas, pudiendo presentar una sola espora miles de núcleos. Este hecho hace imposible la obtención de mutantes estables con las metodologías que se conocen actualmente. Pese a ello, se han llevado a cabo proyectos de transformaciones transitorias mediante biobalística (Helber y Requena, 2008) y de secuenciación de su genoma (Martín y col., 2008). En este sentido, un análisis transcriptómico reciente ha permitido identificar un conjunto de genes que codifican para toda una maquinaria de recombinación meiótica, así como para proteínas específicas de la meiosis, sugiriendo que la falta del ciclo sexual de *G. irregulare*, y posiblemente de otros hongos micorrícicos, no es el resultado de deleciones en los genes esenciales para la reproducción sexual y la meiosis (Tisserant y col., 2012). Por otra parte, este análisis transcriptómico ha revelado la existencia de genes involucrados en transportadores de membrana y proteínas de secreción, así como la ausencia de transcritos de genes codificantes para proteínas de degradación de la pared de células vegetales, factores comunes de *G. irregulare*, hongos simbioses ectomicorrícicos y algunos patógenos biotrofos obligados (Tisserant y col., 2012).

Se han utilizado diversas plantas hospedadoras como modelo para los estudios de interacción micorriza arbuscular entre las cuales cabe destacar *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus*, arroz (*Oryza sativa*) o algunas especies de la familia *Solanaceae* como tomate (*Solanum lycopersicum*) o patata (*Solanum tuberosum*). En este último caso, el conocimiento del genoma de tomate y patata, unido a la susceptibilidad de ambas especies a ser colonizadas por *G. irregulare*, representan una herramienta útil e interesante para el estudio de los mecanismos moleculares asociados a la simbiosis micorriza arbuscular.

3. DIÁLOGO MOLECULAR EN LA INTERACCIÓN PLANTA-HONGO MA

La formación de la simbiosis micorriza arbuscular es un proceso complejo que necesita de un entendimiento mutuo entre sus organismos participantes. En este sentido, se produce un intercambio de señales a lo largo de todo el proceso de formación de la asociación simbiótica entre hongo y planta que comienza ya en la fase presimbiótica, antes del contacto físico entre ambos simbioses. En general, existe un programa genético específico conservado para la formación de la simbiosis micorriza arbuscular en plantas para la adaptación a diferentes hongos simbióticos (Massoumou y col., 2007; Liu y col., 2007), el cual puede diferir entre distintos hongos micorrícicos arbusculares debido a sus características particulares de crecimiento y funcionalidad (Smith y col., 2004). A continuación se describe el proceso de intercambio de señales entre planta y hongo para el establecimiento de la asociación entre ambos organismos, atendiendo tanto a los cambios generados durante la fase presimbiótica, anterior al contacto entre los simbioses, como los generados en la fase simbiótica.

3.1 Fase presimbiótica.

3.1.1 Germinación de esporas.

El diálogo molecular entre planta y hongo comienza desde la germinación de las esporas, cuando algunos metabolitos secundarios exudados por la raíces de las plantas, como los flavonoides, son capaces de interferir en la germinación de las esporas de los hongos micorrícicos arbusculares (Siquiera y col., 1991; Scervino y col., 2005a, 2005b; Kikuchi y col., 2007; Steinkellener y col., 2007). En este sentido, el isoflavonoide coumestrol ha sido identificado como un estimulador de la germinación y crecimiento de las hifas de los hongos MA (Morandi y col., 1984), observándose en plantas mutantes de *Medicago truncatula* hiperacumuladoras de este flavonoide una mayor susceptibilidad a la colonización (Morandi y col., 2009). Sin embargo, los flavonoides podrían no ser esenciales para el reconocimiento planta-hongo puesto que plantas de maíz mutantes afectadas en la producción de flavonoides mostraron una capacidad similar de formación de micorrizas a plantas de tipo silvestre (Bécard y col., 1995). Por

lo tanto, es posible que su función se limite a un efecto de estimulación del crecimiento de las hifas facilitando así el encuentro con la raíz hospedadora.

3.1.2 Crecimiento y ramificación de las hifas.

En ausencia de la planta hospedadora el crecimiento de las hifas fúngicas de los hongos AM es limitado, de tal modo que si no encuentran una planta huésped el crecimiento de las hifas se detiene y se produce una reasignación de los recursos que permite el mantenimiento a largo plazo de la viabilidad y la capacidad de infección de las mismas (Logi y col., 1998), mientras que la presencia de exudados radiculares de la planta producen una activación del crecimiento y de su ramificación (Giovannetti y col., 1993; Buee y col., 2000; Tamasloukht y col., 2003). Esta capacidad de estimulación de los exudados radiculares sobre los AMF se ha reconocido desde mucho tiempo atrás, denominando de manera genérica a esta actividad como “factor de ramificación” o *Branching Factor* (BR) (Buee y col., 2000; Nagahashi y Douds, 2000). Sin embargo, recientemente se ha identificado un grupo de moléculas, las estrigolactonas, como factores necesarios para la ramificación de la hifa fúngica (Akiyama y col., 2005; Besserer y col., 2006). Las estrigolactonas son moléculas orgánicas de pequeño tamaño, derivadas de compuestos carotenoides que poseen un enlace éter muy lábil, fácilmente hidrolizable en la rizosfera. Esta característica permite sugerir la existencia de un gradiente de concentración de moléculas activas en el suelo a partir de la superficie radicular radicular, por lo que su percepción se ha sugerido como un indicador fiable de la proximidad de la raíz huésped para los hongos MA, induciendo en el hongo micorrízico un estado presimbótico que se caracteriza por un crecimiento, aumento de la actividad fisiológica y mayor ramificación de las hifas (Parniske, 2005). Akiyama y colaboradores (2005) caracterizaron la estrigolactona 5-dioxi-estrigol como el BF de *Lotus janopicus*, aunque otras moléculas con la misma estructura de anillos, como GR24, una molécula sintética análoga a las estrigolactonas, puede producir el mismo efecto. Este hecho, pone de manifiesto la importancia de la estructura de la molécula señalizadora en la percepción por parte del hongo MA, sugiriendo la existencia de receptores específicos en la membrana plasmática del hongo capaces de reconocer dicha molécula. En este sentido, Requena y colaboradores (2002, 2006), identificaron al gen *GmGin1* como un componente de este posible mecanismo de recepción de señales en *Glomus mosseae*. Tras la percepción de la señal de la planta

hospedadora, *GmGin1* podría interactuar o modificar otras proteínas de membrana, a través una actividad ATPasa, para transmitir la señal hacia el núcleo, desencadenando una respuesta dirigida a la desactivación de la detención del crecimiento programado, permitiendo que el hongo entre en modo simbiótico.

Por otro lado, el carácter de simbiote obligado de los hongos MA hace necesario maximizar la posibilidad de encontrar una planta huésped antes de agotar los recursos de las esporas. Por esta razón, los AMF son capaces de liberar sustancias solubles a la rizosfera que informen de la presencia de los mismos a las plantas hospedadoras antes del contacto físico (Bonfante y Genre, 2010), en lo que sea ha denominado *programa de anticipación* (Paszkowski, 2006). Algunas de estas moléculas señalizadoras tienen analogía estructural y funcional con los factores de nodulación bacterianos y de ahí su denominación como *Factores de Micorrización* (Factores MIC o “MYC Factors”). Son moléculas de pequeño tamaño (≤ 3 kDa) de carácter parcialmente lipofílico derivados de la quitina (Navazio y col., 2007; Bucher y col., 2009), que recientemente se han descrito como una mezcla de lipochitoooligosacaridos (LCO) sencillos, sulfatados y no-sulfatados (Maillet y col., 2011). Los factores MIC son reconocidos por receptores de membrana de las células de la raíz antes de que se produzca el contacto entre ambos simbioses promoviendo la inducción de la expresión de genes concretos de la planta hospedadora (Kosuta y col., 2003; Weidmann y col., 2004), además de activar procesos de señalización intracelular (Navazio y col., 2007; Kosuta y col., 2008) y de estimular el desarrollo de raíces laterales (Oláh y col., 2005). Por otra parte, se desconoce si la secreción de los factores MIC se induce después de la percepción por parte del hongo de la señal de la planta o si, por el contrario, tienen un carácter constitutivo, lo que permite al hongo estar siempre preparado para la colonización de la raíz (Bonfante y Requena, 2011).

Tras el reconocimiento del hongo, una de las respuestas tempranas de la planta es la puesta en marcha de la vía de señalización SYM o *Symbiotic Pathway*. Esta vía se encuentra parcialmente caracterizada en *L. japonicus* y *M. truncatula*, y posee componentes comunes con la vía de señalización de la simbiosis Rhizobium y leguminosa. El primer paso de esta vía es el reconocimiento del factor MIC por un receptor de membrana tipo quinasa (LRR-RLK) de la célula radicular, identificado en *L. japonicus* como LjSYMRK y en *M. truncatula* como MtDMI2 (Does not Make

Infections 2) (Stracke y col., 2002). La fosforilación de un sustrato, todavía desconocido, a través del dominio quinasa de este receptor inicia una cascada de señalización que comienza con un aumento rápido y transitorio de calcio a nivel citoplasmático (Oldroyd y Downie, 2004; Chabaud y col., 2010) que es transmitido al núcleo celular por dos nucleoporinas (NUP85 y NUP133) (Kanamori y col., 2006; Saito y col., 2007). Además, también participan en esta vía dos proteínas implicadas en el transporte de cationes que se encuentran localizadas en la membrana nuclear, identificadas como LjCASTOR y LjPOLLUX en *L. japonicus* (MtDIM1 en *M. truncatula*) (Ane y col., 2004; Imaizumi-Anraku y col., 2005). La actividad de estos canales sería la responsable de las oscilaciones repetidas que se observan en la concentración de calcio en el núcleo y en la zona perinuclear del citoplasma en las células colonizadas. A su vez, una proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina, LjCCaMK en *L. japonicus* (ortóloga a MtDMI3 en *M. truncatula*), ubicada en el núcleo celular interpreta estas oscilaciones de calcio para, posteriormente, producir la inducción de los llamados genes de micorrización (Levy y col., 2004; Tirichine y col., 2006; Parniske, 2008). No obstante, y aunque se están centrando muchos esfuerzos en el estudio de esta vía de señalización SYM, es probable que existan otras vías paralelas que controlen las repuestas tempranas de micorrización y que aún están por describir. En este sentido, en arroz y *M. truncatula* se han identificado genes específicos de micorrización que actúan de manera independiente de la vía de señalización de la micorrización SYM (Gutjahr y col., 2008; Kuhn y col., 2010).

3.1.3 Formación del apresorio.

A pesar del complejo diálogo molecular que se produce entre hongo y planta durante la fase presimbiótica del proceso de micorrización, la formación del apresorio o hifopodio no necesita de un reconocimiento químico entre ambos simbioses, siendo suficiente el contacto físico entre el hongo y la pared de la célula vegetal (Nagahashi y Douds, 2000). En este sentido, Vierheilig y colaboradores (2002) demostraron la capacidad de los hongos MA de formar apresorios tanto en plantas susceptibles de micorrización como en plantas no hospedadoras. De forma similar, Nagahashi y Douds (1997) observaron que la formación de apresorios puede ocurrir sin previa ramificación hifal y sin ninguna señal secretada a partir de la raíz huésped, incluso sin la presencia del citoplasma celular.

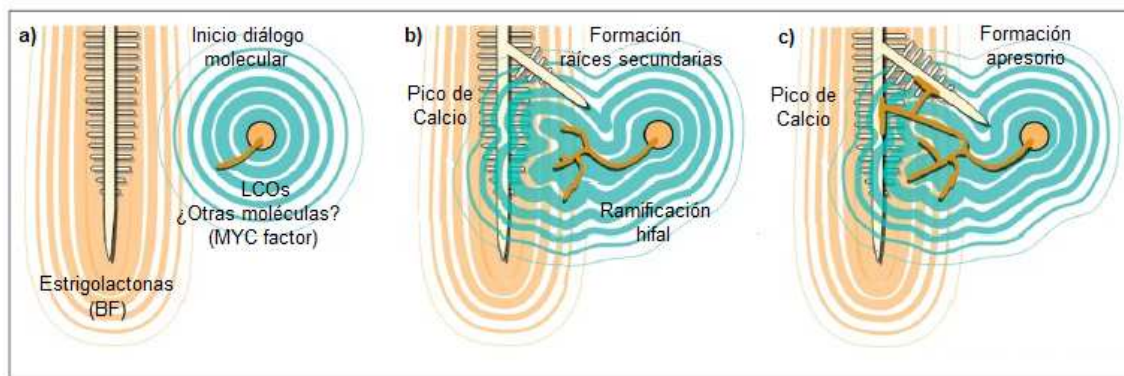


Figura V: Diálogo molecular hongo-planta en la fase presimbiótica. **a)** ambos simbioses liberan moléculas bioactivas a la rizosfera. **b)** percepción de la señal por ambos simbioses, inicio de las repuestas moleculares, celulares y fisiológicas. **c)** formación del apresorio, comienzo de la fase simbiótica. Adaptado de Bonfante y Requena, 2011.

3.2 Fase simbiótica.

3.2.1 Penetración de la hifa radical.

Una vez que se produce el reconocimiento del hongo micorrícico se inicia la formación del aparato de prepenetración (PPA). El PPA es una estructura subcelular que predetermina la vía de desarrollo del hongo MA a través de la célula vegetal. Está conformado por microtúbulos y microfilamentos que junto a las cisternas del retículo endoplásmico forman un conducto que conecta el núcleo principal con el sitio de contacto apressorial. Una vez que se ha genera el PPA es cuando la hifa fúngica penetra en la célula radicular. Si bien, la generación del PPA está bien caracterizada, las señales que desencadenan su formación son aún desconocidas. La estimulación mecánica de las células vegetales con una aguja puede inducir al núcleo por si solo a migrar hacia el sitio donde se produce la perturbación de manera similar a cuando el apresorio entra en contacto con la célula radicular (Gus-Mayer y col., 1998). Éste podría ser el desencadenante físico inicial durante el proceso de penetración de la hifa fúngica, sin embargo, es lógico pensar en la existencia de señales químicas adicionales que proporcionen especificidad y discrimine la formación del PPA de otros eventos biológicos (Parniske, 2008). En este sentido, se han descrito hasta siete genes en *L. japonicus* que parecen estar involucrados en la formación del PPA (Kitsner y col., 2005). Estos genes codifican proteínas que están directa o indirectamente implicados en la vía de señalización SYM, la cual es requerida tanto para el reconocimiento del hongo

micorrícico como para el desarrollo de las estructuras de alojamiento intracelulares en hongos MA y *Rhizobium*. Genre y colaboradores (2005) observaron que mutantes de *M. truncatula* afectados en los genes *dmi*, ortólogos a los genes *sym* de *L. japonicus*, sufren un bloqueo total o parcial de la penetración fúngica en las células epidérmicas al impedir la formación del PPA. El análisis fenotípico de estos mutantes demostró que los genes *dmi2* y *dmi3* son necesarios para la inducción del PPA y que *dmi3* es requerido para un subconjunto de genes que también son inducidos durante la formación del PPA.

Además de los genes *dmi*, se ha demostrado que el gen *ENOD11* (*Early NOdulation 11*) activado tanto durante la micorrización como la nodulación (Journet y col., 2001), es necesario para la formación del PPA (Kosuta y col., 2003). *ENOD11* podría estar implicado en la flexibilidad de la pared celular vegetal siendo necesaria su activación para una mayor plasticidad o porosidad de la misma, permitiendo de este modo la penetración de la hifa fúngica. Sin embargo, se ha observado que los genes *dmi* no son necesarios para la activación de *ENOD11* durante la micorrización (Genre y col., 2005). Este hecho sugiere la posibilidad de la existencia de dos vías diferentes para la activación de *ENOD11*, una independiente de *dmi* y que antecede a la formación del apresorio, y otra dependiente de *dmi* y activada previa formación del mismo. También cabe la posibilidad de la existencia de varios factores activadores que interaccionen con *ENOD11* de forma dependiente e independiente durante el proceso de colonización. En este sentido, Maillet y colaboradores (2011) observaron que *Glomus intraradices* es capaz de producir una mezcla de cuatro lipochitoooligosacaridos o *factores MIC*, los cuales podrían generar diferentes señales que activasen distintas vías durante la micorrización.

3.2.2 Desarrollo intracelular de las hifas.

Una vez se ha producido la penetración de las hifas fúngicas en las células más externas de la raíz de la planta hospedadora, éstas se dirigen hacia las células del córtex donde formarán los arbusculos y en algunos casos vesículas. Aunque el diálogo molecular que se establece entre ambos simbioses durante esta etapa no está todavía bien definido, la caracterización fenotípica de mutantes de *Pisum sativum*, *L. japonicus* y *M. truncatula* afectados en diferentes genes de la vía de señalización SYM, ha demostrado la necesidad de un reconocimiento por parte de la planta en el desarrollo intracelular de las hifas. En este sentido, se han observado diferencias entre distintos

mutantes *sym* afectando a las células de la epidermis, las células más externas de la capa cortical y/o las células formadoras de arbusculos, según el gen que se encuentre mutado (Parniske, 2004). Este hecho es indicativo de la plasticidad sustancial, y, probablemente, de la funcionalidad de cada tipo de célula específica en la red de señalización SYM (Kosuta y col., 2003; Siciliano y col., 2007). Las mutaciones en los genes *LjSymRK*, *LjSym4* y *LjSym15* dan lugar a un fenotipo en el que las hifas fúngicas son incapaces de penetrar en las células corticales, limitando su crecimiento a las células epidérmicas de *L. japonicus* (Novero y col., 2002; Demchenko y col., 2004). La mutación de *LjSym4*, además, produce la muerte de las hifas y de las células corticales adyacentes al penetrar éstas en el córtex (Bonfante y col., 2000). Por otra parte, la mutación en el gen *DCPK1* de *M. truncatula*, así como la mutación de *taci1* en maíz, limita el crecimiento de la hifas a las células epidérmicas desarrollándose únicamente en el eje horizontal (Ivashuta y col., 2005; Paszkowski y col., 2006).

3.2.3 Formación de los arbusculos.

La formación de los arbusculos es el resultado del desarrollo subcelular coordinado de la célula vegetal de la planta hospedadora y del hongo MA. Al penetrar el hongo micorrícico en la célula se producen una serie de cambios morfológicos en la misma, entre ellos una reorganización del citoesqueleto, destinados a permitir el alojamiento de la estructura fúngica en su interior. En este sentido, Blancaflor y colaboradores (2001) observaron una reorganización de microtúbulos en las células en las que se desarrollan los arbusculos y en células adyacentes a las hifas intercelulares en plantas de *M. truncatula*, sugiriendo la necesidad de la existencia de una señalización que indique a las células no colonizadas la presencia del hongo. Del mismo modo, también se ha identificado un gen codificante de una α -tubulina en maíz que es inducido específicamente en las células en las que desarrollan los arbusculos (Bonfante y col., 1996).

Por otra parte, la vía de señalización SYM parece estar también implicada en el desarrollo de los arbusculos. Como se ha señalado anteriormente, la caracterización fenotípica de mutantes de *L. japonicus* y *M. truncatula* afectados en diferentes genes de la vía de señalización SYM, ha demostrado la necesidad de un reconocimiento de la planta en el desarrollo de las diferentes estructuras fúngicas, observándose una especialización en cada tipo de célula implicada en el establecimiento de la simbiosis.

Así, se ha descrito el papel fundamental de los genes *LjCCaMK* y *LjCYCLOPS* en *L. japonicus* (*dmi3* e *ipd3* respectivamente en *M. truncatula*) para el desarrollo de los arbusculos, los cuales codifican para dos proteínas quinasas dependientes de calcio y calmodulina encargadas de interpretar las oscilaciones en las concentraciones de calcio resultantes del reconocimiento de los factores MIC y que producen la inducción de los llamados genes de micorrización (Kistner y col., 2005; Trichine y col., 2006). Además, la mutación en el gen codificante para la proteína LjCASTOR en *L. japonicus*, involucrada en el mantenimiento del equilibrio de carga que se produce durante las oscilaciones de calcio en el núcleo celular, también impide la correcta formación de los arbusculos, mientras que los mutantes afectados en la proteína LjPOLLUX, cuya función en la vía de señalización SYM es similar a LjCASTOR, no presentan alteraciones en el desarrollo de los mismos (Parniske, 2008).

Por otro lado, recientemente se ha atribuido un papel especial en el desarrollo de los arbusculos a la lisofosfatidilcolina o LPC. La LPC es un producto normal del metabolismo de los fosfolípidos que se ha descrito como una molécula de señalización que activa la expresión del gen *PT3* en patata, codificante para un transportador de fosfato localizado en la membrana perisarbuscular (Dissner y col., 2007). Este tipo de transportadores de fosfatos son imprescindibles para la formación y desarrollo de los arbusculos, debido a su papel esencial en el intercambio de nutrientes entre ambos simbioses. El período de mantenimiento de los arbusculos es dependiente de la funcionalidad de estos transportadores llegando al colapso y desaparición una vez se ha perdido la capacidad de transporte en los mismos. En este sentido, Javot y colaboradores (2007) observaron que la mutación en el transportador de fosfato MtPT4 en *M. truncatula* da lugar a una relación simbiótica defectuosa. Estos autores realizaron un análisis detallado de la cinética de desarrollo de los arbusculos revelando que la planta penaliza los arbusculos ineficientes mediante la degradación de los mismos antes de su maduración, no llegándose a establecer la simbiosis de un modo funcional.

Por otra parte, recientes investigaciones en los mutantes *str1* y *str2* de *M. truncatula* han demostrado que estos mutantes tienen una menor micorrización y desarrollo de arbusculos. Los genes mutados en estas 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 y col., 2010; Gutjahr y col., 2012). Además de éstos, se han identificado otra serie de genes involucrados en la penetración epidérmica y el desarrollo arbuscular en plantas de *M. truncatula*. Por ejemplo, el gen *Vapyrin*, codificante para una proteína citoplasmática implicada en el tráfico y biogénesis de la membrana plasmática, parece estar relacionado con la remodelación celular necesaria para el desarrollo intracelular de las hifas de los hongos durante simbiosis AM (Pumplin y col., 2010). También se ha observado que la regulación negativa por RNAi del gen *MtMSBP1*, que codifica para una proteína de membrana de unión a esteroides, da lugar a un fenotipo aberrante de micorrizas con apresorios gruesos y septados y una disminución en el número de arbusculos, así como una deformación de los mismos, producido por un desequilibrio en la homeostasis de esteroides en la raíz (Kuhn y col., 2010). Por otra parte, la regulación de la formación arbuscular también ha sido relacionada con el aporte de carbohidratos y el metabolismo de sacarosa en *M. truncatula*, mediante la utilización de plantas mutantes alteradas en el gen *MtSucSI* codificante de una sacarosa sintasa (Baier y col., 2010).

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 y col., 2009).

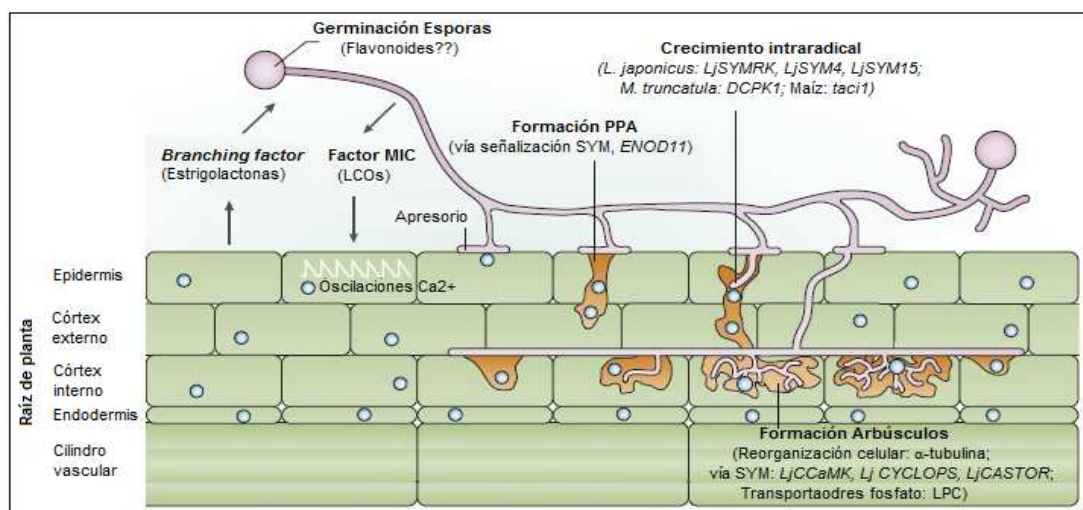


Figura VI: Resumen diálogo molecular planto-hongo durante el proceso de colonización: etapas presimbióticas (germinación de esporas, crecimiento y ramificación de las hifas, formación del apresorio) y simbióticas (formación PPA, desarrollo intraradical de las hifas, formación de arbusculos). Adaptado de Parniske 2008.

4. REGULACIÓN DE LA MICORRIZACIÓN

Como hemos visto en el apartado anterior, la formación de la simbiosis micorriza arbuscular es un proceso complejo, que necesita de un continuo intercambio de señales entre ambos simbioses para su correcto establecimiento. Si bien, durante las primeras etapas de la asociación, la planta es capaz de activar una serie de respuestas encaminadas al reconocimiento del hongo y a la permisividad de la entrada del mismo en la raíz, una vez éste ha colonizado la planta, ésta desencadena otra serie de respuestas destinadas tanto hacia el control de la extensión del desarrollo intraradical del hongo en su interior, con el objeto de impedir que se comporte como un patógeno, como hacia el desarrollo y funcionamiento de las estructuras simbióticas. En este sentido, la planta es capaz de activar una serie de respuestas defensivas mediadas, generalmente, por hormonas vegetales y que, en muchos casos, se produce como consecuencia de la disponibilidad de nutrientes en el suelo, especialmente fósforo. A este proceso de control sobre el hongo simbiote por parte de la planta se le ha denominado regulación de la micorrización. Por analogía con el proceso de control de la nodulación que se produce en leguminosas, se describe un tipo particular de regulación, denominada “autorregulación de la micorrización”, que se activa superado un umbral de micorrización de la raíz y que tiene efectos sistémicos (Vierhelig, 2004; García-Garrido y Vierheilig, 2007). A continuación se describe la participación en el proceso de regulación de la micorrización del fósforo, como elemento limitante de la asociación simbiótica; de la activación y supresión de la respuesta defensiva de la planta para el control de la extensión intraradical del hongo; y de la participación de las hormonas vegetales como moléculas clave durante todo el proceso de desarrollo y regulación de la micorrización.

4.1 Participación del fósforo en la regulación de la micorrización.

El fósforo es un elemento esencial en el establecimiento y desarrollo de la simbiosis micorriza arbuscular ya que uno de los principales beneficios de la simbiosis es la transferencia de éste elemento desde el hongo, que lo capta del suelo, hacia la planta. Por tanto, es fácil pensar que las condiciones de disponibilidad y agotamiento de fósforo para la planta sean un factor importante en la regulación del proceso. En este

sentido, se ha demostrado que altas concentraciones de fosfato soluble en el suelo inhiben la formación de micorrizas, mientras que en condiciones de “hambre” de fosfato se promueve la formación de la simbiosis (McArthur y Knowles, 1992; López-Ráez y col., 2008; Breuillin y col., 2010).

Diversos estudios han demostrado que la disponibilidad de fósforo para la planta origina cambios en la composición de los exudados radiculares, modificando la capacidad de estimular el crecimiento del hongo. Así, los exudados radiculares de plantas cultivadas en bajas concentraciones de fósforo produjeron una inducción del crecimiento y ramificación de las hifas fúngicas, mientras que los exudados obtenidos del cultivo de plantas en concentraciones elevadas de fósforo causaron el efecto contrario (Tawaraya y col, 1998; Piniór y col, 1999; Nagahashi y col, 1996; Nagahashi y Douds, 2000). Uno de los cambios más evidentes en la producción de exudados bajo diferentes concentraciones de fósforo está relacionado con las estrigolactonas. En este sentido, Balzergue y colaboradores (2011) observaron como plantas de guisante cultivadas en condiciones de alta disponibilidad de fosfato perdían su capacidad para estimular la micorrización debido a una menor producción de estrigolactonas. Sin embargo, la suplementación con estrigolactonas exógenas no pudo restaurar completamente la capacidad de colonización de las raíces de las mismas. Esto indica que, si bien las estrigolactonas están involucradas en la regulación de la micorrización mediada por la disponibilidad de fósforo, no es el único factor implicado, sugiriendo la existencia de otras señales tempranas que puedan controlar la estimulación de la colonización (Balzergue y col., 2011). Por otra parte, un estudio del perfil metabólico de exudados radiculares de plantas de guisantes cultivadas en condiciones de alta y baja concentraciones de fósforo disponible realizado por Laparre y colaboradores (2011), permitió observar un cambio significativo en la composición de ambos exudados detectándose una mayor estimulación de ciertos iones en condiciones de baja disponibilidad de fosfatos, algunos de los cuales fueron específicos, que podrían ser una de las vías de regulación de la micorrización por fósforo

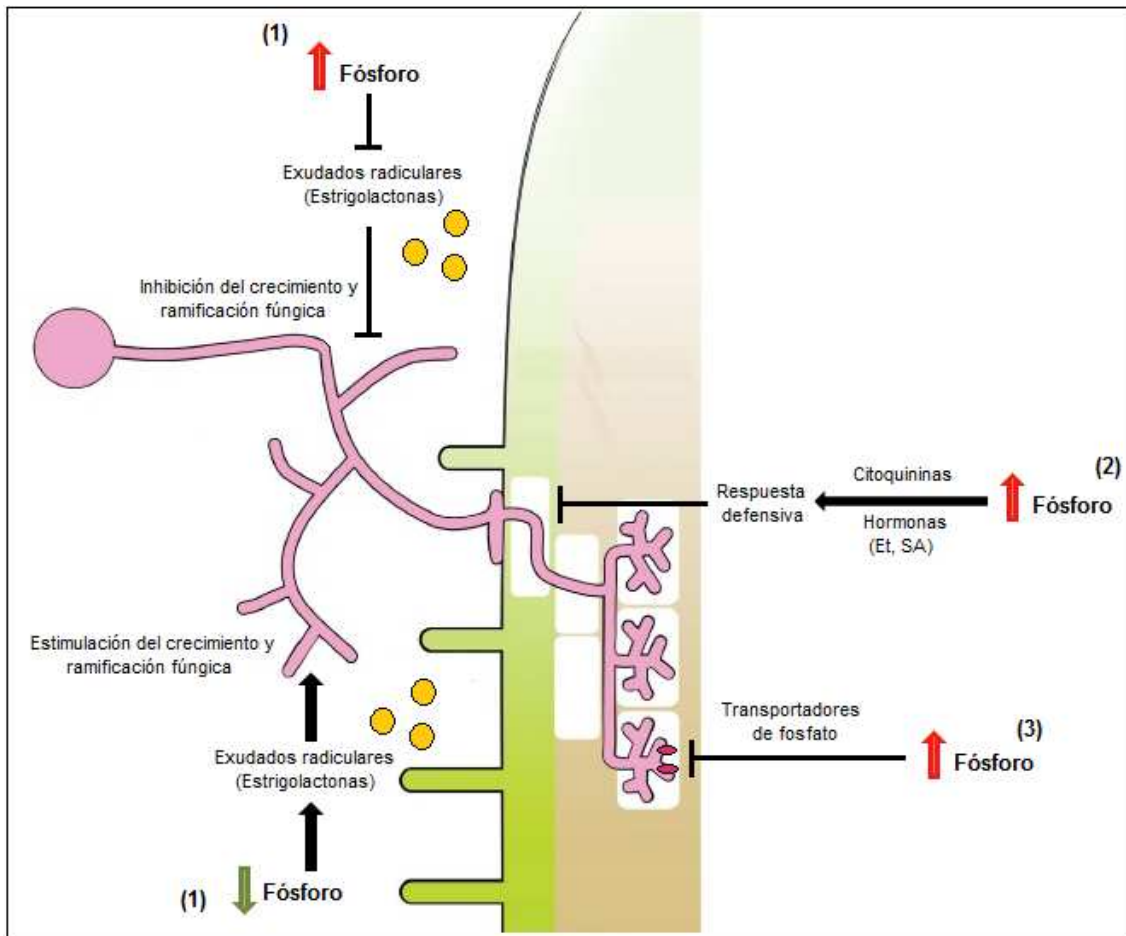


Figura VII: Resumen de la participación del fósforo en la regulación de la micorrización. **1)** Cambios en la composición de los exudados mediados por fósforo. **2)** Activación de respuestas defensivas vía citoquininas y hormonas vegetales. **3)** Regulación de los transportadores de fosfato.

Normalmente, la inhibición de la micorrización mediada por fósforo se produce durante la fase presimbiótica, antes de que se forme el apresorio, sin embargo, en cultivos agronómicos u otras circunstancias, el estatus nutricional de la planta puede alterarse con posterioridad a la formación de la simbiosis, como consecuencia de un aporte exógeno de fósforo, cambiando la relación simbiótica entre planta y hongo. En este sentido, la planta también tiene la capacidad de limitar el desarrollo del hongo dentro de la raíz a través de un mecanismo mediado por la disponibilidad de fósforo. En concreto, mediante la regulación de los transportadores de fosfato encargados de la transferencia de fósforo desde el hongo simbionte hacia ella. En este sentido, Nagy y colaboradores (2005) observaron una supresión de la inducción de los genes *LePT3*, *LePT4* y *LePT5*, codificantes de transportadores de fosfato específicos de la micorrización, en plantas de tomate cultivadas en condiciones de alta concentración de fósforo soluble. Como se ha mencionado anteriormente, el período de mantenimiento de

los arbusculos es dependiente de la funcionalidad de estos transportadores, llegando al colapso y desaparición una vez se ha perdido la capacidad de transporte de los mismos, limitando, de esta forma, el desarrollo del hongo MA en el interior de la raíz.

Estos transportadores tipo Pht1 se han encontrado en distintas especies de plantas, tales como tomate (Nagy y col., 2005; Xu y col., 2007), arroz (Paszkowski y col., 2002) o *M. truncatula* (Javot y col., 2007). Estudios recientes han demostrado que la ausencia en *M. truncatula* del gen *MtPT4*, que codifica para un transportador de fósforo 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 y col., 2007). 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 y col., 2005; Xu y col., 2007).

La regulación de la micorrización mediada por fósforo también ha sido relacionada con la inducción de genes de defensa activados a través de diferentes vías hormonales, fundamentalmente etileno. Así, Zsögön y colaboradores (2008) observaron una fuerte inhibición de la micorrización en plantas de tomate mutantes sobreproductoras de etileno en condiciones de baja concentración de fósforo en el suelo, mediada por la inducción de genes relacionados con la respuesta defensiva, y que no fue observada en las plantas silvestres ni en variedades mutantes de otras fitohormonas. Por otra parte, se ha comprobado que la actividad de la ACD oxidasa, que cataliza el último paso de la ruta de síntesis del etileno, disminuye en plantas micorrizadas frente a no micorrizadas. Sin embargo, en condiciones de disponibilidad de fósforo en el suelo, se produce un aumento de la actividad de la ACD oxidasa, a la vez que se inhibe la micorrización (McArthur y Knowles, 1992). Estos datos sugieren una activación de la respuesta defensiva durante la micorrización inducida por fósforo en la que posiblemente participe el etileno.

Además de actuar sobre la respuesta defensiva mediada por etileno, el nivel de fósforo posiblemente actúe sobre otros genes de defensa mediante otras vías, como pueden ser las citoquininas o el ácido salicílico (SA). En este sentido, se ha observado como un aumento de fósforo en el sustrato de crecimiento de plantas de naranjo es

capaz de producir una disminución de los niveles de citoquininas y con ello un aumento de la respuesta defensiva, inhibiendo la micorrización (Edriss y col., 1984). En cuanto al SA, en condiciones de alta disponibilidad de fósforo en el suelo, no se produce una inhibición de la respuesta mediada por esta fitohormona, permitiendo por tanto la regulación negativa del SA sobre la micorrización (David y col., 1998; Lambais y Mehdy, 1998). La respuesta mediada por SA durante el proceso de micorrización se describirá detalladamente en el apartado 4.3 de participación hormonal en el proceso de autorregulación de la micorrización.

4.2 Regulación de la respuesta defensiva en plantas micorrizadas.

Como es sabido, las plantas poseen mecanismos tanto constitutivos como inducibles de defensa frente a la posible invasión de microorganismos patógenos. Sin embargo, frente a microorganismos mutualistas, como el caso de hongos formadores de simbiosis micorriza arbuscular, estas respuestas defensivas son débiles, localizadas y no impiden la colonización. Por tanto, parte importante de la regulación de la formación de la micorriza arbuscular pasa por un control y regulación de la respuesta defensiva de la planta. En este sentido, una parte importante de esta respuesta defensiva es la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis o proteínas PR, a las que se les ha atribuido una actividad antifúngica (van Loon, 1999; van Loon y col., 2006). El control de la respuesta defensiva es un elemento clave en el establecimiento de la micorriza y la compatibilidad entre ambos simbiosis durante la colonización de la raíz por el hongo MA. De acuerdo con esto, diversos estudios han demostrado que la respuesta defensiva de la planta es inducida durante las etapas iniciales del desarrollo de la simbiosis micorriza arbuscular, aunque, posteriormente, dicha respuesta es reprimida y regulada permitiendo la entrada del hongo en el sistema radical (García-Garrido y Ocampo, 2002; Kapulnik y col., 2006; Liu y col., 2007). A continuación, se describen los procesos de inducción y supresión de la respuesta defensiva mediada por la planta durante el establecimiento de la simbiosis.

4.2.1 Inducción de la respuesta defensiva en las plantas durante la micorrización.

La existencia de plantas no hospedadoras, así como de plantas hospedadoras incompatibles con ciertas especies de hongos MA, son pruebas evidentes de la existencia de barreras defensivas frente a estos hongos, y de la capacidad de estos hongos para generar una respuesta defensiva en la planta. En este sentido, Doude y colaboradores (1998) observaron que en *Medicago sativa*, a pesar de ser una planta hospedadora de hongos micorrícicos, se produce una respuesta hipersensible en las células colonizadas por *Gigaspora margarita*, hongo MA no compatible con ella, durante la cual se acumulan compuestos fenólicos y flavonoides, produciéndose la necrosis y muerte celular en los puntos de infección. Por otra parte, la utilización de mutantes de guisante *Myc⁻*, incapaces de micorrizarse, ha permitido observar la inducción de una respuesta defensiva en la planta caracterizada por la acumulación de depósitos de calosa en la pared celular, de fenoles y la activación de proteínas PR, que bloquean la micorrización (Gollote y col., 1993).

Esta respuesta defensiva desencadenada por la planta se genera en los primeros estadios del proceso de micorrización. Una vez el hongo es reconocido, se produce una transducción de la señal, de manera similar a la que se origina en las interacciones planta-patógeno, responsable de la activación de genes de defensa. Así, el reconocimiento de *G. intraradices* puede producir la inducción de fitoalexinas en plantas de soja (Lambais, 2000), mientras que en plantas de *M. truncatula*, es capaz de inducir, además, la expresión de un gen codificante de una chalcona sintasa, enzima involucrada en la síntesis de flavonoides (Bonanomi y col., 2001). Por otro lado, también ha sido observada la respuesta hipersensible característica de las interacciones planta-patógeno en la asociación entre *M. truncatula* y *G. intraradices* en puntos de entrada de la hifa fúngica en la raíz vegetal (Salzer y col., 1999).

En etapas de formación del apesorio y penetración de hifas se observan otro tipo de respuestas de defensa. En plantas de tabaco, cebolla y judía micorrizadas se produce un incremento transitorio de catalasas y peroxidasas durante la formación del apesorio (Spanu y Bonfante-Fasolo, 1988; Lambais, 2000), mientras que en tabaco, este incremento de catalasas y peroxidasas, coincide con una acumulación de SA (Blilou y col., 2000).

También se ha observado cierta activación de fenómenos de defensa en etapas posteriores de colonización, localizados en las células que contienen arbusculos, posiblemente como un mecanismo de control de la dispersión de hifas y formación de arbusculos (García-Garrido y Ocampo, 2002). En este sentido, se produce una activación de genes relacionados con la respuesta defensiva de la planta que codifican para glicoproteínas ricas en hidroxiprolina o HRGP (Balestrini y col., 1997; Blee y Anderson, 2000), enzimas del metabolismo de flavonoides e isoflavonoides (Harrison y Dixon, 1993), enzimas involucradas en el metabolismo de especies reactivas de oxígeno (Blee y Anderson, 2000) e hidrolasas (David y col., 1998; Salzer y col., 2000). Algunos autores sugieren que esta respuesta defensiva desempeña un papel importante en el control del desarrollo del hongo durante la simbiosis (Lambais y Mehdy, 1996), sin embargo, diversos estudios han comprobado que la formación de micorrizas arbusculares en plantas transgénicas que expresan constitutivamente genes de respuesta no se ha visto afectada (Vierheilig y col., 1993; 1995; Campos-Soriano y col., 2010). Por tanto, o bien los hongos MA han desarrollado la capacidad de eludir los mecanismos de defensa controlados por la planta para colonizarlas, y/o existen una serie de mecanismos que suprimen dichas respuestas para permitir el desarrollo del hongo en el interior de la raíz vegetal.

4.2.2 Supresión de la respuesta defensiva de las plantas durante la micorrización.

Para que la asociación micorriza arbuscular pueda establecerse es necesario la reducción o supresión de la respuesta defensiva mediada por la planta. En este sentido, se ha sugerido que los hongos MA podrían poseer “elicitors” similares a los PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) de hongos patógenos, los cuales deben diferir sensiblemente en los hongos MA, no desencadenando una respuesta de la planta tan agresiva (Harrison, 2005). Por otra parte, los hongos micorrícicos podrían inducir alteraciones en las células de las plantas hospedadoras de tal modo que, esta alteración, produzca la destrucción de dichos elicitors fúngicos, evitando su acción inductora de respuesta defensiva. Un ejemplo de ello, podrían ser las células de abeto, las cuales son capaces de liberar una quitinasa que actúa sobre la quitina de las moléculas elicitoras liberadas por la pared celular de ectomicorrizas, produciendo la degradación de éstas en fragmentos más pequeños que no son capaces de activar la respuesta defensiva (Salzer y col., 1997a; 1997b). De igual modo, las quitinasas podrían tener un papel importante en

la simbiosis micorriza arbuscular puesto que se ha comprobado la liberación de quitinasas en raíces micorrizadas por hongos MA (Spanu y col, 1989, Bonanomi y col, 2001) y en *M. truncatula* se ha detectado la liberación de quitinasas específicas durante la micorrización arbuscular que no se produce frente a patógenos (Salzer y col., 2000).

Otro mecanismo propuesto para la regulación de la respuesta defensiva de la planta durante la formación de MA es la alteración de las vías de señales de transducción mediante el bloqueo de alguno de sus componentes, como especies reactivas de oxígeno o SA, que actúan como segundos mensajeros durante el proceso de micorrización (García-Garrido y Ocampo, 2002). En este sentido, se ha observado incrementos temporales de la actividad de catalasas y peroxidasas durante la micorrización, las cuales estarían implicadas en la degradación del peróxido de hidrógeno evitando que éste actuase como segundo mensajero, inhibiendo la activación de la respuesta defensiva de la planta (Blilou y col., 2000; Lambais y col., 2000). En tabaco, este incremento de la actividad de catalasas y peroxidasas se ha correlacionado con un aumento transitorio de SA (Blilou y col., 2000), el cual está implicado en la regulación de la respuesta mediada por la planta.

Por otra parte, hay evidencias de que la supresión de la respuesta defensiva de la planta puede estar mediada por el proceso de formación de los arbusculos. Se ha demostrado la existencia de una reducción de la expresión de genes relacionados con la síntesis de fitoalexinas en células corticales que contienen arbusculos y en células adyacentes, no observándose dicha reducción en las células de regiones no colonizadas de raíces micorrizadas (Harrison, 2005). Al igual que ocurre en los primeros estadios de la micorrización, las quitinasas podrían ejercer un papel importante en el proceso de regulación de esta respuesta. En los arbusculos la pared celular del hongo es más fina y la quitina no se encuentra altamente polimerizada (Bonfante-Fasolo y col., 1990), de tal modo que la concentración de oligómeros de quitina, que actuaría como molécula elicitora, podría ser mayor. Por otro lado, se ha detectado una inducción de la expresión de genes codificantes de quitinasas específicamente en los arbusculos (Bonanomi y col., 2001), sugiriendo un papel similar al que desempeñarían las quitinasas de células de abeto sobre la quitina de ectomicorrizas en la regulación de la respuesta defensiva (Harrison, 2005). En diversos estudios, se ha observado una correlación entre la regulación de la defensa de la planta y la aparición inicial del desarrollo arbuscular.

Puesto que la formación de los arbusculos es continua durante toda la simbiosis, la supresión de la defensa mediada por arbusculos sería también continua (Volpin y col., 1995; Gianinazzi-Pearson y col., 1996; David y col., 1998).

4.3 Participación de las hormonas vegetales en la regulación de la micorrización.

Las hormonas vegetales tienen un papel esencial en el desarrollo de las plantas, controlando un gran número de sucesos, entre ellos el crecimiento de las plantas, incluyendo sus raíces, la caída de las hojas, la floración, la formación del fruto y la germinación. Además, también desarrollan una importante función en la interacción con otros microorganismos, incluyendo relaciones simbióticas y patogénicas. Por esta razón, es fácil pensar que las hormonas vegetales también estén implicadas en la regulación de la micorrización. La prueba más evidente de ello proviene, principalmente, de la realización de experimentos de aplicación de fitohormonas sobre plantas micorrizadas y de la observación de alteraciones de sus niveles endógenos durante micorrización (Regvar y col., 1996; Barker y Tagu, 2000), aunque en muchas ocasiones los resultados obtenidos han sido contradictorios. En este apartado se pretende arrojar luz sobre la participación de diferentes hormonas vegetales durante el proceso de micorrización, atendiendo también a sus funciones en la interacción con otros microorganismos.

4.3.1 Auxinas.

Las auxinas están implicadas en la regulación de gran número de aspectos relacionados con el crecimiento y desarrollo de las plantas, incluidos división y elongación celular, diferenciación, tropismo, dominancia apical, senescencia, abscisión y floración (Woodward y Bartel, 2005; Teatle y col., 2006). Su ruta de síntesis es bastante compleja y aún no se ha caracterizado completamente, llegándose a proponer dos vías alternativas para la síntesis del ácido indol-3-acético (IAA), una dependiente de triptófano y otra independiente (Mano y Nemoto, 2012).

En la interacción planta-hongo formador de micorriza arbuscular las auxinas desempeñan un papel muy importante durante las primeras etapas del proceso. Prueba de ello es el incremento observado en la producción de raíces laterales durante la

colonización de la raíz hospedadora, similar al generado por el tratamiento exógeno de auxinas sobre raíces de plantas no inoculadas (Ludwig-Müller, 2000). Por otra parte, también se ha demostrado que la aplicación de IAA o de ácido triyodobenzoico (TIBA, un inhibidor del transporte de auxinas) produce un aumento de la micorrización (Gunze y Hennessy, 1980; Müller, 1999). Sin embargo, a pesar de todos estos datos que apuntan a un papel fundamental de las auxinas en la micorrización arbuscular, la función exacta que desempeñan durante el proceso no está aún bien definida. En este sentido, se han observado incrementos contradictorios en los niveles endógenos de auxinas y sus conjugados en plantas micorrizadas. Así, plantas de maíz inoculadas con *G. intrarradices* muestran un incremento de ácido indol-3-butírico (IBA) libre durante las primeras etapas de micorrización, mientras que en etapas posteriores el contenido en IBA libre se mantiene constante (Kaldorf y Ludwig-Müller, 2000). En soja, es el IAA el que presenta un incremento en plantas inoculadas frente a controles no inoculados (Meixner y col., 2005). Sin embargo, en tabaco, tomate y puerro no se observan alteraciones en los niveles de IAA durante la micorrización (Danneberg y col., 1992; Torelli y col., 2000; Shaul-Keinan y col., 2002). En cuanto a los niveles de conjugados de auxinas, no se ha detectado un incremento de los conjugados éster de IAA e IBA en raíces colonizadas, mientras que los niveles de sus conjugados amino aumentan en etapas tardías de la micorrización (Fizte y col., 2005). Por otro lado, la utilización de plantas de tabaco transformadas con el promotor inducible por auxinas *GH3* fusionado al gen reportero *GUS*, ha mostrado una acumulación de auxinas en raíces de plantas micorrizadas, sin embargo, esta acumulación no se ha podido correlacionar con una localización específica en estructuras fúngicas (Jentschel y col., 2007). Estos resultados sugieren la existencia de un complejo mecanismo de regulación de auxinas libres y conjugadas, el cual podría ser inducido durante las diferentes etapas de la micorrización (Fizte y col., 2005).

Por otra parte, las auxinas, en particular el IBA, pueden facilitar la colonización de las plantas hospedadoras mediante la inducción de un incremento del número de raíces laterales (Kaldorf y Ludwig-Müller, 2000). De acuerdo con esta hipótesis, la mayor actividad del micelio fúngico, caracterizada por la actividad de enzimas fúngicas, ha sido encontrada en raíces laterales de nueva formación (Tisserant y col., 1996). En este sentido, se ha observado un incremento del desarrollo de este tipo de raíces en plantas de maíz colonizadas por hongos MA coincidiendo con un aumento de los

niveles de IBA. El mismo efecto sobre la formación de raíces laterales se observó mediante la aplicación exógena de bajas concentraciones de IBA en plantas no inoculadas (Kaldorf y Ludwig-Müller, 2000). Además, la aplicación de IBA es capaz de producir la inducción de la germinación de esporas de hongo micorrízicos y el crecimiento de las hifas en condiciones axénicas (Barea, 1986). Por todo ello, se ha propuesto que las auxinas pueden favorecer la micorrización arbuscular mediante tres formas diferentes: activando la germinación de las esporas, induciendo el crecimiento del micelio fúngico y promoviendo la formación de raíces laterales (Kaldorf y Ludwig-Müller, 2000).

Otra de las posibles funciones de las auxinas durante la micorrización puede estar relacionada con la regulación de la respuesta de defensa en las primeras etapas de la simbiosis. En este sentido, se ha observado una reducción de la expresión de un gen codificante de una endoquitinasa relacionada con la respuesta defensiva inducida tanto por la inoculación de *G. intraradices*, como por el tratamiento con IAA en plantas de *M. truncatula* (Ludwig-Müller y Güther, 2007). Además, las auxinas también han sido relacionadas con la respuesta a estrés, ya que se ha observado un incremento en la expresión de un gen codificante de una glutatión S-transferasa (GST) e inducible por auxinas en células con arbusculos (Strittmatter y col., 1996), siendo la GST una enzima de respuesta a estrés que añade glutatión a diversos compuestos potencialmente citotóxicos para facilitar su transporte a la vacuola (Dean y col., 1995; Marrs y col., 1995). En conjunto, todos estos datos sugieren que las auxinas pueden contribuir a diversos cambios fenotípicos de la planta durante la micorrización para facilitar la formación de la simbiosis.

Por otra parte, también se ha relacionado la acción de las auxinas con la síntesis de estrigolactonas en etapas iniciales de la simbiosis. En este sentido, Hanlon y Coenen (2011), han comprobado, mediante la utilización de dos líneas mutantes de tomate alteradas en la capacidad de respuesta de auxinas (*dgt*) y sobreexpresantes de un transportador de eflujo de auxinas (*PCT*), la necesidad de la presencia de esta fitohormona para que las hifas fúngicas se dirijan hacia la raíz, siendo este efecto favorecido por la síntesis de estrigolactonas (Hanlon y Coenen, 2011).

4.3.2 Citoquininas.

Las citoquininas constituyen un grupo de hormonas vegetales implicadas, fundamentalmente, en la regulación de la división y diferenciación celular, así como la germinación y dormancia de las semillas, la senescencia, la dominancia apical, la síntesis *de novo* de capullos florales, y la estimulación de la expansión de las hojas (Mok, 1994). Además, regulan una gran cantidad de aspectos relacionados con el desarrollo y crecimiento de los órganos subterráneos y aéreos; controlan la respuesta a factores extrínsecos como las condiciones de luz o la disponibilidad de nutrientes y agua en la raíz; y tienen un papel importante en la respuesta frente a estreses abióticos y bióticos (Werner y Schmülling, 2009). Químicamente, se diferencian dos grupos de citoquininas: uno conformado a base de adeninas, como la zeatina, y otro conformado a base de fenilureas, como la difenilurea (Spichal, 2012).

En la simbiosis micorriza arbuscular, las citoquininas parecen estar involucradas en el reconocimiento inicial del hongo, en la supresión de la respuesta defensiva mediada por la planta y en la regulación del crecimiento vegetal derivado de la simbiosis. En lo que se refiere al reconocimiento inicial del hongo MA, se ha descrito que los receptores de citoquininas de las células vegetales desempeñan un papel fundamental en el establecimiento de la simbiosis entre plantas y diferentes microorganismos beneficiosos, como ocurre en la interacción entre *Arabidopsis thaliana* y *Piriformospora indica* (Vadassery y col., 2008). De modo similar, es posible que las citoquininas tengan una función importante en el establecimiento de la micorrización arbuscular, sin embargo, el mecanismo por el cual estarían involucradas no está aún claro (Ludwig-Müller, 2010).

Las citoquininas podrían estar implicadas en la regulación de la respuesta defensiva de la planta para facilitar la colonización de la raíz por el hongo micorrícico. En este sentido, se ha observado una reducción de la producción de quitinasas y proteínas PR en plantas de tabaco y puerro durante la micorrización, asociado a un incremento de citoquininas (Ginzberg y col., 1998; Shaul y col., 1999), mientras que la aplicación directa de citoquininas sobre plantas micorrizadas de tabaco es capaz de producir una reducción de las cantidades de la proteína PR1a y de una quitinasa básica (Mauch y col., 1988; David y col., 1998), señalando la importancia de estas hormonas vegetales en la regulación de la repuesta defensiva. Además, como se ha descrito

anteriormente en el apartado 4.1, se ha demostrado que un aumento de fósforo en el sustrato de naranjos es capaz de producir una disminución de los niveles de citoquininas y con ello un aumento de la respuesta defensiva, inhibiendo la micorrización (Edriss y col., 1984).

Otra de las posibles funciones de las citoquininas durante la micorrización puede estar relacionada con la estimulación del crecimiento vegetal producido por la simbiosis. De acuerdo con esto, Yao y colaboradores (2005) observaron un incremento de la citoquinina isopentenil adenina (iPA) tanto en raíz como en hojas de plantas de lichi, micorrizadas con *G. intraradices* y *Gigaspora margarita*. Estos autores atribuyen, al menos, parte de la estimulación del crecimiento de las plantas colonizadas por hongos MA al aumento de citoquininas durante la micorrización (Yao y col., 2005).

Por su parte, el hongo micorrícico también es capaz de sintetizar compuestos con función similar a citoquininas (Barea y Azcón-Aguilar, 1982), posiblemente para facilitar su propio desarrollo en la raíz. Apoyando esta hipótesis, se ha observado aumentos de los niveles de citoquininas en raíces micorrizadas de *Bouteloua gracilis*, *Linum usitatissimum*, naranjo, tabaco y alfalfa (Allen y col., 1980; Edriss y col., 1984; Drüge y Schöibeck, 1992, Van Rhijn y col., 1997; Ginzberg y col., 1998). Sin embargo, este incremento en los niveles de citoquininas solo se produce en fases tardías de la micorrización (Danneberg y col., 1992).

4.3.3 Giberelinas.

Las giberelinas (GAs) comprenden un gran grupo de ácidos carboxílicos diterpenoides que son ubicuos en las plantas superiores, cuyas principales funciones están relacionadas con la promoción de órganos y cambios en el desarrollo de la planta, incluidos la inducción de la brotación de yemas, la promoción de la floración y el desarrollo de frutos y la interrupción del periodo de latencia de las semillas, induciéndolas a germinar (Hedden y Thomas, 2012).

Existen pocos datos sobre la participación de las GAs en la interacción micorriza arbuscular. Mientras que en otras interacciones simbióticas beneficiosas como la nodulación (Ferguson y col., 2005) y la interacción con hongos promotores del crecimiento como *P. indica* las GAs tienen un papel importante en la regulación de la respuesta defensiva basal (Schäfer y col., 2009), el papel de las GAs durante el proceso

de micorrización no está tan claro. Allen y colaboradores (1982) observaron un incremento de la actividad de GAs en hojas de *Bouteloua gracilis* inoculadas con *G. fasciculatus*, sin embargo, en las raíces se produjo una disminución de la actividad. Resultados similares obtuvieron Dugassa y colaboradores (1996) en plantas de *Linum usitatissimum*. En este sentido, Mada y Baryaraj (1993) detectaron una exudación de GAs desde las raíces de *Leucaena sp.*, indicando que la menor actividad de GAs en las raíces podía deberse en parte a esta secreción, mientras que su acumulación en la parte aérea estaría involucrada en la promoción del crecimiento vegetal derivado de la simbiosis. Por el contrario, se ha observado un incremento de GAs en raíces y no en tallos de plantas de tabaco micorrizadas (Shaul-Keinan y col., 2002) y en plantas de *Agropyron thrachycaulum* inoculadas con *Glomus sp.* (Clapperton y col., 1985). Se ha postulado que este incremento de GAs pueda estar involucrado en la transferencia de carbohidratos en la raíz hacia el hongo, en lugar de promover el crecimiento de las partes superiores de las plantas (Blee y Anderson, 1998).

Por otra parte, la aplicación exógena de bajas concentraciones de GAs sobre raíces micorrizadas provoca la inhibición de la formación de los arbusculos, y dosis más altas son capaces de afectar a la frecuencia e intensidad de la micorrización, llegando a inhibirla completamente (El Ghachtouli y col., 1996), mientras que el tratamiento de raíces de cítricos con placobutrazol (un inhibidor de la síntesis de GAs) aumenta la micorrización (Michelini y col., 1989), sugiriendo la existencia de un efecto negativo de la GAs sobre la interacción micorriza arbuscular. Además, la aplicación exógena de GAs es capaz de inhibir la germinación de las esporas (Barea, 1986). En este sentido, estudios recientes han demostrado una acción reguladora negativa de GAs sobre la abundancia arbuscular y la frecuencia de micorrización. De igual modo, la regulación de la formación de los arbusculos en raíces de plantas de tomate 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 (Martín Rodríguez, 2013 Tesis Doctoral).

Recientemente, varios estudios de análisis transcriptómico han puesto de manifiesto la regulación diferencial de genes del metabolismo de giberelinas durante la micorrización (García-Garrido y col. 2012; Ortu y col., 2012).

4.3.4 Estrigolactonas.

Recientemente, las estrigolactonas han sido reconocidas como una nueva clase de hormonas vegetales, ya que, además de su papel como moléculas de señalización en la rizosfera, también controlan la arquitectura de planta mediante la inhibición de la ramificación de los brotes (Gómez-Roldán y col., 2008; Umehara y col., 2008). Químicamente, las estrigolactonas son moléculas orgánicas de pequeño tamaño derivadas de compuestos carotenoides que poseen un enlace éter muy lábil, fácilmente hidrolizable en la rizosfera.

En el apartado 3.1, que trata del diálogo molecular entre planta y hongo MA durante la fase presimbiótica del proceso de micorrización, se ha descrito el papel fundamental que poseen las estrigolactonas como factores de estimulación del crecimiento y ramificación del hongo formador de micorriza, necesario para el establecimiento de la simbiosis (Akiyama y col., 2005; Besserer y col., 2006). Por otra parte, en el apartado 4.1, dedicado al papel regulador del fósforo en la formación de la simbiosis micorriza arbuscular, se ha explicado como la disponibilidad de fósforo en el suelo puede generar cambios en la composición de los exudados radiculares, especialmente en las estrigolactonas, modificando la capacidad de colonización del hongo MA (Balzergue y col., 2011), lo cual indica que las estrigolactonas están involucradas en la regulación de la micorrización mediada por fósforo.

En este sentido, se ha relacionado a las estrigolactonas con la autorregulación de la micorrización, esto es, una vez que la colonización de las raíces por el hongo micorrizógeno alcanza un cierto nivel, se suprime la capacidad de una nueva colonización (Vierheilig, 2000a; Vierheilig y Piché, 2002; Vierheilig, 2004a, b). Varios estudios sobre el posible mecanismo de autorregulación de la micorrización han excluido tanto al contenido en fósforo de la planta (Vierheilig y col., 2000b) como a la competencia por el carbono (Lerat y col., 2003a, b) como factores reguladores de la supresión observada en la colonización por hongos MA en plantas ya micorrizadas. La simbiosis micorriza arbuscular induce cambios en el perfil transcripcional y hormonal de la planta (López-Raéz y col., 2010), observándose una reducción significativa de la producción de estrigolactonas en plantas micorrizadas. Así, plantas de maíz y sorgo micorrizadas son menos susceptibles a la infección por *Striga hermonthica* (Lendzemo y col., 2005), proponiéndose que esta reducción de la susceptibilidad de infección se

debe, al menos en parte, a una reducción en la producción de estrigolactonas (Lenzdemo y col., 2007, 2009; Matusova y col., 2005; Sun y col., 2008). De acuerdo con esto, se ha planteado que las plantas ya colonizadas pueden autorregular la micorrización mediante una reducción de la producción de estrigolactonas, de forma similar a la regulación de la infección de *Striga* en plantas micorrizadas (Matusova y col., 2005; Lenzdemo y col., 2007). Una prueba de ello es la menor susceptibilidad a la colonización por hongos MA de plantas de tomate mutantes deficientes en la producción de estrigolactonas, las cuales recuperan dicha capacidad mediante la aplicación exógena de la estrigolactona sintética GR24 (Koltai y col., 2010).

Por otra parte, las estrigolactonas parecen no estar involucradas en la no susceptibilidad de plantas no hospedadoras de hongos MA (Illana y col., 2011). Existen indicios de que los niveles de estrigolactonas en los exudados de raíces de plantas no hospedadoras son menores que en plantas hospedadoras de micorrizas arbusculares (Koide y Schreiner, 1992; Gionvanetti y Sbrana, 1998; Vierheilig y Bago, 2005). Sin embargo, la aplicación exógena de GR24 sobre diferentes especies de plantas no hospedadoras no es capaz de inducir la colonización por hongos MA (Illana y col., 2011).

4.3.5 Etileno.

El etileno es una hormonal vegetal gaseosa que participa en procesos de estrés en las plantas, así como en la maduración de los frutos, además de la senescencia de hojas y flores y de la abscisión del fruto (Abeles y col., 1992). El etileno es biosintetizado a partir de de la S-adenosil metionina, la cual forma un intermediario, el ácido 1-aminociclopropilcarboxílico, por acción de la enzima 1-Aminociclopropano-1-carboxilato sintasa. Posteriormente el intermediario se oxida por acción del oxígeno y la enzima aminociclopropanocarboxilato oxidasa, la cual utiliza ácido ascórbico como cofactor, dando como productos etileno, ácido cianhídrico y dióxido de carbono (Kende, 1993).

El etileno está relacionado también con la respuesta de defensa en plantas, por lo que se ha sugerido que tenga un papel importante en la regulación del proceso de micorrización (McArthur y Knowles, 1992). En este sentido, se han realizado diversos estudios sobre el efecto de la aplicación de etileno en plantas micorrizadas,

observándose, en la mayoría de los casos, un efecto negativo en la regulación de la micorrización derivada de su aplicación. Así, la aplicación de ethephon (compuesto químico que al solubilizarse libera etileno) sobre plantas de *M. sativa* inoculadas con *G. mosseae* es capaz de producir una reducción de la colonización por parte del hongo MA (Azcón-Aguilar y col., 1981), obteniéndose resultados similares mediante la aplicación de etileno en forma de gas en plantas de *Poncirus trifolata* (Ishii y col., 1996), guisante y puerro (Geil y col., 2001; Geil y Guinel, 2002). Se ha propuesto que uno de los mecanismos por el cual el etileno es capaz de regular negativamente la micorrización sea mediante la generación de cambios en la morfología de la raíz de la planta hospedadora (Kaldorf y Ludwig-Müller, 2000). De acuerdo con esta hipótesis, Geil y colaboradores (2001), observaron una reducción en la micorrización en plantas de guisante tratadas con etileno derivada de un desarrollo anormal de los apresorios fúngicos, más hinchados y ramificados, posiblemente como consecuencia de los cambios morfológicos producidos en la raíz debido al tratamiento con etileno (Geil y col., 2001). Sin embargo, el efecto del etileno sobre la micorrización puede depender de la dosis, ya que Ishii y colaboradores (1996) han demostrado que bajas concentraciones de etileno pueden estimular la germinación de las esporas.

Por otra parte, la utilización de plantas mutantes, alteradas en la síntesis y/o percepción de etileno, ha ayudado a comprender mejor el papel de esta fitohormona durante la simbiosis micorriza arbuscular. En este sentido, Morales-Vela y colaboradores (2007), encontraron una correlación entre la acumulación de altos niveles de etileno en plantas de guisante transgénicas (*E107*) y una reducción de la colonización por *G. mosseae*. De forma similar, mutantes de tomate más sensibles (*Never ripe*) y sobreproductores de etileno (*epinastic*) inoculados con *G. clarum* mostraron una menor micorrización en condiciones de baja concentración de fósforo, asociándose dicho efecto con la inducción de genes relacionados con la respuesta defensiva de la planta (Zsögön y col., 2008). Además, el impacto negativo de la mutación en las plantas *epinastic* sobre la colonización de la raíz micorrizada se ha relacionado con un aumento transitorio en el nivel de transcripción del gen receptor de etileno *LeETR6* (Torres de los Santos y col., 2011), confirmando que el etileno tiene un papel directo en la regulación negativa de la micorrización. En la misma dirección, plantas de tomate transgénicas *ripenenig-inhibitor (rin)* insensibles a etileno han mostrado un aumento de la micorrización no asociado a una reducción de los receptores de etileno *LeETR4-6*,

sugiriendo que, al menos en plantas de tomate, la regulación de la formación de la simbiosis micorriza arbuscular mediada por la vía RIN (de inhibición de la maduración) es independiente de la regulación mediada por los receptores de etileno (Torres de los Santos y col., 2011). Recientes estudios han demostrado un papel regulador negativo del etileno sobre la micorrización asociado a una interacción antagonista con ABA. Así, se ha evidenciado que la deficiencia de ABA incrementa el contenido en etileno que funciona como un regulador negativo de la intensidad de la micorrización en plantas de tomate (Martín Rodríguez y col., 2011).

También se han observado variaciones en la producción de etileno durante la micorrización, aunque con resultados contradictorios. En este sentido, se han detectado aumentos de etileno y ACD oxidasa (enzima que cataliza el último paso de la síntesis de etileno) en cultivos de papaya bien irrigados, y disminuciones bajo condiciones de estrés hídrico (Cruz y col., 2000). De forma similar, se ha visto un aumento de los niveles de etileno en raíces de *Linum usitatissimum* inoculadas con *G. intraradices* (Dugassa y col., 1996), mientras que en plantas de patata micorrizadas los niveles de ACD disminuyen respecto a sus controles no micorrizados (McArthur y Knowles, 1992). En plantas de tomate, sin embargo, no se han encontrado variaciones en los niveles endógenos de etileno y ACD tras la inoculación con *G. mosseae* y *G. intraradices* (Alexander y col., 1988; Vierheilig y col., 1994).

Por otra parte, la reducción de etileno en las plantas micorrizadas se ha relacionado con la promoción del crecimiento de la misma mediado por el hongo micorrícico, de forma similar a como se produce en la interacción entre *Sebacina vermifera*, un hongo endofítico promotor del crecimiento, y *Nicotiana attenuata* (Barazani y col., 2007; Ludwig-Müller, 2010). No obstante, Riedel y colaboradores (2008) señalan que en la interacción entre *N. attenuata* y *G. intraradices*, la planta hospedadora no percibe ningún beneficio, llegando a producirse una reducción de su crecimiento.

4.3.6 Ácido abscísico.

El ácido abscísico (ABA) es una hormona vegetal implicada en la modulación del desarrollo de la planta, la dormancia de las semillas y su germinación, la división celular y la respuesta frente a diferentes estreses abióticos como salinidad, sequía, frío o

radiación (Santner y col., 2009; Cutler y col., 2010). Se trata de un sesquiterpeno derivado del metabolismo de β -carotenoides en los plastidios, y de la misma ruta derivan las giberelinas, las estrigolactonas y los α -carotenoides (Cutler y Krochko, 1999; Taylor y col., 2005).

Debido a que el ABA participa en la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta, y que éstos eventos se ven alterados durante la micorrización, no es de extrañar que esta fitohormona tenga un papel importante en la simbiosis. Se han realizado diversos experimentos acerca del contenido de ABA en plantas micorrizadas, sin embargo, los datos obtenidos son contradictorios. Así, en plantas de maíz y soja inoculadas con *Glomus* se ha observado un aumento de la cantidad de ABA en hojas y raíces respecto a plantas control no inoculadas (Danneberg y col., 1992; Meixer y col., 2005). Por el contrario, raíces de *B. gracilis* inoculadas con *G. fasciculatus* mostraron una reducción de los niveles de ABA en hojas, mientras que en raíz se mantuvieron inalterados (Allen y col., 1992). Por otra parte, también se ha demostrado que las hifas de *G. intraradices* son capaces de producir ABA (Esch y col., 1994, Ludwig-Müller, 2005). Una posible explicación de la reducción de los niveles de ABA en la hojas podría ser que la planta disminuyera la síntesis de esta fitohormona como adaptación al ABA producido por el hongo, si bien, también esta reducción ha sido relacionada con un mejor balance hídrico de las plantas micorrizadas frente a la sequía (Barker y Tagu, 2000; Ruíz-Lozano, 2003).

Además de estos resultados, el análisis de plantas de tomate mutantes *sitiens*, deficientes en la síntesis de ABA, ha demostrado que esta fitohormona es necesaria para completar el proceso de formación de los arbusculos y para su correcto funcionamiento, afectando también a la capacidad de colonización del hongo (Herrera-Medina y col., 2007). Estos efectos fueron restaurados mediante la aplicación exógena de ABA, observándose también un pequeño incremento de la micorrización en plantas de tomate silvestre tratadas con esta fitohormona. Asimismo, Martín-Rodríguez y colaboradores (2010) advirtieron una reducción de la micorrización en plantas de tomate tratadas con tungstato sódico, un potente inhibidor de la síntesis de ABA. Todos estos resultados indican que el ABA tiene un papel fundamental y funcional durante la simbiosis micorriza arbuscular. Por otra parte, plantas de tomate mutantes *notabilis*, con una deficiencia menos acusada en la capacidad de síntesis de ABA, no mostraron efectos

sobre la micorrización (Zsögon y col., 2008) o solo se observaron al final del proceso de colonización (Martín-Rodríguez y col., 2010), lo cual sugiere que la diferencia en la gravedad de la deficiencia de síntesis de ABA entre los mutantes *sitiens* y *notabilis* puede estar relacionada con las diferencias en el desarrollo de la simbiosis micorriza arbuscular.

Existen evidencias de una interacción antagónica entre las vías de señalización de ABA y etileno (Beaudoin y col, 2000; Gazzarrini y McCourt, 2001). La deficiencia de ABA en plantas puede producir una inducción de etileno, en este sentido, se ha sugerido que uno de los mecanismos utilizados por el ABA para determinar la susceptibilidad a la infección fúngica podría ser a través de la modulación negativa de la vía de etileno (Herrera-Medina y col., 2007; Martín-Rodríguez y col., 2010; 2011). Como se ha mencionado anteriormente, la utilización de mutantes *sitiens* y *notabilis* ha puesto de manifiesto una correlación entre el contenido de ABA en las raíces y la capacidad de micorrización. El uso de diferentes líneas de tomate deficientes en la percepción y síntesis de etileno, suplementadas con tungstato sódico (inhibidor de ABA), ha demostrado que la reducción en la colonización de las raíces por la aplicación de tungstato sódico se correlaciona con el aumento de la sensibilidad de las plantas a etileno (Martín-Rodríguez y col., 2011). Estos resultados fueron corroborados mediante el estudio del efecto sobre la micorrización en plantas *sitiens* tratadas con AVG, un potente inhibidor de la síntesis de etileno, y suplementados con ABA. La inhibición de la síntesis de etileno en *sitiens* incrementó la intensidad de micorrización mientras que la aplicación de ABA restauró la abundancia arbuscular en las zonas micorrizadas de la raíz (Martín-Rodríguez y col., 2011). Esto sugiere la existencia de un mecanismo dual dependiente/independiente de etileno en el papel del ABA en la regulación de la micorrización arbuscular.

Por otra parte, también se ha relacionado al ABA con la regulación de auxinas durante la micorrización. El ABA puede inducir la biosíntesis de auxinas como el IAA (Ludwig-Müller y col., 1995), y se ha visto como la cantidad de auxinas incrementa en plantas de maíz y soja micorrizadas (Kaldorf y Ludwig-Müller, 2000; Meixer y col, 2005), sugiriendo que la inducción de estas auxinas durante la micorrización puede estar regulada por ABA, sintetizado por el hongo. Este podría ser un mecanismo del hongo MA para aumentar el número de raíces laterales, inducidas por el incremento de auxinas

en la planta, y así las posibilidades de entrada en la raíz (Ludwig-Müller y col., 1997; Kaldorf y Ludwig-Müller, 2000).

Otra de las posibles funciones del ABA durante la micorrización puede estar relacionada con la regulación de la captación de carbono en los arbusculos por parte del hongo MA (Schaarschmidt y col., 2007). En este sentido, plantas de tabaco transgénicas con un ligero incremento de la actividad invertasa mostraron un aumento de la micorrización respecto a plantas silvestres, acompañado de un incremento de ABA (Schaarschmidt y col., 2007), sugiriendo una conexión entre ABA y mecanismo de captación de carbono del hongo micorrízico en los arbusculos.

4.3.7 Ácido Salicílico.

El ácido salicílico (SA) es una hormona vegetal que participa en procesos como la germinación de semillas, crecimiento celular, respiración, cierre de estomas, expresión de genes asociados a senescencia, repuesta a estrés abiótico y de forma esencial en la termogénesis, así como en la resistencia a enfermedades (Raskin, 1992; Vlot y col., 2009). Adicionalmente, se ha descrito que en algunos casos el efecto del SA dentro del metabolismo de las plantas puede ser de forma indirecta ya que altera la síntesis y/o señalización de otras hormonas como el ácido jasmónico, etileno y auxinas (Lorenzo y Solano 2005; Broekaert y col., 2006; Loake y Grant 2007).

En la interacción micorriza arbuscular, el SA se ha relacionado con la inducción de la respuesta defensiva en la planta (García-Garrido y Ocampo, 2002). En este sentido, Herrera-Medina y colaboradores (2003) observaron una reducción de la colonización de plantas de tabaco transgénicas *CSA* sobreproductoras de SA, mientras que en plantas de tabaco mutantes *NahG*, con niveles de SA reducidos, la colonización aumentó respecto a las plantas silvestres. Sin embargo, estos autores detectaron una colonización similar al final de los experimentos tanto en plantas transgénicas (*NahG*, *CSA*) como en silvestres, indicando que los niveles de SA en planta pueden provocar un retraso en la colonización pero no parecen afectar al potencial máximo de micorrización de las mismas (Herrera-Medina y col., 2003). Este hecho señala que el SA podría desarrollar un papel importante en la primera etapa de contacto entre ambos simbiosis (Gutjahr y Paszkowski, 2009). En este contexto, Siciliano y colaboradores (2007) han

detectado un incremento de la expresión de una proteína relacionada con la patogénesis, (PR-10) inducible por SA, en células de raíz de *M. truncatula* cercanas al apresorio fúngico y que posteriormente es reprimida durante la formación del PPA y la penetración del hongo en la célula.

Por otra parte, Blilou y colaboradores (2000) demostraron que la aplicación exógena de SA sobre plantas de arroz micorrizadas produce un retraso en la colonización proporcional al SA añadido en el suelo, aunque no observaron ningún efecto sobre la capacidad infectiva del hongo. En cambio, la aplicación exógena de SA sobre la parte aérea en plantas de *Carica papaya*, y *Trapeaolum majus* no produjo ningún efecto sobre la colonización (Ludwig-Müller y col., 2002), señalando que el papel del SA sobre la micorrización no parece ser sistémico, sino local.

En conjunto, estos resultados sugieren que el SA participa en la inducción de la respuesta defensiva de la planta durante las primeras etapas de la micorrización, pero que dicha respuesta debe ser suprimida o atenuada de alguna manera para permitir la colonización del hongo MA. Prueba de ello es que la acumulación transitoria de proteínas PR y quitinasas en plantas de tabaco provocada por la aplicación de análogos de SA fue mayor en plantas no micorrizadas que en plantas inoculadas con hongos MA (David y col., 1998; Ginzberg y col., 1998; Shaul y col., 1999). Además, se ha propuesto que esta regulación de la respuesta mediada por SA del proceso de micorrización pueda ocurrir a través de la interacción de esta fitohormona con otras hormonas vegetales tales como las auxinas (Ludwig-Müller y Güther, 2007) y citoquininas (Ginzberg y col., 1998).

5. PARTICIPACIÓN DE LAS OXILIPINAS EN LA REGULACIÓN DE LA MICORRIZACIÓN

Uno de los objetivos de este trabajo de Tesis doctoral se centra en el estudio de la participación de las oxilipinas, principalmente ácido jasmónico (JA) y sus derivados, los jasmonatos, en la regulación del proceso de micorrización arbuscular. Por esta razón, y a pesar de que el JA es también una hormona vegetal, se ha decidido recoger los conocimientos que se tienen hasta la fecha sobre el papel regulador de esta

fitohormona durante la micorrización en un apartado separado, no perdiendo de vista nunca la relación e interacción que el JA tiene con otras hormonas vegetales en dicho proceso.

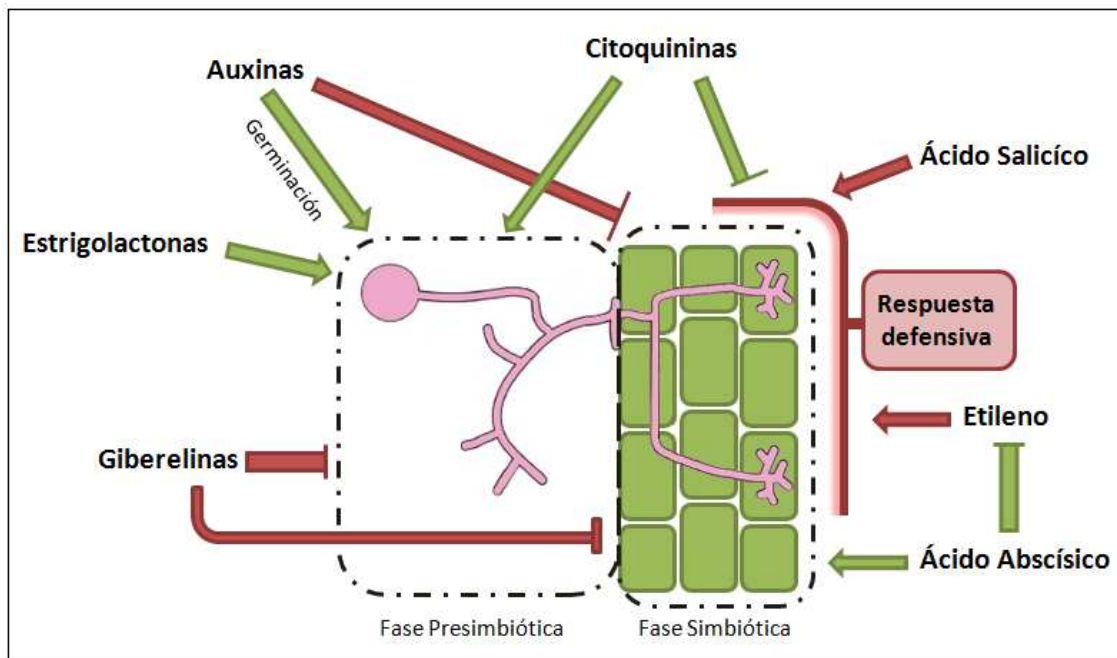


Figura VIII: Resumen de la participación de las hormonas vegetales en la regulación de la micorrización arbuscular. Las flechas rojas representan una función negativa sobre el desarrollo de la micorrización, mientras que las flechas verdes simbolizan una función positiva. Elaboración propia.

Los jasmonatos pertenecen a un grupo de fitohormonas lipídicas, derivadas principalmente de la oxigenación de los ácidos grasos linoleico y linolénico, denominadas oxilipinas, que actúan como moléculas señalizadoras de la respuesta de las plantas a numerosas situaciones de estrés y participan en diversos procesos de desarrollo. Entre las situaciones de estrés que regulan están la respuesta a heridas, la exposición a ozono, sequía y el ataque frente a patógenos y plagas, así como la participación en la interacción planta-microorganismo (Howe y Schilmiller, 2002; Lorenzo y Solano, 2004; Wasternack, 2007; Mosblech y col., 2009). En este sentido, no es de extrañar que los jasmonatos desempeñen un papel esencial durante el proceso de micorrización arbuscular, tanto en su formación, como en la regulación de la respuesta defensiva derivada de la colonización del hongo micorrícico.

5.1 Ruta de biosíntesis de oxilipinas.

Las oxilipinas en plantas pertenecen a un grupo de compuestos biológicamente activos con diversidad estructural y que se generan por la acción coordinada de lipasas, lipoxigenasas (LOXs) y un grupo de citocromos P450 (CYP74) especializados en el metabolismo de hidroperóxidos de ácidos grasos (Howe y Schilmiller, 2002), incluyendo la formación de hidroperoxi-, hidroxi-, oxo-, o keto-ácidos grasos, éteres de divinilo, aldehídos volátiles, y/o la hormona vegetal JA (Grechkin, 1998; Mosblech y col., 2009).

El primer paso de la síntesis de oxilipinas es la formación de hidroperóxidos de ácidos grasos poliinsaturados, la cual puede producirse mediante procedimientos enzimáticos (Bleé, 1998) o por (auto)oxidación química (Mueller, 2004).

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), incluidos el ácido linoleico (18:2), el ácido linolénico (18:3) y el ácido hexadecatrienoico (16:3) son muy abundantes en las membranas del cloroplasto y pueden oxidarse fácilmente para dar los correspondientes hidroperóxidos de ácidos grasos. Bajo condiciones de estrés oxidativo, los hidroperóxidos de ácidos grasos se forman por la oxidación de los PUFAs catalizada por radicales libres, pudiendo también ser oxidados de forma no enzimática para generar fitoprostanos, moléculas relacionadas con la respuesta a estrés oxidativo (Mueller, 2004) (Figura IX). Alternativamente, los hidroperóxidos de ácidos grasos pueden ser sintetizados enzimáticamente por la acción de lipoxigenasas (LOXs) o dioxigenasas (DOXs). En plantas, la síntesis de la mayoría de las oxilipinas se inicia mediante la adición de una molécula de oxígeno por una lipoxigenasa en el carbono 9 ó 13 del ácido linoleico o linolénico, generando las vías 9 ó 13-LOX dependiendo del lugar donde se produzca dicha oxigenación (Siedow, 1991). Los hidroperóxidos de ácidos grasos resultantes pueden ser sustrato para varias vías metabólicas iniciadas por las enzimas: aleno óxido sintasa (AOS), divinil éter sintasa (DES), hidroperóxido liasa (HPL), peroxigenasa (PXG), epoxi alcohol sintasa (EAS) y/o LOX, dando lugar a la formación de diferentes grupos de oxilipinas en plantas, incluidos los jasmonatos (Blee, 2002; Feussner y Wasternack, 2002; Wasternack, 2007; Mosblech y col., 2009) (Figura IX). El grupo de oxilipinas más ampliamente estudiado es la rama 13-LOX derivado de la vía iniciada por las enzimas del grupo de citocromos CYP74: AOS, HPL y DES, ya

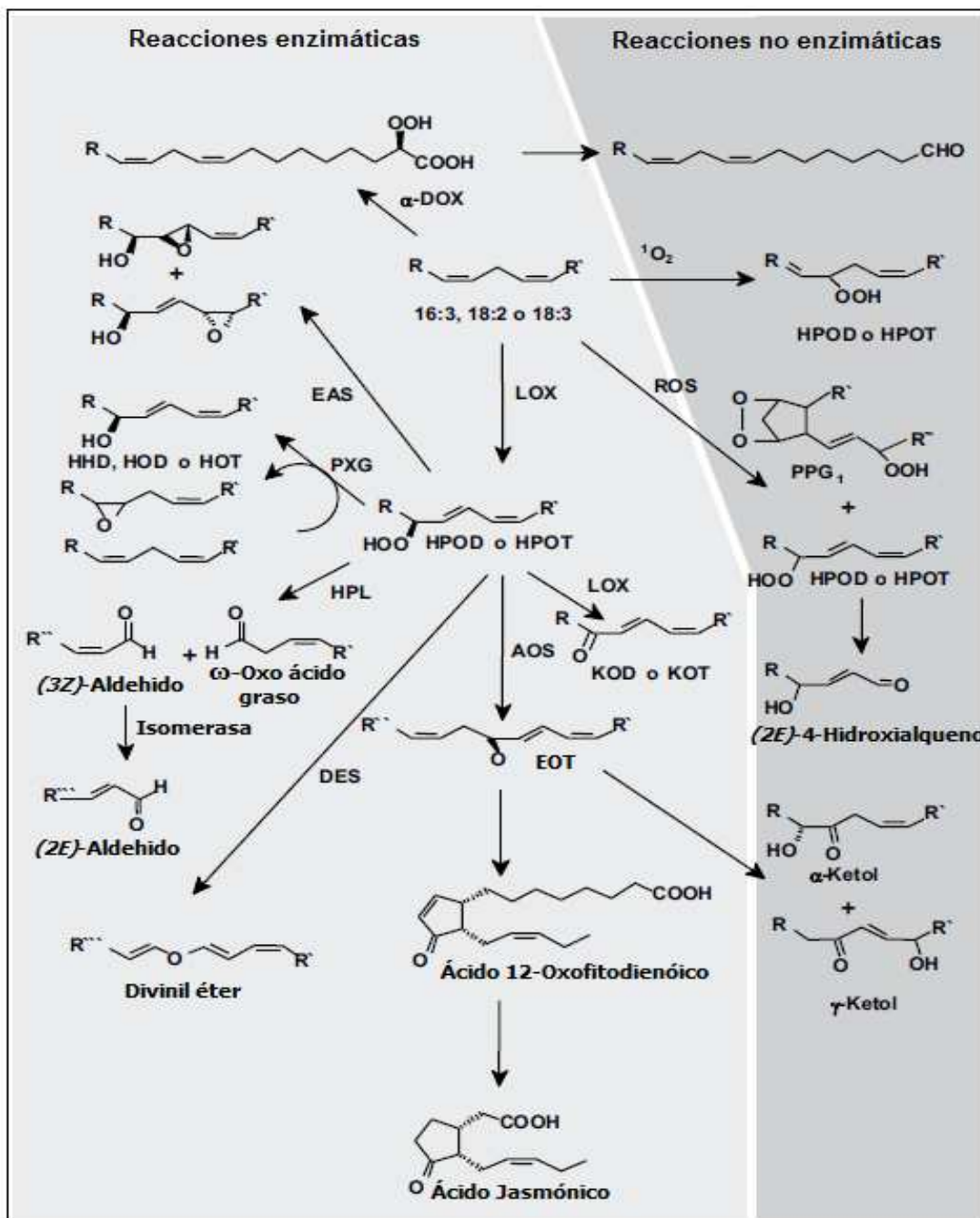


Figura IX: Resumen general de la biosíntesis de oxilipinas. La formación de oxilipinas comienza con la oxidación de ácidos grasos insaturados (PUFAs) con estructura 1-4-pentadieno, tales como el ácido linoleico o el ácido linolénico. La conversión inicial de los PUFAs por la lipoxigenasa (LOX) o dioxigenasa (α -DOX) da lugar a hidroperóxidos de ácidos grasos, que son sustratos para vías metabólicas alternativas iniciadas por las enzimas: AOS (aleno óxido sintasa), DES (divinil éter sintasa), HPL (hidroperóxido liasa), PXG (peroxigenasa), EAS (epoxi alcohol sintasa) y/o LOX. El EOT (ácido epoxi octadecatrienoico) puede ciclarse espontáneamente para formar ciclopentanonas o hidrolizarse en α -ketol y γ -ketol. Bajo condiciones de estrés oxidativo los hidroperóxidos de ácidos grasos se forman por la oxidación de PUFAs catalizada por radicales libres, o también de forma no enzimática. Extraído de Mosblech y col, 2009.

que conducen a la familia de los jasmonatos incluyendo JA/MeJA y su precursor, 12-OPDA. Sin embargo, en los últimos años, la vía 9-LOX ha empezado a ser de interés debido a su papel esencial en la defensa de la planta frente a patógenos microbianos (Blee, 2002; Velosillo y col., 2007).

5.1.1 Ruta de biosíntesis de 9 y 13-LOX-CYP74 oxilipinas en plantas.

Como se ha mencionado, las enzimas AOS, HPL y DES, pertenecientes a una familia atípica de citocromos P450 monoxigenasas (enzimas CYP74), se han identificado como enzimas clave para en el metabolismo de oxilipinas y, especialmente, de jasmonatos. Estas enzimas, al contrario que otras enzimas P450, no requieren oxígeno molecular ni NADPH-dependiente de una citocromo P450 reductasa como cofactores para llevar a cabo la reacción enzimática, utilizando hidroperóxido de acilo tanto de sustrato como de donador de oxígeno para la formación de los enlaces carbono-oxígeno (Howe y Schillmiller, 2002; Werck-Reichhart y col., 2002).

La rama 13-LOX, derivada de la vía iniciada por la enzima AOS, es la responsable de la formación del JA y su conjugado activo, el ligando jasmonil-iso-leucina. La síntesis comienza en los plastidios con la liberación de ácido α -linolénico (α -LeA) a partir de lípidos de membrana por acción de una lipasa, el cual es transformado en ácido 13-hidroperoxi- α -linolénico (13-HPOT) por una lipoxigenasa (Figuras X; XI). A continuación, la AOS convierte el 13-HPOT en un intermediario inestable, el ácido 12-13-epoxi-9-11-15-octadecatrienoico (12,13-EOT) (Tijet y Brash, 2002), que es utilizado como sustrato por la enzima aleno óxido ciclasa (AOC), dando lugar al ácido 12-oxodecatrienoico (12-OPDA) (Brash y col., 1988; Hamberg y Falhstadius, 1990). En una vía paralela, procedente del metabolismo del ácido linoleico, las enzimas AOS y AOC transforman el ácido 13-hidroperoxilinoleico (13-HPOD) en dinor-OPDA (Webber y col., 1997). El 12-OPDA es transportado desde el plastidio, por un mecanismo desconocido, hacia los peroxisomas mediante un transportador tipo ABC (Zolman y col., 2001; Footitt y col., 2002; Hayashi y col., 2002). En el peroxisoma, el 12-OPDA es activado por una OPDA:CoA ligasa (Theodoulou y col., 2005) y reducido por una OPDA reductasa (OPR3) generando el ácido 3-oxo-2-[2'-pentenil]-ciclopentano-1-octanoico (OPC-8:0) (Schaller y col., 2000; Stintzi y Browse,

2000; Strassner y col., 2002), el cual es transformado en JA tras tres ciclos de β -oxidación (Vick y Zimmerman, 1984). Posteriormente, el JA es exportado al citosol por un mecanismo desconocido, donde puede ser conjugado con una isoleucina mediante la acción de una ácido jasmonato-amino transferasas, produciendo la forma biológicamente activa del JA, el (+)-7-iso-jasmonoil-L-isoleucina (Ile-JA) (Fonseca y col., 2009).

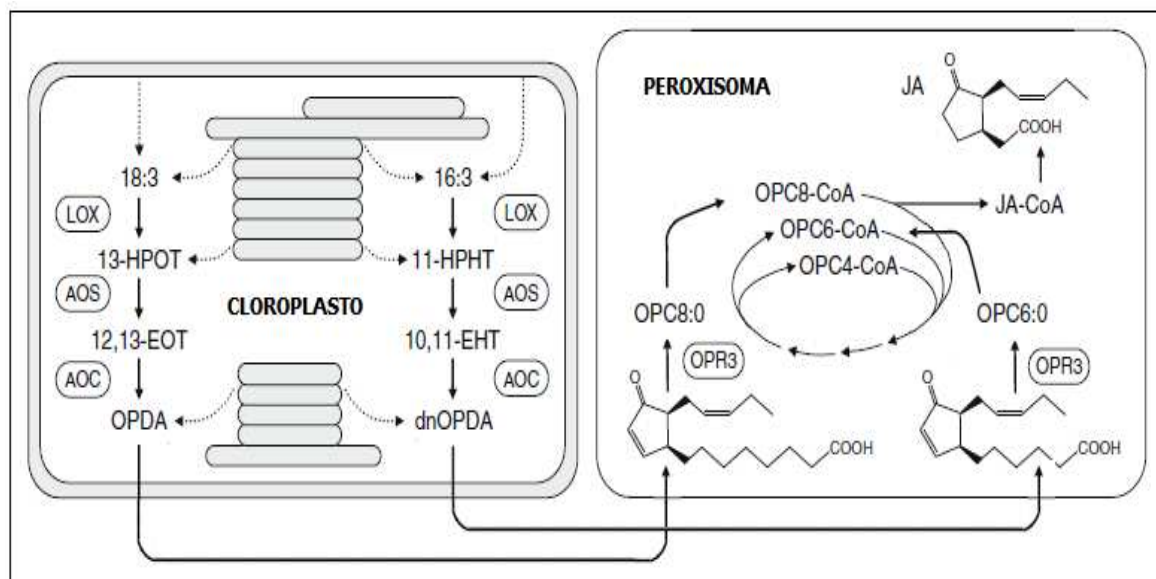


Figura X: Esquema de biosíntesis de jasmonatos. Los ácidos grasos insaturados (18:3 y 16:3) son convertidos a OPDA y dinorOPDA por la acción consecutiva de las enzimas LOX, AOS y AOC en los plastidios. Dentro de los peroxisomas el ácido jasmónico se genera por la acción de OPR3 y por tres ciclos de β -oxidación. Las flechas discontinuas representan la liberación de ácidos grasos por la acción de lipasas. Adaptado de Schaller y Stintzi 2009.

Por su parte, la enzima HPL está involucrada en la escisión de hidroperóxidos de ácidos grasos para generar compuestos volátiles de seis carbonos (alcoholes y aldehídos) conocidos como volátiles de hojas verdes (VHVs), entre los que se incluyen (2E)-hexenal, (2E)-hexenol, (3Z)-hexenal, hexanal y hexanol, dependiendo del sustrato, y disminuyendo la cantidad de hidroperóxidos de ácidos grasos disponibles para la producción de jasmonatos (Matsui, 2006). En general, los VHVs son liberados cuando las hojas son dañadas mecánicamente y cada compuesto volátil tiene un olor característico. Se ha demostrado la utilidad de estos compuestos como señales de defensa frente a diferentes insectos (Vancanneyt y col., 2001; Eigenbrode y col., 2002), sin embargo, se cree que no hay una razón específica para la emisión de estos

compuestos y que cada especie han adaptado su emisión para la obtención de diferentes beneficios (Owen y Peñuelas, 2005).

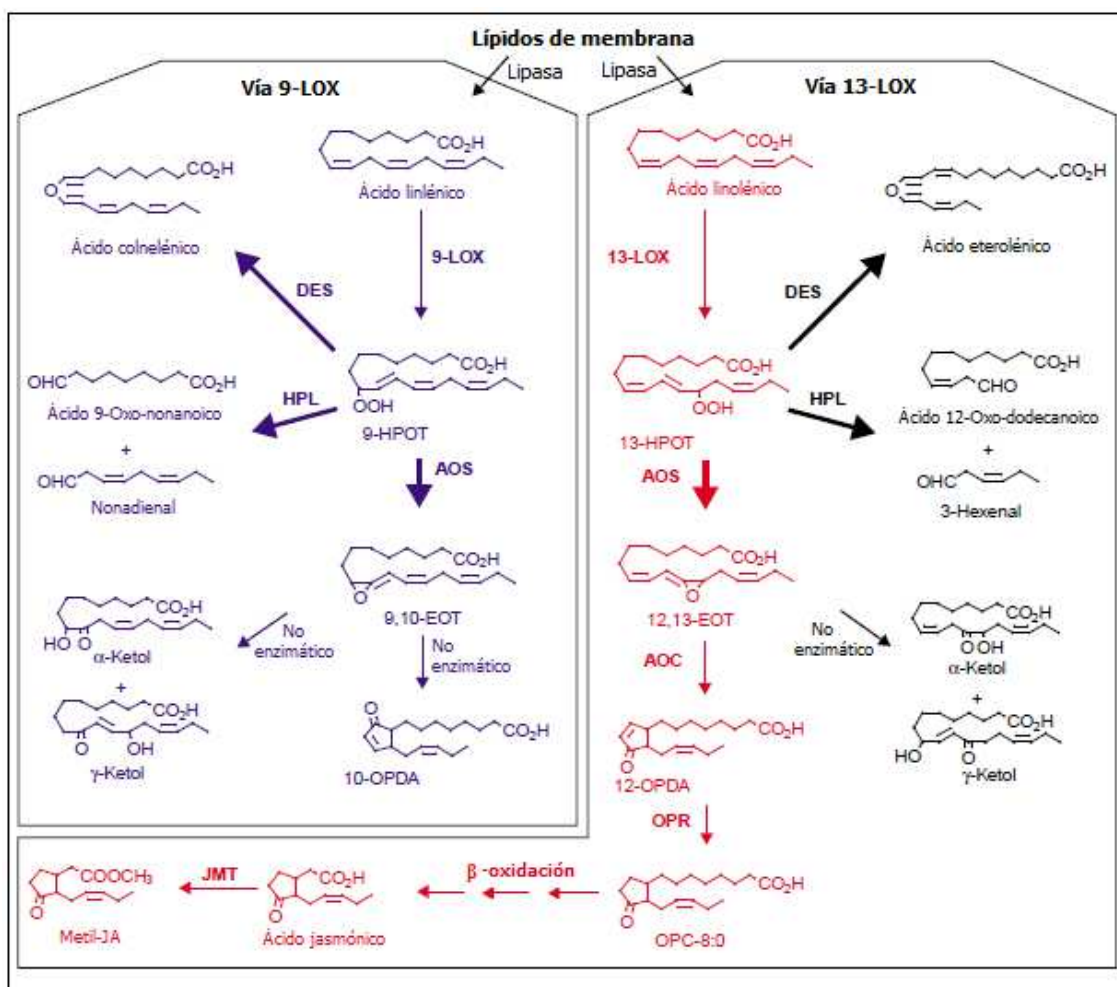


Figura XI: Biosíntesis de las vías 9-LOX y 13-LOX derivadas de actividad la actividad de las enzimas CYP74. Las flechas azules representan la vía 9-LOX. Las flechas rojas simbolizan la vía 13-LOX iniciada por la enzima AOS que da lugar al ácido jasmónico. Las flechas negras representan la conversión del 13-HPOT por la enzima DES en ácido eterolénico y por la enzima HPL en ácido 12-oxo-dodecanoico y 3-hexenal. Extraído de Howe y Schillmiller, 2002.

La enzima DES cataliza la conversión de hidroperóxidos de ácidos grasos en diviniléteres. Estos éteres vinílicos se pueden degradar posteriormente a compuestos volátiles dando lugar a nonenales. Se han aislado cDNAs codificantes de esta enzima en tomate (Itoh y Howe, 2001), tabaco (Fammartino y col., 2007), patata (Stumpe y col., 2001) y ajo (Stumpe y col., 2008). Mientras las enzimas de tomate, tabaco y patata son altamente específicas para los 9-hidroperóxidos, en ajo DES tiene preferencia por los sustratos 13-hidroperóxidos (Stumpe y col., 2008).

Por otra parte, el metabolismo de los 9-hidroperoxiácidos grasos generados por la acción de las enzimas CYP74, da lugar a un grupo de oxilipinas estructuralmente parecido al de la vía 13-LOX pero cuyas funciones no son todavía bien conocidas. La ruta de síntesis comienza con la transformación del ácido α -linolénico a 9-hidroperoxi- α -linolénico (9-HPOT) por acción de una lipoxigenasa de forma similar a como ocurre en la vía 13-LOX (Figura XI). Sin embargo, el producto final de la ruta metabólica iniciada por la enzima AOS es el 10-OPDA y no un análogo del JA, el cual se genera por la transformación no enzimática del sustrato 9,10-EOT (Hamberg, 2000). Por otra parte, la enzima DES cataliza el paso de 9-HPOT a ácido colnelénico, mientras que la enzima HPL, de manera similar a lo que ocurre en la vía 13-LOX, produce la escisión del 9-HPOT en compuestos volátiles de seis carbonos (Howe y Schilmiller, 2002).

5.1.2 Ruta de señalización de los jasmonatos (rama AOS de la vía 13-LOX).

Como hemos visto anteriormente, la ruta de biosíntesis de jasmonatos o ruta de octadecanoides ha sido extensamente estudiada y se conocen bien las enzimas implicadas en cada paso y la localización subcelular de las mismas. Sin embargo, ha sido recientemente cuando se ha comenzado a comprender los mecanismos de transmisión de la señal mediada por jasmonatos. Los conocimientos que se tenían hasta ahora sobre la ruta de señalización de este grupo de hormonas en plantas se han obtenido, fundamentalmente, mediante el uso de mutantes con una capacidad alterada en la producción de jasmonatos o afectados en la sensibilidad a JA y sus derivados. No obstante, el uso de nuevas técnicas moleculares ha permitido desentrañar en parte los mecanismos de transducción de la señal.

Entre los mutantes insensibles a JA en *Arabidopsis* destaca *coil* (*coronatine insensitive 1*), el cual se caracteriza por una pérdida completa de sensibilidad al JA. Fue identificado por Feys y colaboradores (1994) en ensayos de inhibición del crecimiento de la raíz y acumulación de antocianinas mediados por JA y, aunque se describió primero en *Arabidopsis*, se ha descrito posteriormente un homólogo en plantas de tomate (*LeCOII*, Li y col., 2003), indicando la existencia de un alto grado de conservación en diferentes especies. El gen *COII* codifica para una proteína con un dominio F-Box. Puesto que este tipo de proteínas suele participar en la formación de complejos ubiquitin-ligasa E3 de tipo SCF, la presencia del dominio F-box en *COII* sugirió la participación de la degradación de proteínas por el proteosoma como un

mecanismo de regulación de la señalización de JA (Xie y col., 1998). Esta hipótesis se ha comprobado posteriormente mediante la demostración de que *COII* participa en la formación de complejos SCF funcionales, y que mutantes deficientes en otros componentes de complejos SCF también muestran deficiencias en la señalización de JA (Xu y col., 2002; Devoto y col., 2002; Feng y col., 2003).

Otro de los elementos clave en la transducción de la señal de JA se ha determinado mediante la caracterización del mutante de *Arabidopsis jin1*, el cual se identificó inicialmente como un mutante con una sensibilidad reducida a MeJA en un ensayo de inhibición del crecimiento de la raíz, y con una reducción en la capacidad de inducción de *AtVSP* (*VEGETATIVE STORAGE PROTEIN*) por MeJA en hojas (Berger y col., 1996). Se ha demostrado que el gen *JINI* codifica para un factor transcripcional (*AtMYC2*) perteneciente a la familia MYC (Lorenzo y col., 2004) y que es responsable de la activación de una respuesta diferencial mediada por jasmonatos. Por un lado, la activación de *AtMYC2* es capaz de regular negativamente el metabolismo del triptófano y la respuesta defensiva frente a patógenos necrótrofos, mientras que por otro, puede regular positivamente otras respuestas dependientes de JA tales como la biosíntesis de flavonoides y antocianinas, la inhibición del crecimiento radicular o la respuesta a estreses oxidativos causados por heridas (Dombrecht y col., 2007; Lorenzo y col., 2004; Boter y col., 2004).

Por otra parte, recientemente se ha identificado a las proteínas JAZ (*JASMONATE ZIM-DOMINE*) como el elemento de conexión entre el factor de transcripción *AtMYC2* y el complejo SFC^{COII} en la vía de transducción de la señal mediada por JA (Lorenzo y col., 2004; Chini y col., 2007; Tines y col., 2007; Yan y col., 2007). En condiciones no inductivas, la actividad del factor de transcripción *AtMYC2* se encuentra reprimida por la unión directa de las proteínas JAZ a éste, de tal modo que la señal mediada por JA no se transmite. Por el contrario, bajo un estímulo específico, la biosíntesis de JA-Ile (forma activa del JA) promueve la interacción de los represores JAZ con el complejo SFC^{COII} , el cual es capaz de ubiquitinar a las proteínas JAZ para su degradación por el proteosoma 26S, liberando de esta forma al factor de transcripción *AtMYC2* y probablemente a otros factores de transcripción. La activación de *AtMYC2* induce la transcripción de los genes de respuesta inducibles por JA, incluyendo los implicados en la nueva síntesis de proteínas JAZ (Figura XII). La

síntesis *de novo* de las JAZs restaura la represión del factor AtMYC2, apagando nuevamente la ruta de señalización (Lorenzo y col., 2004; Chini y col., 2007; Tines y col., 2007; Yan y col., 2007).

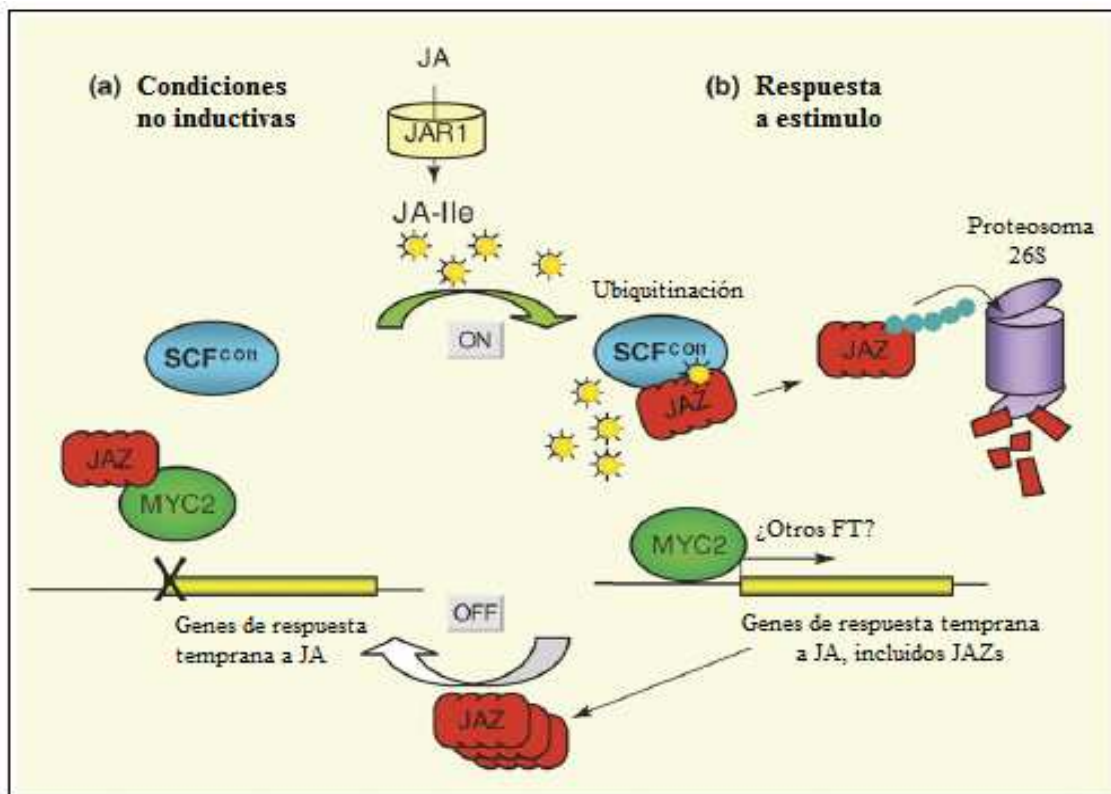


Figura XII: Esquema de señalización de la respuesta mediada por JA en *Arabidopsis*. (a) En condiciones no inductivas, las proteínas JAZ reprimen al factor MYC2 inhibiendo la respuesta mediada por JA. (b) Bajo un estímulo, la síntesis de JA-Ile activa la ubiquitinación de las JAZs a través del complejo SCF^{COI1} y su degradación, liberándose el factor MYC2 y produciéndose la activación de genes de respuesta temprana a JA, incluida la nueva síntesis de JAZs. Extraído de Chico y col., 2008.

Sin embargo, no todos los procesos regulados por *COI1* están alterados en el mutante *jin1*. Por ejemplo, la fertilidad masculina, que es un carácter regulado por JA y defectivo en *coi1* (Feys y col., 1994; Turner y col., 2002), no está afectado en los alelos de *jin1*. AtMYC2, por tanto, solo regula un subconjunto de las respuestas a JA dependientes de *COI1*, lo que sugiere que AtMYC2 actúa por debajo de *COI1* en la ruta de transducción de señal de JA y/o que existen otras vías de transducción alternativas de la señal.

5.2 Funciones de las oxilipinas en plantas.

Las oxilipinas están involucradas en diversos procesos fisiológicos de desarrollo en plantas, tales como el crecimiento, la fertilidad (Creelman y Mullet, 1997; Stintzi y Browse, 2000) o la tuberización en patata (Kolomiets y col., 2001). Además, juegan un papel importante en la adaptación a condiciones ambientales adversas (Creelman y Mullet, 1995) y en la respuesta de defensa frente a patógenos fúngicos y bacterianos (Viyajan y col., 1998; Farmer y col., 2003). La mayoría de los estudios sobre las funciones de oxilipinas en plantas se han centrado en el ácido jasmónico y sus derivados, sin embargo, recientemente se ha descrito como otras oxilipinas juegan un papel antimicrobiano frente a bacterias, oomicetos y hongos patógenos (Weber y col., 1999; Prost y col., 2005), participando también en procesos fisiológicos como la muerte celular (De León y col., 2002).

A continuación se describen detalladamente las funciones de los diversos grupos de oxilipinas en plantas atendiendo tanto a su implicación en los procesos de crecimiento y desarrollo, como en la regulación de la respuesta frente a estreses abióticos y bióticos.

5.2.1 Funciones en plantas derivadas de la actividad enzimática de dioxigenasas.

La identificación de un determinado número de genes codificantes de α -dioxigenasas (α -DOX) en diferentes especies de plantas, fundamentalmente *Arabidopsis* y solanáceas, ha permitido investigar las funciones fisiológicas de esta actividad enzimática (Mosblech y col., 2010). De este modo, los estudios realizados en *Arabidopsis* y tabaco han puesto de manifiesto la participación de la enzima α -DOX1 en la respuesta defensiva frente a infecciones microbianas (Ponce de León y col., 2002; Hamberg y col., 2003; Vicente y col., 2012). En ambas especies vegetales, se observó una fuerte inducción de la expresión génica de α -DOX1 en hojas en respuesta a la inoculación con patógenos, alcanzando una elevada acumulación de transcritos y proteínas cuando la infección resultó en una reacción de hipersensibilidad. Un estudio más detallado sobre las señales celulares que median la activación de α -DOX1 en *Arabidopsis* reveló que la expresión del gen es inducida por SA, anión superóxido y óxido nítrico, todas ellas señales que median la muerte celular (Hamberg y col., 2003). En este sentido, se ha sugerido que esta actividad enzimática protege a los tejidos

vegetales de someterse a una necrosis excesiva y que la activación de α -DOX1 es parte de los mecanismos de defensa inducidos para proteger a las células del estrés oxidativo (Hamber y col., 2003; Mosblech y col., 2010). Además de la respuesta frente a infecciones microbianas, la actividad α -DOX1 podría desempeñar un papel importante en la respuesta de las plantas al ataque de insectos (Hermsmeier y col., 2001) y diferentes tipos de estrés abiótico como salinidad, frío, sequía y exposición a metales pesados (Wei y col., 2000; Seki y col., 2002; Koeduka y col., 2005; Tirajoh y col., 2005). Sin embargo, la contribución de la actividad α -DOX1 durante estas respuestas no está aún bien definida.

Por otra parte, también se ha caracterizado una segunda enzima con actividad dioxigenasa en diferentes especies de plantas, como *Arabidopsis*, arroz, guisante y solanáceas, denominada α -DOX2, cuya función parece no estar relacionada con la activación de la respuesta defensiva frente a patógenos (Hamberg y col., 2005). En contraste con α -DOX1, los análisis en tomate y *Arabidopsis* han revelado que el gen codificante de α -DOX2 no es inducido en respuesta a la infección microbiana, si bien puede activar su expresión débilmente por daño mecánico. No obstante, la mayor acumulación de transcritos derivados de la actividad α -DOX2 ha sido observada en hojas sometidas a senescencia inducida por la caída de las mismas, manteniéndose dicho incremento incluso varios días después de la pérdida de las hojas. De forma similar, también se ha podido observar una inducción débil de la expresión de la actividad α -DOX1 después de la separación de las hojas. En este sentido, la inducción de α -dioxigenasas en las hojas desprendidas puede ser parte de los mecanismos de protección activados durante la senescencia para controlar la ruptura celular, permitiendo la removilización y redistribución adecuada de los nutrientes a las partes en crecimiento de la planta (Hamberg y col., 2005; Bannenber y col., 2009).

5.2.2 Funciones de jasmonatos en plantas.

- **Funciones de los jasmonatos en el desarrollo:**

La primera función fisiológica atribuida al JA fue la inhibición del crecimiento radicular (Ueda y Kato, 1980; Dathe y col., 1981), de tal forma que la búsqueda de este efecto se convirtió en el ensayo más prominente para la detección de mutantes afectados en la señalización de JA. En este sentido, mutantes sobreproductores de JA como *cev1*,

cet1, *joe2* o *cex1* presentan un crecimiento radicular inferior al de sus variedades silvestres y similar al originado por el tratamiento con MeJA (Ellis y col., 2002). Mientras que mutantes insensibles a JA como *coil*, *jin1* o *jar1* no muestran ningún efecto en el crecimiento radicular provocado por el tratamiento con JA (Staswick y col., 1992). Otra de las primeras actividades biológicas observada para los jasmonatos fue el efecto de la promoción de la senescencia (Ueda y Kato, 1980; Dathe y col., 1981). El papel del JA en la senescencia parece estar relacionado con la regulación negativa genes relacionados con la fotosíntesis y con la regulación positiva de genes activados en las reacciones de defensa contra estrés biótico y abiótico (Wasternack, 2004, 2006).

Por otra parte, se ha demostrado que la ruta de biosíntesis de JA así como su vía de señalización son esenciales para el desarrollo floral. Prueba de ello es la falta de desarrollo de las flores tanto en mutantes alterados en la capacidad de síntesis como afectados en la percepción de la señal mediada por JA. Todos estos mutantes en *Arabidopsis* presentan una esterilidad en los órganos masculinos debido a un desarrollo retardado y una dehiscencia incompleta de las anteras o a un deterioro de la elongación del filamento (Turner y col., 2002; Delker y col., 2006). Por el contrario, el deterioro en el dominio F-box de *coil* en tomate conduce a una esterilidad femenina (Li y col., 2004). Recientemente, se ha demostrado que otras enzimas involucradas en la vía de síntesis de jasmonatos tales como AOC y OPR3 también están involucradas en el desarrollo de los óvulos vegetales (Hause y col., 2000; Miersch y col., 2004), sugiriendo la necesidad de una acción coordinada de diferentes oxilipinas en el desarrollo floral.

Otra de las funciones clásicas atribuidas a los jasmonatos está relacionada con el enrollamiento de zarcillos en plantas. En este sentido, Stelmach y colaboradores (1998) observaron que la aplicación exógena de JA produce un enrollamiento de la hojas en plantas de *Bryonia dioica* acompañado por un aumento de auxinas y 12-OPDA. Más recientemente, Nakamura y colaboradores (2006) han demostrado que el movimiento de nictinastia, así como el enrollamiento de las hojas de *Albizia julibrissica* es dependiente de un enantiómero específico de 12-OH-JA-O-glucósido, el cual se acumula en células especializadas en el movimiento de las hojas.

Además, se ha demostrado que la tuberización es inducida por el JA, concretamente, el compuesto activo responsable de esta inducción es el ácido tuberónico (12-OH-JA, Yoshihara y col., 1989). En un primer paso, se produce la

hidroxilación del JA mediante enzimas hidroxilantes para dar el ácido tuberónico que, posteriormente, es glucosilado permitiendo su transporte desde las hojas, donde es sintetizado, hacia los estolones, donde se inicia la tuberización. Allí, parece estar implicado en el control de la reorientación de los microtúbulos que permiten la expansión radial de las células que originaran el tubérculo (Matsuki y col., 1992; Fujino y col., 1995; Takahashi y col., 1995). Las enzimas hidroxilantes encargadas de la hidroxilación inicial del JA están reguladas por el fotoperiodo de la planta (Ewing, 1985; Ewing y Struik, 1992). Aunque el ácido tuberónico se encontró inicialmente en solanáceas, recientes investigaciones han revelado la presencia de 12-OH-JA en diferentes especies de plantas como *Arabidopsis* o *Glycine max* (Gidda y col., 2003; Wasternack, 2007).

Otra función fisiológica importante en la que participan los jasmonatos es la inhibición de la germinación de las semillas. Aunque en un principio esta función se atribuyó a un efecto directo del JA y su conjugado metilado MeJA (Corbineau y col., 1988), en un estudio reciente, Dave y colaboradores (2011) han propuesto que el 12-OPDA es el compuesto que tiene un efecto más fuerte sobre la inhibición de las semillas. Asimismo, estos autores han encontrado una relación sinérgica entre el OPDA y el ABA en la inhibición de la germinación de semillas en *Arabidopsis*, confirmando el retraso sobre la germinación de las semillas de *Arabidopsis*, *Brassica napus* y *B. usitatissimum* observado anteriormente por diversos autores tras el tratamiento conjunto de ABA y JA (Wilén y col., 1991; Ellis y Turner, 2002; Nambara y col., 2010) e indicando el efecto sinérgico de ambas fitohormonas durante este proceso.

- **Jasmonatos frente a estreses abióticos y bióticos:**

La participación del JA en la respuesta de defensa frente a hongos, insectos y bacterias, así como en la respuesta a herida ha sido ampliamente estudiada. Si bien el SA está implicado, generalmente, en la activación de la respuesta defensiva frente a patógenos biotrófos (Seo y col., 2001), el JA está relacionado, principalmente, con la respuesta frente a patógenos necrotróficos, es decir, aquellos que se alimentan de los tejidos muertos de la planta. Una de las razones es que el JA no induce la respuesta de hipersensibilidad que da lugar a la aparición de necrosis y que, por tanto, podría servir como sustrato a los patógenos necrotróficos (Govrin y Levine, 2000; Thomma y col.,

2001). Los niveles de JA y sus conjugados aumentan de manera exponencial en respuesta al daño causado por herbivoría, herida mecánica y otros agentes patógenos (Farmer y Ryan, 1990), iniciando la formación de diferentes defensas vegetales entre los que se incluyen inhibidores de proteinasas, terpenos y alcaloides. La demostración directa del papel de los jasmonatos en la resistencia a insectos se observó en investigaciones con líneas mutantes de *Arabidopsis* que producen bajos niveles de ácido jasmónico (McConn y col., 1997). Estos mutantes eran infectados fácilmente por plagas que normalmente no afectan a *Arabidopsis*, mientras que la aplicación exógena de la hormona fue capaz de restablecer la resistencia casi a los niveles de las plantas silvestres. Esta respuesta ha sido ampliamente estudiada en solanáceas, especialmente en tomate, y se inicia mediante la síntesis de (pro)sistemina en las hojas heridas de la planta, si bien, la señal puede viajar a otras zonas no afectadas de la planta originando una respuesta sistémica (Howe, 2004; Schilmiller y Howe 2005).

La respuesta comienza con la síntesis de prosistemina, un precursor proteico de gran tamaño (200 aminoácidos), en las hojas heridas de la planta. Posteriormente, la prosistemina es procesada proteolíticamente para producir un polipéptido de pequeño tamaño (18 aminoácidos) denominado sistemina (Pearce y col., 1991, McGurl y col., 1992), el cual es liberado desde las células dañadas al apoplasto y transportado por el floema hacia otras zonas de la planta (Narvaez-Vasquez y Ryan, 2004). En las células diana, la sistemina se une a un receptor de membrana tipo LRR iniciando la síntesis de jasmonatos, los cuales son responsables de la activación de genes de respuesta defensiva como los inhibidores de proteinasas que bloquean la acción proteolítica de las enzimas digestivas de los herbívoros e insectos (Jhonson y col., 1989; Ryan, 2000; Taiz y Zeiger, 2006). Durante mucho tiempo, la sistemina solo ha sido detectada en tomate, sin embargo, recientemente se ha identificado un polipéptido de pequeño tamaño (23-aa), denominado *AtPEPI*, que actúa en la señalización frente a heridas en *Arabidopsis* (Huffaker y col., 2006). El *AtPEPI* es procesado a partir de un precursor de 92-aa, *PROPEPI*, cuya expresión es inducida por herida, JA y etileno dando lugar, en última instancia, a la formación de H₂O₂ y la expresión de genes de defensa como *PDF1.2* (Huffaker y col., 2006).

No cabe duda de que el análisis de la acumulación de transcritos tras herida o ataque de patógenos (Pieterse y col., 2006), así como el uso de mutantes afectados en la

biosíntesis y/o señalización de JA (Turner y col., 2002; Lorenzo y Solano, 2005; Delker y col., 2006; Wasternack, 2006), han mejorado mucho la comprensión de la respuesta de las plantas a estrés abiótico y biótico, ayudando a diseccionar los pasos de las vías de señalización y transducción de la señal mediada por JA. Entre los mutantes relacionados con la biosíntesis de JA, *def1* (*DEFENSELESS1*) fue el primero en ser identificado en solanáceas (Herder y col., 1996; Stenzel y col., 2003). Posteriormente, se caracterizaron dos mutantes de supresión de la expresión de prosistemina (*spr2*, *spr1*; Lee y Howe, 2003) y uno de insensibilidad a JA (*jai1*; Howe, 2004). El mutante *spr1* tiene bloqueada la percepción a sistemina (Lee y Howe, 2003), mientras que *spr2* se encuentra afectado en una ω -desaturasa plástica que cataliza el último paso de la biosíntesis de ácido linolénico (Li y col., 2003), siendo las plantas transgénicas *spr2* deficientes en la síntesis de JA. Por otra parte, como se ha mencionado anteriormente, el mutante *jai1* se caracteriza por una pérdida completa de sensibilidad al JA (Li y col., 2004). La mayoría de los genes de respuesta activados por herida en solanáceas son dependientes de *COII*, sin embargo, existen una ARNasa extracelular y una proteína quinasa inducible por herida (WIPK) cuya expresión es independiente de *COII* y JA, señalando que la respuesta a herida puede no ser solamente dependiente de jasmonatos y que otras vías de señalización de hormonas vegetales pueden estar implicadas (Holley y col., 2003).

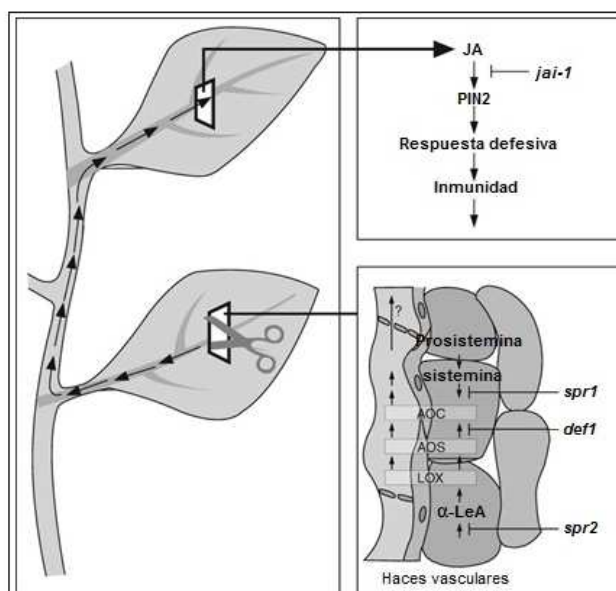


Figura XIII: Esquema de respuesta local y sistémica a herida en tomate. Localización de mutaciones relacionadas con la síntesis (*spr1*, *spr2*, *def1*) y percepción de jasmonatos (*jai-1*). Modificado de Wasternack, 2007.

Por otra parte, el JA está estrechamente relacionado con el etileno en la activación de la respuesta defensiva de las plantas, llegándose a solapar sus vías de señalización en muchas ocasiones (Penninckx y col., 1998; Pieterse y col., 1998; Van Wees y col., 1999; Thomma y col., 2001; Ellis y Turner, 2001, Rojo y col., 2003). La selección de la ruta más adecuada a cada respuesta concreta viene determinada por el tipo de interacción que se establezca. En el caso de los patógenos necrotrofos ambas hormonas actúan de manera sinérgica activando la expresión de diferentes genes de defensa (Xu y col., 1994; Penninckx y col., 1998), mientras que los mutantes afectados en alguna de las dos vías de señalización son incapaces de inducir la respuesta defensiva y son más susceptibles al ataque de los patógenos (Knoester y col., 1998; Vijayan y col., 1998; Staswick y col., 1998; Thomma y col., 1998, 1999). Sin embargo, en la respuesta a daño mecánico o herida, ambas rutas de señalización antagonizan en la activación de los genes de defensa (Rojo y col., 1999, 2003). Ambas hormonas son necesarias para la inducción del factor de transcripción *ERF1* (*Ethylene-Response-Factor1*; Lorenzo y col., 2003), clave en la activación de los mecanismos de defensa de la planta frente a patógenos necrotrofos. La expresión de *ERF1* se induce tras la infección por patógenos necrotrofos y regula la expresión de genes de defensa como la defensina *PDF1.2* (Kauss y col., 1992, 1994). Esta respuesta de defensa mediada por ambas hormonas se produce tanto a nivel local como sistémico (Clarke y col., 2000).

Al contrario que con el etileno, el SA y el JA suelen ser antagonistas en la activación de la respuesta defensiva de la planta. En este sentido, el SA inhibe la síntesis y activación de genes inducidos por JA en la respuesta a herida en tomate y patata (Doares y col., 1995; Harms y col., 1998; Niki y col., 1998; O'donnell y col., 1996), mientras que el tratamiento con JA inhibe la expresión de algunos genes PR activados por SA (Niki y col., 1998). Otra prueba más de esta relación antagónica es que la expresión de *PDF1.2* se inhibe por la acción del SA (Clarke y col., 2000, 2001; Gupta y col., 2000; Jirage y col., 2001). Estos ejemplos de interacciones antagónicas a nivel molecular también pueden observarse en la reducida tolerancia a *Pseudomonas syringae* de las plantas transgénicas sobreexpresantes *ERF1*, señalando que la sobre activación de la vía de señalización de JA mediada por *ERF1* puede tener un efecto negativo en la tolerancia a *P. syringae*, la cual es dependiente de SA (Berrocal y col., 2002).

Por otro lado, también existen evidencias de un comportamiento sinérgico de ambas fitohormonas en la respuesta defensiva a patógenos, como lo demuestra la implicación de ambas rutas de señalización en la resistencia de *Arabidopsis* a *P. cucumerina* (Berrocal y col., 2002), *P. syringae* y *Peronospora parasitica* (Clarke y col., 2000).

5.2.3 Funciones en planta de otras oxilipinas de la vía 13-LOX-CYP74.

Como se ha comentado anteriormente, el ácido 13-hidroperoxi- α -linolénico (13-HPOT) puede ser usado como sustrato tanto por la enzima AOS, dando lugar a la síntesis de jasmonatos, como por las enzimas HPT y DES, cuyos productos finales desempeñan también diversas funciones en la planta.

La enzima HPL está involucrada en la escisión de hidroperóxidos de ácidos grasos para generar compuestos volátiles de seis carbonos (alcoholes y aldehídos) conocidos como volátiles de hojas verdes (VHVs). Los VHVs son emitidos comúnmente por las plantas verdes y su producción aumenta drásticamente bajo condiciones de estrés biótico. En este sentido, se ha demostrado que estos compuestos pueden actuar como señales de defensa frente a diferentes insectos herbívoros (Vancanneyt y col., 2001; Eigenbrode y col., 2002), así como reclamo para enemigos carnívoros naturales de los herbívoros que atacan a la planta (Takabayashi y col., 1991; Birkett y col., 2003; Shiojiri y col., 2006). Además, también poseen una actividad antimicrobiana frente a diversos hongos y bacterias (Croft y col., 2003; Nakamura y Hatanaka, 2002; Shiojiri y col., 2006). Todo esto sugiere que los VHVs pueden tener un alto potencial para el control de insectos y otros patógenos en plantas, sin embargo, algunos autores creen que no hay una razón específica para la emisión de estos compuestos y que cada especie ha adaptado su emisión para la obtención de diferentes beneficios (Owen y Peñuelas, 2005). Por ejemplo, en guisante la síntesis de productos derivado de la actividad HPL se ha relacionado con una función reguladora tanto del control del crecimiento como de la adaptación a otros estrés abióticos (Mukhtarova y col., 2011).

Por otro lado, el conocimiento acerca de la función fisiológica de los éteres de divinilo procedentes de la actividad DES en la vía 13-LOX es aún escaso. Su actividad se ha relacionado con reacciones de defensa frente a patógenos que dependen de la vía

de señalización de SA (Stumpe y col., 2008), sin embargo, en ajo y patata, la mayor acumulación de estos éteres se encuentra en órganos subterráneos, sugiriendo algún tipo de función biológica asociada a los mismos (Stumpe y col., 2006, 2008).

5.2.4 Funciones en planta de oxilipinas de la vía 9-LOX.

Como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de los estudios sobre las funciones de oxilipinas en plantas se han centrado en el ácido jasmónico y sus derivados, sin embargo, se ha demostrado que la vía 9-LOX también está involucrada en diversos procesos fisiológico, como el desarrollo de raíces laterales o la tuberización (Kolomiets y col., 2001; Velosillo y col., 2007), así como en la respuesta de defensa frente a diferentes patógenos microbianos (Rance y col., 1998; Weber y col., 1999; Blee y col., 2002; Fammartino y col., 2010).

- **Funciones de la vía 9-LOX en el desarrollo:**

Experimentos realizados con mutantes de *A. thaliana* insensibles a ácido 9-hidroxiocetadecatrienoico (9-HOT) han demostrado la implicación de la vía 9-LOX de oxilipinas en la modulación de la ondulación de la raíz, la elongación radicular, el desarrollo de raíces laterales y la determinación de la dominancia apical (Velosillo y col., 2007). En este sentido, parece que el 9-HOT, o un producto estructuralmente vinculado a la vía 9-LOX, actúa como un potente inductor de la ondulación de la raíz, así como un modulador endógeno de la formación de raíces laterales, mientras que los productos derivados del metabolismo de las enzimas DES y HPL de esta vía están involucrados en la elongación y dominancia apical del sistema radicular. Además, análisis histoquímicos y moleculares han revelado que el 9-HOT también está implicado en la respuesta a patógenos como *Pseudomonas*. La naturaleza de los cambios detectados en estos mutantes de *Arabidopsis* durante la infección con *Pseudomonas* y el desarrollo radicular, sugiere que las oxilipinas de la vía 9-LOX pueden estar involucradas en las modificaciones de la pared celular requeridas para el desarrollo de la raíz y la detección de patógenos (Velosillo y col., 2007).

Por otra parte, estudios realizados con plantas transgénicas de patata han proporcionado pruebas evidentes de la participación de la vía 9-LOX de oxilipinas en la regulación de la tuberización. De acuerdo con esto, Kolomiets y colaboradores (2001) observaron que mutantes de supresión de patata, incapaces de expresar el gen *StLOX1*,

mostraban una reducción en el rendimiento de la formación de tubérculos, así como defectos en la forma y tamaño de los mismos. Un análisis más detallado de la acumulación de transcritos de *StLOX1* determinó que la actividad LOX asociada a la vía 9-LOX de oxilipinas está restringida al desarrollo de estolones, tubérculos y raíces, señalando la importancia de dicha actividad en el proceso de tuberización. De forma similar, Stumpe y colaboradores (2006) demostraron que la actividad AOS asociada a la vía 9-LOX también se encuentra involucrada en el proceso de tuberización de patata, observándose una acumulación de 10-OPDA y α -ketoles en tubérculos, raíces y estolones.

- **Participación de la vía 9-LOX en la respuesta defensiva:**

Al igual que el ácido jasmónico y sus derivados, se ha demostrado que la vía 9-LOX de oxilipinas también está involucrada en la respuesta de defensa frente a diferentes patógenos microbianos, especialmente en solanáceas. En este sentido, se ha observado como en patata y tabaco, los omicetos *Phytophthora infestans* y *P. parasitica* var. *nicotianae*, respectivamente, así como elicitores derivados de estos patógenos, son capaces de inducir un aumento de la actividad enzimática de esta vía de oxilipinas (Fournier y col., 1993; Véronési y col., 1996; Göbel y col., 2001; Stumpe y col., 2001) que, generalmente, es acompañada por un incremento de productos derivados de la misma (Rusterucci y col., 1999; Weber y col., 1999; Göbel y col. 2001-2003). Concretamente, en patata, se ha detectado una inducción de la expresión del gen codificante de la enzima 9-DES (*StDES*) en respuesta a diversos patógenos y elicitores (Stumpe y col., 2001), así como un incremento de los ácidos colneleico y colnelénico derivados de dicha actividad enzimática (Weber y col., 1999, Mosblech y col., 2009). Además, Göbel y colaboradores (2001) observaron una activación de la vía 9-LOX y una acumulación de los transcritos derivados de la misma, en cultivos de células de patata tratados con elicitores de *P. infestans*, que no fue acompañada por una inducción de la vía 13-LOX, señalando que, la formación de productos derivados de la vía 9-LOX, incluidos los procedentes de las actividades enzimáticas AOS, HPL, y DES, parece estar estimulada preferentemente frente a la vía 13-LOX en patata en respuesta a ciertos patógenos (Göbel y col. 2001).

En tabaco, la resistencia a patógenos mediada por la vía 9-LOX parece estar asociada a una actividad coordinada de las enzimas LOX y DES. En este sentido, Fammartino y colaboradores (2007) detectaron una acumulación de ácido colneléico y colnelénico en plantas de tabaco silvestres como respuesta al ataque por *P. parasitica* var. *Nicotianae*, que no fue observado en mutantes antisentido *NtLOX1* y *NtDES1* y que fueron susceptibles a la infección. Los transcritos derivados de estas actividades enzimáticas fueron detectados en los tejidos sanos de diferentes órganos de la planta, acumulándose a nivel local y de forma transitoria después de la infección del hongo, pero no después de la lesión (Rancé y col., 1998; Fammartino y col., 2007, 2010). Por otra parte, se ha relacionado la respuesta de hipersensibilidad a patógenos con una activación de la vía 9-LOX en tabaco, sugiriendo que la inducción de esta vía podría dar lugar a un proceso activo de degradación de la membrana que conduce a la muerte celular de aquellas zonas infectadas por el patógeno. Sin embargo, no está claro si la peroxidación de lípidos durante la respuesta hipersensible es inducida por especies reactivas de oxígeno y radicales libres y/o es el resultado de la activación de la vía 9-LOX (Rusterucci y col., 1999; Glazebrook, 2005; Montillet y col., 2005).

Recientemente, también se han realizado investigaciones sobre la participación en la respuesta defensiva frente a patógenos de la vía 9-LOX en *Arabidopsis*. En este sentido, plantas transgénicas de *A. thaliana* caracterizadas por una pérdida de función de la actividad enzimática LOX, resultaron ser más susceptibles a la infección por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, observándose además un deterioro en la capacidad de activación de la respuesta sistémica adquirida. Sin embargo, al contrario que en patata y tabaco, el análisis de transcritos reveló que el ácido 9-ketooctadecatrienoico (9-KOT) fue el producto más acumulado tras la infección bacteriana, el cual es derivado de la actividad lipoxigenasa y no de la actividad de las enzimas de la familia CYP74 (Vicente y col., 2012). Una de las posibles razones de las diferencias encontradas en la acumulación de transcritos entre *Arabidopsis* y solanáceas, puede derivarse del tipo de infección estudiada, si bien los conocimientos actuales sobre el modo de acción de las oxilipinas derivadas de la vía 9-LOX todavía no son abundantes.

Por otra parte, un estudio realizado por Gao y colaboradores (2007) ha demostrado una relación positiva entre la producción de oxilipinas derivadas de la vía 9-LOX en plantas de maíz y la capacidad de infección de ciertos hongos. Las oxilipinas en

determinados géneros de hongos pueden actuar como potentes reguladores de la esporogénesis y de la biosíntesis de micotoxinas (Brodhagen y Keller, 2006; Brodowsky y Oliw, 1993; Hamberg y col., 1994; Su y col., 1998). Siguiendo esta hipótesis, Gao y colaboradores observaron, mediante la utilización de plantas transgénicas de maíz afectadas en la actividad lipoxigenasa de la vía 9-LOX, una disminución de la formación de conidios y síntesis de micotoxinas en *Fusarium verticillioides* y *Colletotrichum graminicola*, que se manifestó en una reducción de la capacidad infectiva de ambos hongos. Estos datos sugieren que el metabolismo mediado por la vía 9-LOX de oxilipinas parece ser necesario para la patogénesis de ciertos géneros de hongos, incluyendo el desarrollo de la enfermedad y la producción de esporas y micotoxinas (Gao y col., 2007).

5.3 Participación de las oxilipinas en otras interacciones simbióticas mutualistas en plantas.

Además de tener un papel importante durante el desarrollo y establecimiento de la simbiosis micorriza arbuscular, las oxilipinas también participan en otro tipo de interacciones simbióticas presentes en la naturaleza. En este sentido, la interacción más estudiada es la llevada a cabo por plantas y bacterias fijadoras de nitrógeno. Varios estudios han demostrado la existencia de un efecto estimulante de los jasmonatos sobre la producción de (iso)flavonoides en plantas y la inducción de la expresión de genes de nodulación (*nod*), necesarios para el establecimiento de esta simbiosis (Rosas y col., 1998; Mabood y Smith, 2005; Mabood y col., 2006; Zhang y col., 2007). Una prueba de ello es que la inoculación de rizobacterias tratadas con jasmonatos puede mejorar la nodulación, la fijación de nitrógeno y el crecimiento de la planta (Mabood y Smith, 2005). Por otra parte, los flavonoides e isoflavonoides son considerados agentes inductores esenciales para la activación de genes *nod* del microsimbionte que permiten el establecimiento de la simbiosis. Así pues, los jasmonatos no solo son capaces de inducir la expresión de genes *nod* directamente, sino que también pueden promover, de forma indirecta, la producción de factores Nod mediante la inducción de síntesis de (iso)flavonoides (Zhang y col., 2007). Sin embargo, un estudio reciente ha demostrado que durante las etapas iniciales de la simbiosis, ciertas oxilipinas como el JA y el 9-

HPOD pueden inhibir la señalización de los factores Nod (Zhang y col., 2012). En relación con esto, también se ha observado que la aplicación de jasmonatos puede afectar negativamente a los picos de calcio intracelulares que se producen durante el reconocimiento de los simbiontes y en la inducción de genes *nod* implicados en dicho reconocimiento (Sun y col., 2006).

A parte de las respuestas tempranas, poco se sabe sobre el papel de los jasmonatos en el desarrollo y funcionalidad de los nódulos. Varios estudios muestran que el desarrollo de los nódulos en la simbiosis rhizobium-leguminosa es acompañado por una acumulación de transcritos derivados de una actividad lipoxigenasa, LOX (Perlick y col., 1996; Porta y col., 1999; Wisniewski y col., 1999; Demechencko y col., 2011). Sin embargo, existe una alta variedad de isoformas de la proteína LOX en leguminosas y no está claro si la acumulación de transcritos observada se encuentra directamente relacionada con la nodulación y/o con la biosíntesis de JA (Hayashi y col., 2008; Hause y Schcaarschmidt, 2009). Por otra parte, Yanagi y colaboradores (2011) no han detectado cambios significativos en el patrón de oxilipinas durante la nodulación en *L. japonicus*, mientras que al suministrar altas concentraciones de nitrógeno en plantas noduladas, advirtieron una disminución del número de nódulos acompañado por un disminución de la expresión de la actividad AOS en hojas, sugiriendo que dicha actividad puede ser importante tanto en la nodulación como en el estatus nitrogenado de la planta (Yanagi y col., 2011).

Además, los jasmonatos podrían afectar al crecimiento celular y el envejecimiento de los nódulos influyendo sobre el metabolismo del ascorbato y del glutatión (GSH) (Loscos y col., 2008), los cuales son esenciales para el desarrollo apropiado de los nódulos (Frendo y col., 2005).

Por otro lado, el JA, en concordancia con el etileno, participa en la respuesta sistémica inducida (ISR) por rhizobacterias, y otros microorganismos simbiontes como *Piriformospora indica* o *Trichoderma*, a diferentes tipos de bacterias y hongos patógenos (Van Loon y col., 1998; Fontenelle y col., 2011; Qiang y col., 2012). En este sentido, la aplicación de MeJA es capaz de proporcionar una protección frente a diversas bacterias parecida a la proporcionada por la ISR (Van Wees y col., 1999; Ton y col., 2002a), mientras que plantas transgénicas de *Arabidopsis* insensibles a JA son incapaces de activar dicha respuesta (Ton y col., 2002b). Otra prueba de la importancia

de la participación de ambas hormonas en la ISR se desprende del uso de plantas de *Arabidopsis* en las cuales se indujo ISR con la bacteria *Ps. flouorescens* WCS417r y posteriormente inoculadas con la bacteria patógena *Ps. syringae* pv *tomate* DC3000, en las que se observó que una gran cantidad de genes aumentaron su expresión en hojas que desarrollan ISR, siendo dichos genes regulados por vías de transducción de JA y/o ET (Van Wees y col., 1999; Hase y col., 2003; Van Oosten y col., 2008). Un análisis más detallado de los genes comunes que responden a MeJA e ISR reveló un aumento de la expresión del factor de transcripción *MYC2*, que desempeña un papel central en la vía de señalización del JA, en plantas que expresan ISR, identificando a dicho factor como un regulador potencial del *priming* para mejorar la expresión de genes de respuesta a JA durante la ISR activada por rizobacterias (Pozo y col., 2008). En contraste, los niveles endógenos de JA y etileno en plantas que expresan ISR no parecen estar alterados, revelando que este tipo de resistencia inducida no está asociada a cambios en la producción de estos compuestos (Pietersen y col., 2000; Van Wees y col., 1999; Verhagen y col., 2004), sino más bien a un aumento en la sensibilidad del tejido a estas hormonas (Pozo y col., 2004).

5.4 Participación de las oxilipinas en la regulación de la micorrización.

Como se ha mencionado con anterioridad, en general, la mayoría de las investigaciones sobre oxilipinas se han centrado en el JA y sus derivados, los jasmonatos. Por tanto, es comprensible que, hasta hace poco, el estudio de la función reguladora de oxilipinas en la micorrización arbuscular también se haya centrado en los jasmonatos, si bien, recientes estudios han demostrado la participación de otras oxilipinas en el proceso.

5.4.1 Participación de los jasmonatos en la regulación de la micorrización.

Los primeros estudios realizados sobre la participación del JA y sus derivados durante el proceso de micorrización arbuscular se basaron en la aplicación exógena de JA en diferentes especies de plantas colonizadas por hongos MA, sin embargo, los resultados obtenidos son contradictorios, ya que se ha demostrado que la aplicación de JA puede tener tanto efectos negativos como positivos, dependiendo de la dosis

utilizada. En este sentido, Regvar y colaboradores (1996) observaron como la aplicación exógena de JA en bajas concentraciones sobre la parte aérea en plantas de *Allium sativum* promueve la colonización y el desarrollo del hongo en el interior de la raíz. Por el contrario, la aplicación en dosis altas y frecuentes sobre hojas de plantas inoculadas de *Carica papaya*, *Tropeolum majus* y *Cucumis sativus* tiene un efecto inhibitorio sobre la micorrización (Ludwig-Müller y col., 2002).

Por otra parte, la colonización de raíces de plantas por hongos MA ha sido relacionada con incrementos endógenos de los niveles de JA (Hause y col., 2002; Meixner y col., 2005; Stumpe y col., 2005). Respecto a esto, Hause y colaboradores (2002) detectaron un incremento en la acumulación de JA libre y su conjugado con isoleucina en las células con arbusculos de raíces de cebada micorrizadas, relacionando dicho incremento con la inducción de genes implicados en la biosíntesis de JA y de la proteína regulada por jasmonatos JIP23. Resultados similares fueron obtenidos por Isayenkov y colaboradores (2005) en plantas de *M. truncatula* inoculadas con *G. intraradices*. Estos autores silenciaron el gen que codifica para la enzima AOC de la vía 13-LOX de oxilipinas en raíces de *M. truncatula*, observando una reducción de los niveles de JA y, en consecuencia, del grado de micorrización que afectó principalmente a la formación de los arbusculos, aunque no a su estructura (Isayenkov y col., 2005). Es posible que uno de los mecanismos por el cual los jasmonatos regulan el proceso micorrización y la formación de arbusculos sea a través de la regulación del metabolismo y transporte de los carbohidratos en la planta. En este sentido, el grado de colonización de plantas de tomate micorrizadas ha sido relacionado con cambios en la regulación transcripcional de genes implicados en el transporte e hidrólisis de sacarosa, la actividad invertasa de la pared celular y el contenido específico de ácidos grasos en raíces micorrizadas y, por tanto, de oxilipinas (Tejeda-Sartorius y col., 2008). Estos resultados fueron confirmados en plantas de tomate deficiente en la síntesis de JA (*spr-2*), las cuales mostraron un nivel reducido de colonización, mientras que la aplicación exógena de JA produjo una recuperación parcial del nivel de micorrización asociada a un aumento de la expresión de genes implicados en el metabolismo y transporte de carbono en la planta (Tejeda-Sartorius y col., 2008). Por otro lado, las células vegetales con arbusculos actúan como sumideros de carbohidratos, puesto que la planta cede parte de los mismos al hongo simbionte como respuesta al suministro de nutrientes facilitados por este último. Este hecho, unido a la inducción de genes involucrados en la biosíntesis

de JA que se ha observado en tejidos sumidero de la planta (Hause y col., 2000; Maucher y col., 2000), ha llevado a proponer un modelo que sugiere que la biosíntesis de JA inducida en plantas micorrizadas puede estar vinculada a dicho efecto sumidero (Hause y col., 2000).

Los jasmonatos también pueden estar involucrados en la regulación del proceso de micorrización mediante la inducción de la biosíntesis de metabolitos secundarios, tales como flavonoides o terpenos, los cuales es sabido que desempeñan un papel importante durante la simbiosis (Strack y col., 2003). En este sentido, la aplicación de jasmonatos puede producir un incremento de la actividad enzimática fenilalanina amino liasa (PAL) (Thoma y col., 2003), así como de la acumulación de transcritos asociada a ella (Gundlach y col., 1992). La enzima PAL está involucrada en la biosíntesis de flavonoides que estimulan el crecimiento del hongo (Blilou y col., 2000), lo que sugiere que los jasmonatos podrían tener un papel importante durante el proceso de micorrización a través de la regulación de la síntesis de estos.

Además, se ha sugerido que el JA puede estar implicado en la regulación de la colonización de las raíces por hongos MA mediante la inducción de genes codificantes de proteínas relacionadas con la respuesta defensiva. En este aspecto, Herrera-Medina y colaboradores (2008) observaron una mayor susceptibilidad a la colonización, especialmente en la frecuencia e intensidad de micorrización, en plantas transgénicas de tomate insensibles a JA, *jai-1*, respecto a plantas silvestres. Las plantas *jai-1* son deficientes en la señalización de JA, siendo incapaces de inducir la expresión de genes relacionados con la defensa de la planta mediados por JA en respuesta a herida o la aplicación de MeJA (Li y col., 2004). Por el contrario, plantas de tomate tratadas con MeJA muestran una reducción significativa de la micorrización que afecta, principalmente, al metabolismo del fosfato y la formación de los arbusculos (Herrera-Medina y col., 2008). De acuerdo con estos resultados la colonización por hongos MA puede estar controlada por la vía de señalización del JA y, por tanto, por la inducción de genes de respuesta defensiva mediados por esta vía.

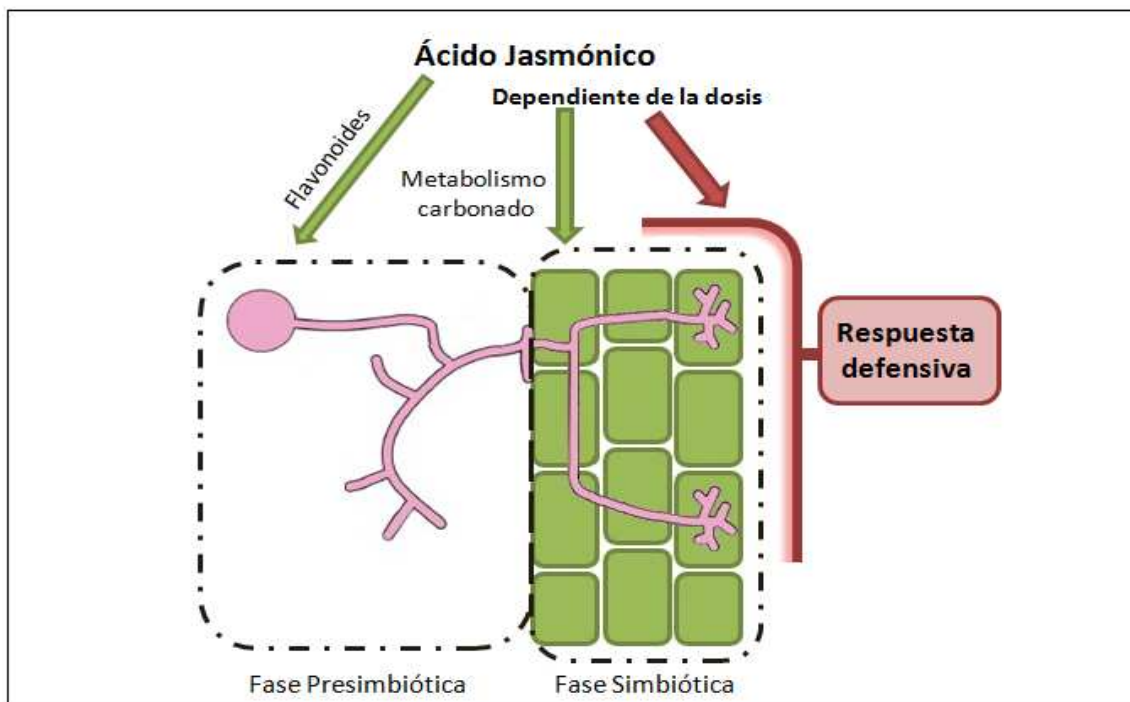


Figura XIV: Resumen de la participación del JA y sus derivados en la regulación de la micorrización arbuscular. Los jamonatos pueden actuar positivamente, mediante la regulación del metabolismo carbonado en los arbusculos, o negativamente, induciendo la respuesta defensiva mediada por JA, sobre la micorrización dependiendo de la dosis. También pueden influir sobre la síntesis de metabolitos secundarios, como flavonoides, involucrados en el proceso de micorrización. Elaboración propia.

5.4.2 Participación de la vía 9-LOX en la regulación de la micorrización.

Existen pocos estudios acerca de los cambios que se producen en la vía 9-LOX de oxilipinas durante la micorrización arbuscular, sin embargo, un reciente análisis de microarrays de raíces de tomate micorrizadas con diversos hongos MA ha mostrado la existencia de una regulación significativa de genes implicados en el metabolismo 9-LOX en el proceso de formación de la simbiosis (López-Ráez y col., 2010). Por otra parte, se ha realizado un análisis del perfil de ácidos grasos en plantas micorrizadas de *M. truncatula* inoculadas con *G. intraradices*, no observándose cambios en el metabolismo 9-LOX y sí en el metabolismo 13-LOX del que se deriva la síntesis del JA, que alcanzó altos niveles de inducción en raíces inoculadas (Stumpe y col., 2005).

López-Ráez y colaboradores (2010), observaron un incremento en los niveles de OPDA en plantas de tomate micorrizadas aunque, debido a que tanto la vía 9-LOX como la 13-LOX son activadas durante la micorrización y a la imposibilidad técnica de

distinguir entre los isómeros 10 y 12-OPDA, estos autores señalan que es posible que este aumento de OPDA observado en plantas de tomate micorrizadas sea una mezcla de ambos isómeros, que sin embargo no se vio acompañado de un aumento de JA libre. Por otro lado, tanto el 10-OPDA como el 12-OPDA han sido relacionados con la respuesta defensiva de la planta frente a diferentes patógenos microbianos (Itoh y col., 2002; Taki y col., 2005; Stinzti y col., 2001). En este sentido, es posible que el OPDA, y otras oxilipinas derivadas de la vía 9-LOX, aunque no el JA libre, jueguen un papel importante en la regulación de la respuesta de la planta frente a hongos MA en solanáceas.

Además, López-Ráez y colaboradores (2010) también observaron una inducción del gen codificante de la enzima LeDES de la vía 9-LOX que cataliza la biosíntesis de ácido colneléico y colnelénico, cuya función ha sido relacionada con la defensa frente a patógenos en plantas de tabaco y patata (Weber y col., 1999; Mosblech y col., 2009). Sin embargo, un análisis transcripcional realizado por Fiorilli y colaboradores (2009) en plantas de tomate no mostró la inducción de dicho gen, ni de otros de genes involucrados en la vía 9-LOX, indicando que la regulación transcripcional de *LeDES* durante la micorrización puede depender de otros parámetros aún no bien conocidos.

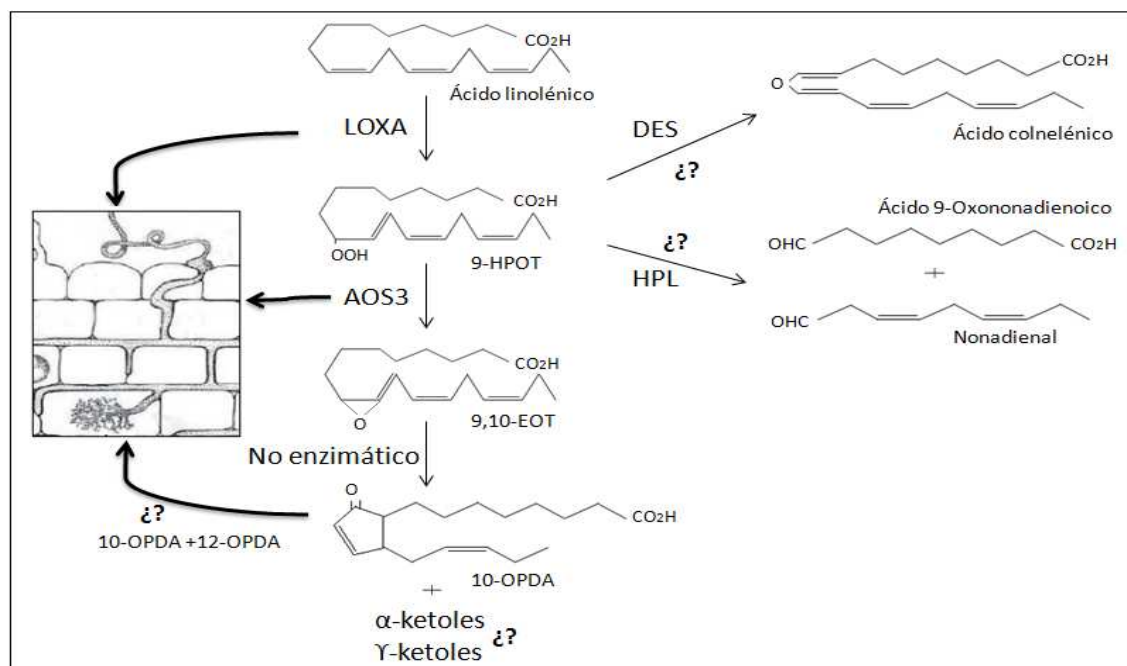


Figura XV: Resumen de la participación de la vía 9-LOX de oxilipinas en la regulación del proceso de micorrización arbuscular. Las enzimas LOXA, AOS3 y el transcrito 10-OPDA son inducidos durante la micorrización. Del resto de actividades enzimáticas, así como de transcritos derivados de esta, no se tienen aún conocimientos suficientes sobre su participación en la simbiosis MA. Elaboración propia.

MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. VARIEDADES DE PLANTAS EMPLEADAS

A lo largo de esta tesis doctoral se han utilizado variedades silvestres de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y patata (*Solanum tuberosum* L.), así como diferentes líneas de tomate modificadas genéticamente.

1.1 Tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Las líneas silvestres de tomate empleadas han sido: *Moneymarker* (LA2706 del Tomato Genetics Resource Center, TGRC), *Castlemart* (cod LA2400 del TGRC), *Ailsa Craig* (cod. LA2838A del TGRC), *Rheinlands Rhum* (cod. LA0535 del TGRC) y un cruce proveniente de *Castlemart* y *MicroTom* (cod. LA3911 del TGRC). En cuanto a las líneas modificadas genéticamente, las variedades utilizadas han sido:

Spr-2: *suppressed in prosystemin-mediated responses2*, línea transgénica de la variedad *Castlemart* que tiene suprimida la respuesta mediada por prosistémica, molécula fundamental para la inducción de la síntesis del ácido jasmónico (Li y col., 2001). El mutante es deficiente en la biosíntesis de JA pero sensible a este cuando se aporta de manera exógena.

Def-1: *defenseless1*, línea transgénica de la variedad *Castlemart*, deficiente en la acumulación de JA en situaciones de respuesta a herida y pro-(sistémica) (Howe y col., 1996). Estas plantas, al igual que los mutantes *Spr-2*, son sensibles a aportes exógenos de JA produciendo la respuesta defensiva mediada por dicha molécula. La mutación afecta a la ruta de síntesis del JA y MeJA a distinto nivel que en las plantas *Spr-2*.

Jai1: *jasmonate acid insensitive1*, mutante proveniente del cruce de las variedades *Castlemart* y *MicroTom*, obtenido del tratamiento de irradiación sobre semillas de tomate. La mutación sólo se presenta en plantas homocigóticas recesivas *jai1/jai1* y afecta a la señalización del ácido jasmónico, siendo éstas insensibles a

aportes exógenos. Los mutantes homocigotos son estériles debido a una deficiencia en el control maternal de la maduración de las semillas (Li y col., 2004).

Sitiens: (Cod. LA0574 del TGRC) línea transgénica de la variedad *Rheinlands Rhum* deficiente en la acumulación de ABA debido a la alteración en la actividad de la ácido abscísico-específica aldehído oxidasa, involucrada en el último paso de la ruta biosintética del ABA (Taylor y col., 1988). Los mutantes *Sitiens* sintetizan niveles inferiores al 8% de ABA con respecto al tipo silvestre, y no poseen la capacidad de inducción de la producción de dicha hormona por herida, calor o corrientes eléctricas (Herde y col., 1999).

Las semillas de tomate de las variedades *Castlemart*, *Spr-2*, *Def-1* y las correspondientes al cruce entre *Castlemart* y *MicroTom* han sido cedidas por el Dr. Gregg Howe de la Universidad de Michigan. Así mismo, las semillas de las variedades Ailsa Craig, Moneymarker y Rheilands Rhum han sido obtenidas del Tomato Genetics Resource Center (TGRC) de la Universidad de California, Davis.

1.2 Patata (*Solanum tuberosum* L.)

Como línea silvestre de patata para la producción de plantas transgénicas se ha utilizado la variedad *Andigena* (línea 7540), cedida por el laboratorio de la Dra. Salomé Prat del Centro Nacional de Biotecnología (C.S.I.C.) en Madrid. El proceso de tuberización de esta variedad silvestre está regulado por la luz, dando lugar a tubérculos de patata en condiciones de día corto (más de ocho horas de oscuridad), permitiendo el control de este proceso mediante la regulación de la misma.

2. CONDICIONES DE CULTIVO

2.1 Esterilización de las semillas de tomate.

Las semillas se esterilizaron en superficie, sumergiéndolas en una solución de hipoclorito sódico (NaClO) al 10% durante 15 minutos, posteriormente se procedió a su

lavado con agua estéril y se sumergieron nuevamente en una solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 7% durante 15 minutos. Tras esta operación, se enjuagaron con agua estéril de 3-4 veces y se mantuvieron en imbibición en agua estéril durante hora y media. Una vez esterilizadas en superficie, se incubaron en placas de Petri sobre papel de filtro húmedo en condiciones estériles entre tres y cuatro días a 28°C en oscuridad para facilitar su germinación. Con posterioridad se trasladaron a semillero con vermiculita estéril durante siete u ocho días, según ensayo, hasta su paso a maceta, seleccionando plántulas de igual tamaño para el transplante.

2.2 Selección de semillas *jai1/jai1*.

La mutación recesiva *jai1* causa esterilidad en las flores femeninas de las plantas homocigotas para la mutación, por lo que son estériles. Esta es la razón por la cual las plantas homocigotas recesivas se seleccionaron de una población de semillas provenientes de la generación F2 (Li y col., 2004). El fenotipo de las plántulas *jai1/jai1*, homocigotas recesivas e insensibles a JA, y de las plántulas *Jai1/jai1*, heterocigotas, y *Jai1/Jai1*, homocigotas dominantes y sensibles a JA, es distinguible mediante la observación de la respuesta de las semillas a una solución de metil jasmonato (MeJA) 1mM (Howe y col., 1999). Las semillas sensibles a MeJA presentaron una inhibición del crecimiento y una coloración violácea en el hipocotilo debido a una acumulación de antocianinas en éste. Las semillas insensibles a MeJA, correspondientes al fenotipo *jai1/jai1*, no sufrieron inhibición del crecimiento ni coloración violácea. Este método de preselección fue completado con la realización de RT-PCR para la identificación de la mutación en el genoma de las plantas. El gen mutado en *jai1* es el gen CORONATINE-INSENSITIVE 1 (*LeCOII*) (Li y col., 2004). El genotipo *jai1/jai1* presenta una delección de 6,2 kb en el gen *LeCOII* (Figura I). Los cebadores diseñados (tabla II) para la determinación de los genotipos de *jai1* amplificaron diferentes tamaños de fragmentos de ADN en base a la presencia o no de dicha delección (tabla I).

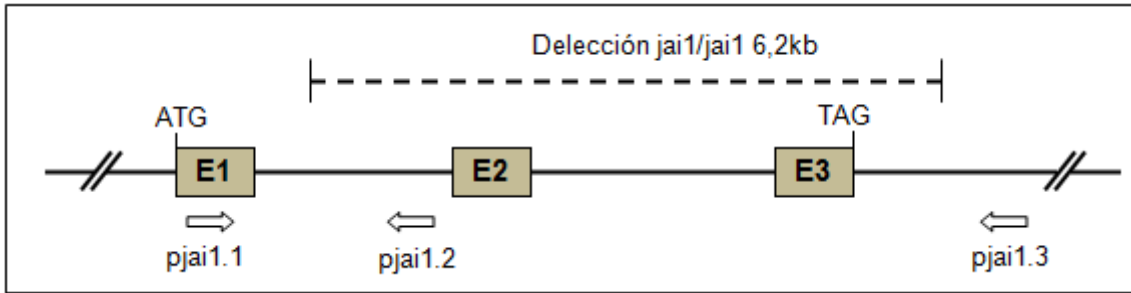


Figura I: Esquema de la delección presente en *jai1/jai1* y lugar de acoplamiento de los cebadores diseñados para la determinación de los distintos genotipos. Basado en el esquema de Li y col. (2004).

Tabla I: Fragmentos amplificados según el fenotipo

Fragmento (pb)	Cebadores (nombre)	Genotipo
525	pjai1.1-pjai1.2	Jai1/Jai1 (no mutante)
525 y 777	pjai1.1-pjai1.2 y pjai1.1-pjai1.3	Jai1/jai1 (no mutante)
777	pjai1.1-pjai1.3	jai1/jai1 (mutante)

Tabla II: Cebadores para la amplificación de *jai1*

Nombre	Secuencia (5'-3')	T ^a alineamiento (°C)	Nombre gen y referencia
pjai1.1	gtggagaccatatgttgagactaa	65	LeCOI1 (Li
pjai1.2	ccatggagtccatcacctaacagt	65	y col, 2004)
pjai1.3	gtggtcagatcagagccctctatt	65	

2.3 Cultivo in vitro.

Las plantas de patata (*S. tuberosum* ssp. *andigena*), utilizadas en los experimentos de transformación génica para la obtención de nuevas variedades sobreexpresantes y de silenciamiento génico, se cultivaron *in vitro* en medio básico Murashige y Skoog (1962), suplementado con un 2% de sacarosa (medio 2MS), cuya composición se detalla en la siguiente tabla:

Tabla III: composición medio 2MS

	Concentración g/l
Sacarosa	20,0
Murashige & Skoog (DUCHEFA)	4,4
Ácido 2-(N-Morfolino) etano sulfónico (MES)	0,5
Plant Agar	5,5

pH 5,8 ajustado con una solución al 10% de KOH
Esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 120°C.

El medio se tendió en recipientes estériles de vidrio transparente de 445ml con tapadera traslúcida para permitir el paso de la luz a través de la misma. El volumen de medio por recipiente fue de 60ml. Para la replicación de las patatas se procedió a cortar el ápice de las plántulas con un bisturí estéril, sembrándolas posteriormente sobre un nuevo recipiente con medio 2MS desde la base del tallo cortado. El tiempo de estancia de las plantas en el medio para su crecimiento y conservación osciló entre cuatro y ocho semanas, siendo necesario llevar a cabo una nueva replicación pasado este tiempo para el mantenimiento de las diferentes líneas. El cultivo original se realizó a partir de una planta proporcionada por el laboratorio de la Dra. Salomé Prat.

2.4 Sustrato y condiciones de cultivo.

El sustrato empleado para el cultivo de las plantas en la mayoría de los experimentos fue una mezcla de vermiculita, suelo, arena en proporciones 1:2:3, al que posteriormente se le agregó el inóculo portador de los propágulos infectivos del hongo micorrícico. El volumen de maceta utilizado fue de 330ml. La arena, de diámetro inferior a 2mm, y la vermiculita se enjuagaron para eliminar los residuos y exceso de sales que pudiesen contener y se autoclavaron a 120°C durante 20 minutos para esterilizarlas. El suelo, proveniente de la finca Cortijo Peinado perteneciente a la Diputación de Granada, se tamizó y esterilizó mediante tindalizado durante 1 hora a 100°C en tres días consecutivos. La composición y características del suelo empleado se detallan en la siguiente tabla:

Tabla IV: Características 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

Para el abonado de las plantas se empleó abono Osmocote®Exact®Mini de Scotts (1g/kg de mezcla vermiculita:suelo:arena) de liberación lenta (longevidad 3-4 meses a 21°C temperatura media del suelo) con la siguiente composición:

Tabla V: Composición de abono NPK de liberación lenta

Composición	Concentración
Nitrógeno total (N):	16%
nitrógeno nítrico	8,4%
nitrógeno amoniacal	7,6%
Anhídrido fosfórico (P ₂ O ₅) soluble en citrato amónico neutro y agua 5,7% soluble en agua	8%
Óxido de potasio (K ₂ O) soluble en agua	11%
Óxido de magnesio (MgO) 1,4% soluble en agua.	2%
Boro (B) soluble en agua	0,02%
Cobre (Cu) 0,038% soluble en agua	0,05%
Hierro (Fe) 0,20% quelatado EDTA	0,40%
Manganeso (Mn)	0,06%
Molibdeno (Mo) 0,014 soluble en agua	0,02%
Zinc (Zn) 0,008 soluble en agua	0,015%

Los riegos se efectuaron en base a las necesidades hídricas de las plantas, empleando agua corriente y efectuándolo por capilaridad para no afectar a las propiedades físico-químicas del suelo.

Las condiciones de luz y temperatura difirieron según el tipo de cultivo. El periodo de luz/oscuridad para las plantas de tomate fue de 16/8 horas, con una intensidad lumínica de $45\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$, mientras que la temperatura diurna se fijó en 25°C y la nocturna en 19°C . Para el cultivo de patata, el periodo de luz/oscuridad se mantuvo en 16/8 horas siendo la intensidad lumínica algo inferior, $35\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$. La temperatura diurna y nocturna se estableció constante a 21°C . La humedad relativa para los dos cultivos fue del 50%.

2.5 Tratamientos hormonales.

Además del tratamiento con metil jasmonato, utilizado para la selección de plántulas *jai1/jai1*, se llevaron a cabo otra serie de tratamientos hormonales en algunos de los ensayos realizados:

2.5.1 Tratamientos con metil jasmonato (MeJA).

Inicialmente se preparó una solución madre de MeJA (Sigma-Aldrich) $0,5\text{mM}$ a pH 7, en agua destilada, con Tween 20 al 0,01%. La aplicación de MeJA se realizó directamente sobre el sustrato en dosis de 25ml, siendo la frecuencia de aplicación diferente para el ensayo de *respuesta de tratamientos hormonales*, con dosis única $50\mu\text{M}$, que para el resto de ensayos con tratamiento. En éstos, se realizó el tratamiento dos veces por semana, a partir de la primera semana de la inoculación del hongo, en dosis $0,5\mu\text{M}$ y $5\mu\text{M}$.

2.5.2 Tratamiento con ácido abscísico (ABA).

Se preparó una solución madre de ABA (Sigma) 1mM a pH 7, en agua destilada con 1% de etanol y 0,05% de tritón X-100 (Sigma). Se realizó una sola aplicación de 25ml por maceta, directamente sobre el sustrato y a una concentración 75 μ M.

2.5.3 Tratamiento con ethephon (ácido 2-cloroetilfosfónico, Et).

El ethephon (Sigma) es un compuesto químico (C₂H₆ClO₃P, ácido 2-cloroetilfosfónico) que al solubilizarse libera etileno (Drennan y Norton, 1972). Se partió de una solución madre 0,1mM a pH 7, en agua destilada. La aplicación se realizó en una sola dosis de 25ml por maceta suministrada directamente sobre el sustrato y a una concentración 70 μ M.

2.5.4 Tratamiento con giberelinas (GA₃).

La aplicación de giberelinas se llevó a cabo en forma de ácido giberélico (GA₃, Sigma) en una sola dosis de 25ml por planta con una concentración 5 μ M. Dicha dilución fue obtenida a partir de una solución madre 0,1mM a pH 7, en agua destilada. Al igual que en los tratamientos anteriores se aplicó de forma directa al sustrato.

2.5.5 Tratamiento con ácido salicílico (SA).

Se preparó una solución madre de SA (Sigma-Aldrich) 10mM a pH7, en agua destilada con 0,1% de etanol, necesario para disolverlo previamente. Se realizó un solo tratamiento de 25ml por maceta aplicado sobre el sustrato con una concentración final 0,5mM.

2.5.5 Control en los tratamientos de aplicación hormonal.

Debido a la heterogeneidad de los tratamientos empleados, el control utilizado para todos ellos en el ensayo de *respuesta de tratamientos hormonales*, fue H₂O-miliQ a pH7 con 0,1% de etanol. En los ensayos de aplicación de MeJA los tratamientos control

se realizaron mediante las diluciones correspondientes de una solución madre de agua destilada con Tween 20 al 0,01% a pH7.

2.6 Sistema de cultivo de raíces compartimentalizadas.

En algunos ensayos se utilizó un sistema de compartimentalización de raíces o sistema “Split-root”, el cual fue diseñado para el estudio de los efectos sistémicos en raíces micorrizadas. Este sistema se ha definido como una herramienta útil para el análisis de dichos efectos sistémicos, incluidos los mecanismos de autorregulación de la micorrización (Catford y col., 2003), y el efecto sistémico bioprotector de las micorrizas arbusculares contra hongos patógenos (Khaosaad y col., 2007). El sistema consiste en dividir la raíz de la planta ensayada en dos mitades, cultivando cada una de ellas en macetas adyacentes, de tal modo que compartan la parte aérea de la planta y ambas raíces se desarrollen de forma independiente (ver figura II). De este modo, es posible inocular uno de los dos compartimentos manteniendo el otro sin inóculo y observar los efectos sistémicos derivados de dicho tratamiento. En las plantas control se lleva a cabo el mismo procedimiento, sin inocular ninguno de los dos compartimentos, manteniendo así el posible efecto surgido de la compartimentalización de las raíces.

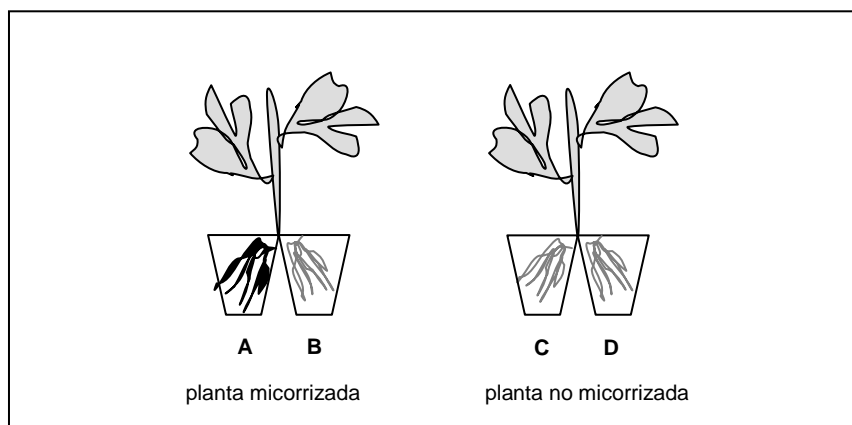


Figura II: Sistema Split-root. A y B representan los compartimentos inoculado y no inoculado respectivamente de la planta problema. C y D corresponden a los compartimentos no inoculados de la planta control.

Con el objeto de asegurar un desarrollo radical similar en los dos compartimentos, previamente al transplante se procedió a cortar al ápice de la raíz

principal, intentando con ello inducir un mayor crecimiento de las raíces secundarias y una mayor homogeneidad radicular. Realizada esta operación, las plantas fueron cultivadas en vermiculita estéril durante un periodo de siete a diez días y regadas con solución Hewitt (1952), cuya composición se detalla en la tabla VI, para favorecer el crecimiento de las raíces antes de ser transferidas al sistema de compartimentalización.

Tabla VI: solución Hewitt

	Concentración g/l
KNO ₃	30,3
Ca(NO ₃) ₂	70,8
MgSO ₄ ·7H ₂ O	18,4
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	2,5
EDTA-Fe (II)	2,2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2,4
H ₃ BO ₃	2,9
CuSO ₄ ·5H ₂ O	18,6
ZnSO ₄ ·2H ₂ O	3,0
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	20,8

pH7 ajustado con una solución 10% de NaOH

3. DETERMINACION DE NIVELES DE HORMONAS EN RAÍCES

3.1 Extracción y cuantificación de etileno en raíces de tomate.

La determinación de la producción de etileno en las raíces de plantas de tomate se realizó siguiendo la metodología descrita por Lund y colaboradores (1998) para la producción de etileno en hojas y rosetones de *Arabidopsis thaliana*. Para ello, se lavaron las raíces con agua destilada, se cortaron por debajo del cuello del tallo y se dejaron reposar durante 30 minutos en un tubo de ensayo abierto de entre 16 y 50 ml, dependiendo del tamaño de la raíz, para liberar el etileno acumulado en la raíz y no falsear los datos. A continuación, se cerró herméticamente el tubo de ensayo durante una hora a temperatura ambiente. Tras ese tiempo de incubación, se tomaron tres tomas

de 1 ml del volumen del contenedor de cada muestra, mediante una jeringa, para su posterior análisis cromatográfico. Se realizaron un mínimo de tres réplicas independientes.

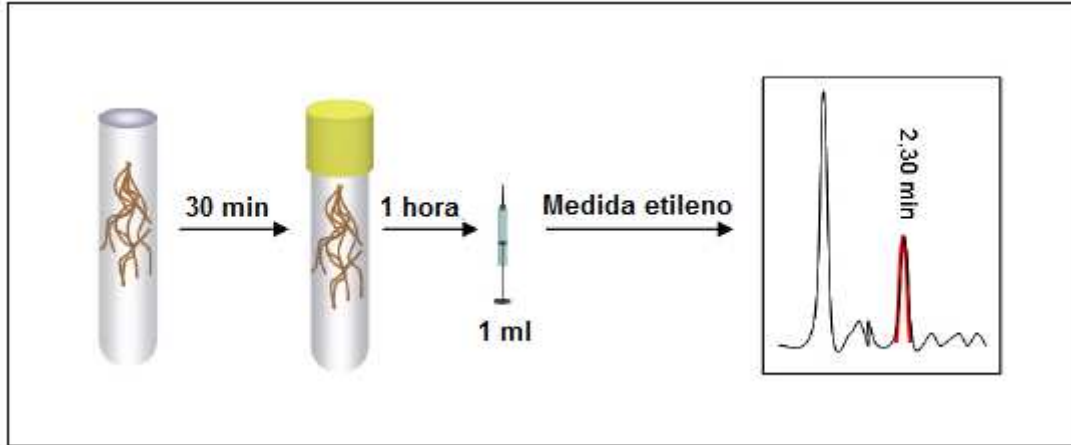


Figura III: Extracción y medida de etileno producido en raíces de tomate.

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 HP 5890 (Hewlett Packard), con una columna R de Porapak y el integrador HP 3396. La llama del detector de ionización se mantuvo con un flujo de aire e hidrógeno (H_2) con una presión de 2 bares y 1 bar, respectivamente. La fase móvil se basó en un flujo de nitrógeno (N_2) de 45 ml/minuto, y una presión de 2 bares. La columna se mantuvo a $70^\circ C$, el inyector a $120^\circ C$ y el detector a $105^\circ C$. El tiempo de retención del etileno en estas condiciones fue de aproximadamente dos minutos y medio.

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

3.2 Extracción y cuantificación de ácido abscísico en raíces de tomate.

Para la determinación del contenido de ABA en raíces de tomate se tomaron tres muestras homogéneas de 0,5g por cada planta cosechada y se analizaron un mínimo de tres réplicas biológicas independientes. Las muestras cosechadas se congelaron en N₂ líquido para su conservación y, posteriormente, se liofilizaron. 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), añadiéndole a cada muestra 100 ng del estándar interno (D6)-ABA (Plant Biotechnology Institute, National Research Council de Canadá, Saskatoon, Canadá). La preparación de las muestras se realizó según el protocolo de Meixner y colaboradores (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 N₂. 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. Posteriormente, el metanol se evaporó bajo una corriente de N₂ y la muestra se resuspendió en 100µl 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 llevó 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, se inyectaron 2µl de la muestra metilada disuelta en 30µl de acetato de etilo 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 0,25µm) 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°C/minuto hasta 180°C, incrementando a continuación 5°C/minuto hasta 250°C y 25°C/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 utilizó el μ SIS mode (VarianManual) (Wells y Huston, 1995).

La concentración de ABA endógeno se calculó 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 y col., 2000). La cantidad de ABA final por muestra, correspondiente a su producción, se cuantificó en $\text{nmoles} \cdot \text{g}^{-1}$.

3.3 Extracción y cuantificación de oxilipinas en raíces de tomate.

De igual modo que para la cuantificación del ABA, se tomaron tres muestras homogéneas de 0,5g por cada planta cosechada, analizándose un mínimo de tres réplicas biológicas independientes. Las muestras cosechadas se congelaron en N_2 líquido para su conservación y, posteriormente, se liofilizaron. El procedimiento de extracción y determinación de los niveles endógenos de ácido jasmónico (JA), jasmonil isoleucina (JA-Ile, forma activa de JA), ácido oxofitodienoico (10 y 12-OPDA) y ácido colneleico en las raíces de plantas de tomate se realizó en el Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural de la Universidad Jaume I de Castellón, por el Dr. Victor Flors. La extracción de las muestras se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Flors y colaboradores (2008). Antes de la extracción, se añadió una mezcla de estándares internos de 100 ng de ácido dihidrojasmonico y 100 ng de prostaglandina B1 a cada muestra. El tejido seco fue inmediatamente homogeneizado en 2,5 ml de agua ultrapura (NanopureTM, Barnstead, RU) y centrifugado a 5000 g durante 40 minutos. A continuación, se recuperó el sobrenadante y se acidificó (pH 2,8) con un 6% de ácido acético (v/v) y se hicieron dos particiones con el mismo volumen de éter dietílico. La fracción orgánica se recuperó y se secó a temperatura ambiente en una centrífuga de evaporación a vacío (Speed Vacuum, Ependorf). El residuo seco resultante se resuspendió añadiendo 1 ml de una solución agua/metanol (90:10) y se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,22 μm . A continuación, se inyectó 20 μl de cada muestra en un equipo HPLC (Waters Alliance 2690, Waters Corp., Milford, EEUU) acoplado a un espectro de masas en tándem con interfase de electrospray (Quattro LC,

Micromass, Manchester, RU). La separación se llevó a cabo en fase reversa en una columna Acquity UPLC BEH C18 (Waters) a un caudal de 300 $\mu\text{l}/\text{min}$.

La cuantificación de las diferentes oxilipinas medidas se realizó con la ayuda del software MassLynx 4.1 (Waters) utilizando los estándares internos y las curvas de calibrado inyectadas previamente como referencia. La cantidad de cada oxilipina por muestra se cuantificó en ng/g de peso seco (ng/dw·g).

4. MATERIAL FÚNGICO

El hongo micorrícico empleado en los ensayos fue *Glomus intraradices* (DAOM 197198) perteneciente familia *Glomeraceae*, reclasificado como *Glomus irregulare* por Stockinger y colaboradores (Stockinger y col., 2009) y recientemente como *Rhizophagus irregularis* (Krüger y col., 2012). El cultivo del hongo se realizó mediante sistema monoxénico con raíces de zanahoria transformadas (medio MM), cuya composición se muestra en la tabla X (Chabot y col., 1992). La aplicación del inóculo se llevó a cabo agregando a cada maceta un trozo del cultivo monoxénico conteniendo micelio y esporas del hongo, procurando asegurar el contacto directo entre las raíces de las plantas y los propágulos fúngicos, con el objeto de garantizar la inoculación. A las plantas control no inoculadas se les agregó un trozo de medio de cultivo MW con raíces de zanahoria transformadas pero sin hongo micorrícico.

Tabla VII: Composición medios MM y MW

	Concentración		
	MM (g/l)	MW (g/l)	Soluciones 1000X (g/l)
<i>Macronutrientes</i>			
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,731	0,731	
KNO ₃	80·10 ⁻³	80·10 ⁻³	
KCl	65·10 ⁻³	65·10 ⁻³	
KH ₂ PO ₄	4,8·10 ⁻³	-	
NaSO ₄ anhidro	-	0,199	
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	-	19·10 ⁻³	
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0,288	0,288	
EDTA-NaFe	8·10 ⁻³	8·10 ⁻³	8
KI	0,75·10 ⁻³	0,75·10 ⁻³	0,75
<i>Microelementos</i>			
MnCl ₂	6·10 ⁻³	6·10 ⁻³	6

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,65·10 ⁻³	2,65·10 ⁻³	2,65
H ₃ BO ₃	1,50·10 ⁻³	1,50·10 ⁻³	1,5
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,13·10 ⁻³	0,13·10 ⁻³	0,13
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	2,4·10 ⁻⁶	2,4·10 ⁻⁶	2·10 ⁻³
<i>Vitaminas</i>			
Glicina	3·10 ⁻³	3·10 ⁻³	3
Tiamina	0,1·10 ⁻³	0,1·10 ⁻³	0,1
Piridoxina	0,1·10 ⁻³	0,1·10 ⁻³	0,1
Ácido nicotínico	0,5·10 ⁻³	0,5·10 ⁻³	0,5
Mio-inositol	50·10 ⁻³	50·10 ⁻³	50
<i>Sacarosa</i>	10	30	-
<i>Gel-Gro</i>	4	4	-
pH 5,5 (ajustado con soluciones al 10% de KOH/HCl)			
Esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 120°C			

5. DETERMINACIÓN DE LA COLONIZACIÓN DEL HONGO MICORRÍZICO

Para la determinación de los parámetros de micorrización se procedió a la tinción histoquímica de las estructuras fúngicas del hongo con azul de tripán (Philips y Hayman, 1979). Los parámetros determinados fueron: porcentaje de longitud de raíz micorrizada (determinación bajo lupa binocular), frecuencia de micorrización (F%), intensidad de micorrización (M%), intensidad arbuscular de la zona micorrizada (a%) e intensidad arbuscular total (A%) (estos cuatro parámetros determinados tras observación al microscopio). También se midió la eficiencia de la micorrización mediante la tinción de la actividad fosfatasa alcalina (ALP), la cual se localiza principalmente en las vacuolas del micelio intraradical (Gianinazzi y col., 1979), según la metodología descrita por Tisserant y colaboradores (1993).

5.1 Tinción con azul de tripán.

Para la tinción con azul de tripán se procedió a cortar las raíces de tomate en fragmentos de aproximadamente un centímetro de longitud y se sumergieron en una solución de KOH al 10% al baño maría durante 15 minutos. Se seleccionó una cantidad de raíz representativa del total del sistema radicular. Se lavaron las raíces con agua del grifo varias veces y se trataron con ClH 0,1N durante tres minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se eliminó el ClH y se cubrieron con azul de tripán al 0,05%

en ácido láctico, durante 15 minutos al baño maría. Se quitó el colorante y se conservaron en ácido láctico hasta su observación.

5.2 Tinción de la actividad fosfatasa alcalina (ALP).

La tinción de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (ALP) nos permite determinar la acumulación y el transporte de fósforo en el micelio fúngico y, por tanto, la eficacia de la micorrización. Del mismo modo que en la tinción con azul de tripán, se trocearon las raíces en fragmentos de un centímetro aproximadamente. Se sumergieron con una solución de hidrólisis durante una hora, se lavaron y se cubrieron con la solución específica para la tinción de la ALP. Posteriormente, se sometieron a infiltración por vacío entre cinco y diez minutos para facilitar la penetración de dicha solución y se mantuvieron a 37°C durante 24 horas. Tras el periodo de incubación, se enjuagaron con agua de grifo y se les añadió hipoclorito sódico al 3%, incubándose a temperatura ambiente 15-20 minutos. Por último, se lavaron con agua de grifo y se cubrieron con ácido láctico para su conservación.

Tabla VIII: Solución de hidrólisis

Composición	Para 50ml
Buffer 0,05M Tris/Cítrico pH 9,2	50ml
Sorbitol	2,5g
Celulasa de <i>Aspergillus niger</i>	0,016g (150U)
Pectinasa de <i>Aspergillus niger</i>	380µl (150U)

Preparación en el momento de la tinción.

Tabla IX: Solución ALP

Composición	Para 50ml
Buffer 0,05M Tris/Cítrico pH 9,2	45ml
Ácido α -naftil fosfato	50mg
Sal de Fast blue RR	50mg
MgCl ₂ ·6H ₂ O	50mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	40mg

Preparación en el momento de la tinción.

5.3 Determinación de los parámetros de micorrización.

Para la determinación del porcentaje de longitud de raíz micorrizada se empleó el método descrito por Giovannetti y Mosse (1980). Las raíces teñidas se extendieron en placas de $10 \times 10 \text{ cm}^2$ divididas en cuadrículas de 1,2cm de lado. El número de cruces de la raíz con las cuadrículas es directamente proporcional al porcentaje de longitud de la raíz en la placa (Newman, 1966), siendo, por tanto, el número de cruces de raíz micorrizada con las cuadrículas proporcional al porcentaje de longitud de raíz micorrizada.

En el caso de la determinación de la frecuencia de micorrización (F%), la intensidad de micorrización (M%), la intensidad arbuscular de la zona micorrizada (a%) y la intensidad arbuscular total (A%), se utilizó la metodología descrita por Trouvelot y colaboradores (1986). Dicha técnica consiste en la observación al microscopio de 30 fragmentos de raíces teñidas con azul de tripán sobre un porta-objetos, cuantificando la proporción de estructuras fúngicas (otorgando valores de 0 a 5 según el grado de ocupación del hongo en la raíz) y la proporción de arbusculos (dando valores entre 0 y 3 según el mismo criterio), tal y como se muestra en la figura:

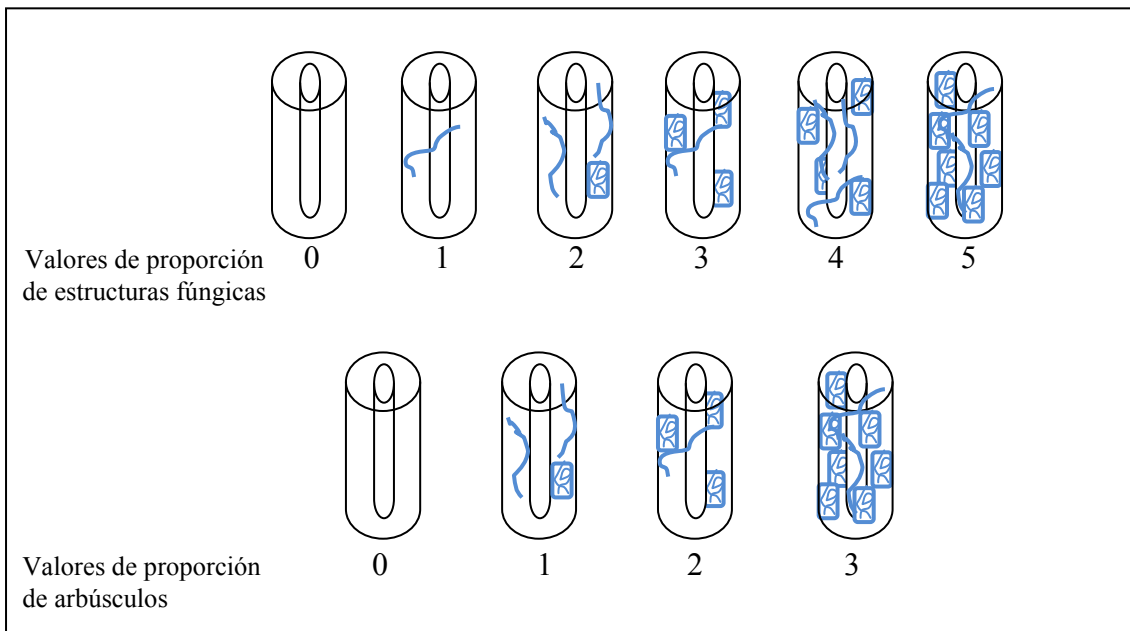


Figura IV: Método de determinación de la frecuencia (F%), intensidad (M%), intensidad arbuscular de la zona micorrizada (a%) e intensidad arbuscular (A%) según Trouvelot y col. (1986).

Los datos resultantes fueron analizados mediante las siguientes fórmulas matemáticas con la ayuda del programa MYCOCALC, obteniendo los valores de los diferentes parámetros de micorrización:

$$F\% = n^{\circ} \text{ fragmentos con micorrización} \cdot 100 / n^{\circ} \text{ total fragmentos}$$

$$M\% = (95 \cdot n_5 + 70 \cdot n_4 + 30 \cdot n_3 + 5 \cdot n_2 + n_1) / n^{\circ} \text{ total fragmentos}$$

$$m\% = M\% \cdot n^{\circ} \text{ total fragmentos} / n^{\circ} \text{ fragmentos con micorrización}$$

$$a\% = (100 \cdot mA_3 + 50 \cdot mA_2 + 10 \cdot mA_1) / 100$$

$$mA_3 = (95 \cdot n_5 \cdot A_3 + 70 \cdot n_4 \cdot A_3 + 30 \cdot n_3 \cdot A_3 + 5 \cdot n_2 \cdot A_3 + n_1 \cdot A_3) \cdot 100 / \text{fragmentos micorrizados}$$

$$mA_2 = (95 \cdot n_5 \cdot A_2 + 70 \cdot n_4 \cdot A_2 + 30 \cdot n_3 \cdot A_2 + 5 \cdot n_2 \cdot A_2 + n_1 \cdot A_2) \cdot 100 / \text{fragmentos micorrizados}$$

$$mA_1 = (95 \cdot n_5 \cdot A_1 + 70 \cdot n_4 \cdot A_1 + 30 \cdot n_3 \cdot A_1 + 5 \cdot n_2 \cdot A_1 + n_1 \cdot A_1) \cdot 100 / \text{fragmentos micorrizados}$$

$$A\% = a \cdot M / 100$$

Figura V: Fórmulas utilizadas para el cálculo de los parámetros de micorrización. En las fórmulas n_5 , 4, 3, 2 y 1 corresponden al número de fragmentos con valor 5, 4, 3, 2 y 1 respectivamente de ocupación por el hongo. A_3 , 2 y 1 corresponden al número de fragmentos con valor 3, 2 y 1 respectivamente de ocupación de arbusculos. mA_3 , 2 y 1 representan la intensidad media por fragmento con una abundancia de arbusculos 3, 2 y 1 respectivamente.

6. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

6.1 Extracción de ARN de raíces.

La extracción de ARN se llevó a cabo a partir raíces, previamente lavadas y cortadas en fragmentos de aproximadamente un centímetro y que fueron rápidamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C para su conservación. El protocolo de extracción empleado se basó en el uso de Trizol (TRI REGAENT LS, Molecular Research Center, Inc.) como agente aislante del ARN, el cual consta de tres fases:

Etapa 1: Preparación de la muestra:

Se procedió a la maceración de la muestra de raíz (0,5g, generalmente) con el uso de un mortero de porcelana, con nitrógeno líquido para evitar la descongelación y degradación, hasta obtener un polvo fino y homogéneo. A continuación se traspasó la muestra macerada a un tubo eppendorf y se le añadió 1ml de TRI REAGENT LS (trizol) por cada 50-100 mg de tejido de partida empleado. El trizol es una solución mono-fásica de fenol e isocianato de guanidina que durante la homogenización o lisis de la muestra mantiene la integridad del ARN, al mismo tiempo que altera la estabilidad de las células y disuelve sus componentes celulares. Se mezcló bien el homogenado con vortex hasta disolver completamente la muestra y se centrifugó 10 minutos a 4°C y 12000 x g. Posteriormente se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf.

Etapa 2: Separación de las fases:

En primer lugar, se dejó la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos para facilitar la disociación de los complejos proteicos. A continuación se añadió 100µl de 1-bromo-3-cloropropano (BCP, Molecular Research Center, Inc.) con el objeto de separar la muestra en tres fases: orgánica (lípidos y proteínas), interfase (ADN) y fase acuosa (ARN). Para ello se agitó vigorosamente con vortex durante 15 segundos, se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 x g durante 15 minutos a 4°C, obteniendo las tres fases. La fase acuosa, con el ARN, fue transferida a un nuevo tubo eppendorf. A continuación se añadió 0,5ml de isopropanol por ml de trizol empleado en la etapa 1 para la deshidratación del ARN, facilitando de ese modo su precipitación. Se mezcló suavemente y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12000 x g durante 10 minutos a 4°C para precipitar el ARN. Se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1ml de etanol al 75% por ml de trizol empleado en la etapa 1. Tras mezclar suavemente, se centrifugó de nuevo a 7500 x g y se desechó el sobrenadante. El precipitado obtenido se dejó secar durante unos minutos a temperatura ambiente para eliminar el exceso de etanol. Una vez realizada esta operación, se resuspendió en 30µl de H₂O DEPC. Para facilitar la solubilización del ARN se incubó a 65°C durante 5 minutos. A continuación se llevó a cabo un tratamiento con DNAsa para la eliminación del ADN que pudiese quedar retenido junto al ARN, añadiendo una mezcla de reacción de 10µl de DNAsa

(10U/ μ l, DNAsa I libre de RNAsa de QIAGEN) más 70 μ l de buffer RDD (DNA Digest Buffer de QIAGEN). Se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Etapa 3: Limpieza del ARN:

La limpieza del ARN se llevó a cabo mediante el uso de columnas NucleoSpin RNA Clean-up de Macherey-Nagel, siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.2 Extracción de ADN.

Las plantas *jai1/jai1*, insensibles al aporte exógeno de JA, presentan una delección en el gen *LeCOII* que permite identificarlas mediante RT-PCR frente a los fenotipos sensibles (ver apartado 2.2). *LeCOII* es un gen que presenta varios intrones en su secuencia, por esta razón, la extracción de ARN no es válida para la identificación de los diferentes fenotipos, siendo necesario llevar a cabo una extracción de ADN que se use como molde para la RT-PCR. Para realizar dicha extracción se utilizó una versión reducida del protocolo descrito por Dellaporta y colaboradores (1983).

Tras la preselección de los fenotipos de las plántulas mediante la aplicación exógena de MeJA (ver apartado 2.2), estas fueron cultivadas de forma individual en alveolos. Una vez desarrolladas las primeras hojas verdaderas se cortaron los cotiledones de las mismas para utilizarlos como material de partida en la extracción de ADN.

Para la preparación de la muestra, se procedió a la maceración de los cotiledones en 200 μ l de tampón de extracción EB (tabla X) mediante el uso de un pistilo estéril de plástico en un tubo eppendorf. Una vez homogeneizada la muestra, se completó el volumen con 400 μ l de tampón EB y se añadió 50 μ l de SDS (dodecilsulfato sódico) al 20% para lisar los núcleos y liberar el ADN. A continuación se incubó a 65°C con agitación durante 10 minutos para inhibir la actividad DNAsa que existiese en la preparación. Una vez realizada esta operación, se añadieron 250 μ l de acetato potásico 5M con el objeto de precipitar el ADN, y otros componentes celulares como glúcidos, y

se incubó durante 15 minutos a -80°C . Se centrifugó la muestra durante 10 minutos a $12000 \times g$ y se desechó el sobrenadante. Seguidamente se lavó el precipitado con un volumen de isopropanol y se incubó durante 15 minutos a -80°C . Se centrifugó de nuevo durante 10 minutos a $12000 \times g$, desechando el sobrenadante, y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente durante algunos minutos para eliminar el exceso de alcohol. Para aumentar la solubilidad del ADN, el precipitado fue resuspendido en $150\mu\text{l}$ de tampón 50mM Tris- 10mM EDTA (tabla XI) y se incubó durante 5 minutos a 65°C . Posteriormente, se centrifugó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante, conteniendo el ADN, a un nuevo tubo eppendorf. En la última fase del proceso, se añadió un décimo del volumen obtenido de acetato sódico 3M a $\text{pH } 5,2$ y se agitó vigorosamente. El acetato sódico se une al ADN aumentando su peso molecular y haciendo que precipite más fácilmente. A continuación se añadió un volumen de isopropanol para producir la deshidratación del ADN y su precipitación y se dejó incubar durante 1 hora a -20°C . Tras la incubación, se centrifugó a $12000 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante. Se lavó el precipitado con etanol al 70% y se procedió a centrifugar nuevamente. Por último, se dejó secar durante algunos minutos para eliminar el etanol sobrante y se resuspendió en $30\mu\text{l}$ de H_2O MilliQ.

Tabla X: Composición del tampón de extracción EB

	Para 500ml
10mM Tris-ClH pH 8	5 ml
50mM EDTA-Na pH 8	50 ml
ClNa 5M	50 ml
H ₂ O	395 ml

Esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 120°C .
 Tras autoclavado, añadir $70\mu\text{l}$ de β -mercaptoetanol por cada 100ml de tampón.

Tabla XI: Composición buffer 50mM Tris-10mM EDTA

	Para 50ml
10mM Tris-ClH pH 8	2,5 ml
50mM EDTA-Na pH 8	1 ml
H ₂ O	46,5 ml

Esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 120°C .

6.3 Cuantificación de ácidos nucleicos.

La cuantificación de los ácidos nucleicos extraídos, ADN y ARN, se llevó a cabo mediante el uso de NanoDrop (NanoDrop ND-1000 UV/Vis, de Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Otro método de cuantificación empleado fue el descrito por Sambrook y colaboradores (1989) basado en la separación por electroforesis en gel de agarosa de los ácidos nucleicos extraídos y su comparación con marcadores de peso molecular estándar (ver apartado 6.6). Este método nos permitió, no sólo conocer la cantidad de ADN o ARN extraído, sino también su grado de degradación y, por tanto, la calidad del mismo.

6.4 Síntesis de ADN complementario.

El ADN complementario (ADNc), utilizado para el análisis de expresión génica, se obtuvo mediante la transcripción inversa (RT) del ARNm extraído, usando el uso del “kit” de síntesis iScript cDNA de Bio-Rad. En la mezcla de reacción se partió de 1µg de ARN, suplementado con 5µl de tampón 5x iScript reaction mix, 1µl de enzima iScript reverse transcriptase y H₂O tratada con DEPC hasta completar un volumen de 20µl, según las instrucciones del fabricante. Esta mezcla de reacción se incubó durante 5 minutos a 25°C, seguidamente 30 minutos a 42°C para producir la amplificación del ADNc y, por último, 5 minutos a 85°C con el objeto de desnaturalizar la enzima. El volumen de reacción fue completado con 80µl de H₂O tratada con DEPC y se conservó a -20°C hasta su utilización.

6.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La determinación de la expresión de los genes analizados se llevó a cabo mediante amplificación de ADNc por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), bien mediante análisis semicuantitativo (PCR semicuantitativa) o cuantitativo (PCR a tiempo real o qPCR).

6.5.1 PCR semicuantitativa.

La amplificación de fragmentos de ADNc mediante el uso de la técnica de PCR se realizó empleando el termociclador Eppendorf MasterCycler™ Personal y la enzima Taq-ADN Polimerasa (Roche). La composición de la mezcla de reacción, preparada en tubos de 0,2ml, fue:

Tabla XII: Composición de la mezcla de reacción de PCR

	Concentración final	Para 25µl
cDNA		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)	80 µM	2
Cebador 5' (10 µM)	0,8 µM	2
Cebador 3' (10 µM)	0,8 µM	2
H ₂ O-mQ estéril		2,25
Taq ADN polimerasa (5U/µl)	1,25U	0,25

La reacción fue sometida a una desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales constando de tres etapas: una desnaturalización de 30 segundos a 95°C, una hibridación de 1 minuto (a la temperatura de alineamiento adecuada para cada pareja de cebadores) y una polimerización a 72°C y un tiempo de extensión variable entre 1 y 3 minutos en base al tamaño del amplificado. Tras los 30 ciclos se realizó una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

6.5.2 PCR cuantitativa.

La amplificación de ADNc mediante qPCR se realizó con el uso del termociclador iQ5 Multicolor Real-time PCR Detection System y la mezcla de reacción iQ™ SYBR Green Supermix de Bio-Rad, añadiendo los cebadores específicos para cada gen amplificado:

Tabla XIII: Composición de la mezcla de reacción de qPCR

	Volumen por reacción (µl)
iQ™ SYBR Green Supermix	10,5
Cebador 5' (10µM)	0,45
Cebador 3' (10µM)	0,45
H ₂ O	8,6
Volumen final	20

Del mismo modo que para la técnica de PCR semicuantitativa, la mezcla de reacción fue sometida a un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, de hibridación (a la temperatura de alineamiento adecuada para los cebadores) durante 30 segundos y de extensión a 72°C durante 30 segundos. La mezcla de reacción iQ™ SYBR Green Supermix lleva incorporado un fluorocromo de unión inespecífica al ADN capaz de generar fluorescencia bajo una longitud de onda determinada. Una vez que el fluorocromo se une al producto de PCR formado en la reacción, éste emite una señal fluorescente que se procesa en tiempo real (Walker, 2002). Por lo tanto, un aumento del producto de PCR conduce a un aumento de la fluorescencia detectada en cada ciclo, permitiendo que la concentración de ADN pueda ser cuantificada (Ririe y col., 1997).

Los datos se analizaron mediante la ayuda del software iQ5 Optical System Software Version 2.1 de Bio-Rad y el programa Microsoft Excel. Para obtener dichos datos fue necesario conocer los valores de los ciclos umbrales (Ct por sus siglas en inglés *Cycle threshold*). Estos valores son determinados por la identificación del ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se eleva por encima de un umbral adecuado, previamente fijado, en la fase exponencial de la reacción de PCR (Bustin, 2005), siendo los números de ciclo en los cuales la curva de fluorescencia atraviesa el umbral establecido los correspondientes a los valores Ct que se utilizan en los cálculos posteriores.

La cuantificación de la expresión de los genes estudiados se realizó mediante el análisis comparativo de la expresión relativa de los mismos, calculada como valores Ct, respecto a un gen de referencia de expresión constitutiva (factor de elongación 1 alfa, *EFA1*), según el método 2 delta-delta Ct descrito por Pfaffl (2001). El método 2 delta-

delta Ct expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del gen de referencia siguiendo la ecuación:

$$\text{Ratio} = 2^{-(\Delta\text{Ct}_{\text{muestra}} - \Delta\text{Ct}_{\text{gen control}})}$$

El nivel de expresión relativa de los genes analizados se expresó como valor M, calculado como \log_2 del cociente de la expresión de cada gen analizado respecto a la expresión de dicho gen en un tratamiento control determinado. De este modo, un valor $M = 1$ significa un incremento en la expresión de dos veces respecto al tratamiento control, y un valor $M = -1$ indica una reducción de la expresión de dos veces respecto al tratamiento control. En este sentido, y en este trabajo, tanto para los experimentos de análisis de expresión génica, como de análisis transcriptómico, no hemos considerado biológicamente relevante una diferencia en la expresión génica de dos veces (represión/inducción), es decir, valores del parámetro M comprendidos entre -1 y 1. En la mayoría de los ensayos, el tratamiento control escogido para el cálculo de M fue el correspondiente a las plantas no micorrizadas.

6.5.3 Cebadores utilizados.

Para el análisis de la expresión génica se hizo uso de una serie de cebadores específicos de los genes analizados. En la tabla XIV se detalla la secuencia y características de estos cebadores, clasificados en función del origen fúngico o vegetal de los genes amplificados. Se destacan en negrita los de diseño propio, con la ayuda del programa Primer3.

Tabla XIV: Cebadores de genes de *Glomus irregulare*

Nombre	Secuencia (5´-3´)	Tª alineamiento (°C)	Nombre gen y referencia
qGinEF-F	gctattttgatcattgccgcc	58	<i>GinEF</i> (Benabdellah y col., 2009)
qGinEF-R	tcattaaaacgttcttcgacc		
qGinGS-F	cctcaaggtccctattattgttctg	60	<i>GinGS</i> (Gómez y col., 2009)
qGinGS-R	acgataatgagcttcacaacgt		

Nota: debido a la alta homología existente entre los genomas de patata y tomate, muchos de los cebadores empleados en la amplificación de los genes analizados durante el desarrollo de esta tesis han servido como molde para ambas especies de planta, no siendo éste el caso de los cebadores utilizados para la amplificación del gen *AOS3*.

Tabla XV: Cebadores de genes de tomate

Nombre	Secuencia (5´-3´)	T^a alineamiento (°C)	Nombre gen y referencia
EF α 1-F	gcggtgagactggtgtgat	62	<i>EFα1</i> (Martín-Rodríguez y col., 2010)
EF α 1-R	gatgatgacctgggcagtg		
PT4-F	gaaggggagccatttaattgtgg	65	<i>LePT4</i> (Nagy y col., 2005)
PT4-R	ccatcttgtgtgtattgtgtatc		
LeAOS3-F	tccagatagatttgtggggg	60	<i>LeAOS3</i> (García-Garrido y col., 2010)
LeAOS3-R	ccaataaaccttcccatcaaca		
LOXA-F	gaaaaaaccccgataagggcat	60	<i>LeLOXA</i> (García-Garrido y col., 2010)
LOXA-R	aggagactctcgttgcga		
LeDES-F	ccggatgagttgtacctga	60	<i>LeDES</i> (López-Ráez y col., 2010)
LeDES-R	atctttgectggacattgct		
PIN-II-F	gaaaatcgtaatttatccac	60	<i>PI-II</i> (Uppalapati y col., 2005)
PIN-II-R	acatacaaaccttccatcttta		
LOXD-F	gactggtccaagttcacgatcc	60	<i>LeLOXD</i> (Uppalapati y col., 2005)
LOXD-R	atgtgctgccaatataaatggttcc		
AOS1-F	cacctgttaaacaagcgaac	60	<i>LeAOS1</i> (López-Ráez y col., 2010)
AOS1-R	gacctggtggcatgttcgt		
AOS2-F	agattttcttcccgaatatgctgaa	60	<i>LeAOS2</i> (Uppalapati y col., 2005)
AOS2-R	atactactgatttcatcaacggcat		
AOC-F	gcacgaagaagagaagaaaggagat	60	<i>LeAOC</i> (Uppalapati y col., 2005)
AOC-R	cggtgacggctaggttaagtttc		
OPR3-F	ttggcttagcagttgttgaaag	60	<i>OPR3</i> (Uppalapati y col., 2005)
OPR3-R	tacgtatcgtggctgtgttaca		

Tabla XVI: Cebadores de genes de patata

Nombre	Secuencia (5´-3´)	T^a alineamiento (°C)	Nombre gen y referencia
EF α 1-F	gcggtgagactggtgtgat	62	<i>EFα1</i> (Martín-Rodríguez y col., 2010)
EF α 1-R	gatgatgacctgggcagtg		
StAOS3-F	gcggaggagttcaatccag	60	<i>StAOS3</i> (López-Ráez y col., 2010)
StAOS3-R	cgcatgaaaaactccacaacc		

6.6 Electroforesis en gel de agarosa.

El análisis de los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR se llevó a cabo por electroforesis horizontal en gel sumergido de agarosa, preparado con tampón TBE 1x. El porcentaje de agarosa varió en base al tamaño molecular del amplificado. Para el análisis se utilizaron 20µl de volumen de la mezcla de reacción de PCR, a los que se añadió 2µl de tampón de carga Orange G 10x. El marcador de peso molecular empleado se adaptó al tamaño del ADN amplificado: HyperLadder IV de BIOLINE para amplificados de pequeño tamaño (100-1000pb), HyeprLadder I de BIOLINE para tamaños medios (200-10000pb) y marcador λIII de Roche para amplificados de mayor tamaño (564-21226pb). La electroforesis se realizó a 50V durante 45-50 minutos en gel de agarosa al 1% para fragmentos de ADN amplificados de tamaño entre 200-2000pb. Para fragmentos de ADN de mayor tamaño, la electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa al 0.8% a similar voltaje y tiempo. Los fragmentos de ADN amplificados menores a 200pb se separaron en gel de agarosa al 1.2%, siendo el voltaje similar y el tiempo de separación de 60-70 minutos.

El gel de agarosa fue teñido por inmersión en GelRed (40µl de una solución de GelRed 1µg/ml añadidos a 400ml de H₂O) y observado bajo luz ultravioleta (260nm) para su análisis con la ayuda del transiluminador Universal Hood II de BioRad, que incorpora un sistema de fotografiado y análisis de imagen mediante el programa Quantity One.

Tabla XVII: Composición TBE 5x

	Para 1l
450mM Tris-HCl	54g
12,5mM EDTA-Na	4,7g
450mM BO ₃ H ₂	27g
pH 8,2 ajustado con una solución al 10% NaOH	

Tabla XVIII: Composición tampón de carga Orange G 10x

	Concentración	Para 20ml
Glicerol	50%	10ml
EDTA-Na	10mM	74mg
Orange G	0,5%	0,1mg

7. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO

7.1 Extracción de ARN.

La extracción de ARN se llevó a cabo a partir raíces, previamente lavadas y cortadas en fragmentos de aproximadamente un centímetro y que fueron rápidamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C para su conservación, en tubos eppendorf de 2ml. El protocolo de extracción empleado se basó en el uso de Trizol (TRI REAGENT LS, Molecular Research Center, Inc.) como agente aislante del ARN, tal y como se describe en el apartado 6.1 de determinación de la expresión génica.

Una vez extraído el ARN, se cuantificó la concentración y calidad del mismo mediante espectrofotometría, con una absorbancia a 260nm, utilizando el bioanalizador Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU.).

7.2 Síntesis de ARNc biotinilado.

Para el análisis transcriptómico, se utilizó el sistema GeneChip Tomato Genome Array de Affymetrix. Este sistema contiene más de 10.000 genes y secuencias génicas expresadas (EST). De este modo, se pudo cuantificar la expresión relativa de un gran número de genes o secuencias expresadas contenidas en este sistema de Affymetrix. Para el análisis, en primer lugar se sintetizó el ADN complementario (ADNc) total correspondiente a 4 μg de ARN de cada muestra siguiendo el manual *Expression Analysis Technical Manual* (Affymetrix, Santa Clara, CA, EEUU). El ADNc se transcribió *in vitro* con UTP y CTP biotiniladas, obteniendo los ARN complementarios (ARNc) marcados con biotina correspondientes. Los ARNc (15 μg) marcados fueron

incubados a 94°C durante 35 minutos dividiéndose en fragmentos de entre 35 y 200pb para su posterior hibridación.

7.3 Hibridación.

A cada muestra de ARNc biotilada se le añadió una solución con 100 mM de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico, 1 M de Na⁺ y 20 mM de EDTA en presencia de 0,01% de Tween-20, a una concentración final de ARNc de 0,05g/ml. La hibridación se realizó durante 16 horas a 45°C, mediante el uso de la estación de fluidos Genechip Fluidics Station 450 (Affymetrix). Durante este proceso, cada microarray se lavó y se tiñó con estreptavidina marcada con un fluorocromo (R-phycoerytrin), realizándose una nueva incubación con anticuerpos marcados con biotina anti-estreptavidina y una segunda incubación con estreptavidina marcada con fluorescencia, obteniéndose, de este modo, una amplificación de la señal de cada muestra que fue detectada mediante el uso del escáner GeneChip 3000 Sistema 7G (Affymetrix).

7.4 Análisis de datos.

El análisis de los datos del microarray se llevó a cabo utilizando el paquete affylmaGUI R (Wettenhall y col., 2006). El pre procesado de los datos para eliminar el efecto de los errores sistemáticos acumulados durante la obtención del microarray se realizó en base a la técnica de normalización Robust Multiarray Average (RMA) (Irizarry y col., 2003). El análisis de la expresión diferencial de las muestras se realizó mediante el método estadístico Bayes t para modelos lineales de datos de Microarray (limma), incluido en el paquete affylmGUI. Los valores de P fueron corregidos para múltiples pruebas utilizando el método de Benjamini-Hochberg (Benjamini y Hochberg 1995; Reiner y col., 2003). De este modo, los genes se consideraron diferencialmente regulados si $P < 0,05$. Además, sólo los genes con una proporción de registro de señal > 1 o < -1 fueron considerados para su posterior análisis. Para la visualización gráfica de los datos se utilizó la herramienta interactiva FIESTA.

8. CONSTRUCCIÓN GÉNICA

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se ha realizado una construcción génica de silenciamiento por ARN interferente, para la posterior transformación y análisis de plantas de patata de la variedad *Andígena*. Para tal objetivo, se seleccionó el gen codificante de la enzima aleno óxido sintasa de tomate (*LeAOS3*), cuyo número de acceso es AW651347 (GenBankTM), involucrado en la ruta de síntesis de la vía 9-LOX de oxilipinas.

8.1 Sistema de clonación y amplificación del gen.

La amplificación del fragmento del gen *LeAOS3* para la construcción de silenciamiento por ARN interferente, se llevó a cabo por PCR mediante el uso de la enzima *proofreading* Expand High Fidelity PCR System de Roche. La mezcla de reacción fue similar a la descrita en el apartado 6.5. La clonación se llevó a cabo mediante el sistema de clonación Gateway[®] Technology de Invitrogen, teniendo en cuenta las consideraciones necesarias para el diseño de los cebadores empleados en la amplificación del fragmento. Así, al cebador 5' se le añadió una cola de nucleótidos CACC en el extremo N terminal (ver sistema de clonación Gateway[®] Technology, 8.9).

Tabla XIX: Cebadores para construcción génica *LeAOS3* por ARNi

Construcción	Nombre	Secuencia (5'-3')	T ^a anillamiento
ARN interferente	LeAOS3-F	cacc ggaccaatggctaatacacaagactc	60°C
	LeAOS3RNi-R	accaggaatcccggttggaaca	

En negrita se muestra la secuencia añadida **cacc** para clonación con sistema Gateway[®] Technology.

8.2 Purificación del producto de PCR.

El fragmento de ADNc amplificado fue separado en gel de agarosa, cortado y purificado mediante el uso del kit Quiaex II de Quiagen, según las instrucciones del fabricante. Para evitar la exposición del amplificado a la luz ultravioleta en el revelado,

se corrieron dos muestras en pocillos paralelos con un marcador de peso molecular adecuado. Posteriormente, se dividió el gel en dos mitades, sometiendo solamente a luz ultravioleta el pocillo de muestra junto al marcador. Se señaló con ayuda de un bisturí la ubicación en el gel del producto amplificado y, uniendo la otra mitad del gel, se procedió a cortar el fragmento de gel de agarosa contiguo, obteniendo el producto de PCR no sometido a luz ultravioleta.

8.3 Ligación en vector primario pENTRTM/D-TOPO[®].

La ligación del fragmento de silenciamiento génico por ARN interferente del gen *LeAos3*, se realizó siguiendo las indicaciones del kit de clonaje pENTRTM Directional TOPO[®] Cloning de Invitrogen para transformación química en células competentes de *Escherichia coli*. La mezcla de reacción, descrita en la siguiente tabla, fue incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos y, posteriormente, a 4°C durante 4 horas, antes de su transformación. La relación molar entre vector e inserto fue 1:1.

Tabla XX: Mezcla de reacción para ligación en pENTRTM/D-TOPO[®]

	Para 6µl
Inserto de ADN	Xµl
Solución salina	1µl
TOPO [®] vector	1µl
H ₂ O mili-Q	4-X µl

8.4 Preparación de células competentes de *Escherichia coli*.

Para la preparación de células quimiocompetentes de *Escherichia coli* se utilizó el método del cloruro de rubidio descrito por Hanahan (1983). Inicialmente, se cultivaron bacterias de *E. coli* de la cepa *DH5α* en 3ml de LB (Luria-Bertani) líquido a 37°C en agitación durante 12-16 horas. Una vez crecido el cultivo, se inoculó 1 ml del mismo en 100ml de medio Psi Broth y se incubó a 37°C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica a 550nm de 0,4 a 0,6 unidades de absorbancia (1-2 horas). Se detuvo el

crecimiento del cultivo colocándolo en hielo durante 15 minutos y se centrifugó a 3000g durante 5 minutos a 4°C. A continuación, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 34ml (0,4 volúmenes) de medio TfbI. Se incubó en hielo durante 15 minutos y se centrifugó nuevamente a 3000g durante 5 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 3,4ml de medio TfbII, dejándolas enfriar en hielo durante 15 minutos. Por último, se hicieron alícuotas de 100µl en tubos eppendorf de 1,5ml, que se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su utilización.

Tabla XXI: Composición medio LB

	Concentración g/l
Triptona	10
Extracto de levadura	5
Cloruro sódico	5
Agar bacteriológico (solo medio sólido)	15
pH 7 ajustado con una solución al 10% de KOH	
Esterilizado en autoclave durante 20 minutos a 120°C.	

Tabla XXII: Composición del medio Psi Broth

	Concentración g/l
Extracto de levadura	5
Bacto Triptona	20
Sulfato de Magnesio	5
pH 7,6 ajustado con una solución al 10% de KOH	
Esterilizado en autoclave durante 20 minutos a 120°C.	

Tabla XXIII: Composición del medio TfbI

	Para 200ml
Acetato potásico 30mM	588g
Cloruro de rubidio 100mM	2,42g
Cloruro de calcio 10mM	0,222g
Cloruro de magnesio 50mM	2g
Glicerol 15% v:v	30ml
pH 5,8 ajustado con ácido acético diluido.	
Esterilizado en autoclave durante 20 minutos a 120°C.	

Tabla XXIV: Composición del medio TfbII

	Para 100ml
Acido 3-n-morfolino-propanosulfónico 10mM	0,21g
Cloruro de rubidio 10mM	0,121g
Cloruro de calcio 75mM	0,83g
Glicerol 15% v:v	15ml

pH 6,5 ajustado con NaOH diluido.

Esterilizado en autoclave durante 20 minutos a 120°C.

8.5 Transformación de células competentes de *Escherichia coli*.

La transformación de células competentes de *E. coli DH5α* se llevó a cabo mediante una modificación del protocolo descrito por Hanahan (1983). En primer lugar, se procedió a descongelar las células competentes, guardadas a -80°C, en hielo para evitar su degradación. Una vez estuvieron descongeladas, se añadió, en campana de flujo, de 4 a 6µl de la mezcla de ligación y se incubó en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, se indujo un choque térmico incubándolas a 42°C durante 30 segundos, tras el cual se mantuvieron nuevamente en hielo durante 1-2 minutos. Hecho esto, se añadió 250µl de LB líquido y se cultivó durante 1 hora a 37°C en agitación. Pasado este tiempo, se sembró en placa de LB sólido con kanamicina (25µg/ml) como agente selectivo y se cultivó durante 24 horas a 37°C.

8.6 Aislamiento y purificación del ADN plasmídico.

Para el aislamiento y purificación del ADN plasmídico (ADNp) se procedió, previamente, a cultivar las colonias bacterianas seleccionadas en 3ml de LB líquido durante 6 horas a 37°C en agitación. Pasado este tiempo, se realizó una minipreparación para su obtención y purificación mediante el uso del kit QIAprep Plasmid de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante.

8.7 Digestión de ADN mediante enzimas de restricción.

Antes de realizar la ligación en el vector binario, y con el objeto de comprobar que la construcción génica realizada sobre el vector pENTRTM/D-TOPO[®] fue llevada a cabo con éxito, se procedió al chequeo de dicha construcción mediante digestión del ADNp, aislado y purificado, con enzimas de restricción. La mezcla de reacción de lisis del ADNp, detallada en la siguiente tabla, se incubó durante al menos 1 hora a 37°C, siendo en algunos casos, según el tratamiento posterior realizado, necesaria una nueva incubación a 65°C durante 20 minutos para la desactivación de la actividad enzimática.

Tabla XXV: Composición de mezcla de reacción para digestión de ADNp

	Para 20µl
ADNp (0,5-1µg)	Xµl
Buffer específico (10x)	2µl
Enzima de restricción (10u/µl)	0,5µl
H ₂ O mili-Q	17,5-Xµl

Para la selección de las enzimas de restricción utilizadas se procuró escoger enzimas presentes tanto en la secuencia del vector pENTRTM/D-TOPO[®] como del inserto clonado en cada construcción génica.

Tabla XXVI: Enzimas de restricción para el chequeo de la construcción génica

Enzima de restricción	Construcción génica	Sitio de secuencia diana
NotI	pENTR TM /D-TOPO [®] ::LeAOS3i	pENTR TM /D-TOPO [®]
EcoRI	pENTR TM /D-TOPO [®] ::LeAOS3i	LeAOS3i

8.8 Secuenciación.

La secuenciación del fragmento de ADN fue realizada por el Servicio de Secuenciación de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC, Granada), según las instrucciones ofrecidas por el mismo. El análisis e identificación de la secuencia se llevó a cabo mediante el programa Chromas Lite.

8.9 Ligación en vector de clonación binario.

El sistema Gateway[®] Technology de Invitrogen está basado en el uso de un método de clonación direccional por recombinación *in vitro* que utiliza sitios específicos presentes en los vectores primario y de destino, attL y attR respectivamente, capaces de intercambiarse mediante una reacción catalizada en un solo paso por la enzima LR clonasa (Landy, 1989; Hartley y col., 2000). Como se describe en el apartado 8.3, fue necesario realizar una primera clonación del inserto en un vector primario (pENTR[™]/D-TOPO[®]) que incorporase un “casete Gateway” con sitios específicos de recombinación attL flanqueando el fragmento clonado. La ligación hacia el vector de destino se llevó a cabo mediante la acción de la enzima LR Clonase[™] II de Invitrogen. La mezcla de reacción, descrita en la siguiente tabla, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y, posteriormente, a 4°C durante 16 horas. Pasado este tiempo, se procedió a la desactivación de la reacción de recombinación mediante la adición de 0,5µl de Proteínasa K (Invitrogen). La relación molar entre el vector primario y el vector de destino fue 1:1. El fragmento del gen *LeAOS3* amplificado para la construcción de silenciamiento por ARN interferente se ligó en el vector binario *pBin19RNAi* (Serra y col., 2009) diseñado y cedido por el laboratorio de la Dra. Salomé Prat.

Tabla XXVII: Mezcla de reacción para ligación por recombinación (LR)

	Para 5µl
LR Clonase [™] II	1µl
Vector primario (pENTR [™] /D-TOPO [®]) (50-100ng)	Xµl
Vector de destino Gateway (50-100ng)	Yµl
H ₂ O mili-Q	4-X-Y µl

8.10 Preparación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*.

Para la preparación de células quimiocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* cepa *pGV2260* se utilizó el método descrito por An y colaboradores

(1988). Inicialmente, se cultivaron bacterias de *A. tumefaciens* en 10ml de YEB líquido a 28°C en agitación durante 12-16 horas. Una vez crecido el cultivo, se inocularon 2 ml del mismo en 200ml de medio YEB suplementado con 100µg/ml de rifampicina y se incubó a 28°C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm de 0,4 a 0,6 unidades de absorbancia (2-3 horas). Se detuvo el crecimiento del cultivo colocándolo en hielo durante 15 minutos y se centrifugó a 4300rpm durante 5 minutos a 4°C. A continuación, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 20ml de TE a pH 7.5 para el lavado de las células. Se repitió la operación para realizar un segundo lavado. El precipitado obtenido se resuspendió nuevamente en 20ml de medio YEB sin antibiótico. Por último, se hicieron alícuotas de 400µl en tubos eppendorf de 1,5ml, que se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su utilización.

Tabla XXVIII: Composición medio YEB

	Concentración g/l
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	1
Peptona	5
Sacarosa	5
Sulfato de Magnesio 2mM	0,48
Agar bacteriológico	15

pH 7,2 ajustado con una solución al 10% de NaOH
 Esterilizado en autoclave durante 20 minutos a 120°C.

Tabla XXIX: Composición tampón TE

	Para 100ml
1M Tris-ClH	1 ml
0,5M EDTA-Na pH 8	0,2 ml
H2O	98,8 ml

pH 8 ajustado con una solución al 10% de NaOH
 Esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 120°C.

8.11 Transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*.

Se descongelaron las células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*, guardadas a -80°C , a temperatura ambiente. Una vez descongeladas, se añadió, en campana de flujo, de 100 a 150ng del plásmido clonado con el inserto específico y se incubó en hielo durante 5 minutos. Se congelaron las células competentes en nitrógeno líquido, donde permanecieron durante 5 minutos y se indujo un choque térmico incubándolas a 42°C durante 5 minutos. A continuación, se añadió 600 μl de medio YEB líquido y se cultivó a 28°C durante 2-3 horas. Crecido el cultivo, se sembró en placa de YEB sólido con agentes selectivos apropiados, en este caso, kanamicina a una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ y rifampicina a 100 $\mu\text{g/ml}$, y se incubó durante 48 horas a 28°C . Todos los vectores binarios utilizados en las construcciones génicas realizadas contienen el gen *NPT-II* de resistencia a kanamicina.

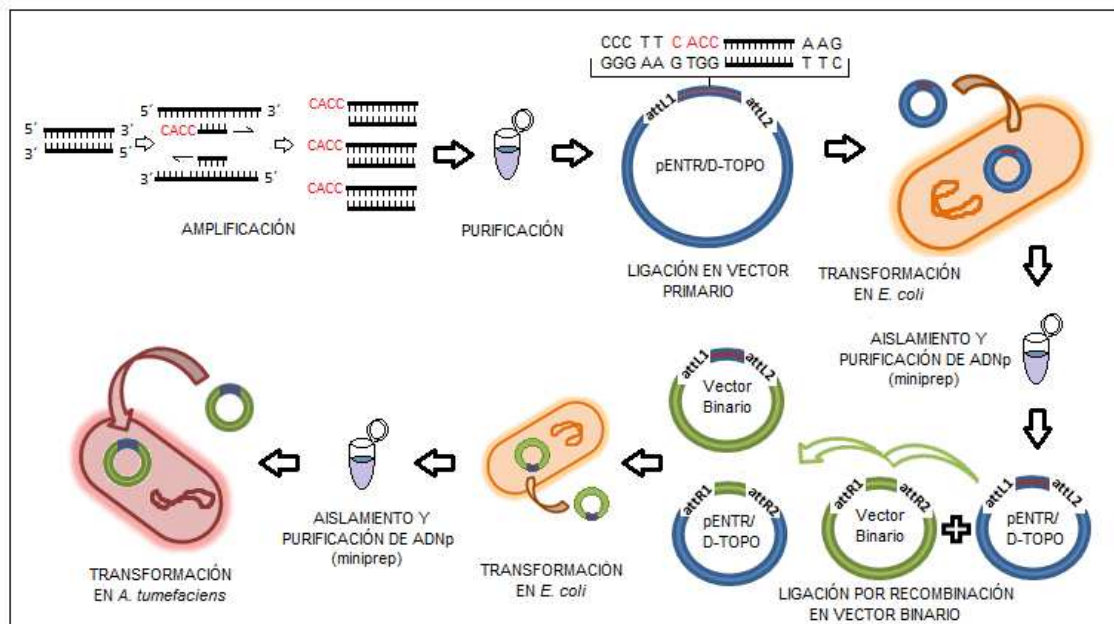


Figura VI: Esquema de construcción génica basado en la utilización del sistema de clonación Gateway[®] Technology. Diseño propio.

9. PRODUCCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE PATATA

La construcción de plantas transgénicas estables de patata de la variedad *Andigena* línea 7540 se realizó siguiendo el protocolo descrito por Banerjee y colaboradores (2006). Esta metodología fue aprendida durante una estancia breve realizada en el laboratorio de la Dra. Salomé Prat (Centro Nacional de Biotecnología, C.S.I.C, Madrid). Como se describe en el apartado 8, se produjeron plantas transgénicas de silenciamiento génico por ARN interferente del gen *LeAOS3* de tomate.

9.1 Preparación de células de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas.

Una vez transformado *A. tumefaciens* cepa *pGV2260* con el vector de destino adecuado, se inoculó un precultivo de 10ml de medio YEB suplementado con rifampicina (100µg/ml) y kanamicina (50µg/ml) y se dejó crecer hasta saturación a 28°C en agitación. Con 1ml de este precultivo, se inoculó un nuevo cultivo de 10ml de medio YEB suplementado con las mismas concentraciones de antibióticos y se creció a 28°C en agitación durante 3-4 horas hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm de 0,6 a 0,8 unidades de absorbancia. El cultivo se centrifugó durante 10 minutos a 4000 x g y el precipitado se resuspendió en el mismo volumen de sobrenadante desechado para mantener la concentración celular del cultivo, y usando medio YEB sin antibiótico, siendo éste el tampón de inoculación.

9.2 Procedimiento de transformación.

Para el procedimiento de transformación se utilizaron hojas de plantas de patata de entre cuatro y cinco semanas crecidas *in vitro*. El número de hojas usado para la transformación de silenciamiento génico por ARN interferente fue entre 40-50. Las hojas fueron separadas de la planta de patata y, posteriormente, con el uso de un bisturí estéril, se procedió a realizar sobre el envés 3-4 cortes, a modo de herida, perpendiculares al nervio central sin llegar hasta el borde de las mismas para permitir la entrada de *A. tumefaciens* transformado. A continuación, se eliminó el peciolo de las hojas y se colocaron, de cinco a seis hojas, sobre una placa petri con 10ml de medio

2MS líquido con el envés hacia arriba para evitar la desecación. Realizada esta operación, las hojas fueron inoculadas sobre el envés con 70 μ l del tampón de inoculación anteriormente preparado (apartado 7.1). Se sellaron las placas con parafilm y se cubrieron con papel de aluminio para preservarlas de la luz. Posteriormente, se incubaron a 21°C durante 48 horas.

Tras este periodo, las hojas de patata fueron transferidas a medio de inducción de callos (CIM) con el envés de las mismas hacia arriba y se incubaron a temperatura constante de 21°C durante 8 días con un periodo de luz/oscuridad de 16/8h y una intensidad lumínica de 35 μ mol fotón m⁻²s⁻¹. Pasados los ocho días de incubación, las hojas fueron trasladadas a medio de inducción de tallos (SIM) y se incubaron nuevamente en las mismas condiciones detalladas anteriormente. El medio de inducción de tallos fue renovado semanalmente hasta la aparición de los tallos transformados. Cuando estos alcanzaron una longitud de aproximadamente un centímetro se cortaron y se trasladaron a medio de enraizamiento (MG) suplementado con cefotaxima (250 μ g/ml) para suprimir el crecimiento de *A. tumefaciens* y kanamicina (75 μ g/ml) como antibiótico. En este medio permanecieron, en las mismas condiciones detalladas con anterioridad, hasta la producción de raíces, tras lo cual, fueron transferidas a medio básico 2MS, cuya composición se describe en el apartado 2.3, donde permanecieron hasta su utilización.

Tabla XXX: Composición medio MG

	Concentración g/l
Glucosa	16,0
Murashige & Skoog	4,4
Ácido 2-(N-Morfolino) etano sulfónico (MES)	0,5
Plant Agar	5,5

pH 5,8 ajustado con una solución al 10% de KOH

Esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 120°C.

Los medios de inducción de callos (CIM) y de inducción de tallos (SIM) se realizaron a partir del medio básico MG suplementado con los reguladores del crecimiento y antibióticos, añadidos en campana de flujo cuando se enfriaron a 50°C, que se detallan a continuación.

Tabla XXXI: Composición medio CIM

Medio básico MG. Añadido cuando se enfrió a 50°C:

	Concentración mg/l
Ácido Naftalenacético (NAA)	5,0
Bencil Amino Purina (BAP)	0,1
Cefotaxima (Clf)	250,0
Kanamicina (Km)	50,0
o Higromicina(Hyg)	2,5

Tabla XXXII: Composición medio SIM

Medio básico MG. Añadido cuando se enfrió a 50°C:

	Concentración mg/l
Ácido Naftalenacético (NAA)	0,02
Ácido Giberelínico (GA3)	0,15
Ribósido de Zeatina (ZR)	2,2
Cefotaxima (Clf)	250,0
Kanamicina (Km)	50,0
o Higromicina(Hyg)	2,5

Para mantener las condiciones de esterilidad de los medios CIM y SIM fue necesario esterilizar, antes de su incorporación al medio, por filtración (filtro de 0,22 μ m) aquellos reactivos disueltos en H₂O miliQ: kanamicina, cefotaxima e higromicina. Los reactivos disueltos en etanol (ácido giberelínico y bencil amino purina) así como los disueltos en dimetilsulfóxido (ácido naftalenacético y ribósido de zeatina) no fue necesario esterilizarlos debido a las propiedades asépticas de los disolventes.

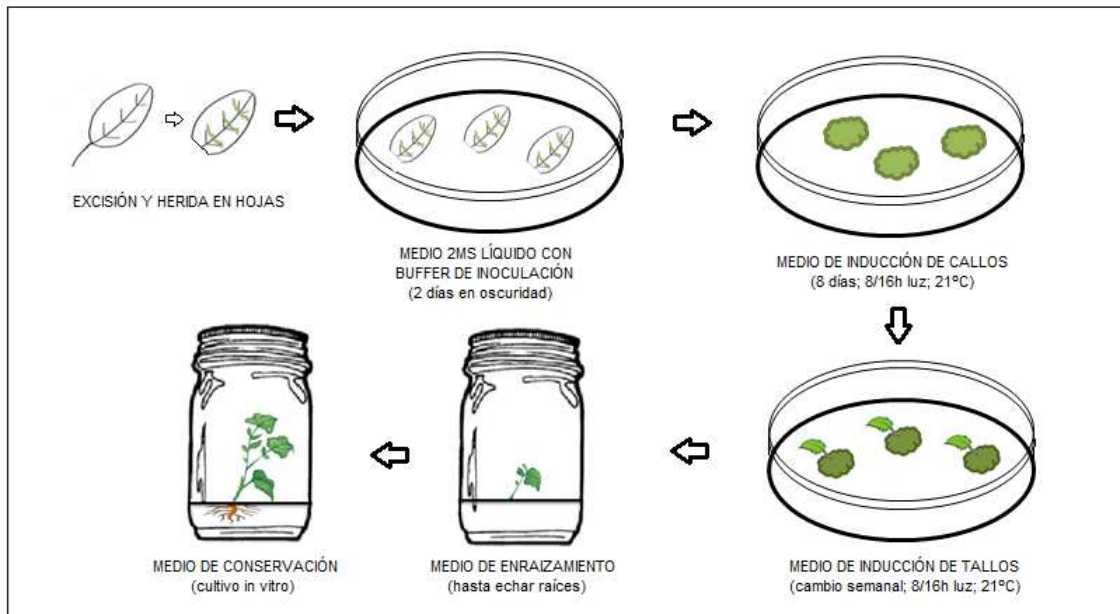


Figura VII: Procedimiento de transformación de patata. Diseño propio.

9.3 Análisis de plantas transformadas.

El análisis de las plantas transgénicas de patata se llevó a cabo a través de dos metodologías diferentes. Por una parte, se comprobó la presencia o no del T-DNA integrado en el genoma de la planta mediante la amplificación de fragmentos específicos del mismo por PCR. Por otra, se realizó un análisis del nivel de expresión del gen clonado mediante qPCR, si bien, se hizo un tratamiento previo con MeJA, con dosis única $50\mu\text{M}$, para comprobar la capacidad de inducción del gen *LeAOS3* en respuesta a dicho tratamiento.

9.3.1 Extracción de AND genómico.

Para la amplificación de las secuencias específicas del T-DNA introducido en las plantas transgénicas de patata mediante PCR, se utilizó como molde ADN genómico extraído mediante el protocolo descrito por Dellaporta y colaboradores (1983).

Como material vegetal de partida se usó la parte aérea (hojas, brotes y tallos) de las plantas cosechadas. Dicho material se conservó a -80°C hasta su utilización. A continuación, se procedió a la maceración de la muestra (1,5g generalmente) mediante

el empleo de un mortero de porcelana, con nitrógeno líquido para evitar la degradación, hasta obtener un polvo fino y homogéneo. Una vez homogeneizada la muestra, se añadieron 15ml de tampón EB (tabla X) y 0,5g de polivinilpirrolidona para evitar la oxidación del material vegetal. Seguidamente, se añadió 1ml de SDS (dodecilsulfato sódico) al 20% para lisar los núcleos y liberar el ADN y se incubó a 65°C con agitación durante 10 minutos para inhibir la actividad DNAsa que existiese en la preparación. Realizada esta operación, se añadieron 5ml de acetato potásico 5M con el objeto de precipitar el ADN, y otros componentes celulares como glúcidos, y se incubó durante 20 minutos en hielo. Se centrifugó la muestra a 4°C durante 15 minutos a 20000 x g y se filtró el sobrenadante, completando el volumen resultante con 10ml de isopropanol. Se incubó a -20°C durante 30 minutos. A continuación, se centrifugó nuevamente a 4°C durante 15 minutos a 20000 x g, se desechó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente durante 15 minutos para el eliminar el exceso de alcohol. Para aumentar la solubilidad del ADN, el precipitado fue resuspendido en 400µl de buffer 50mM Tris-10mM EDTA (tabla XI) y se incubó durante 5 minutos a 65°C. Posteriormente, se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 20000 x g y se transfirió el sobrenadante, conteniendo el ADN, a un nuevo tubo eppendorf.

Para eliminar las proteínas de la solución resultante, se procedió a la fenolización de la misma añadiendo un volumen de fenol equilibrado a pH8 con TE (SIGMA), se agitó la muestra y se centrifugó a 4°C durante 5 minutos a 20000 x g. La fase acuosa (arriba) se transfirió a un nuevo tubo eppendorf y se añadió un volumen de mezcla de fenol y cloroformo (25 partes fenol: 24 partes cloroformo: 1 parte alcohol isoamílico), se agitó vigorosamente y se centrifugó de nuevo a 4°C durante 5 minutos a 20000 x g. Se transfirió la fase acuosa (arriba) a un nuevo eppendorf y se añadió un volumen mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1), se agitó y se centrifugó a 4°C durante 3 minutos a 20000 x g. Nuevamente, se transfirió la fase acuosa (arriba) a un tubo eppendorf, obteniendo de esta manera la muestra sin proteínas.

En la última fase del proceso, se procedió a la eliminación de los glúcidos presentes en la muestra. Para ello, se añadió un décimo del volumen, obtenido tras la fenolización, de acetato sódico 3M a pH 5,2 y se agitó vigorosamente. El acetato sódico se une al ADN aumentando su peso molecular y haciendo que precipite más fácilmente. A continuación se añadió un décimo de volumen de etanol absoluto para producir la

deshidratación del ADN y su precipitación y se dejó incubar durante 30 minutos a -80°C . Tras la incubación, se centrifugó a $20000 \times g$ durante 10 minutos 4°C y se desechó el sobrenadante. Se lavó el pellet con etanol al 70% y se procedió a centrifugar nuevamente. Por último, se dejó secar durante 24 horas para eliminar el etanol sobrante y se resuspendió en $50\mu\text{l}$ de H_2O .

9.3.2 Amplificación por PCR de secuencias específicas de T-DNA.

La presencia o no del T-DNA integrado en el genoma de las plantas transgénicas de patata se analizó mediante la amplificación por PCR de secuencias específicas del mismo. Para ello se diseñaron cebadores cuyas secuencias se encuentran presentes tanto en el fragmento de T-DNA correspondiente al vector binario como en el gen clonado.

Las secuencias de los cebadores utilizados se detallan a continuación:

Tabla XXXIII: Cebadores para la comprobación de plantas transgénicas

Nombre	Secuencia (5'-3')	T ^a alineamiento (°C)	Nombre gen y referencia
NptII-F	gaggetattcggtatgactg	55	<i>NptII</i> (Venkatachalam y col., 2000)
NptII-R	atcgggagggcgataaccgta		
pBin19RNAi-F	cgtaacatggtggagcagaca	50	pBin19RNAi::Aos3
LeAOS3RNi-R	accaggtaatcccgggtggaaca		(diseño propio)

9.3.3 Análisis del nivel de expresión del gen clonado.

El análisis del nivel de expresión del gen *LeAOS3* en las plantas transgénicas de patata de silenciamiento génico se llevó a cabo mediante qPCR, según la misma metodología descrita en el apartado 6.5.2, realizándose un tratamiento con MeJA previamente al análisis de expresión. Para ello, se aplicó un solución de MeJA $50\mu\text{M}$ sobre las raíces de las plantas transformadas 24h antes de su cosecha. Posteriormente, se procedió a la correspondiente extracción de ARN, síntesis de ADNc y análisis de expresión del gen *LeAOS3* mediante qPCR. Como control se utilizaron plantas silvestres tratadas y no tratadas con MeJA así como plantas de cada línea transgénica sin tratamiento con JA, identificadas previamente mediante la amplificación de una

secuencia específica del T-DNA integrado en su genoma. Dicho tratamiento, permitió comprobar la capacidad de inducción de *LeAOS3* a MeJA y, por tanto, identificar aquellas líneas transgénicas incapaces de inducir el gen como líneas *knock out*. Las secuencias de los cebadores utilizadas para el análisis fueron:

Tabla XXXIV: Cebadores para análisis de nivel de expresión transgénicas

Nombre	Secuencia (5´-3´)	T ^a alineamiento (°C)	Nombre gen y referencia
EF α 1-F	gcgttgagactggtgtgat	62	<i>EFα1</i> (Martín-Rodríguez y col., 2010)
EF α 1-R	gatgatgacctgggcagtg		
StAOS3-F	gcggaggagttcaatccag	60	<i>StAOS3</i> (López-Ráez y col., 2010)
StAOS3-R	cgcataaaaaactccacaacc		

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizaron de tres a cinco repeticiones de cada tratamiento y por ensayo. Los resultados de todas las gráficas y tablas presentadas en los resultados de esta tesis doctoral se sometieron a un análisis ANOVA, bajo el test de rango múltiple de Duncan con un nivel de significación de $p \leq 0.05$, con la ayuda del programa estadístico SPSS. Las diferencias significativas encontradas se indican con letras diferentes en los distintos tratamientos.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. ANÁLISIS DEL PERFIL TRANSCRIPTÓMICO ASOCIADO AL PROCESO DE MICORRIZACIÓN EN PLANTAS DE TOMATE

Los arbusculos son las estructuras simbióticas encargadas de la transferencia de nutrientes entre el hongo y la planta en la asociación micorriza arbuscular (MA). Diversos estudios han demostrado que su desarrollo y funcionalidad están relacionados con la vía de síntesis de diferentes hormonas vegetales, especialmente ABA (Herrera-Medina y col., 2007) y JA (Isayenkov y col., 2005). En este sentido, y con el objetivo de determinar e identificar qué genes están involucrados en el proceso de micorrización y formación arbuscular, se realizó un análisis transcriptómico de plantas de tomate micorrizadas de tipo silvestre y mutantes *sitiens*, deficientes en la capacidad de síntesis de ABA, comparándolas entre sí y con sus respectivos controles no micorrizadas. Las plantas *sitiens* son menos susceptibles a la infección fúngica y los parámetros de micorrización analizados en éstas se encuentran reducidos en aproximadamente un 70% respecto a las plantas de tipo silvestre. Además, la mayoría de los arbusculos de los mutantes *sitiens* son arbusculos poco desarrollados que solo ocupan parcialmente la célula vegetal (Herrera-Medina y col., 2007). Por otra parte, la colonización de raíces de plantas por hongos MA ha sido relacionada con cambios endógenos de los niveles de JA (Hause y col., 2002; Meixner y col., 2005; Stumpe y col., 2005), sugiriéndose que un posible mecanismo por el cual los jasmonatos regulan el proceso micorrización y la formación de arbusculos sea a través de la regulación del metabolismo y transporte de los carbohidratos en la planta (Hause y col., 2000; Tejeda-Sartorius y col., 2008).

En el presente capítulo se describen los resultados del análisis de hibridación de microarrays, comparando los resultados de raíces micorrizadas y no micorrizadas de plantas de tomate de tipo silvestre y mutantes *sitiens* deficientes en ABA, con el objetivo de obtener una visión de conjunto sobre las modificaciones transcripcionales ocurridas en la raíz de tomate en respuesta al estado de micorrización, según la concentración de ABA en las raíces, así como para la búsqueda de genes marcadores del desarrollo de la simbiosis.

1.1 Análisis transcriptómico de la expresión génica según el contenido de ABA en la raíz.

Con el objeto de determinar e identificar aquellos genes involucrados durante el proceso de micorrización y la formación arbuscular, se realizó un análisis transcriptómico de raíces micorrizadas de plantas de tomate de tipo silvestre y mutantes *sitiens*, alterados en la capacidad de síntesis de ABA. Experimentos previos han revelado que los mutantes *sitiens* son menos susceptibles a la infección fúngica, presentando, además, arbusculos poco desarrollados que ocupan la célula vegetal solo parcialmente (Herrera-Medina y col., 2007). En este sentido, se llevaron a cabo tres experimentos independientes de micorrización de plantas de tomate de tipo silvestre (Rheinlands Ruhm) y mutantes *sitiens* inoculadas y no inoculadas con *G. intraradices*. Se recogieron muestras de ARN de un *pool* de tres raíces por tratamiento para cada experimento realizado y se obtuvo cRNA marcado para hibridación en el chip de ADN “*Affymetrix Tomato GeneChip*” que contiene 10.209 conjuntos de sondas (Affymetrix), realizándose, en total, doce experimentos de hibridación.

Las plantas se cosecharon 50 días posteriores a la inoculación (dpi), debido a que ensayos previos han demostrado claras diferencias en la micorrización entre ambas líneas, mutantes y silvestres, para ese momento (Herrera-Medina y col., 2007). Los parámetros de micorrización analizados fueron: porcentaje de raíz micorrizada, frecuencia de micorrización (F%), intensidad de micorrización (M%) e intensidad de arbusculos en la zona colonizada (a%). Por lo general, en todos los ensayos el peso fresco de la parte aérea de los mutantes *sitiens* fue inferior al de las plantas silvestres como consecuencia de su fenotipo, si bien, en el peso radicular no se observaron dichas diferencias (figura I, gráficas A y B). La medida de los parámetros de micorrización analizados mostró, para los tres experimentos realizados, una menor susceptibilidad de los mutantes *sitiens* a la colonización por *G. intraradices* respecto a las plantas de tipo silvestre, especialmente en cuanto a la intensidad de micorrización y a la intensidad de arbusculos en la zona colonizada, llegando a reducirse en el “experimento I” la intensidad de micorrización hasta un 70% y la intensidad arbuscular hasta un 10%, respecto a las plantas control micorrizadas (figura I, gráficas C, D, E y F). Para comprobar la funcionalidad arbuscular en las raíces de las plantas *sitiens*, se realizó un análisis de la expresión génica del gen *LePT4*, codificante de un transportador de

fósforo asociado a la funcionalidad de los arbusculos en plantas de tomate micorrizadas, mediante el uso de la técnica qRT-PCR. Dicho análisis, mostró una clara correlación entre el nivel de expresión de *LePT4* y los datos obtenidos mediante las determinaciones histoquímicas de intensidad de arbusculos en la zona colonizada (figura I, gráfica G).

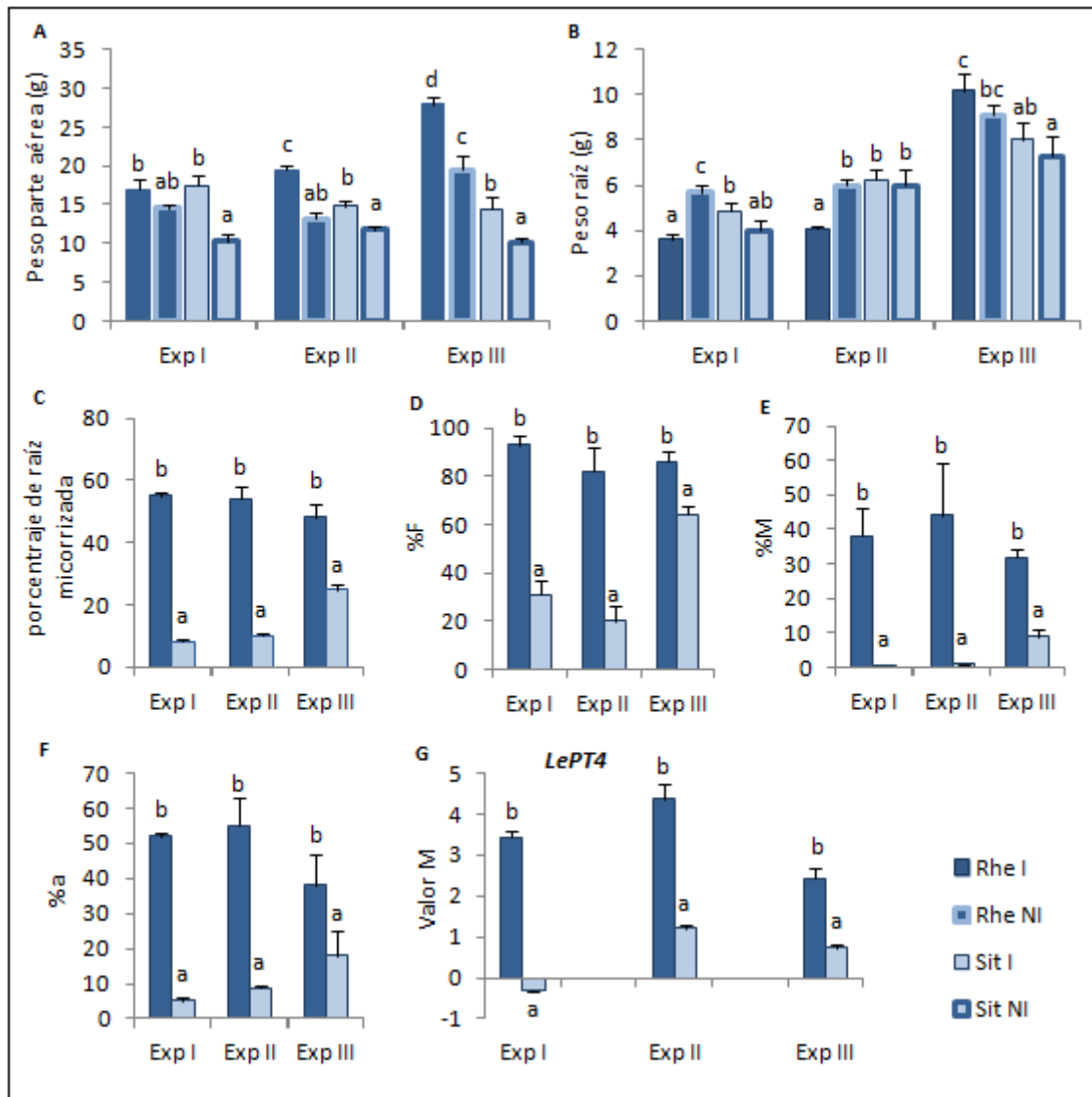


Figura I: Parámetros de micorrización en los tres experimentos de plantas de tomate de la variedad silvestre Rheinlands rhum y mutantes *sitiens*, alteradas en la capacidad de síntesis de ABA, inoculadas con *G. intraradices* y cosechadas a 50dpi. **Gráfica A:** Peso fresco de parte aérea. **Gráfica B:** Peso fresco de la raíz. **Gráfica C:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica D:** Frecuencia de micorrización (F%). **Gráfica E:** Intensidad de micorrización (M %). **Gráfica F:** Intensidad de arbusculos en la zona colonizada. **Gráfica G:** Análisis de expresión génica del gen *LePT4* mediante qRT-PCR. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas ± error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

Por otro lado, también se efectuaron medidas de los niveles endógenos de ABA libre y etileno en las raíces de las plantas de tipo silvestre y mutantes, inoculadas y no inoculadas con *G. intraradices*, para el “experimento I”. Como era de esperar, los niveles de ABA en las raíces de las plantas *sitiens* se redujeron respecto a los de las plantas de tomate de tipo silvestre, mientras que la producción de etileno aumento en las mutantes deficientes en ABA (figura II, gráficas A y B).

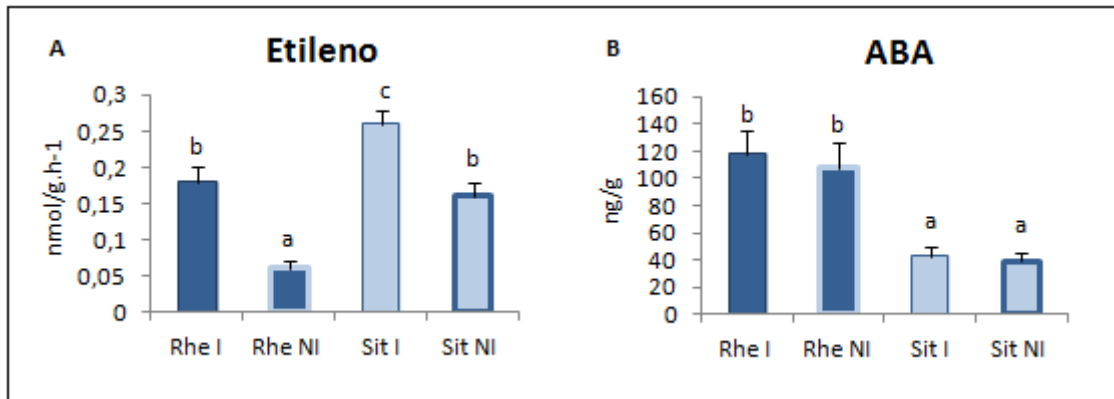


Figura II: Análisis del contenido endógeno de Etileno (**gráfica A**) y ABA libre (**gráfica B**) en raíces de plantas de tomate de tipo silvestre (Rheinlands Rhum) y mutantes *sitiens* deficientes en la síntesis de ABA, inoculadas y no inoculadas con *G. intraradices* y cosechadas a 50dpi. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

Para la identificación de los genes expresados diferencialmente en el análisis transcriptómico se utilizó como criterio el cambio en el nivel de expresión de dichos genes, al menos en dos veces (valor M de 1 ó -1), entre un tratamiento y otro, aplicando un valor $P \leq 0,05$. Siguiendo este criterio se seleccionaron 238 genes (anexo I). De estos, 127 (53%) mostraron un aumento en su nivel de expresión en las raíces de las plantas de tomate silvestres inoculadas con *G. intraradices*, mientras que otros 50 (21%) genes presentaron una disminución en su nivel de transcripción en estas mismas raíces, respecto a los controles no inoculados. En las raíces de los mutantes *sitiens*, se observó una expresión diferencial en 98 genes, de los cuales, 83 (35%) presentaron una regulación transcripcional positiva y otros 15 (6%) negativa, respecto a las plantas mutantes control no micorrizadas. Comparando ambos conjuntos de datos, es decir, la regulación transcripcional en las plantas silvestres frente a plantas *sitiens* inoculadas, se observó una superposición de un 15% de los genes seleccionados, de los cuales, 33 de ellos (13% del total de los genes seleccionados) se encontraban regulados positivamente, mientras que tan solo 4 (2% de los genes seleccionados) presentaron una

reducción en sus niveles de expresión en las plantas micorrizadas respecto a las no micorrizadas, independientemente del fenotipo de la planta. La distribución de los datos de los genes seleccionados de acuerdo con el genotipo de las plantas mostró que un 40% de los genes fueron regulados positivamente y un 19% negativamente exclusivamente en las plantas silvestres inoculadas respecto a los controles no inoculados, mientras que tan solo un 22% de los genes seleccionados presentaron un regulación positiva y un 4% negativa en los mutantes *sitiens* deficientes en ABA (Figura III).

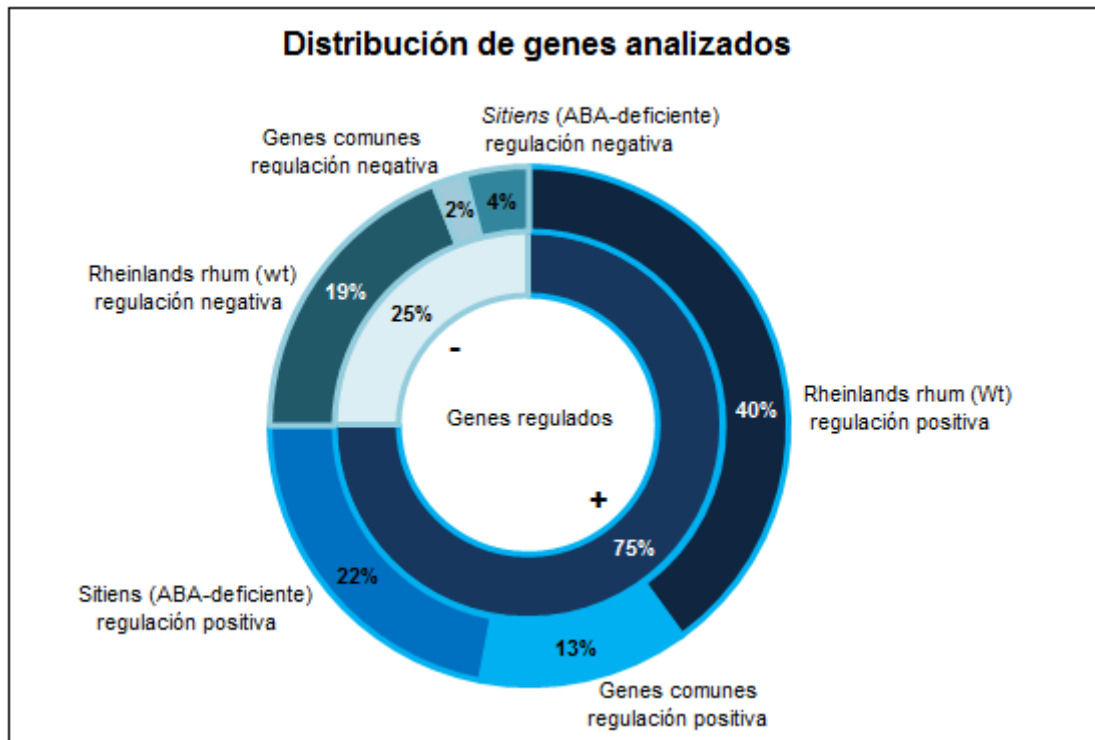


Figura III: Distribución de los genes analizados mediante microarrays. Porcentaje de genes regulados positiva y negativamente en raíces de plantas de tomate silvestres (Rheinlands rhum) y mutantes *sitiens* deficientes en la síntesis de ABA.

1.2 Anotación, identificación y asignación de funciones de los genes seleccionados.

La anotación, identificación y asignación de las funciones putativas de los genes seleccionados se realizó con la ayuda de la información proporcionada por el chip de ADN “*Affymetrix Tomato GeneChip*” de Affymetrix y la base de datos de solanáceas “*Solanaceae Genomics Network*” (SGN) de la Universidad de Cornell.

De igual modo que en otras plantas hospedadoras, se pudo identificar una serie de genes en tomate ortólogos a otros descritos anteriormente como “genes básicos de la micorrización” (Liu y col., 2007; Guether y col., 2009). En este sentido, se encontraron genes regulados positivamente en raíces de tomate micorrizadas, codificantes de proteasas, ortólogos a otros descritos previamente en *Medicago truncatula* (Liu y col., 2003) y *Lotus japonicus* (Kistner y col., 2005). Entre ellos, se hallaron un gen codificante de una serina carboxipeptidasa (Les.4810.1.S1_at), dos pertenecientes a la categoría de proteasas de tipo subtilisina (Les.5764.1.S1_at y LesAffx.8850.1.S1_at) y otro codificante de una miraculina (Les.3397.1.S1_at) (Tabla I). Curiosamente, todos estos genes de proteasas se encontraban regulados positivamente y de un modo similar tanto en las plantas silvestres como en los mutantes *sitiens* micorrizados, si bien, también se observó una inducción de otra subtilisina (Les.513.1.S1_at) tan solo en las plantas *sitiens* micorrizadas. Por otro lado, se identificaron varios inhibidores de proteasas regulados positivamente en las raíces de las plantas inoculadas con *G. intraradices*, si bien, los genes inducidos codificantes para éstas no resultaron ser los mismos en las plantas de tomate silvestres (Les.3281.1.S1_at y Les.4820.1.S1_x_at) y *sitiens* deficientes en ABA (LesAffx.69210.1.S1_at y Les.3940.2.A1_at) (Tabla I). Además, se identificaron otros “genes básicos de la micorrización”, descritos anteriormente, tales como genes codificantes para glucosiltransferasas, anexinas, acuaporinas, citocromos P-450, glutatión S-transferasas o una giberelina 20-oxidasa, regulados positivamente en las raíces de las plantas micorrizadas, especialmente en las de tipo silvestre (Tabla I).

ID	ID Affimetrix GeneChip	Genotipo en el que se expresa	Categoría funcional	Función molecular
BT013423	Les.4810.1.S1_at	Rhe/Sit	Metabolismo	Peptidasa
BT014524	Les.5764.1.S1_at	Rhe/Sit	Metabolismo	Subtilasa
AW034398	LesAffx.8850.1.S1_at	Rhe/Sit	Metabolismo	Subtilisina
BG631366	Les.3397.2.A1_at	Rhe/Sit	Metabolismo	Miraculina
BT013596	Les.513.1.S1_at	Sit	Metabolismo	Subtilisina
AI897365	Les.3281.1.S1_at	Rhe	Metabolismo	Inhibidor proteasas
AF198390	Les.4820.1.S1_x_at	Rhe	Metabolismo	Multicistatina
BI921774	LesAffx.69210.1.S1_at	Sit	Defensa y estrés	Cistatina
BG628187	Les.3940.2.A1_at	Sit	Defensa y estrés	Inhibidor proteasas
X72729	Les.3981.1.S1_at	Rhe/Sit	Metabolismo	Glucosiltransferasa
AW223624	Les.2403.2.S1_at	Rhe	Metabolismo	Glucosiltransferasa
AW649975	LesAffx.39771.2.S1_at	Rhe	Señalización	Anexina
BE451719	LesAffx.59952.2.S1_at	Rhe/Sit	Transporte	Acuaporina
BE451576	LesAffx.51311.1.S1_at	Rhe	Metabolismo	Citocromo P450

AF049898	Les.64.1.S1_at	Rhe	Fitohormonas	Giberelina 20-oxidasa
AW040299	LesAffx.71535.1.S1_at	Sit	Metabolismo	Glutación S-transferasa

Tabla I: Identificación, anotación, posible función y genotipo en el que se incrementa la expresión de genes de tomate identificados en el análisis transcriptómico como “genes básicos de la micorrización” en plantas de tomate silvestres (Rhe, Rheinlands rhum) y *Sitiens* (Sit), deficientes en ABA, inoculadas con *G. intraradices* y cosechadas a 50dpi, respecto a plantas control no inoculadas. ID: identificación GenBank.

Basándose en la función molecular putativa del total de genes seleccionados, éstos se pudieron clasificar en las siguientes categorías: metabolismo (incluyendo proteínas, lípidos, hidratos de carbono y metabolismo primario y secundario), transporte, señalización, síntesis de fitohormonas, respuesta a defensa y estrés, genes relacionados con el metabolismo de la pared celular y “otros” (incluyendo proteínas de función desconocida y genes no clasificados). El análisis comparativo de las distintas categorías mostró un panorama similar entre los genes “comunes” (aparecen tanto en plantas silvestres como mutantes *sitiens*) y los genes específicos de las plantas silvestres micorrizadas, regulados positivamente (Figura IV). En este sentido, las categorías de metabolismo, transporte, señalización y síntesis de fitohormonas se encontraban representados de manera similar tanto entre los genes “comunes” regulados positivamente de las plantas micorrizadas como entre los genes específicos inducidos en las plantas silvestres inoculadas, si bien, la mayoría de los genes regulados positivamente en ambos conjuntos parecen estar relacionados con cambios en el metabolismo asociado a la micorrización de las raíces de tomate. La segunda categoría funcional mejor representada entre los genes “comunes” regulados positivamente de las plantas micorrizadas fue la relacionada con la respuesta a defensa y estrés, con un 15% del total de los genes inducidos. Por su parte, en el conjunto de genes específicos de las plantas silvestres inoculadas, la segunda categoría más representada fue la de “otros” (figura IV, gráficas A y B). En cuanto a los genes regulados positivamente en las plantas *sitiens* deficientes en ABA, la distribución de los genes fue totalmente diferente. En ese caso, la categoría funcional más representada fue la relacionada con la respuesta a defensa y estrés (30%), mientras que la representación de los genes relacionados con el metabolismo perdió importancia a favor de las categorías relacionadas con la pared celular y "otros" (figura IV, gráfica C).

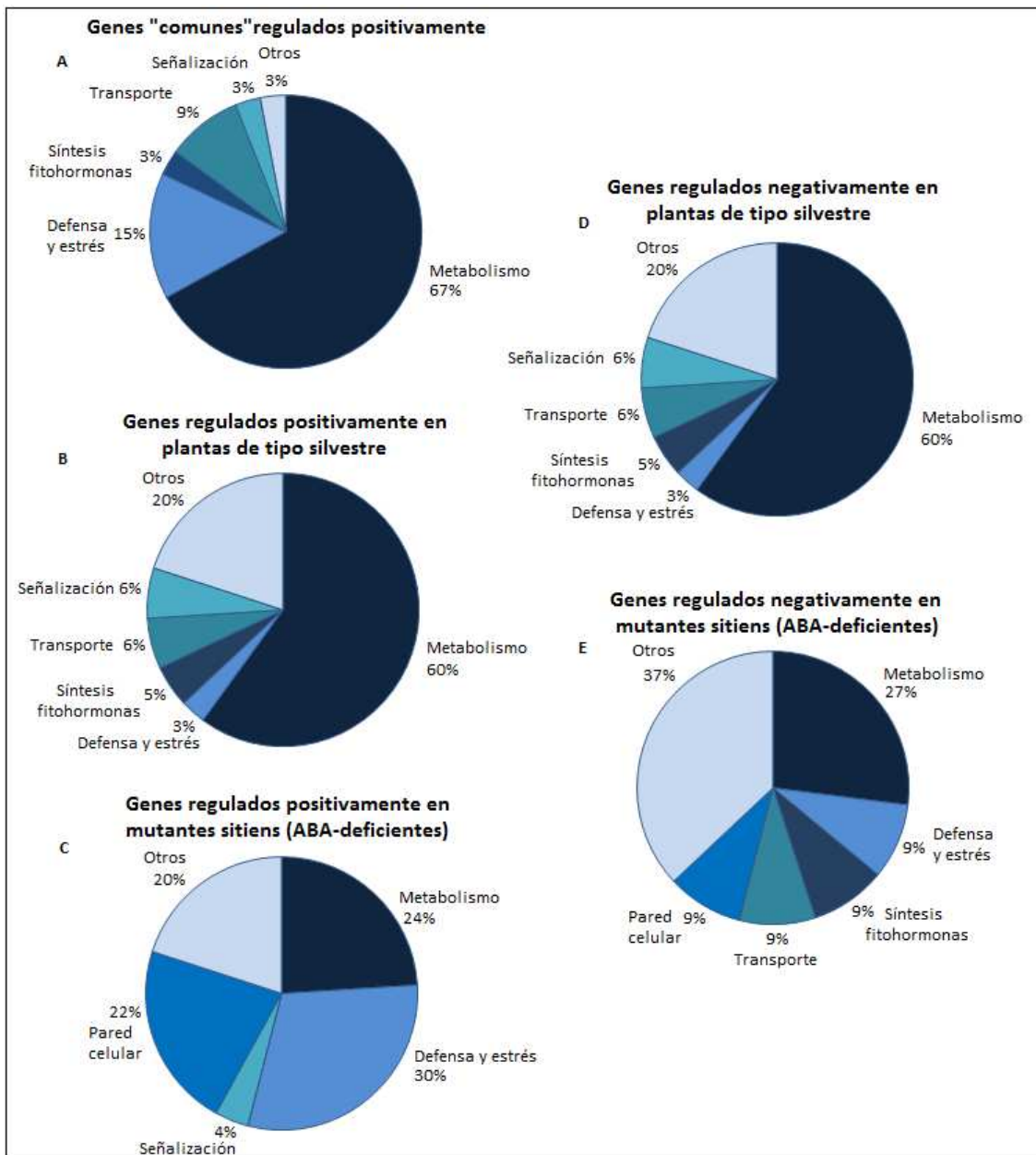


Figura IV: Distribución por categorías (metabolismo, defensa y estrés, síntesis de hormonas, transporte, señalización, pared celular y otros) de los genes regulados positiva y negativamente en plantas de tomate silvestres y mutantes *sitiens* deficientes en ABA, cosechadas a 50dpi e inoculadas con *G. intraradices*. **Gráfica A:** Genes “comunes” (presentes en plantas silvestres y *sitiens*) regulados positivamente. **Gráfica B:** Genes regulados positivamente en plantas silvestres. **Gráfica C:** Genes regulados positivamente en mutantes *sitiens*. **Gráfica D:** Genes regulados negativamente en plantas silvestres. **Gráfica E:** Genes regulados negativamente en mutantes *sitiens*.

Curiosamente, se observó la misma distribución y porcentaje entre las diferentes categorías funcionales descritas para los genes regulados positiva y negativamente de las plantas silvestres micorrizadas (figura IV, gráficas B y D). Por otra parte, la distribución de las categorías de los genes regulados negativamente entre los mutantes *sitiens* inoculados, mostró un patrón similar a la observada para los genes regulados

positivamente, siendo la categoría relacionada con “otros” la mejor representada (37%) y obteniendo una mayor importancia la relacionada con la pared celular (9%) respecto a lo observado en las plantas silvestres (figura IV, gráfica E).

1.2.1 Inducción de genes de respuesta defensiva y metabolismo de la pared celular asociada a la micorrización de mutantes *sitiens* deficientes en ABA.

El estudio comparativo de los datos obtenidos en el análisis transcriptómico de las plantas de tomate de tipo silvestre y mutantes *sitiens* deficientes en ABA, reveló que el deterioro en la formación arbuscular de los mutantes en ABA se encuentra asociado con una regulación positiva de genes relacionados con la defensa y el metabolismo de la pared celular. En este sentido, el 30% de los genes regulados positivamente en los mutantes *sitiens* micorrizados pertenecieron a la categoría de resistencia a enfermedades y respuesta frente a estrés. Entre los genes relacionados con la respuesta defensiva se incluyeron cinco posibles peroxidasas, dos inhibidores de proteasas, tres proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR), una β -1,3-glucanasa y una endoquitinasa (Tabla II).

Aunque otros análisis transcriptómicos realizados en plantas de *M. truncatula* y *L. japonicus* micorrizadas han mostrado un incremento de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la pared celular, tales como endoglucanasas y celulosa sintasas (Liu y col., 2003; Guether y col., 2009), el análisis de microarrays llevado a cabo en plantas de tomate reveló que tan solo en los mutantes *sitiens*, deficientes en ABA, se produjo una regulación diferencial de esta categoría funcional de genes. En este sentido, se encontraron once genes implicados en el metabolismo de la pared celular regulados positivamente en los mutantes *sitiens* respecto a las plantas silvestres micorrizadas: dos genes codificantes para endo-1,4- β -glucanasas, tres genes diferentes de pectinasas, tres genes relacionados con expansinas y tres genes codificantes para extensinas (Tabla II).

Categoría, ID	ID <i>Affimetrix GeneChip</i>	Expresión (Valor M)			Función molecular
		Rhe I/NI	Sit I/NI	Rhel /SitI	
Defensa y estrés					
BI203178	LesAffx.39466.1.S1_at	0.13	2.24	-1.72	Peroxidasa
X74906	Les.3652.1.S1_at	0.13	1.93	-1.58	β ,1-3 Glucanasa TomQ
Z15141	Les.122.1.S1_at	0.00	1.80	-2.29	Endo-quitinasa
X70787	Les.45.1.S1_at	-0.48	1.35	-1.00	PR P23
BI921774	LesAffx.69210.1.S1_at	0.00	1.66	-1.07	Cistatina, inhibidor proteasas
AF146690	Les.3742.1.S1_at	-0.58	1.77	-2.13	<i>Prg1 (Pto-responsive gene 1)</i>
U34808	Les.3614.1.S1_at	0.92	2.63	-1.00	TPSI 1
X71593	Les.3608.1.S1_at	0.67	1.66	-1.09	CVI1 peroxidasa
AJ635323	Les.4527.1.S1_at	0.56	1.23	-1.13	Polifenol oxidasa A
BT013033	Les.4976.1.S1_at	0.26	1.56	-1.62	Peroxidasa, prx14
CN385433	LesAffx.39.1.S1_at	-0.37	1.38	-1.44	Peroxidasa PER72
CN385109	LesAffx.4779.1.S1_at	-1.38	1.07	-1.20	Peroxidasa
BI208926	LesAffx.823.1.S1_at	-0.57	1.14	-1.30	Proteína PR
M69248	Les.3608.1.S1_at	0.67	1.66	-1.09	Peroxidasa CVI 1
BG628187	Les.3940.2.A1_at	1.01	1.20	-1.00	Inhibidor de proteasas
Pared celular					
DQ234354	LesAffx.5130.1.S1_at	0.13	2.76	-2.78	β -expansina
BT014190	Les.5579.1.S1_at	0.13	1.99	-1.58	Pectato liasa
AK224792	Les.2946.2.S1_at	0.48	1.84	-1.20	Extensina
Z46674	Les.2839.1.S1_at	0.26	1.80	-1.00	Extensina Lemmi8
AF077339	Les.3491.1.S1_at	0.13	1.63	-1.43	Endo-1,4- β -glucanasa
AF059489	Les.369.1.S1_at	-0.48	1.56	-1.48	Expansina precursor 5
X55193	Les.3663.1.S1_at	0.37	1.74	-1.76	Similar a Pectato liasa
AI894578	Les.218.2.S1_at	0.13	1.54	-1.58	Pectin metilesterasa
Z46675	Les.3747.1.S1_at	-0.58	1.26	-1.13	Extensina Lemmi11
Y11268	Les.3636.1.S1_at	0.67	1.82	-2.35	Endo-1,4- β -D-glucanasa
U82123	Les.191.1.S1_at	-0.37	1.69	-2.17	Expansina LeEXP1

Tabla II: Genes relacionados con el metabolismo de la pared celular y la respuesta defensiva y estrés, regulados positivamente en plantas mutantes *sitiens*, deficientes en ABA, inoculadas con *G. intraradices* y cosechadas a 50dpi. ID: identificación GenBank.

1.2.2 Inducción de genes relacionados con el metabolismo de isoprenoides en plantas de tomate silvestres micorrizadas.

El análisis transcripcional también reveló la regulación positiva de diversos genes relacionados directamente con el metabolismo de isoprenoides solamente en las plantas de tomate de tipo silvestre micorrizadas, sugiriendo la necesidad de una micorrización funcional y correctamente establecida para su expresión. Entre estos, se identificaron los genes codificantes para dos enzimas que catalizan los primeros pasos de la ruta del metileritritol fosfato (MEP) de síntesis de isoprenoides en cloroplastos: 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa 2 (DXS2) (LesAffx.62488.2.S1_at) y 1-desoxi-D-5-

fosfato xilulosa reductoisomerasa (DXR) (Les. 3487.1_at). La vía MEP se produce en los plastídios y da lugar a la síntesis del difosfato de isopentenilo (IPP) y el difosfato de geranilgeranilo (GGDP), a partir de los cuales se deriva la formación de importantes isoprenoides vegetales como carotenoides, apocarotenoides, ABA, estrigolactonas y giberelinas (Figura V).

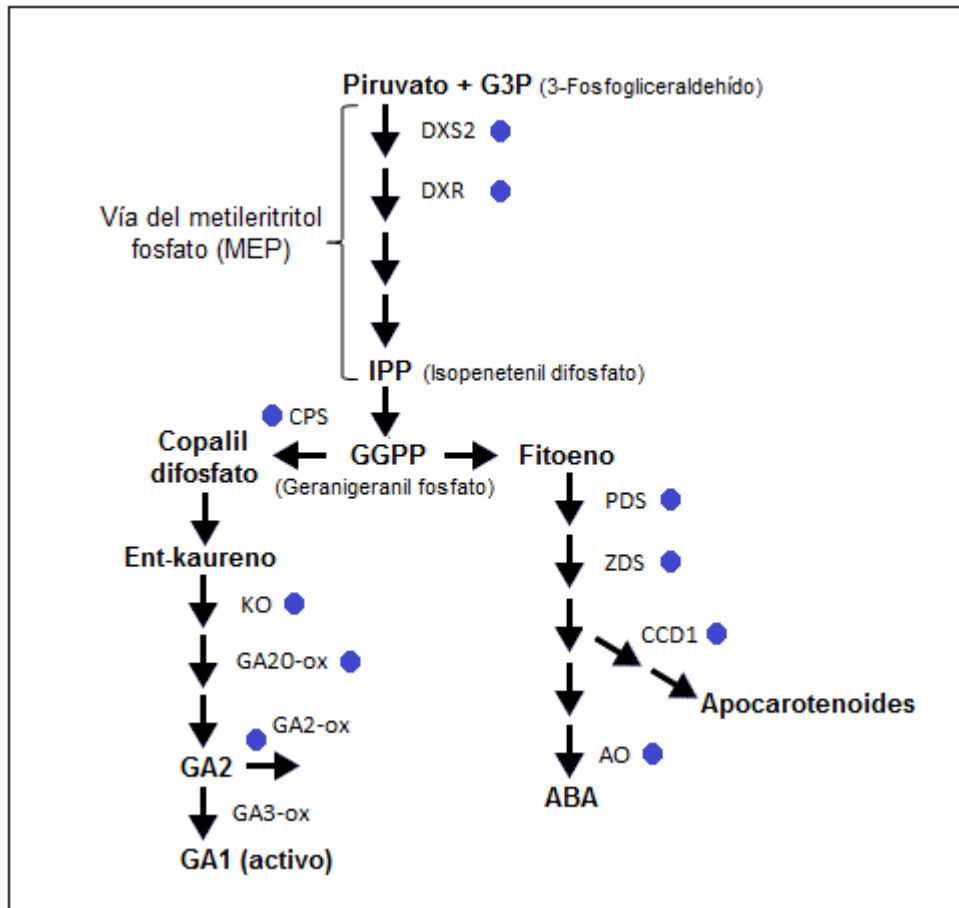


Figura V: Vía de síntesis simplificada de giberilanas (GA), ácido abscísico (ABA) y apocarotenoides. Los puntos azules indican los genes identificados en el análisis transcriptómico, regulados positivamente en raíces de plantas de tomate silvestre inoculadas con *G. intraradices* y cosechadas a 50dpi.

En este sentido, se observó la regulación positiva de varios genes involucrados en el metabolismo de carotenoides y apocarotenoides, incluyendo genes implicados en la síntesis de ABA. La inducción de estos genes fue específica de las raíces de tomate de las plantas silvestres micorrizadas, no observándose en los mutantes *sitiens*, ni en los controles no inoculados. Entre ellos, se identificaron un gen codificante para una fitoeno desaturasa (PDS) (Les.259.2.S1_at), una Z-caroteno desaturasa (ZCD) (Les.20.1.S1_at), una 9,10-9',10'-carotenoide dioxigenasa (CCD1) (Les.5921.1.S1_at), y una xantina deshidrogenasa (AO) (Les.3528.1.S1_at) (Tabla III).

Otro grupo de genes regulados positiva y específicamente en las raíces de tomate de las plantas silvestres micorrizadas encontrados en el análisis transcriptómico se relacionó con el metabolismo de giberelinas. Así, se observó la inducción de genes codificantes para ent-kaureno oxidasa (LesAffx.70667.1.S1_at), giberelina 20-oxidasa (GA20-ox) (Les.64.1.S1_at), giberelina 2- β -dioxigenasa (GA2-ox) (Les.4335.2.S1_at) y giberelina 3- β -dioxigenasa (GA3-ox) (Les.10.1.S1_at). Por otra parte, también se identificó un gen que codifica para una posible copalil difosfato sintasa (CPS) (Les.27.1.S1_at), que cataliza el primer paso en la síntesis de giberelinas a partir del precursor GGDP, regulado positivamente tanto en las raíces de las plantas silvestres como en los mutantes deficientes en ABA, si bien, la inducción de este gen en los mutantes *sitiens* se encontraba cerca del límite de los criterios de selección (valor M 1,06) (Tabla III).

Categoría, ID	ID <i>Affimetrix GeneChip</i>	Expresión (Valor M)			Función molecular
		Rhe I/NI	Sit I/NI	RheI /SitI	
Metabolismo					
BI933750	LesAffx.62488.2.S1_at	3.20	0.68	2.26	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa 2 (DXS2)
AF331705	Les.3487.1.S1_at	1.31	0.58	1.00	1-desoxi-D-5-fosfato xilulosa reductoisomerasa (DXR)
EF650011	Les.259.2.S1_a_at	1.70	0.58	1.12	Fitoeno desaturasa (PDS)
AF195507	Les.20.1.S1_at	1.82	0.49	1.43	Z-caroteno desaturasa (ZCD)
AY576001	Les.5921.1.S1_at	1.49	0.11	1.26	9,10-9',10'-carotenoide dioxigenasa (CCD1)
AF258810	Les.3528.1.S1_at	1.05	0.38	1.00	Xantina deshidrogenasa (AO)
Fitohormonas					
AI899070	LesAffx.70667.1.S1_at	1.88	0.38	1.38	Ent-kaureno oxidasa (KO)
AF049898	Les.64.1.S1_at	1.67	0.14	1.61	Giberelina 20-oxidasa (GA20-ox)
AW931003	Les.4335.2.S1_at	1.08	-0.05	1.00	giberelina 2- β -dioxigenasa (GA2-ox)
AB010991	Les.10.1.S1_at	2.81	0.85	2.26	giberelina 3- β -dioxigenasa (GA3-ox)
AB015675	Les.27.1.S1_at	3.18	1.06	2.36	Copalil difosfato sintasa (CPS)

Tabla III: Genes relacionados con el metabolismo de isoprenoides regulados positivamente en plantas de tomate silvestres inoculadas con *G. intraradices* y cosechadas a 50dpi.

1.3 Activación de genes implicados en el metabolismo de oxilipinas durante la simbiosis micorriza arbuscular.

Un estudio más detallado de los genes expresados diferencialmente en el análisis transcriptómico de las raíces de tomate de plantas silvestres y mutantes *sitiens* micorrizadas reveló la existencia de un grupo de genes regulados positivamente e involucrados en el metabolismo de oxilipinas. Estos genes fueron inducidos tanto en plantas de tipo silvestre como en mutantes *sitiens* colonizadas por *G. intraradices*, sugiriendo que su inducción no requiere una plena y total funcionalidad de la simbiosis micorriza arbuscular.

Entre los genes identificados se incluyen un gen codificante de una omega-6 ácido graso desaturasa (ω -6-DES; Les.5934.1.S1_at), homólogo al gen *FAD2* caracterizado en *Arabidopsis*, que cataliza la introducción de un doble enlace carbono-carbono en el C-12 del ácido oleico (Okuley y col., 1994), formando el ácido linoleico; un gen codificante de una lipoxigenasa (*LOXA*; Les.3668.1.S1_at), responsable de la adición de una molécula de oxígeno en el C-9 del ácido linoleico o linolénico, generando las vía 9-LOX de oxilipinas; y un gen codificante de una aleno óxido sintasa (*LeAOS3*; Les.3986.1.S1-a) que cataliza la conversión del 9-hidroperoxi- α -linolénico (9-HPOT) a 9,10-epoxi-9,11,15-octadecatrienoico (9,10-EOT), en la vía 9-LOX de oxilipinas (figura VI; Tabla IV). Todos estos genes fueron regulados positivamente tanto en plantas silvestres como mutantes *sitiens* micorrizadas respecto a sus controles no inoculados, independientemente del fenotipo de la planta.

Categoría, ID	ID <i>Affimetrix GeneChip</i>	Expresión (Valor M)			Función molecular
		Rhe I/NI	Sit I/NI	RheI /SitI	
Metabolismo					
U09026	Les.3668.1S1_at	2.2	2.8	-2.2	Lipoxigenasa (LOXA)
AF454634	Les.3986.1.S1_at	2.8	2.9	0.0	Aleno oxido sintasa (LeAOS3)
AI895164	Les.5934.1.S1_at	2.6	2.0	-1.2	ω -6-Desaturasa (6-DES)

Tabla IV: Genes implicados en el metabolismo de oxilipinas regulados positivamente en raíces de plantas de tomate silvestres (Rhe) y *sitiens*, deficientes en ABA, inoculadas con *G. intraradices* y cosechadas a 50dpi.

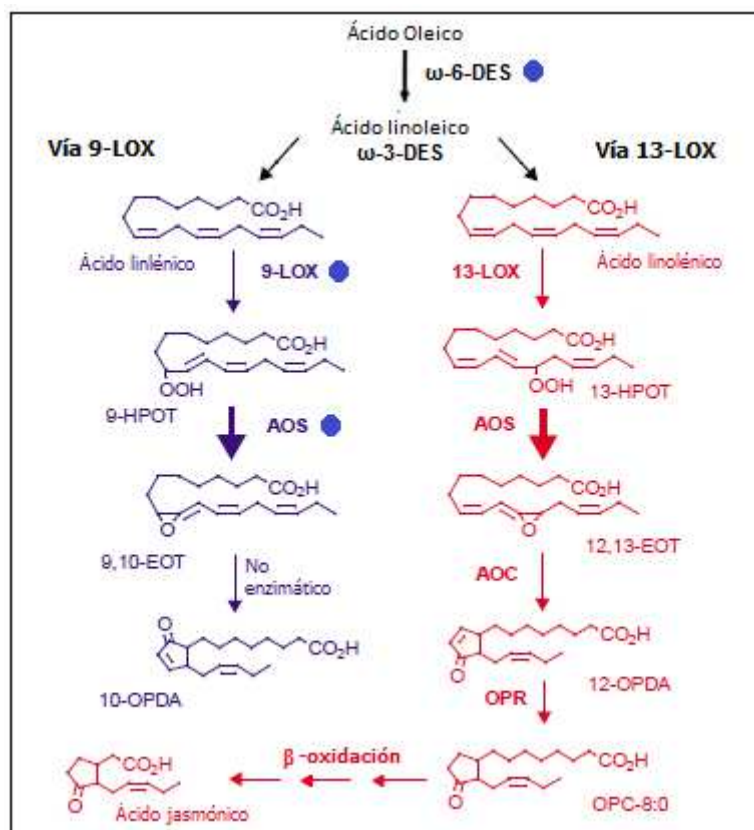


Figura VI: Biosíntesis de las vías 9-LOX y 13-LOX derivadas de la actividad de las enzimas CYP74. Los puntos azules indican los genes identificados en el análisis transcriptómico: *ω-6-DES*, *LOXA* y *LeAOS3*, regulados positivamente tanto en plantas de tipo silvestres como mutantes *sitiens* micorrizadas. Adaptado de Howe y Schilmiller, 2002.

1.4 Análisis mediante qRT-PCR de genes representativos.

Para verificar los resultados obtenidos mediante el estudio transcriptómico de las raíces micorrizadas de plantas de tomate silvestres y mutantes *sitiens*, se llevó a cabo un análisis mediante qRT-PCR de 14 genes seleccionados, representativos de una amplia gama de funciones biológicas y de los tres conjuntos de genes regulados positivamente encontrados en los diferentes fenotipos vegetales: “comunes”, silvestres y mutantes *sitiens*. Las reacciones de qRT-PCR se realizaron con ARN de plantas inoculadas y no inoculadas con *G. intraradices* de los experimentos I y II, utilizando repeticiones biológicas independientes a las usadas para el análisis transcriptómico. Para el análisis comparativo de la expresión observada de dichos genes en el análisis transcriptómico y mediante el uso de la técnica qRT-PCR, se determinó el valor M, calculado como el cociente de la expresión de los genes analizados en plantas micorrizadas respecto a la

expresión de dichos genes en plantas control no micorrizadas para cada genotipo (Rhe I/NI y Sit I/NI). Además, se determinó la relación entre la expresión de los genes seleccionados entre las plantas de tipo silvestre y mutantes *sitiens* micorrizadas, calculada como valor M (Rhe I/Sit I; Tabla V). El análisis comparativo demostró una amplia correlación entre los datos obtenidos mediante el análisis de microarrays y el análisis con qRT-PCR, observándose el mismo patrón de expresión para todos los genes “comunes” analizados, tanto en plantas de tomate silvestres como en mutantes *sitiens*. En cuanto a los genes regulados específicamente en plantas de tipo silvestre, el análisis mediante qRT-PCR mostró una inducción, no detectada en el análisis transcriptómico, de dichos genes en los mutantes *sitiens*. De forma similar, mediante el uso de la técnica de qRT-PCR, se observó una regulación diferencial de la expresión de los genes regulados específicamente en los mutantes *sitiens* también en plantas de tipo silvestre, si bien, esta inducción/represión se encontraba en la mayoría de los casos cerca del límite de los criterios de selección (valor M de 1 ó -1) (Tabla V).

Genes seleccionados		Análisis microarrays			Análisis qRT-PCR		
ID <i>Affimetrix</i> <i>GeneChip</i>	Anotación putativa	Rhe I/NI	Sit I/NI	RheI /SitI	RheI/NI	SitI/NI	RheI/SitI
Comunes							
Les.3668.1S1_at	Lipoxigenasa	2.2	2.8	-2.2	2.3±0.1	3.2±0.2	-1.0±0.06
Les.3986.1.S1_at	Aleno oxido sintasa	2.8	2.9	0.0	4.5±0.2	4.4±0.3	2.0±0.1
Les.5934.1.S1_at	ω-6-Desaturasa	2.6	2.0	-1.2	1.3±0.09	1.8±0.1	-1.0±0.08
Les.5764.1S.1_at	Proteasa	4.5	2.0	2.6	5.4±0.4	3.7±0.3	2.7±0.2
Les.51.1.S1_at	RNAsa	4.5	1.6	3.2	6.3±0.03	2.1±0.1	3.2±0.1
LesAffx.28554.1.S1_at	α-β-Hidrolasa	7.0	2.8	3.1	9.5±0.2	5.4±0.1	4.1±0.2
Les.3981.1S1_at	Glucosiltransferasa	6.7	2.2	4.5	7.6±0.05	2.2±0.3	6.3±0.1
Silvestres							
Les.2985.1.A1_at	Oxidoreductasa	4.0	0.0	3.3	9.3±0.1	2.0±0.1	6.1±0.1
Les.259.2.S1-a-at	Fitoeno desaturasa	1.5	0.0	1.0	1.5±0.05	1.2±0.1	0.9±0.1
Les.10.1S1_at	Giberelina 3-β-dioxigenasa	2.7	0.0	2.0	4.9±0.05	2.4±0.1	2.0±0.1
Sitiens							
LesAffx.39466.1S1_at	Peroxidasa	0.0	2.3	-1.5	1.1±0.1	3.2±0.2	-1.0±0.05
Les.513. S1_at	Subtilisina	0.0	3.5	-2.4	0.9±0.08	2.5±0.1	-1.7±0.09
Les.122. S1_at	Endo-Quitinasa	0.0	1.7	-2.3	-1.1±0.07	1.0±0.1	-3.1±0.1
LesAffx.5130.1S1_at	B-Expansina	0.0	2.7	-2.7	-0.7±0.02	6.1±0.2	-6.6±0.03

Tabla V: Análisis comparativo de los datos obtenidos mediante microarrays y qRT-PCR de plantas de tometes silvestres (Rhe) y mutantes *sitiens* (Sit) micorrizadas, cosechadas a 50dpi e inoculadas con *G. intraradices*. El valor M (referido a log₂ del cociente RheI/NI, Sit I/NI y Rhe I/Sit I) es 0 si no hay cambios en la expresión y +1 ó -1 si hay una inducción o represión doble, respectivamente. Los datos del valor M obtenidos mediante qRT-PCR son medias de dos repeticiones biológicas y tres repeticiones técnicas ± error estándar.

1.5 Análisis de respuesta a tratamientos con fitohormonas de genes representativos.

Diversos estudios han demostrado que el desarrollo y funcionalidad de la simbiosis micorriza arbuscular y, en especial, de los arbusculos, están relacionados con la vía de síntesis de diferentes hormonas vegetales, principalmente ABA (Herrera-Medina y col., 2007) y JA (Isayenkov y col., 2005). En este sentido, se decidió realizar un experimento de tratamiento hormonal sobre plántulas de tomate de la variedad silvestre Rheinlands rhum (Rhe) para determinar la capacidad de respuesta de los genes seleccionados en el análisis transcriptómico, representativos de las diferentes funciones biológicas y de los tres conjuntos de genes regulados positivamente en los distintos fenotipos vegetales: “comunes”, silvestres y mutantes *sitiens* (tabla V). Para ello, se realizaron aplicaciones exógenas de ABA y etileno, debido a los cambios endógenos detectados en las raíces de los mutantes *sitiens* respecto a plantas de tipo silvestre para estas fitohormonas (figura II). Además, se incluyó un tratamiento con MeJA por la importancia que se ha determinado que posee la vía de señalización de los jasmonatos durante la micorrización en varias especies vegetales (Hause y col., 2007). Las plántulas fueron tratadas con las distintas soluciones hormonales y se extrajo el ARN de las raíces de las mismas después de 12 y 24h tras el tratamiento. Los experimentos fueron diseñados sólo para mostrar la capacidad de los genes seleccionados para responder a la aplicación exógena de estas fitohormonas, no para determinar el modo exacto de su regulación, que puede estar influenciado por diversos aspectos de fisiológicos y de desarrollo en las diferentes etapas de la formación de la simbiosis micorriza arbuscular.

El tratamiento con ABA provocó una regulación positiva de la expresión del gen codificante de la β -expansin (β -Exp) seis veces superior a la observada en el control (Valor M de 2,7) 24h después del mismo (figura VII, gráfica A). En cuanto al tratamiento con etileno, cuatro de los catorce genes analizados mostraron una regulación positiva de entre tres y diecisiete veces superior a la detectada en el control sin tratar. De ellos, dos se encontraron regulados positivamente tanto en plantas silvestres como en mutantes *sitiens* micorrizados en el análisis transcriptómico (*LeAOS3* y α,β -hidrolasa) y su inducción se mantuvo en los dos tiempos de cosecha realizados, mientras que los otros dos genes, *Endo-Q* y β -Exp, tan solo se hallaron regulados positivamente en los mutantes *sitiens*, deficientes en ABA (figura VII, gráfica B).

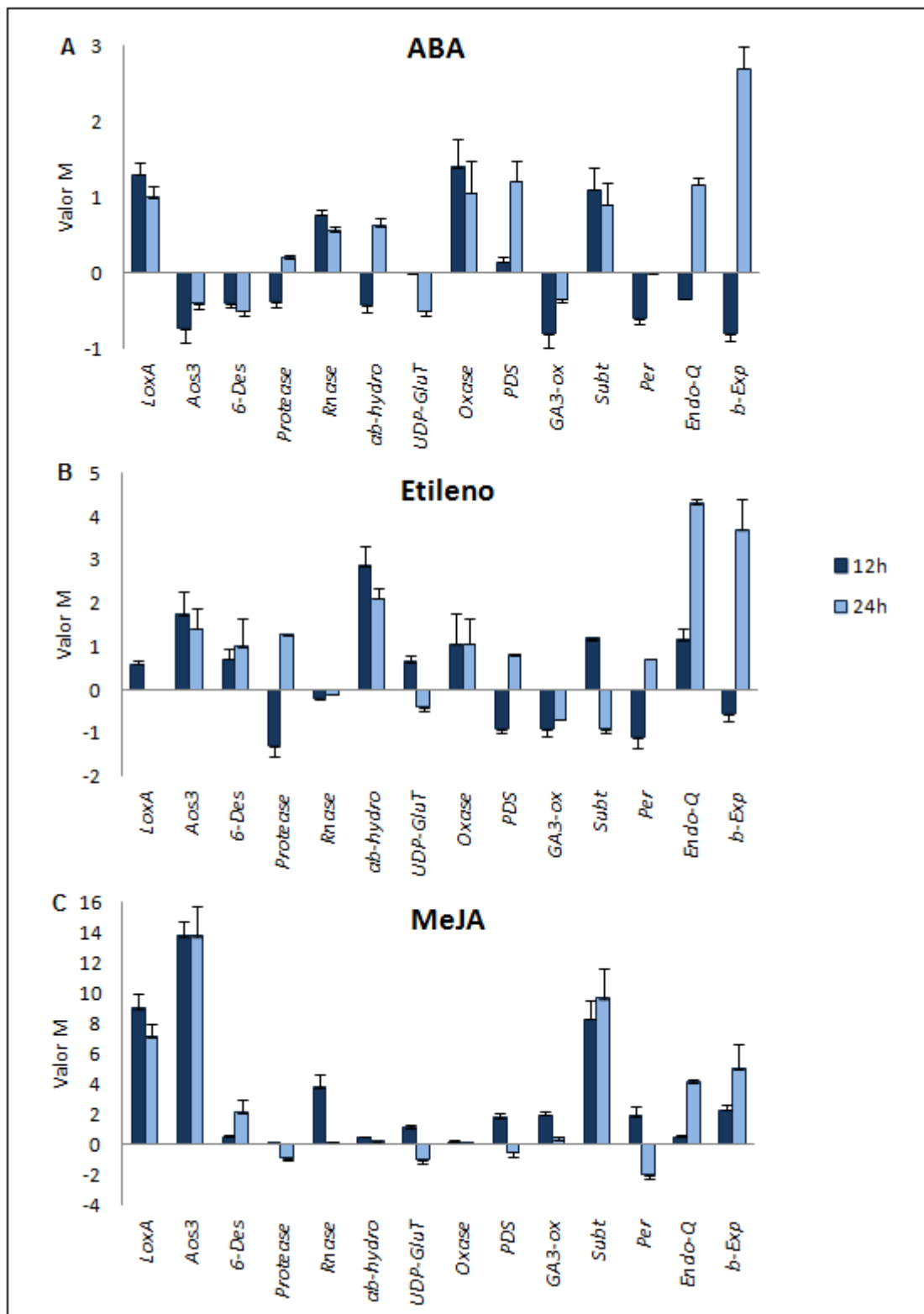


Figura VII: Análisis de expresión génica de genes representativos del estudio transcriptómico en respuesta a tratamientos hormonales en plantas de tomate silvestres (Rheinlands rhum): ABA (**gráfica A**), etileno (**gráfica B**) y MeJA (**gráfica C**) a 12 y 24h tras la aplicación. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

El tratamiento con MeJA produjo una inducción importante, de hasta ocho mil veces (valor M de 14), en dos de los genes involucrados en el metabolismo de oxilipinas (*LOXA* y *LeAOS3*), los cuales se encontraron regulados positivamente tanto en plantas silvestres como en los mutantes *sitiens* inoculados en el análisis transcriptómico, y del gen de la *subtilisin-PI-19* inducido tan solo en mutantes *sitiens* micorrizados. Además, el tratamiento con MeJA provocó una expresión moderada y transitoria del gen de *RNAse*, inducido en ambos genotipos de plantas micorrizadas utilizados. Por otra parte, también se observó una inducción tardía de los genes de *Endo-Q* y *β -Exp*, expresados diferencialmente tan solo en mutantes *sitiens* y sensibles al tratamiento con etileno (figura VII, gráfica C).

1.6 Análisis de la expresión génica de los genes implicados en el metabolismo de oxilipinas en diferentes etapas del desarrollo de la simbiosis micorriza arbuscular.

Identificados y seleccionados los genes involucrados en el metabolismo de oxilipinas, *ω 6-DES*, *LOXA* y *LeAOS3*, mediante análisis transcriptómico y verificados dichos resultados mediante qRT-PCR, se procedió a realizar un estudio más exhaustivo del comportamiento de los mismos durante el desarrollo de la simbiosis micorriza arbuscular. Para ello, se llevó a cabo un análisis del patrón de expresión de los mismos en raíces de plantas de tomate de tipo silvestre y mutantes *sitiens*, deficientes en la síntesis de ABA, cosechadas a 37 y 56 días después de la inoculación con *G. intrarradices*.

Los parámetros de micorrización analizados fueron: porcentaje de raíz micorrizada, frecuencia de micorrización (F%), intensidad de micorrización (M%) e intensidad de arbusculos en la zona colonizada (a%). Debido al fenotipo propio de los mutantes *sitiens*, tanto el peso fresco de la parte aérea como el de la raíz fue inferior al de las plantas silvestres a lo largo de todo el ensayo (figura VIII, gráficas A y B). Como era de esperar, el análisis de los parámetros de micorrización mostró una menor susceptibilidad de las plantas *sitiens*, deficientes en la síntesis de ABA, a la micorrización en comparación con las plantas de tipo silvestre. En este sentido, el porcentaje de longitud de raíz micorrizada fue de 7,5 y 9,8% en *sitiens* y plantas de tipo

silvestre, respectivamente, a los 37 dpi y de 24% (*sitiens*) y 48% (silvestres) a los 56 días después de la inoculación con *G. intrarradices* (figura VIII, gráfica C). La frecuencia de micorrización alcanzó valores próximos al 90% a los 56dpi en las plantas silvestres, siendo la intensidad de micorrización para ese tiempo de cosecha de un 32% y la intensidad arbuscular de un 38% (figura VIII, gráficas D, E y F). Por su parte, la frecuencia de micorrización en los mutantes *sitiens* apenas se alcanzó un 65% a los 56dpi, con valores de intensidad de micorrización e intensidad arbuscular de 9,9 y 18% respectivamente (figura VIII, gráficas D, E y F).

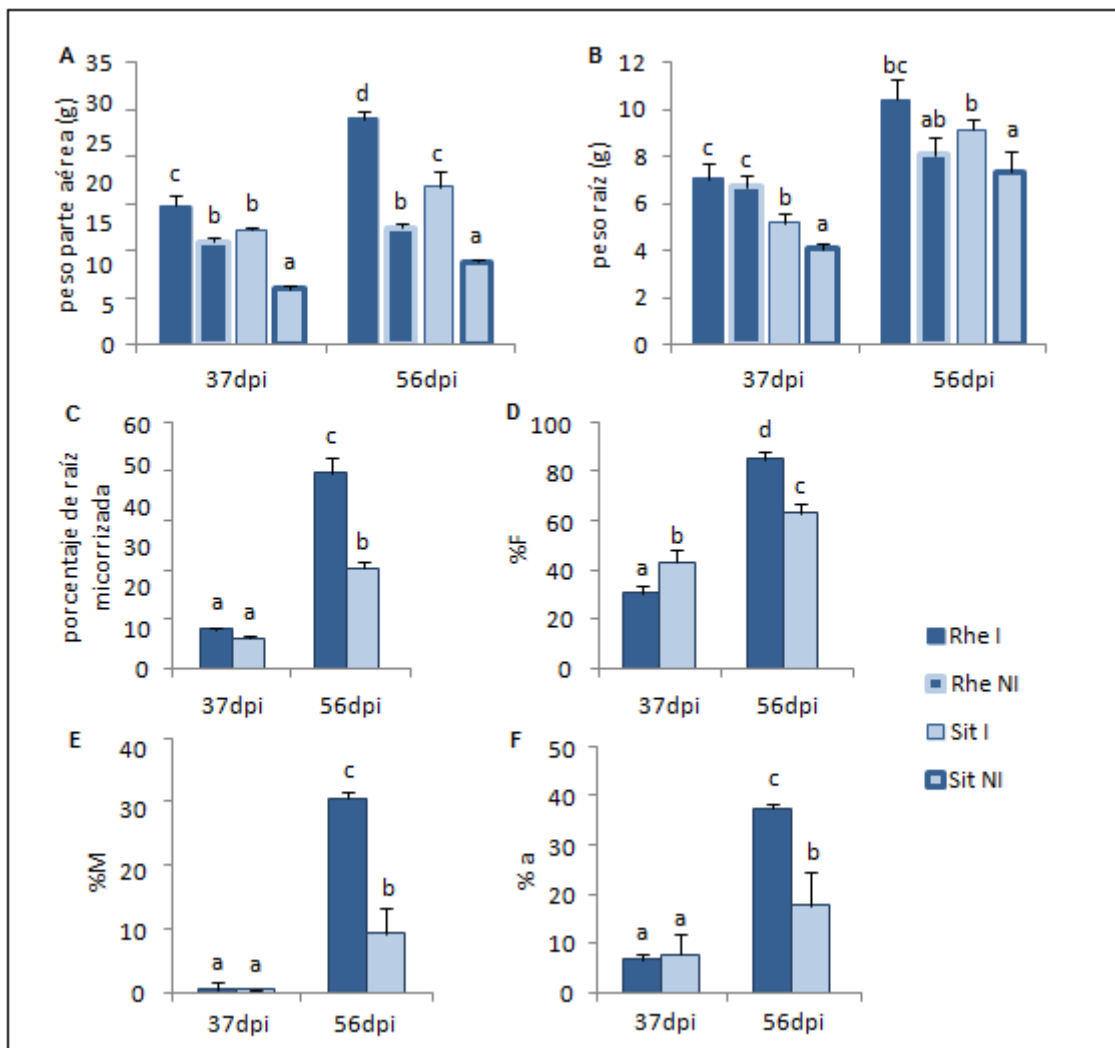


Figura VIII: Parámetros de micorrización de plantas de tomate de tipo silvestre y mutantes *sitiens*, inoculadas con *G. intrarradices* y cosechadas a 37 y 56dpi. **Gráfica A:** Peso fresco de parte aérea. **Gráfica B:** Peso fresco de la raíz. **Gráfica C:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica D:** Frecuencia de micorrización (F%). **Gráfica E:** Intensidad de micorrización (M%). **Gráfica F:** Intensidad de arbusculos en la zona colonizada. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas más/menos el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

El análisis del patrón de expresión de los genes relacionados con la síntesis de oxilipinas identificados en el análisis transcriptómico, *ω6-DES*, *LOXA* y *LeAOS3*, mostró un comportamiento similar para todos ellos durante las diferentes etapas del desarrollo de la micorrización arbuscular. Como gen de referencia para el cálculo de la expresión génica, formulada como valor M, se usó el gen constitutivo *EFa1* de tomate. Para el cálculo del valor M se utilizó el cociente de la expresión de cada uno de los genes analizados en plantas micorrizadas respecto a la expresión de dichos genes en plantas control no micorrizadas para cada tiempo de cosecha. Tanto en las plantas de tomate de tipo silvestre como en los mutantes *sitiens*, deficientes en ABA, la expresión de los tres genes seleccionados fue inferior en las raíces de las plantas micorrizadas respecto a las no inoculadas con *G. intrarradices* para el primer tiempo de cosecha (figura IX, gráficas A, B y C).

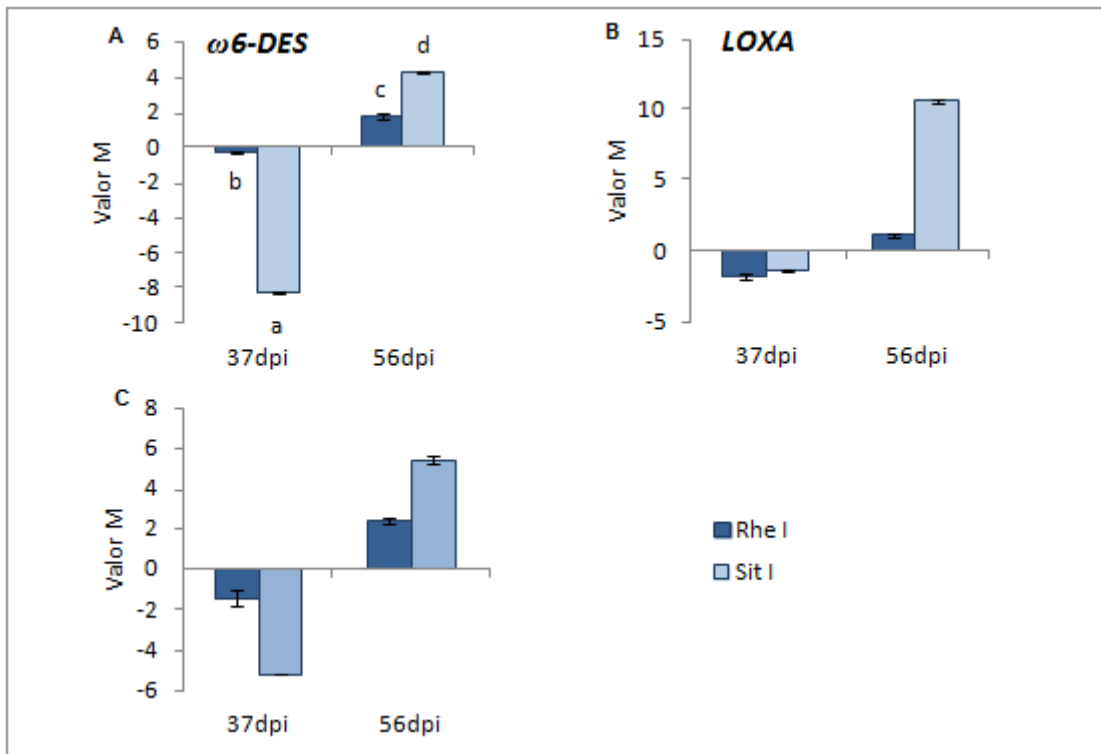


Figura IX: Análisis de expresión génica de los genes *ω6-DES*, *LOXA* y *LeAOS3* en plantas de tomate de tipo silvestre y mutantes *sitiens*, deficientes en la síntesis de ABA, inoculadas con *G. intrarradices*, cosechadas a 37 y 56 dpi. **Gráfica A:** Análisis de expresión del gen *ω6-DES* mediante qRT-PCR. **Gráfica B:** Análisis de expresión del gen *LOXA* mediante qRT-PCR. **Gráfica C:** Análisis de expresión del gen *LeAOS3* mediante qRT-PCR. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas más/menos el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

No obstante, la expresión de todos ellos, *ω6-DES*, *LOXA* y *LeAOS3*, aumentó desde los 37 a los 56 dpi con respecto a los niveles de expresión de las plantas control no inoculadas en ambos fenotipos, si bien, en las plantas de tipo silvestre la inducción de los mismos fue inferior en todos los genes a la observada en los mutantes *sitiens* (figura IX, gráficas A, B y C).

Los resultados obtenidos en este ensayo para el segundo tiempo de cosecha, en el cual los mutantes *sitiens* presentan un grado de inducción superior al de las plantas de tipo silvestre, difieren con los datos observados a partir de los tres experimentos utilizados para el análisis transcriptómico, en el que la expresión de los tres genes seleccionados, *ω6-DES*, *LOXA* y *LeAOS3*, fue similar en plantas de tipo silvestres y *sitiens*, deficientes en ABA. Para resolver esta discrepancia, se cuantificó el nivel de expresión del gen *LeAOS3* en raíces de plantas silvestres y mutantes *sitiens* de los tres experimentos utilizados para el análisis de microarrays (figura VIII, gráfica D).

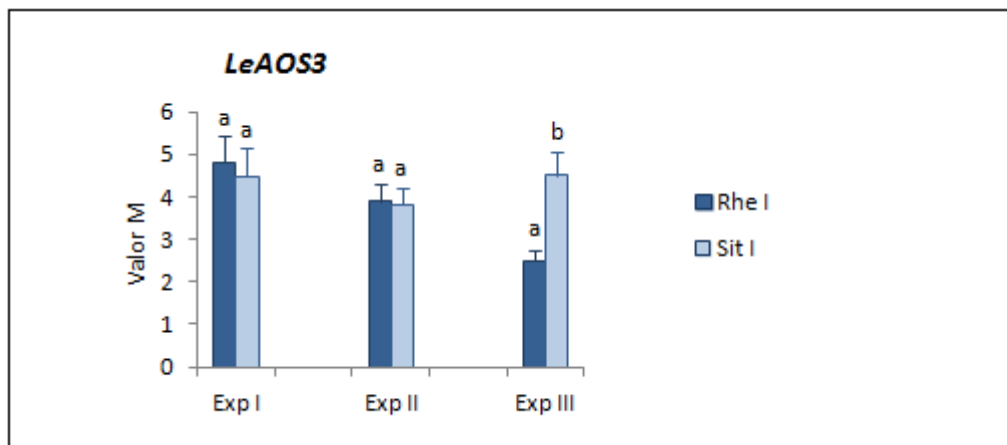


Figura X: Expresión génica mediante qRT-PCR del gen *LeAOS3* en plantas de tomate silvestres y mutantes *sitiens*, deficientes en ABA, cosechadas a 50 días después de la inoculación con *G. intraradices*. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas más/menos el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

El estudio comparativo del patrón de expresión génica de *LeAOS3* mostró, en todos los casos, un aumento de la expresión de dicho gen en plantas micorrizadas en comparación con las no micorrizadas, observándose tan solo una menor inducción de *LeAOS3* en las raíces de las plantas de tipo silvestre respecto a los mutantes *sitiens* para el “experimento III”. Por otra parte, las plantas silvestres del “experimento III” mostraron un menor porcentaje de micorrización y formación arbuscular, así como una menor acumulación de transcritos de *LePT4*, que las plantas silvestres de los

“experimentos I y II”, siendo esta una posible causa del menor nivel de inducción del gen *LeAOS3* en el “experimento III” (figura I, gráficas C, F y G). Estos resultados apoyan los datos obtenidos mediante el análisis transcriptómico, validado por qRT-PCR, ya que representan el promedio de los tres experimentos realizados y, por tanto, se acerca más a lo observado en el mismo.

2. PARTICIPACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN EL METABOLISMO 9-LOX DE OXILIPINAS DURANTE EL PROCESO DE MICORRIZACIÓN

Las oxilipinas son un grupo de compuestos biológicamente activos, derivado del metabolismo oxidativo de los ácidos grasos poli-insaturados, que realizan una gran variedad de funciones durante el desarrollo y en la respuesta de las plantas frente a condiciones de estrés (Howe y Schilmiller, 2002). Se generan por la acción coordinada de lipoxigenasas y un grupo de citocromos P450 (CYP74) especializados en el metabolismo de los hidroperóxidos de ácidos grasos, dando lugar a dos vías específicas, 9-LOX y 13-LOX, derivadas de la inserción de un átomo de oxígeno en el carbono 9 ó 13 del ácido linolénico. Se ha propuesto una función defensiva de la vía 9-LOX frente a patógenos en raíces (Blée, 2002; Vellosillo y col., 2007; Mosblech y col., 2009), por tanto, es posible pensar que la activación de la vía 9-LOX sea parte de la estrategia de la planta para controlar el desarrollo de hongos AM dentro de las raíces de la misma. En este sentido, el análisis transcriptómico realizado con raíces micorrizadas de plantas de tomate de tipo silvestre y mutantes *sitiens* deficientes en ABA (resultados, capítulo 1), ha revelado la importancia de estos genes durante el desarrollo de la simbiosis micorriza arbuscular.

Uno de los objetivos de esta tesis doctoral ha sido aportar nuevos conocimientos acerca de la posible participación de genes involucrados en el metabolismo 9-LOX de oxilipinas durante el proceso de micorrización. Para ello, se estudió el patrón de expresión de dichos genes durante diferentes estadios del desarrollo de la simbiosis, tanto en plantas silvestres como en plantas mutantes alteradas en la síntesis y en la percepción de ácido jasmónico, así como el posible efecto sistémico inducido por el proceso de micorrización en la expresión de estos genes. Además, se realizó un análisis de la respuesta a tratamientos hormonales de los genes involucrados en el metabolismo 9-LOX con el objeto de esclarecer la capacidad de inducción de dichos genes por diferentes fitohormonas.

2.1 Análisis del patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 9-LOX durante el proceso de formación de Micorriza Arbuscular en plantas de tomate.

Para determinar la posible participación de genes involucrados en el metabolismo 9-LOX durante el proceso de micorrización se realizó un estudio de la expresión de dichos genes durante diferentes fases del desarrollo de la simbiosis en plantas de tomate silvestres de la variedad Ailsa Craig inoculadas con *G. intraradices*. De este modo, se siguió la evolución de la micorrización durante tres cosechas: 36, 50 y 65 días posteriores a la inoculación (dpi) y se analizó la expresión de genes involucrados en el metabolismo 9-LOX para esos mismos tiempos. Los genes seleccionados para determinar esta posible participación en el proceso de micorrización fueron: *LOXA*, codificante de una lipoxigenasa responsable de la adición de una molécula de oxígeno en el C-9 del ácido linoleico o linolénico, generando las vía 9-LOX de oxilipinas; *LeAOS3*, codificante de una aleno óxido sintasa que cataliza la conversión del 9-HPOT a 9,10-EOT en la vía 9-LOX; y *LeDES*, que codifica para una divinil éter sintasa que cataliza el paso de 9-HPOT a ácido colneleico o colnelénico. Los dos primeros genes fueron seleccionados a partir del análisis del perfil transcriptómico asociado al proceso de micorrización en plantas de tomate descrito en el capítulo anterior (Capítulo 1 de resultados), ya que dicho análisis reveló una inducción significativa de estos genes durante el establecimiento de la simbiosis. Por otra parte, varios estudios han demostrado la existencia de una inducción de la expresión del gen codificante de para la enzima LeDES, así como un incremento de los ácidos colneleico y colnelénico derivados de dicha actividad enzimática en respuesta a diversos patógenos y elicitores (Stumpe y col., 2001; Mosblech y col., 2009), sugiriendo un papel en la respuesta defensiva de la planta para esta enzima. En este sentido, no es difícil pensar que *LeDES* pueda tener un papel importante en la regulación del proceso de micorrización, siendo interesante su estudio. En cuanto al gen *ω-6-Des*, también involucrado en el metabolismo de oxilipinas e identificado en el análisis transcriptómico como un gen regulado positivamente durante el proceso de micorrización, la actividad enzimática asociada a éste se encuentra aguas arriba del inicio de la vía 9-LOX, pudiendo influir tanto en el patrón de expresión de la vía 9-LOX como 13-LOX durante el proceso de micorrización. Por esta razón, y para focalizar el estudio solo en aquellos

genes directamente involucrados en la vía de síntesis 9-LOX de oxilipinas, se decidió no incluir el gen *ω-6-Des* en este análisis de expresión.

Los parámetros de micorrización analizados fueron: porcentaje de raíz micorrizada, frecuencia de micorrización (F%), intensidad de micorrización (M%), intensidad de arbusculos en la zona colonizada (a%) y porcentaje de actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%). Las plantas inoculadas mostraron una dinámica de colonización típica, observándose un aumento en el tiempo de todos los parámetros de micorrización analizados (figura I).

El porcentaje de raíz micorrizada osciló del 10% a los 36 dpi hasta el 56% a los 65 dpi (figura I, gráfica A). La frecuencia de micorrización alcanzó valores próximos al 100% a los 65 dpi, siendo la intensidad de micorrización cercana al 45% para ese mismo tiempo (figura I, gráficas B y C). La intensidad arbuscular en la zona colonizada presentó valores muy similares a la intensidad de micorrización oscilando entre el 7% a los 36 dpi y el 38% a los 65dpi (gráfica D). También se cuantificó la eficiencia de la micorrización por medio de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%), localizada principalmente en los arbusculos, mostrando valores cercanos al 25% a los 50dpi y al 45% para el último tiempo de cosecha (figura I, gráfica E). El peso fresco de la parte aérea tanto en plantas inoculadas como no inoculadas no presentó diferencias significativas. En el caso del peso fresco de raíz, para el último tiempo de cosecha, se observó un aumento del mismo en las plantas control respecto a las micorrizadas (figura I, gráficas F y G).

Por otro lado, también se realizó un análisis de la colonización fúngica mediante la medida de expresión de los genes *GinEF*, para la cuantificación del grado de colonización fúngica, y *GinGS*, para la determinación de la eficiencia de micorrización. (figura II, gráficas A y B). Como gen de referencia para el cálculo de la expresión génica, formulada como valor M, se usó el gen constitutivo *EFa1* de tomate. Para el cálculo del valor M se utilizó el cociente de la expresión de los genes *GinEF* y *GinGS* en cada tiempo de cosecha respecto de la expresión de dichos genes en el primer tiempo de cosecha (36 dpi), de ahí que la expresión de dichos genes a 36 dpi tenga un valor M=0. El análisis mostró una clara correlación entre el nivel de expresión de *GinEF* y *GinGS* y los datos obtenidos mediante las determinaciones histoquímicas, observándose un aumento de la expresión de ambos genes en el tiempo (figura II, gráficas A y B).

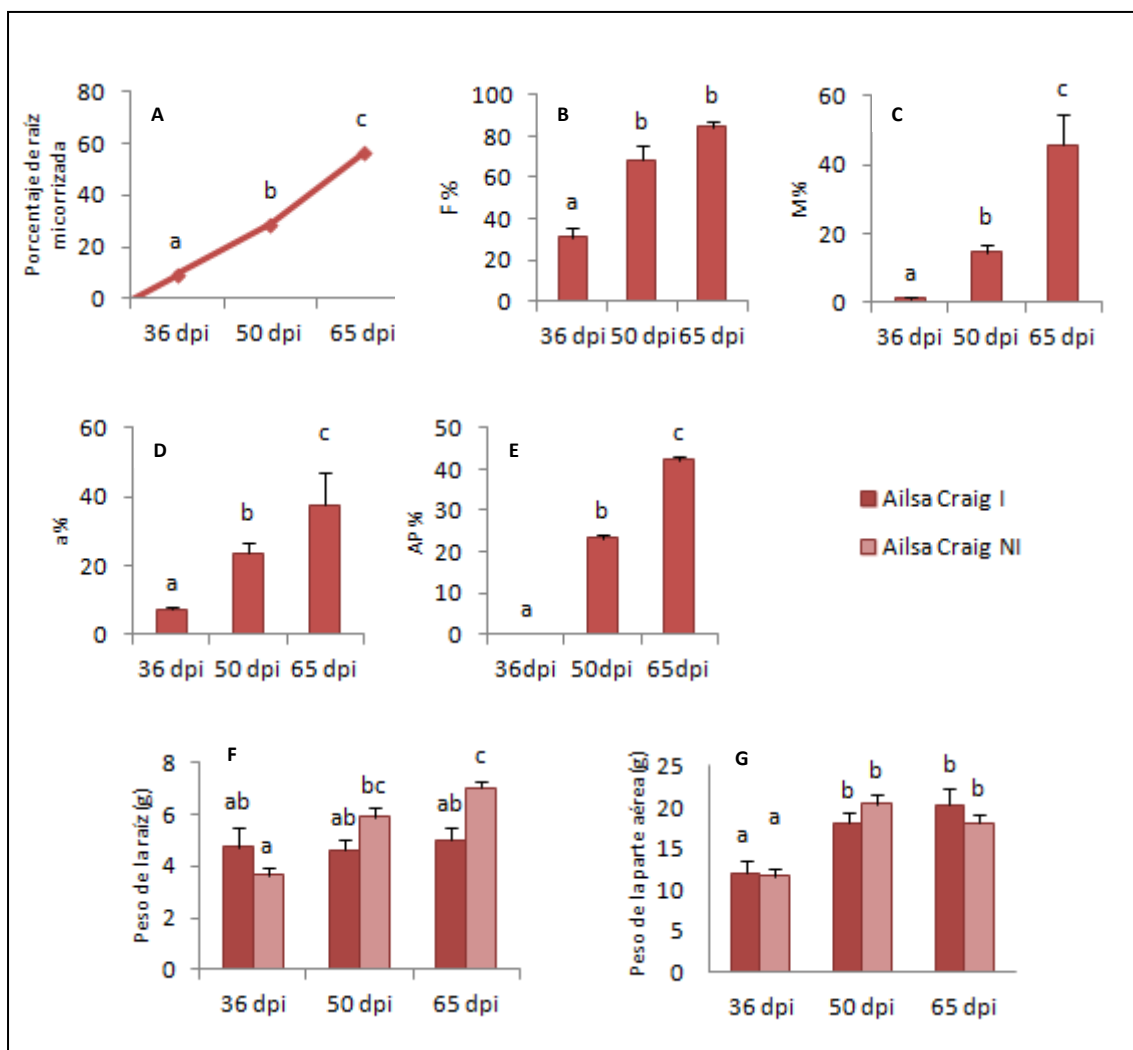


Figura I: Parámetros de micorrización de plantas de tomate silvestres de la variedad Ailsa Craig inoculadas con *G. intraradices*, cosechadas a 36, 50 y 65dpi. **Gráfica A:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica B:** Frecuencia de micorrización (F%). **Gráfica C:** Intensidad de micorrización (M%). **Gráfica D:** Intensidad de arbusculos en la zona colonizada. **Gráfica E:** Porcentaje de actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%). **Gráfica F:** Peso fresco de la raíz. **Gráfica G:** Peso fresco de la parte aérea. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

El patrón de expresión de los genes involucrados en el metabolismo 9-LOX: *LOXA*, *LeAOS3* y *LeDES*, se realizó mediante qRT-PCR usando como gen de referencia para la cuantificación de su expresión, formulada como valor M, el gen constitutivo *EFa1* de tomate. Para el cálculo del valor M se utilizó el cociente de la expresión de los genes analizados en plantas micorrizadas respecto a la expresión de dichos genes en plantas control no micorrizadas para cada tiempo de cosecha. Así, la expresión del gen *LOXA* para el primer tiempo de cosecha fue inferior en las plantas micorrizadas respecto a las plantas control, observándose una inducción posterior a los 50dpi y 65dpi (figura

II, gráfica C). El análisis de la expresión del gen *LeAOS3* mostró un patrón similar al del gen *LOXA*, de este modo, se vio una menor expresión en las plantas inoculadas respecto de su control no micorrizado a los 36dpi, produciéndose posteriormente un aumento de la expresión para el último tiempo de cosecha (figura II, gráfica D). En cuanto al patrón de expresión del gen *LeDES*, se observó también una menor expresión a los 36dpi en las planta no micorrizadas que, al contrario que en *LOXA* y *LeAOS3*, se mantuvo durante todo el tiempo del experimento, a excepción de los 65 dpi, donde no hubo diferencias relevantes (figura II, gráfica E).

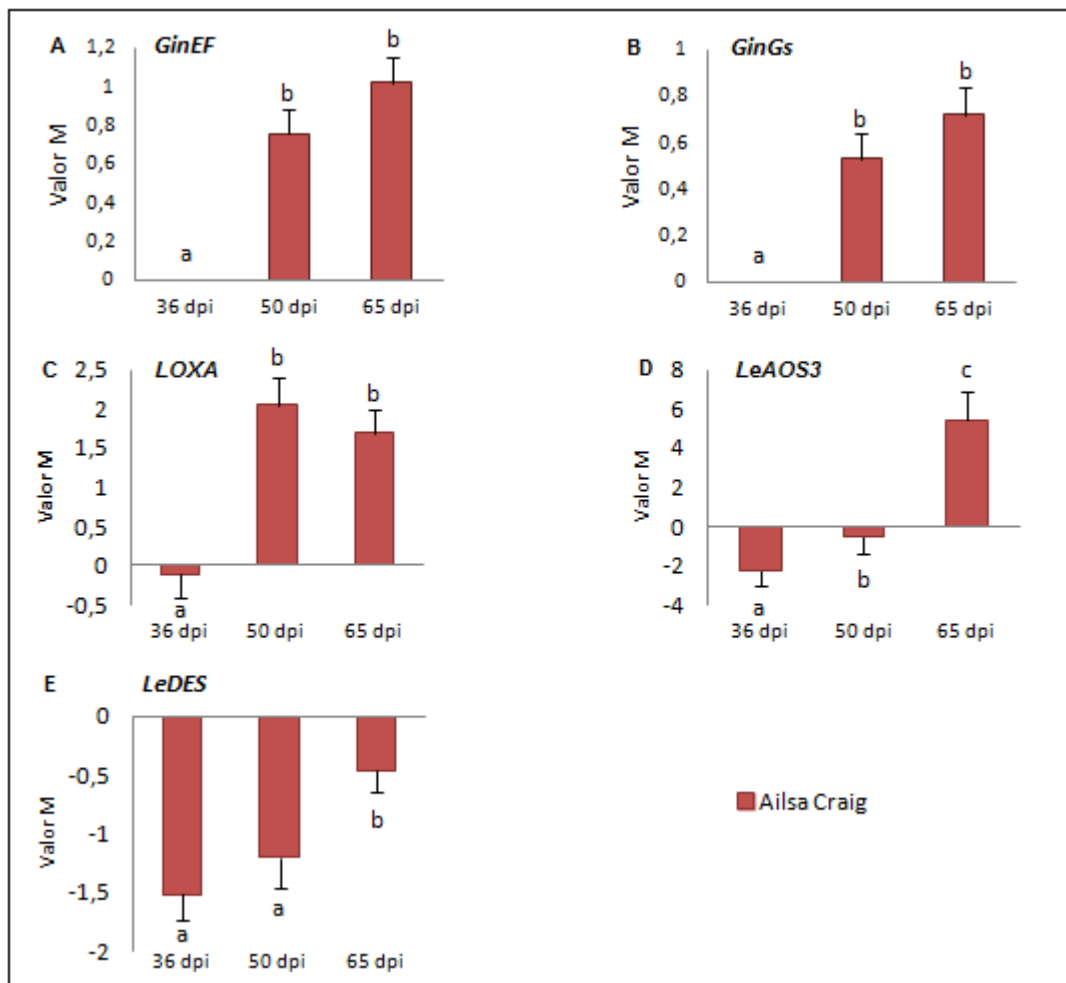


Figura II: Análisis de expresión de genes involucrados en el metabolismo 9-LOX en plantas de tomate silvestres de la variedad Ailsa Craig inoculadas con *G. intraradices*, cosechadas a 36, 50 y 65dpi. **Gráfica A:** Análisis de expresión del gen *GinEF* mediante qRT-PCR. **Gráfica B:** Análisis de expresión del gen *GinGs* mediante qRT-PCR. **Gráfica C:** Análisis de expresión del gen *LOXA* mediante qRT-PCR. **Gráfica D:** Análisis de expresión del gen *LeAOS3* mediante qRT-PCR. **Gráfica E:** Análisis de expresión del gen *LeDES* mediante qRT-PCR. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

2.2 Análisis del posible efecto sistémico sobre la expresión de genes involucrados en el metabolismo 9-LOX debido a la formación de Micorriza Arbuscular en plantas de tomate.

Para determinar el posible efecto sistémico en la expresión de genes involucrados en el metabolismo 9-LOX producido por el proceso de micorrización se utilizó un sistema de cultivo de plantas de tomate de la variedad Moneymarker con raíces compartimentalizadas. De este modo, se diseñó un experimento con dos tipos de plantas con sus raíces compartimentalizadas, plantas micorrizadas y no micorrizadas. Dentro de las plantas micorrizadas, tan solo uno de los compartimentos del sistema se inoculó con el hongo *G. intraradices*. Los parámetros de micorrización analizados fueron los siguientes: porcentaje de raíz micorrizada, frecuencia de micorrización (F%), intensidad de micorrización (M%) e intensidad de arbusculos en la zona colonizada (a%), así como también se realizó un análisis de expresión de genes involucrados en el metabolismo 9-LOX (*LOXA*, *LeAOS3* y *LeDES*) y genes marcadores de la micorrización (*GinEF*; *GinGS*) tanto en el compartimento inoculado como en el no inoculado, estudiando así el efecto sistémico del proceso de micorrización sobre la expresión de dichos genes. Como control se utilizaron plantas de tomate silvestres con raíces compartimentalizadas en las que ninguno de los dos compartimentos fue micorrizado.

El análisis de los parámetros de micorrización, realizado en tres cosechas: 40dpi, 54dpi y 75dpi, mostró una dinámica de colonización típica en las plantas micorrizadas. El porcentaje de raíz micorrizada presentó valores entre un 12% a los 40dpi y un 53% a los 75dpi (figura III, gráfica B). La frecuencia alcanzó valores cercanos al 100% a los 54dpi (figura III, gráfica C), siendo la intensidad de micorrización del 7% a los 40dpi, del 35% a los 54dpi y del 48% para el último tiempo de cosecha (figura III, gráfica D). La intensidad de arbusculos en la zona colonizada, indicador indirecto de la eficiencia de la micorrización, mostró valores cercanos al 60% para el último tiempo de cosecha, presentando ya valores altos (54%) a los 54dpi (figura III, gráfica E). En cuanto al peso fresco de la parte aérea, no se encontraron diferencias significativas entre plantas inoculadas y no inoculadas a lo largo de todo el experimento (figura III, gráfica F). El peso fresco de la raíz mostró tendencia a incrementarse en los compartimentos no

micorrizados, tanto en las plantas micorrizadas como en las plantas control, sobre todo en el último tiempo de cosecha (figura III, gráfica G).

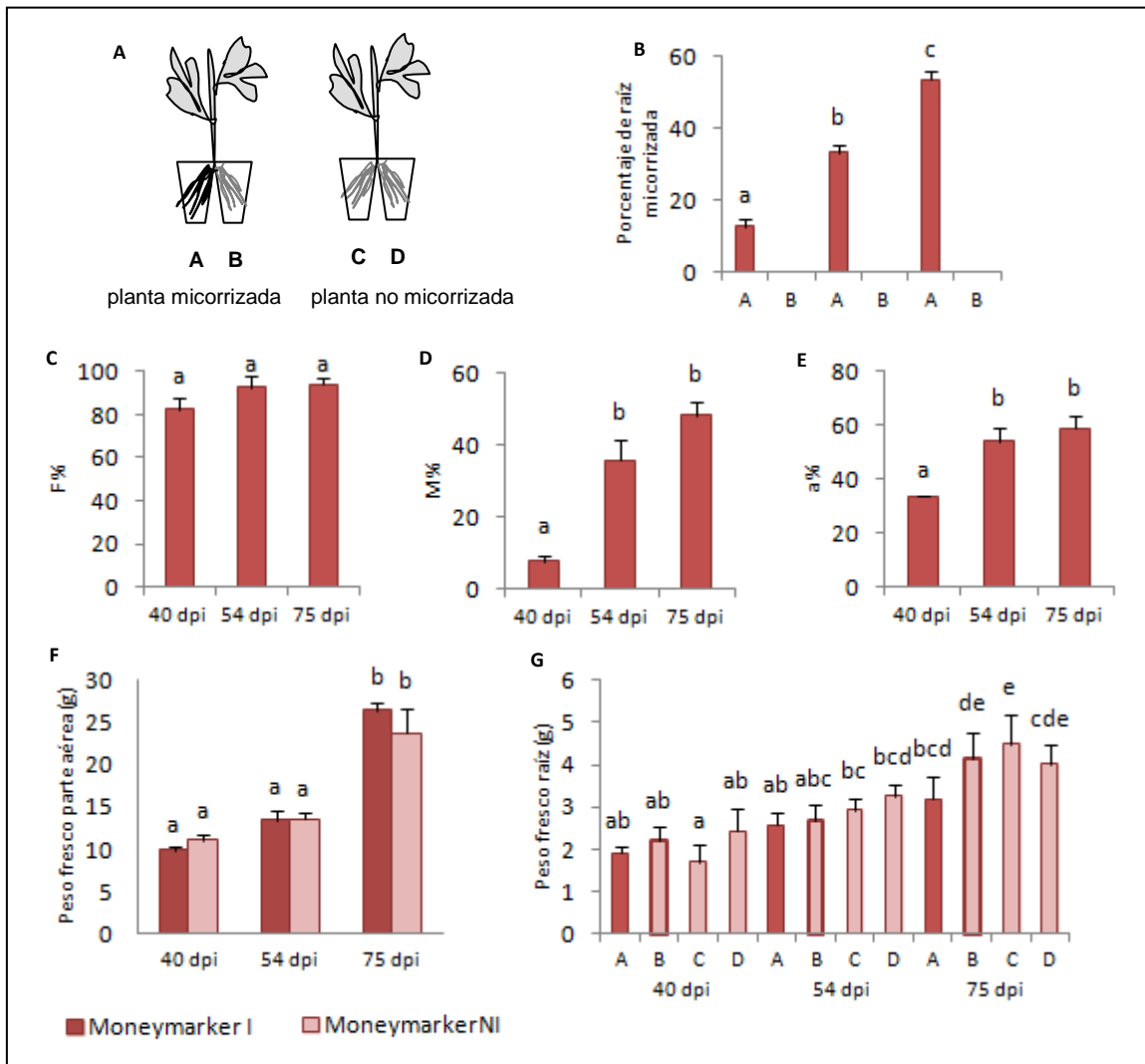


Figura III: Parámetros de micorrización de plantas de tomate silvestres de la variedad Moneymarker en sistema de compartimentalización de raíces inoculadas con *G. intraradices*. **Gráfica A:** Esquema de sistema de compartimentalización de raíces. **Gráfica B:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica C:** Frecuencia de micorrización (F%). **Gráfica D:** Intensidad de micorrización (M%). **Gráfica E:** Intensidad arbuscular en la zona colonizada (a%). **Gráfica F:** Peso fresco de la parte aérea. **Gráfica G:** Peso fresco de la raíz. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

El análisis de los parámetros histoquímicos se complementó con experimentos de cuantificación mediante qRT-PCR del nivel de acumulación de ARNm de los genes *GinEF*, para la cuantificación del grado de colonización fúngica, y *GinGS*, para la determinación de la eficiencia de micorrización. Como gen de referencia para el cálculo de la expresión génica, formulada como valor M, se usó el gen constitutivo *EFa1* de tomate. Para el cálculo del valor M se utilizó el cociente de la expresión de los genes

GinEF y *GinGS* en cada compartimento respecto de la expresión de dichos genes en el compartimento micorrizado del primer tiempo de cosecha (40dpi), de ahí que la expresión de dichos genes a 40 dpi tenga un valor $M=0$. No se encontró expresión de genes fúngicos en el compartimento no inoculado de las plantas micorrizadas confirmando que el hongo fue retenido por el compartimento inoculado durante el desarrollo del experimento (figura IV, gráficas B y C). La evolución de la expresión en el compartimento inoculado, tanto de *GinEF* como de *GinGS*, fue similar a lo largo de todo el ensayo. La expresión en ambos genes se vio incrementada aproximadamente 6 veces (valor M de 2,5) a los 54dpi respecto a los 40dpi. A los 65dpi, la expresión de *GinEF* y *GinGS* fue entre 2-3 veces superior que a los 40dpi (figura IV, gráficas B y C).

Para la determinación del patrón de expresión de los genes *LOXA*, *LeAOS3* y *LeDES*, involucrados en el metabolismo 9-LOX de oxilipinas, se analizó el nivel de acumulación de transcrito mediante qRT-PCR. Al igual que para el cálculo de la expresión de los genes *GinEF* y *GinGS*, se usó el gen constitutivo *EFa1* de tomate como gen marcador de referencia. El valor M se calculó mediante el cociente de la expresión de los genes *LOXA*, *LeAOS3* y *LeDES* en cada compartimento respecto de la expresión de dichos genes en el compartimento C (figura IV, gráfica A) de las plantas control para el primer tiempo de cosecha (40dpi). La evolución de la expresión en los genes *LOXA* y *LeAOS3* fue similar a lo largo del experimento. Así, la expresión de ambos genes no varió en el compartimento inoculado respecto al no inoculado (compartimento B) en las plantas micorrizadas a los 40dpi, mostrando un claro incremento de la expresión en el compartimento inoculado a los 54dpi. Del mismo modo, no se observó variación en la expresión de ambos genes en los compartimentos no inoculados, tanto de las plantas micorrizadas como de las plantas control, a los 54dpi respecto de la expresión mostrada a los 40dpi. A los 75dpi, la expresión de los genes *LOXA* y *LeAOS3* disminuyó en todos los compartimentos analizados, mostrando una tendencia clara a la disminución de la expresión con la edad de las plantas (figura IV, gráficas D y E). En cuanto a *LeDES*, no se encontraron diferencias biológicamente relevantes en su expresión a lo largo de todo el experimento asociadas a la micorrización, y así el valor M osciló entre 1 y -1 (menos de dos veces de inducción) en todos los casos (figura IV, gráfica F).

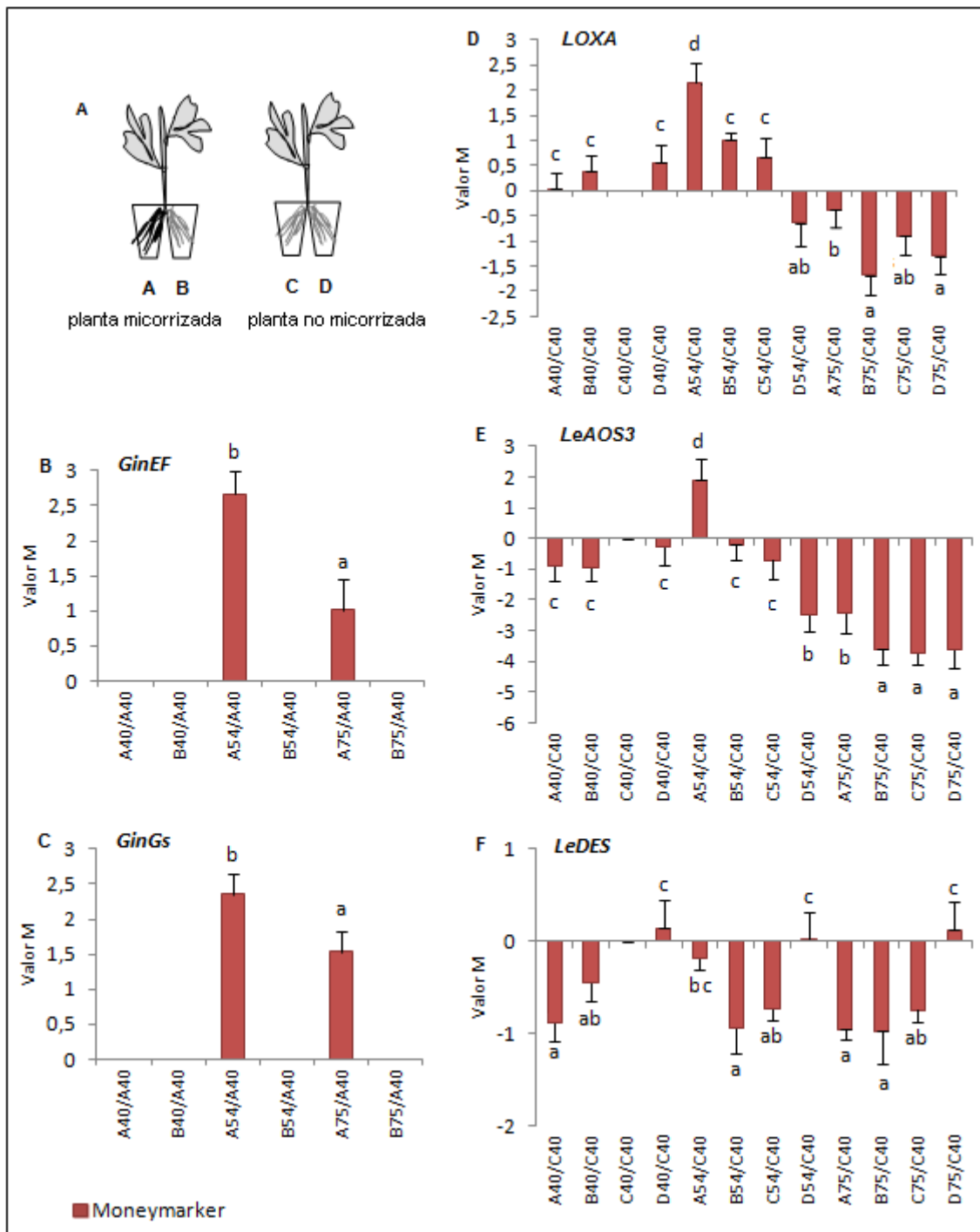


Figura IV: Análisis de expresión del efecto sistémico/local en el patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 9-LOX en plantas de tomate silvestres de la variedad Moneymarker en sistema de compartimentalización de raíces. **Gráfica A:** Esquema de sistema de compartimentalización de raíces. **Gráfica B:** Análisis de expresión del gen *GinEF* mediante qRT-PCR. **Gráfica C:** Análisis de expresión del gen *GinGs* mediante qRT-PCR. **Gráfica D:** Análisis de expresión del gen *LOXA* mediante qRT-PCR. **Gráfica E:** Análisis de expresión del gen *LeAOS3* mediante qRT-PCR. **Gráfica F:** Análisis de expresión del gen *LeDES* mediante qRT-PCR. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

Además de los genes involucrados en el metabolismo 9-LOX, se realizó un análisis del patrón de expresión del gen de respuesta a JA, *PIN II*, y de un gen codificante para una subtilisina (*Subt*, Les.513.1.S1_at) identificado en el análisis del perfil transcriptómico asociado al proceso de micorrización y descrito en el capítulo anterior (capítulo 1 de resultados), con actividad proteasa y activado en respuesta a JA. El objeto de este análisis fue determinar la capacidad de las plantas de tomate de activar la respuesta mediada por JA frente a los hongos formadores de micorriza, así como el posible efecto sistémico producido por el proceso de micorrización sobre la expresión de estos genes marcadores.

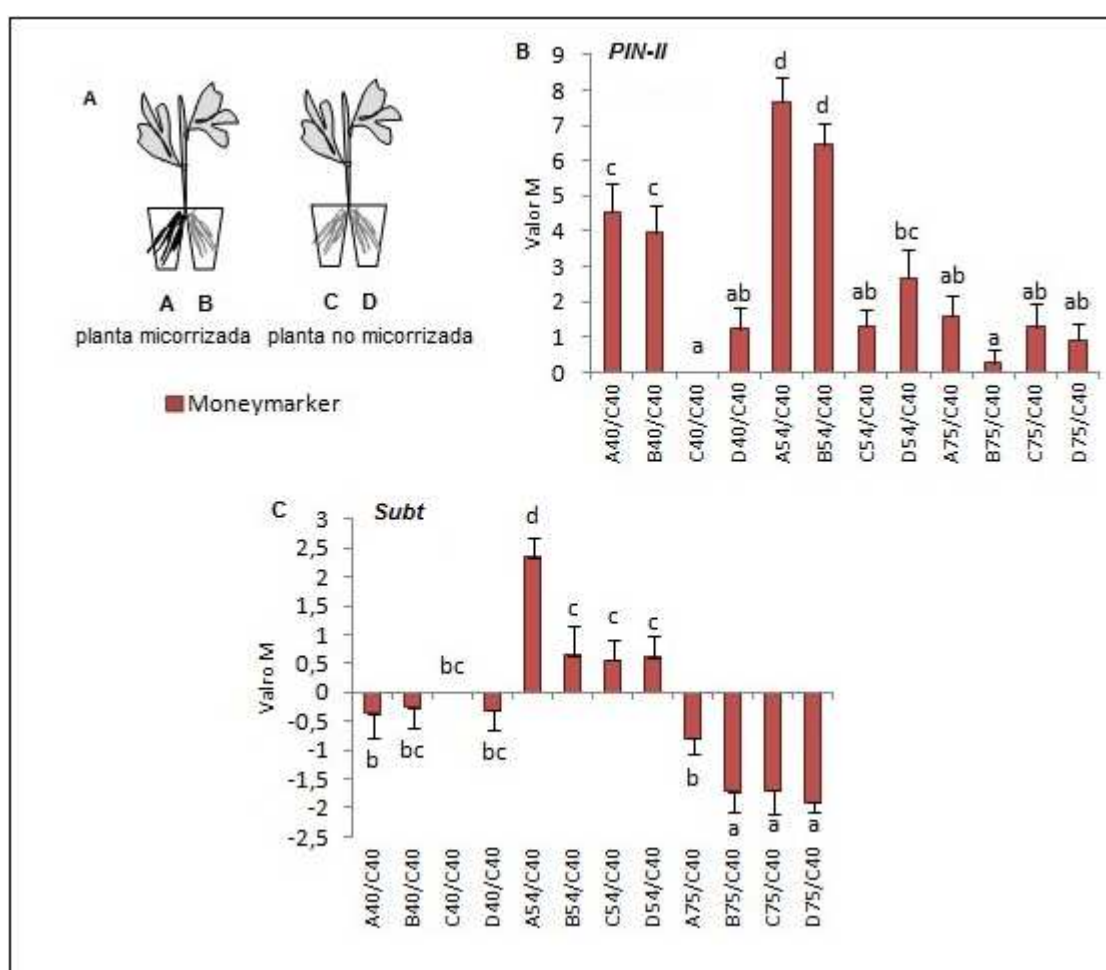


Figura V: Análisis de expresión del efecto sistémico/local en el patrón de expresión de los genes *PIN II* y *Subt* en plantas de tomate silvestres de la variedad Moneymarker en sistema de compartimentalización de raíces. **Gráfica A:** Esquema de sistema de compartimentalización de raíces. **Gráfica B:** Análisis de expresión del gen *PIN II* mediante qRT-PCR. **Gráfica C:** Análisis de expresión del gen *Subt* mediante qRT-PCR. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

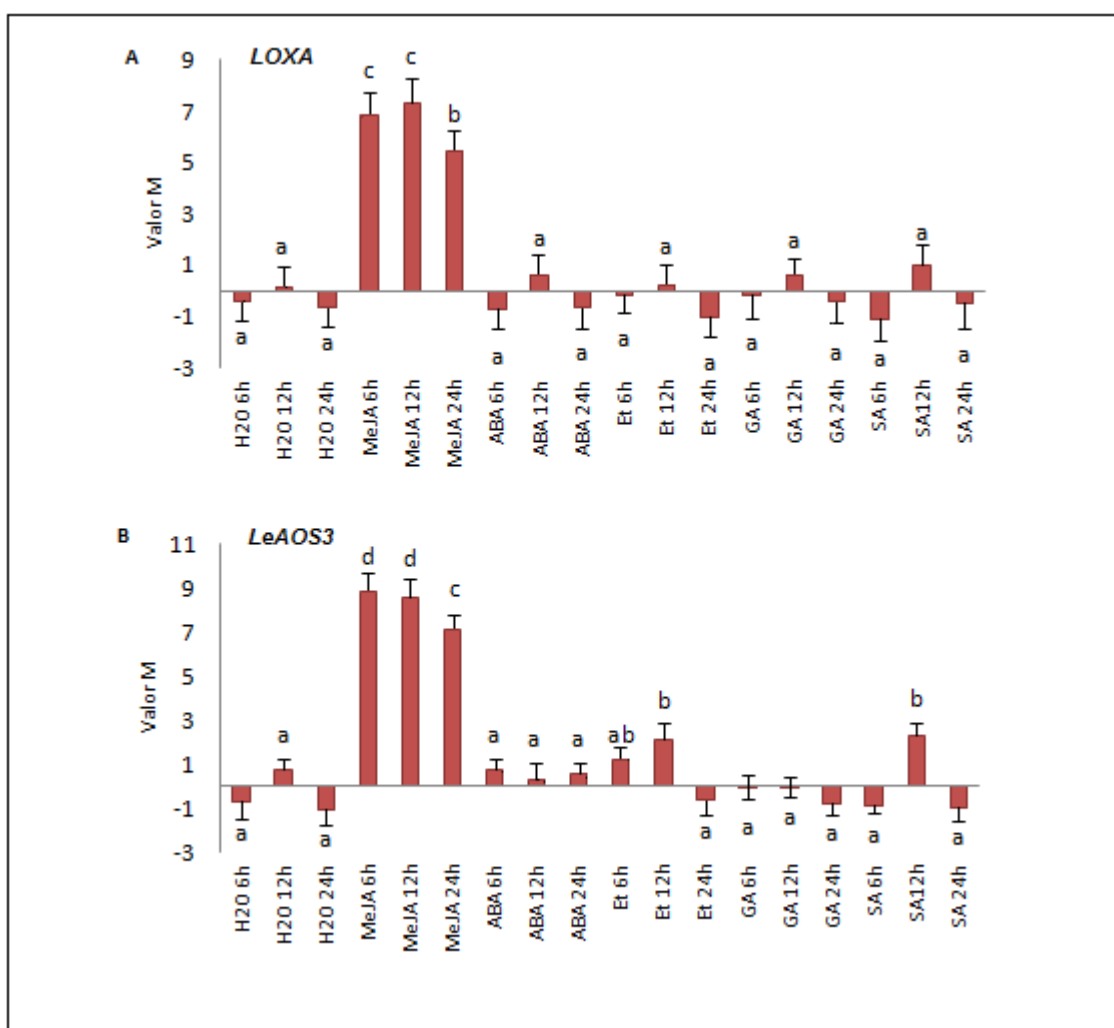
Al igual que para el cálculo de la expresión de los genes anteriormente analizados, se usó el gen constitutivo *EF α 1* de tomate como gen de referencia. El valor M se calculó mediante el cociente de la expresión de los genes *PIN II* y *Subt* en cada compartimento respecto de la expresión de dichos genes en el compartimento C (figura V, gráfica A) de las plantas control para el primer tiempo de cosecha (40dpi). El análisis de *PIN II* mostró un claro incremento de la expresión de éste tanto en el compartimento inoculado como en el no inoculado de las plantas micorrizadas respecto a las plantas no micorrizadas a los 40 y 54 dpi, observándose en este último tiempo de cosecha un aumento hasta 200 veces superior (valor M 7,5) en comparación con las plantas control no inoculadas. La expresión de *PIN II* en plantas micorrizadas bajo a los niveles de plantas no micorrizadas, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos en la expresión de *PIN II* a los 75 dpi. (Figura V, gráfica B). En cuanto a *Subt*, el patrón de expresión fue similar al de los genes *LOXA* y *LeAOS3*. Así, su expresión no varió en el compartimento inoculado respecto al no inoculado (compartimento B) en las plantas micorrizadas a los 40dpi, mostrando un claro incremento de la expresión en el compartimento inoculado a los 54dpi. De igual modo, a los 75 dpi la expresión de *Subt* disminuyó en todos los compartimentos analizados respecto a su expresión en plantas control de 40 dpi (figura V, gráfica C).

2.3 Análisis de la expresión de genes involucrados en el metabolismo 9-LOX en respuesta a tratamientos con fitohormonas en plantas de tomate.

Estudiado el patrón de expresión de los genes involucrados en el metabolismo 9-LOX, así como su no activación sistémica durante el proceso de micorrización, se realizó un experimento para determinar su respuesta a tratamientos con hormonas vegetales en plantas de tomate silvestres de la variedad Moneymarker sin micorrizar. El objeto de este experimento es comprobar si la expresión de los genes involucrados en el metabolismo 9-LOX puede estar mediada por ciertas fitohormonas con acción demostrada como reguladores del proceso de formación de simbiosis micorrizo-arbuscular (Hause y col., 2007), dada la evidencia, además, de la capacidad de inducción de los genes *LOXA* y *LeAOS3* por ácido jasmónico (López-Ráez y col., 2010; García-Garrido y col., 2010). De este modo, pareció interesante realizar un ensayo de

aplicación exógena de fitohormonas involucradas tanto en la formación de estructuras fúngicas como en el correcto establecimiento de la simbiosis, y analizar la respuesta de dichos genes.

Las plantas de tomate fueron tratadas con una dosis única de MeJA ($50\mu\text{M}$), ABA ($75\mu\text{M}$), Et ($70\mu\text{M}$), GA ($5\mu\text{M}$) y SA ($0,5\text{mM}$) y cosechadas a las 6, 12 y 24h posteriores al tratamiento. El ensayo fue diseñado para mostrar la capacidad respuesta temprana (6h) y tardía (12 y 24h) de los genes seleccionados a la aplicación exógena de las soluciones de fitohormonas preparadas. El análisis de la expresión génica de los genes *LOXA*, *LeAOS3* y *LeDES* en respuesta a los tratamientos hormonales se realizó mediante qRT-PCR, en plantas de tomate silvestres de 40 días de edad, usando como gen de referencia para la cuantificación de su expresión, formulada como valor M, el gen constitutivo *EFa1* de tomate. Para el cálculo del valor M se utilizó el cociente de la expresión de los genes seleccionados para cada tratamiento hormonal respecto de la expresión de dichos genes a tiempo 0 en las plantas control sin tratar.



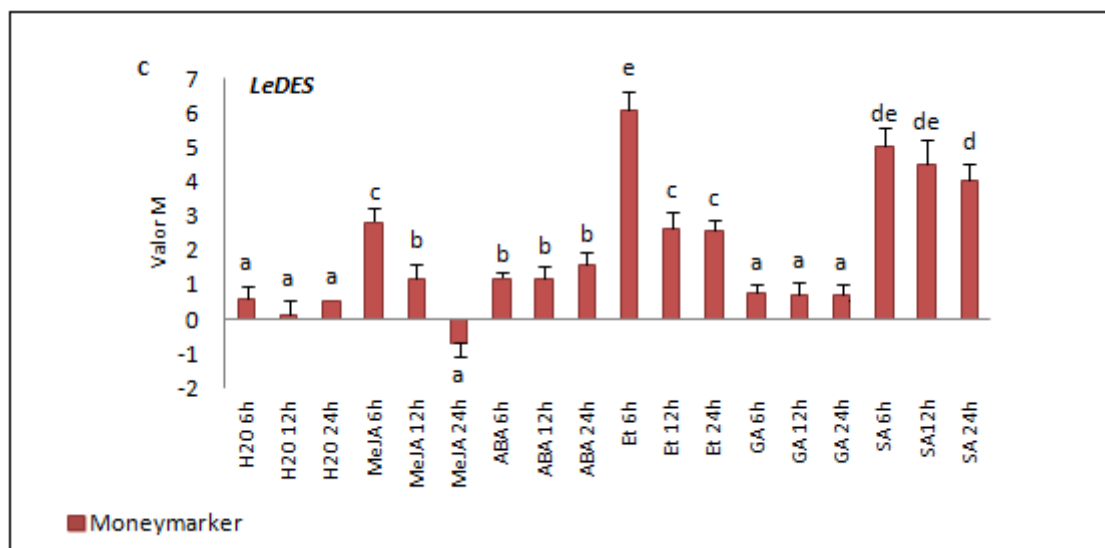


Figura V: Análisis de expresión en respuesta a tratamientos con fitohormonas de genes involucrados en el metabolismo 9-LOX en plantas de tomate silvestres de 40 días de edad y de la variedad Moneymarker. **Gráfica A:** Análisis de expresión del gen *LOXA* mediante qRT-PCR. **Gráfica B:** Análisis de expresión del gen *LeAOS3* mediante qRT-PCR. **Gráfica C:** Análisis de expresión del gen *LeDES* mediante qRT-PCR. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

El patrón de expresión de los genes *LOXA* y *LeAOS3* fue similar en cuanto a su respuesta al tratamiento con fitohormonas (figura V). En ambos casos, se produjo un incremento considerable de la expresión en el tratamiento con MeJA, alcanzando un pico máximo de expresión de 450 veces superior al control (valor $M=8,8$) para el gen *LeAOS3* y 110 veces (valor $M=6,8$) para *LOXA* a las 6h después de la aplicación, que decreció ligeramente a las 24h. Además del MeJA, se observaron dos leves incrementos de expresión del gen *LeAOS3* a las 12h para los tratamientos con Et y SA. Ningún otro tratamiento causó un cambio significativo en la expresión de los genes *LOXA* y *LeAOS3*, comparando con los controles tratados con agua y a los tiempos de experimentación ensayados (figura V, gráficas A y B). En cuanto a *LeDES*, el tratamiento con MeJA provocó un incremento temprano (6h), moderado y transitorio de su expresión. Además, también se observó una respuesta positiva a los tratamientos con ABA, Et, SA. La aplicación de ABA causó un ligero pero significativo incremento de la expresión de *LeDES* que se mantuvo en el tiempo. El tratamiento con Et produjo una respuesta temprana (6h), elevada y puntual en la expresión de *LeDES*, mientras que el SA causó un moderado pero permanente incremento en su expresión (figura V, gráfica C).

2.4 Análisis de micorrización y del patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 9-LOX en plantas mutantes de tomate alteradas en la vía de señalización del JA.

En vista de la respuesta positiva de los genes *LOXA* y *LeAOS3* a la aplicación de MeJA, y para examinar el alcance y la importancia de la interacción entre la vía de señalización del JA y la expresión génica de la vía 9-LOX en relación con el proceso de formación de micorriza arbuscular, se realizaron una serie de experimentos con plantas mutantes de tomate alteradas en la biosíntesis y/o en la percepción de JA. Así, se utilizaron dos tipos diferentes de líneas mutantes. Por un lado, las líneas *spr-2* y *def-1*, alteradas en la respuesta a JA debido a una insuficiencia en la capacidad de síntesis del mismo (Howe y col., 1996; Li y col., 2004), y por otro, la línea *jai-1* deficiente en la percepción de JA, causada por un bloqueo de la vía de señalización de esta fitohormona (Li y col., 2001).

2.4.1 Micorrización y análisis del patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 9-LOX en plantas mutantes de tomate alteradas en la biosíntesis de JA.

La posibilidad de utilizar plantas mutantes alteradas en la capacidad de biosíntesis de JA permitió complementar el estudio de los genes involucrados en el metabolismo 9-LOX de oxilipinas en el proceso de micorrización, así como avanzar en el conocimiento del papel regulador de dicha fitohormona en el establecimiento de la simbiosis. De este modo, se siguió la evolución de la micorrización en las plantas de tomate transgénicas *spr-2* y *def-1*, deficientes en la síntesis de JA, aunque afectadas a distinto nivel en la ruta de biosíntesis, y se analizó el patrón de expresión de los genes involucrados en el metabolismo 9-LOX seleccionados. Las plantas se inocularon con *G. intraradices* realizándose dos cosechas: 38 y 52 dpi. Los parámetros de micorrización analizados fueron: porcentaje de raíz micorrizada, frecuencia de micorrización (F%), intensidad de micorrización (M%), intensidad de arbusculos en la zona colonizada (a%) y porcentaje de actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%).

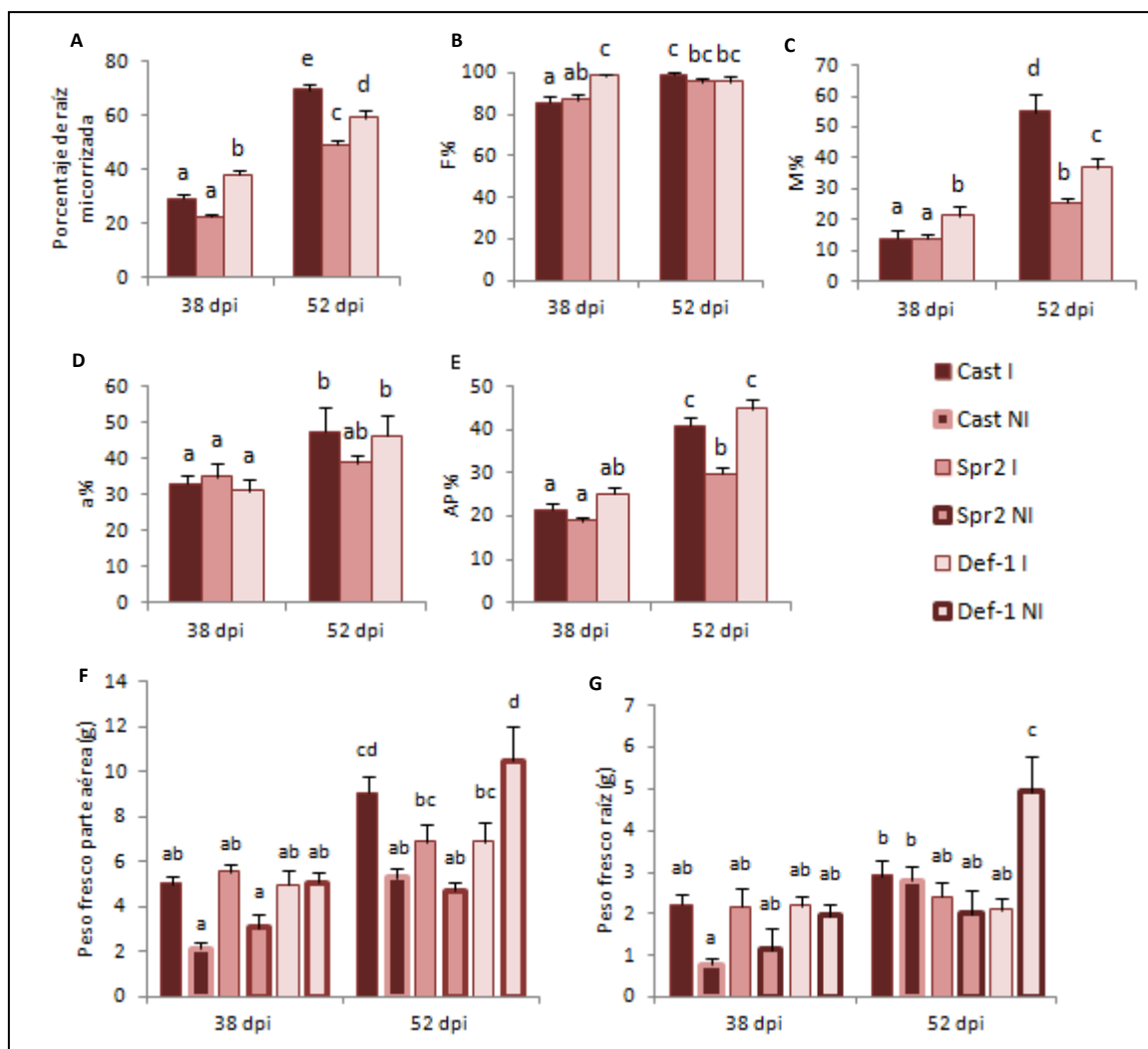


Figura VI: Parámetros de micorrización de plantas mutantes de tomate alteradas en su capacidad de biosíntesis de JA (líneas *spr-2* y *def-1*), y silvestre Castlemart, inoculadas con *G. intraradices*, y cosechadas a 38 y 52 dpi. **Gráfica A:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica B:** Frecuencia de micorrización (F%). **Gráfica C:** Intensidad de micorrización (M%). **Gráfica D:** Intensidad de arbusculos en la zona colonizada. **Gráfica E:** Porcentaje de actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%). **Gráfica F:** Peso fresco de parte aérea. **Gráfica G:** Peso fresco de la raíz. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas ± el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

Las plantas de tomate de la variedad Castlemart, utilizadas como línea isogénica silvestre, mostraron una dinámica de micorrización típica, con valores de porcentaje de raíz micorrizada que oscilaron desde un 30% a los 38 dpi hasta un 67% a los 52 dpi (figura VI, gráfica A), alcanzando una frecuencia de micorrización cercana al 100% al final del experimento (figura VI, gráfica B). La intensidad de micorrización presentó valores del 15% a los 38 dpi llegando hasta el 55% a los 52 dpi (figura VI, gráfica C), mientras que la intensidad arbuscular en la zona colonizada alcanzó valores del 30% en el primer tiempo de cosecha y del 45% a los 52 dpi (figura VI, gráfica D). También se

cuantificó la eficiencia de la micorrización por medio de la actividad fosfatasa alcalina fúngica mostrando valores cercanos al 25% a los 50dpi y al 45% para el último tiempo de cosecha (figura VI, gráfica E).

Las plantas transgénicas *spr-2* mostraron valores de todos los parámetros de micorrización analizados similares a los determinados para el tipo silvestre en el primer tiempo de cosecha (38dpi), observándose una reducción de todos ellos, excepto de la frecuencia de micorrización, a los 52 dpi (figura VI, gráficas A, B, C, D y E). En cuanto a *def-1*, se detectó un ligero incremento, tanto del porcentaje de raíz micorrizada como de la frecuencia e intensidad de micorrización a los 38 dpi respecto a los valores presentados por el tipo silvestre y la línea transgénica *spr-2*, sin embargo, para el segundo tiempo de cosecha (52 dpi), el análisis de estos parámetros mostró una reducción significativa del porcentaje de micorrización y la intensidad de micorrización respecto al tipo silvestre, aunque con valores superiores a los determinados para *spr-2* (figura VI, gráficas A, B y C). En cuanto a la intensidad arbuscular en la zona colonizada, así como el porcentaje de actividad fosfatasa alcalina fúngica, no se observaron cambios significativos con respecto al tipo silvestre para ninguno de los dos tiempos de cosecha, excepto una disminución del valor de actividad fosfatasa alcalina fúngica en plantas *spr-2* a los 52 dpi (figura VI, gráficas D y E). En lo referente al peso fresco, tanto de la parte aérea como de la raíz, este se vio incrementado en las plantas inoculadas frente a las no inoculadas en el primer tiempo de cosecha (38dpi), excepto para la línea *def-1* en la que no se observaron cambios. Para el segundo tiempo de cosecha (52dpi), el peso fresco de la parte aérea de las plantas inoculadas de las líneas Castlemart y *spr-2* fue superior al de los controles no micorrizados, no observándose diferencias en los pesos frescos de la raíz. Sin embargo, en el caso de *def-1*, tanto el peso fresco de la parte aérea como el de la raíz, fue mayor en las plantas no inoculadas respecto a las inoculadas (figura VI, gráficas F y G).

El análisis de los parámetros histoquímicos se complementó con experimentos de cuantificación mediante qRT-PCR del nivel de acumulación de ARNm de los genes *GinEF* y *GinGS*, relacionados con el grado de colonización fúngica y la eficiencia del funcionamiento de la simbiosis, respectivamente. Como gen de referencia para el cálculo de la expresión génica, formulada como valor M, se usó el gen constitutivo *EFa1* de tomate. Para la determinación del valor M se utilizó el cociente de la expresión de cada tratamiento, para cada uno de los genes analizados, respecto al nivel de

expresión presentado por el tipo silvestre en el primer tiempo de cosecha (38 dpi). El análisis mostró una clara correlación entre el nivel de expresión de *GinEF* y *GinGS* (figura VII, gráficas A y B) y los datos obtenidos mediante las determinaciones histoquímicas de intensidad de arbusculos en la zona colonizada y porcentaje de actividad fosfatasa alcalina fúngica (figura VI, gráficas D y E). No obstante, y si bien, el análisis de expresión génica de *GinEF* y *GinGS* mostró diferencias estadísticamente significativas a los 38 dpi entre las distintas líneas utilizadas, todos los valores obtenidos para ese tiempo de cosecha se encuentran en el rango +1 y -1, siendo la inducción/represión inferior a dos veces (valor M de 1) respecto a las plantas control no inoculadas y, por tanto, no considerándose biológicamente significativas tales diferencias en la expresión génica de dichos genes entre las distintas líneas utilizadas (figura VII, gráficas A y B), tal y como se observa en las determinaciones histoquímicas para el primer tiempo de cosecha (figura VI, gráficas D y E). En cuanto a la expresión de *GinEF* y *GinGS* a los 52 dpi, se observa una clara inducción en la expresión de ambos genes en las líneas Castlemert y *def-1* respecto a *spr-2* (figura VII, gráficas A y B), tal y como se observa en las determinaciones histoquímicas, si bien, en el caso de la intensidad arbuscular, las diferencias observadas no son estadísticamente significativas (figura VI, gráficas D y E).

Para la determinación del patrón de expresión de los genes *LOXA*, *LeAOS3* y *LeDES*, involucrados en el metabolismo 9-LOX, se analizó el nivel de acumulación de ARNm mediante qRT-PCR. Al igual que para el cálculo de la expresión de los genes *GinEF* y *GinGS*, se usó el gen constitutivo *EF α 1* de tomate como gen marcador de referencia. Para el cálculo del valor M se utilizó el cociente de la expresión de los genes analizados en plantas micorrizadas respecto de la expresión de dichos genes en plantas control no micorrizadas para cada variedad y tiempo de cosecha. Los datos obtenidos no mostraron cambios biológicamente relevantes (valor M entre 1 y -1) en la expresión génica de las plantas micorrizadas respecto a las no micorrizadas en ninguna de las tres líneas utilizadas a los 38 dpi, a excepción de un ligero incremento detectado en la expresión de *LeDES* en las plantas *spr-2* micorrizadas. Sin embargo, a los 52 dpi la expresión de *LOXA*, *LeAOS3* y *LeDES* presentó un considerable incremento en las plantas silvestres micorrizadas respecto a los controles no inoculados. En cuanto a *spr-2* y *def-1*, no se observaron cambios biológicamente significativos en la expresión génica de *LOXA* y *LeAOS3* para ese mismo tiempo de cosecha, produciéndose una reducción

significativa de la expresión de *LeDES* en las plantas de la línea *def-1* (figura VII, gráficas C, D y E).

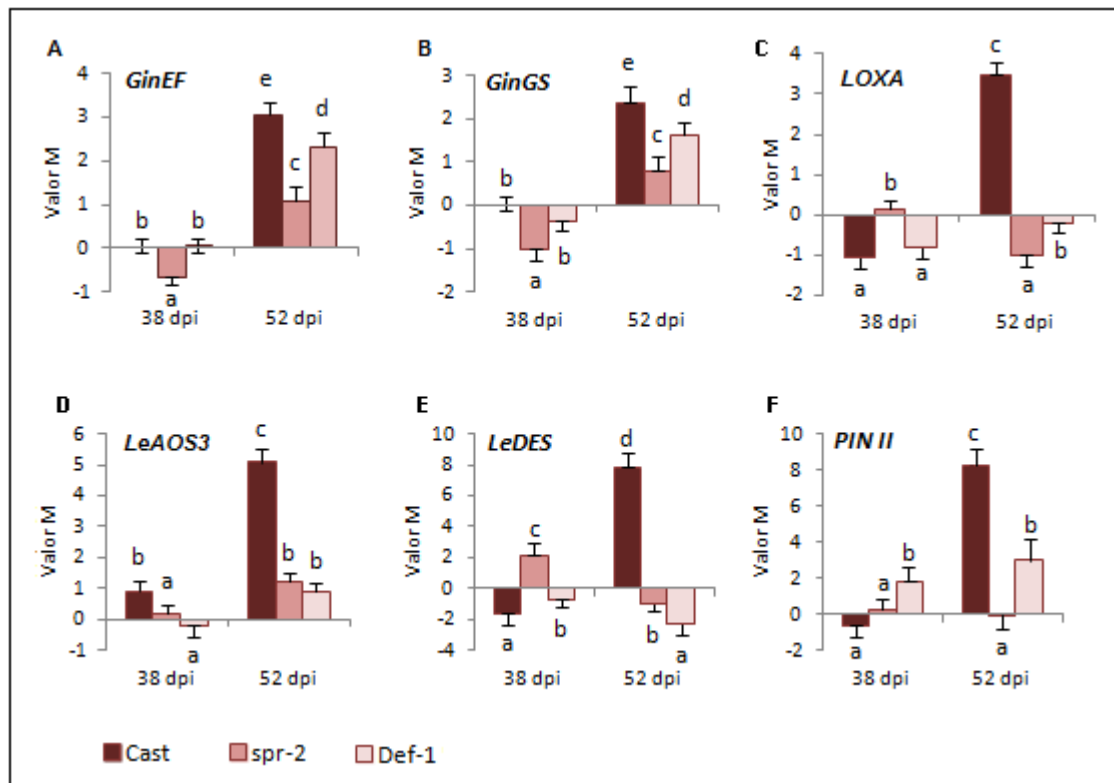


Figura VII: Análisis de expresión génica de los genes *GinEF*, *GinGS*, *LOXA*, *LeAOS3*, *LeDES* y *PIN II* en plantas de tomate mutantes alteradas en la biosíntesis de JA (*spr2* y *def-1*) y control no transgénico, Castlemart, inoculadas con *G. intraradices*, y cosechadas a 38 y 52 dpi. **Gráfica A:** Análisis de expresión del gen *GinEF* mediante qRT-PCR. **Gráfica B:** Análisis de expresión del gen *GinGS* mediante qRT-PCR. **Gráfica C:** Análisis de expresión del gen *LOXA* mediante qRT-PCR. **Gráfica D:** Análisis de expresión del gen *LeAOS3* mediante qRT-PCR. **Gráfica E:** Análisis de expresión del gen *LeDES* mediante qRT-PCR. **Gráfica F:** Análisis de expresión del gen *PIN II* mediante qRT-PCR. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

Además de los genes involucrados en el metabolismo 9-LOX, se realizó un análisis del patrón de expresión del gen de respuesta a JA, *PIN II*. El objeto de este análisis fue determinar la capacidad de las líneas *spr-2* y *def-1* de activar la respuesta mediada por JA frente a los hongos formadores de micorriza. Del mismo modo que para las determinaciones de los genes anteriormente analizados, el valor M fue calculado como el cociente entre la expresión de *PIN II* en las plantas micorrizadas respecto a las no inoculadas. El patrón de expresión de *PIN II* fue similar al observado para los genes *LOXA* y *LeAOS3*. Así, no se produjo cambios biológicamente significativos de su expresión a los 38 dpi con excepción de un ligero incremento en las plantas micorrizadas de la línea *def-1*. Para el segundo tiempo de cosecha, al igual que pasara

con *LoxA* y *LeAos3*, se detectó un incremento considerable de la expresión de *PIN II* en la línea silvestre (hasta 300 veces más, valor M de 8). Este incremento, aunque en mucha menor medida (8 veces más, valor M de 3) se observó también para la línea mutante *def-1*. En cuanto a la línea *spr-2*, no se produjo alteración en la expresión de *PIN II* a lo largo de todo el experimento con respecto a las plantas no micorrizadas (figura VII, gráfica F).

2.4.2 Micorrización y análisis del patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 9-LOX en plantas mutantes de tomate alteradas en la percepción de JA.

Para complementar el estudio del papel regulador de la vía de señalización del JA, así como de la participación de los genes involucrados en el metabolismo 9-LOX en el proceso de micorrización, se utilizaron plantas mutantes de tomate *jai1*, afectadas en la sensibilidad al JA y al MeJA. La mutación *jai1* es recesiva, por lo que sólo las plantas homocigotas para la mutación presentan insensibilidad al JA. Las plantas utilizadas en los ensayos de micorrización se seleccionaron a partir de una población de semillas de la generación F₂, usando los criterios de sensibilidad al MeJA y de selección génica descritos en el apartado 2.2 del material y métodos. De este modo, se siguió la evolución de la micorrización en plantas de tomate silvestres *JAI/-* (sensibles a JA) y en plantas mutantes *jai1/jai1* (insensibles a JA) inoculadas con *G. intraradices*, realizándose dos cosechas: 38 y 52 dpi, y se analizó el patrón de expresión de los genes involucrados en el metabolismo 9-LOX de oxilipinas seleccionados. Los parámetros de micorrización analizados fueron: porcentaje de raíz micorrizada, frecuencia de micorrización (F%), intensidad de micorrización (M%), intensidad de arbusculos en la zona colonizada (a%) y porcentaje de actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%).

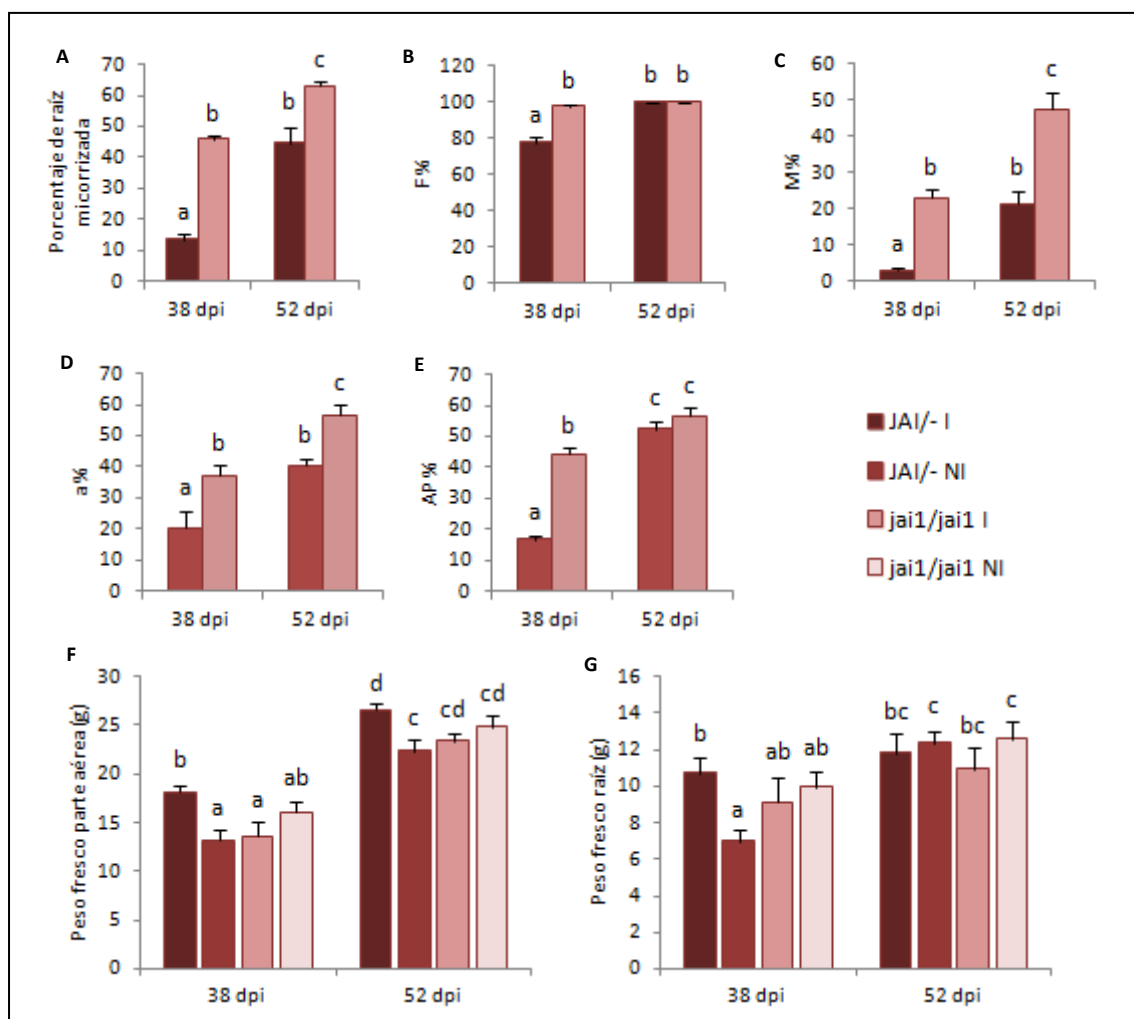


Figura VIII: Parámetros de micorrización de plantas de tomate sensibles (*JAI/-*) e insensibles a JA (*jai1/jai1*) inoculadas con *G. intraradices*, cosechadas a 38 y 52 dpi. **Gráfica A:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica B:** Frecuencia de micorrización (F%). **Gráfica C:** Intensidad de micorrización (M%). **Gráfica D:** Intensidad de arbusculos en la zona colonizada. **Gráfica E:** Porcentaje de actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%). **Gráfica F:** Peso fresco de parte aérea. **Gráfica G:** Peso fresco de la raíz. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

El análisis de todos los parámetros histoquímicos analizados mostró un claro incremento de la micorrización en las plantas de tomate mutantes insensibles a JA para el primer tiempo de cosecha (38 dpi) respecto a las plantas sensibles. Así, se observó un incremento del porcentaje de raíz micorrizada de hasta cuatro veces más en las plantas *jai1/jai1* respecto a la *JAI/-* (figura VIII, gráfica A), alcanzando la frecuencia de micorrización valores cercanos al 100% para las plantas insensibles ya a los 38 dpi (figura VIII, gráfica B). La intensidad de micorrización presentó valores cinco veces superior en las plantas *jai1/jai1* (figura VIII, gráfica C), mientras que la intensidad arbuscular en la zona colonizada fue dos veces mayor (figura VIII, gráfica D). Para el

segundo tiempo de cosecha (52 dpi), se siguió observando valores de todos los parámetros analizados superiores en las plantas insensibles *jai1/jai1* respecto a las plantas sensibles *JAI/-*, a excepción de la frecuencia de micorrización que presentaba valores del 100% para ambas líneas, si bien, esta diferencia disminuyó, debido, probablemente, a que en las plantas *jai1/jai1* ya se había establecido la simbiosis de forma estable, alcanzando valores máximos de todos los parámetros analizados (figura VIII, gráficas, A, B, C y D). Además, se cuantificó la eficiencia de la simbiosis mediante la actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%), observándose un incremento tres veces superior de dicha actividad para las plantas insensibles respecto a las plantas sensibles a los 38 dpi. En el segundo tiempo de cosecha no se observaron cambios significativos en la actividad fosfatasa alcalina fúngica entre ambas líneas (figura VIII, gráfica E). El peso fresco de la parte aérea y de la raíz de las plantas *JAI/-* sensibles a JA inoculadas fue superior al de las plantas control no inoculadas durante todo el experimento, con excepción del peso fresco de la raíz en el segundo tiempo de cosecha, en el que no se encontraron diferencias significativas. En cuanto a las plantas *jai1/jai1* insensibles a JA, no se observaron diferencias significativas entre los pesos de la parte aérea y la raíz a lo largo de todo el ensayo (figura VIII, gráficas F y G).

Al igual que en el experimento con plantas mutantes alteradas en la capacidad de biosíntesis de JA, el estudio de los parámetros histoquímicos se completó con la cuantificación del nivel de acumulación de ARNm de los genes *GinEF* y *GinGS* mediante qRT-PCR, utilizando el gen constitutivo *EFa1* como gen de referencia para el cálculo de su expresión. El valor M se cuantificó mediante el cociente de la expresión de cada gen para cada tratamiento respecto al valor de la expresión de las plantas micorrizadas *JAI/-* a los 38 dpi. Los resultados del análisis mostraron una clara correlación entre los datos obtenidos mediante la cuantificación de los parámetros histoquímicos y la expresión génica de *GinEF* y *GinGS*, observándose un incremento significativo de su inducción en los mutantes insensibles a JA (*jai1/jai1*) en las dos cosechas realizadas respecto a las plantas de tipo silvestre (figura IX, gráfica A).

El patrón de expresión de los genes *LOXA*, *LeAOS3* y *LeDES* se determinó mediante qRT-PCR, utilizando el gen *EFa1* de tomate como gen de referencia. Para el cálculo del valor M se utilizó el cociente de la expresión de los genes analizados en plantas micorrizadas respecto a la expresión de dichos genes en plantas control no micorrizadas para cada variedad y tiempo de cosecha. Los datos obtenidos mostraron un

patrón similar de los genes *LOXA* y *LeAOS3* en las raíces de las plantas sensibles *JAI/-*. En estas plantas, la expresión de ambos genes fue inferior en las plantas micorrizadas que en las no micorrizadas a los 38 dpi, produciéndose posteriormente un cambio de tendencia y por tanto un incremento significativo de su expresión a los 52 dpi de entre 8 y 10 veces (figura IX, gráficas B y C). Para *LeDES* no se detectaron cambios biológicamente significativos (valor M entre 1 y -1) en la expresión de las plantas micorrizadas respecto a las no inoculadas a lo largo de todo el ensayo (figura IX, gráfica D). En cuanto a las plantas insensibles a JA (*jai1/jai1*), el bloqueo de la vía de señalización de los jasmonatos afectó ligeramente al patrón de expresión de los genes involucrados en el metabolismo 9-LOX. Así, en estas plantas no se encontraron diferencias biológicamente significativas en el patrón de expresión de *LOXA* y *LeAOS3* en las plantas micorrizadas frente a las no micorrizadas a los 38 y 52 dpi, con excepción de un ligero incremento de la expresión (4 veces superior) de *LOXA* a los 38dpi (figura IX, gráficas B y C). Por otra parte, la expresión de *LeDES* fue inferior en las plantas inoculadas respecto a las no inoculadas a lo largo de todo el ensayo, siendo dos veces inferior a los 38 dpi y cuatro veces a los 52 dpi (figura IX, gráfica D).

Al igual que en el experimento con plantas mutantes alteradas en la capacidad de biosíntesis de JA, se realizó un análisis del patrón de expresión del gen *PIN II*. El cálculo de la expresión, formulado como valor M, se llevó a cabo de igual forma al de los genes anteriormente analizados. Los resultados obtenidos mostraron un patrón de expresión de *PIN II* similar al de los genes *LOXA* y *LeAOS3*, encontrándose una disminución de la expresión del mismo en las plantas micorrizadas sensibles a JA respecto a su control no inoculado a los 38 dpi con un incremento significativo posterior a los 52 dpi (tres veces más, valor M de 1,5). En cuanto a las plantas *jai1/jai1*, insensibles a JA, no se observaron cambios significativos en la expresión de *PIN II* a lo largo de todo el ensayo (figura IX, gráfica E).

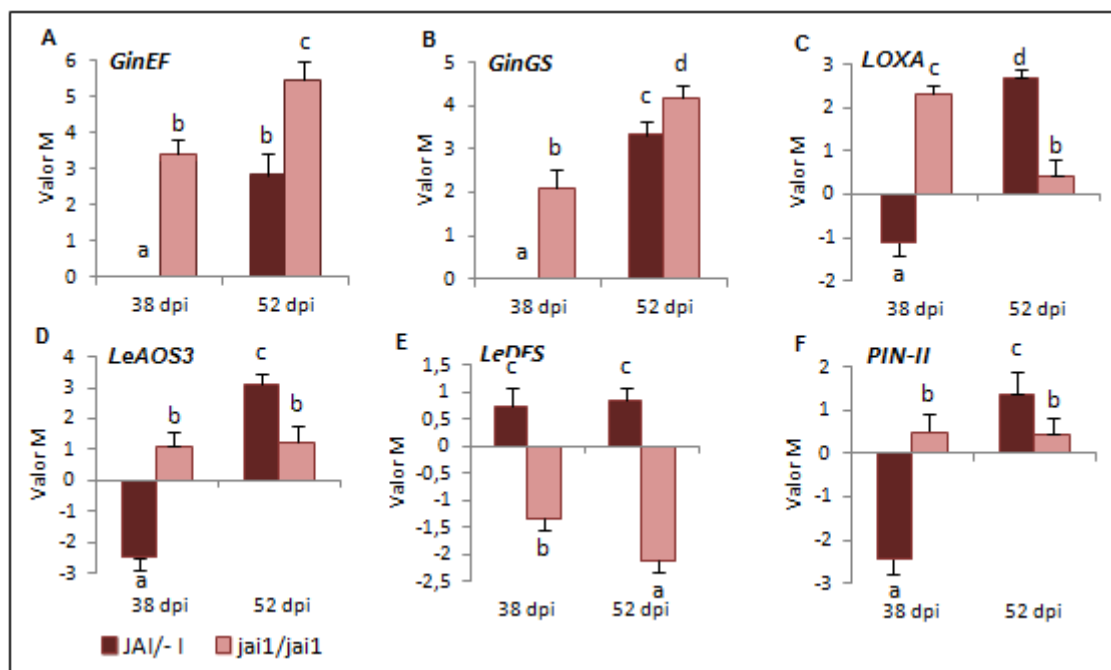


Figura IX: Análisis de expresión génica de los genes *GinEF*, *GinGS*, *LOXA*, *LeAOS3*, *LeDES* y *PIN II* en plantas de tomate sensibles (*JAI/-*) e insensibles a JA (*jai1/jai1*), inoculadas con *G. intraradices*, y cosechadas a 38 y 52 dpi. **Gráfica A:** Análisis de expresión del gen *GinEF* mediante qRT-PCR. **Gráfica B:** Análisis de expresión del gen *GinGs* mediante qRT-PCR. **Gráfica C:** Análisis de expresión del gen *LOXA* mediante qRT-PCR. **Gráfica D:** Análisis de expresión del gen *LeAOS3* mediante qRT-PCR. **Gráfica E:** Análisis de expresión del gen *LeDES* mediante qRT-PCR. **Gráfica F:** Análisis de expresión del gen *PIN II* mediante qRT-PCR. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

Por otro lado, también se efectuaron medidas de los niveles endógenos de ácido jasmónico (JA), jasmonil isoleucina (JA-Ile, forma activa de JA), ácido oxofitodienoico (10 y 12-OPDA) y ácido colneleico en las raíces de las plantas *JAI/-* sensibles y *jai1/jai1* insensibles a JA, inoculadas y no inoculadas con *G. intraradices*. Los datos obtenidos no mostraron diferencias significativas en los niveles endógenos JA-Ile y JA en las plantas sensibles *JAI/-*, inoculadas y no inoculadas, a lo largo de todo el ensayo. Por el contrario, en las plantas insensibles *jai1/jai1* micorrizadas se pudo observar un incremento de la cantidad de JA-Ile a los 52 dpi respecto del primer tiempo de cosecha (38 dpi), el cual no fue observado en las medidas de JA, ni en las plantas no micorrizadas (figura X, gráficas A y B). En cuanto al contenido de OPDA, medido como una mezcla de 10 y 12-OPDA, no se apreciaron diferencias significativas entre las plantas *JAI/-* inoculadas para los dos tiempos de cosecha realizados, detectándose una reducción drástica en el contenido del mismo para los controles no micorrizados a los

52 dpi. Para las plantas *jai1/jai1*, insensibles a JA, no se observaron diferencias estadísticamente significativas a lo largo de todo el ensayo, tanto en las plantas inoculadas como en las no inoculadas (figura X, gráfica C). Las medidas de ácido colneléico mostraron un patrón similar al observado para el contenido de OPDA en las plantas sensibles *JAI/-*, apreciándose una reducción del mismo en las plantas no micorrizadas para el segundo tiempo de cosecha, que no fue detectado en las plantas inoculadas. En cuanto a las plantas insensibles *jai1/jai1*, se observó un incremento significativo de los niveles de ácido colneléico en las plantas micorrizadas frente a las no micorrizadas tanto a los 38 como 52 dpi (figura X, gráfica D).

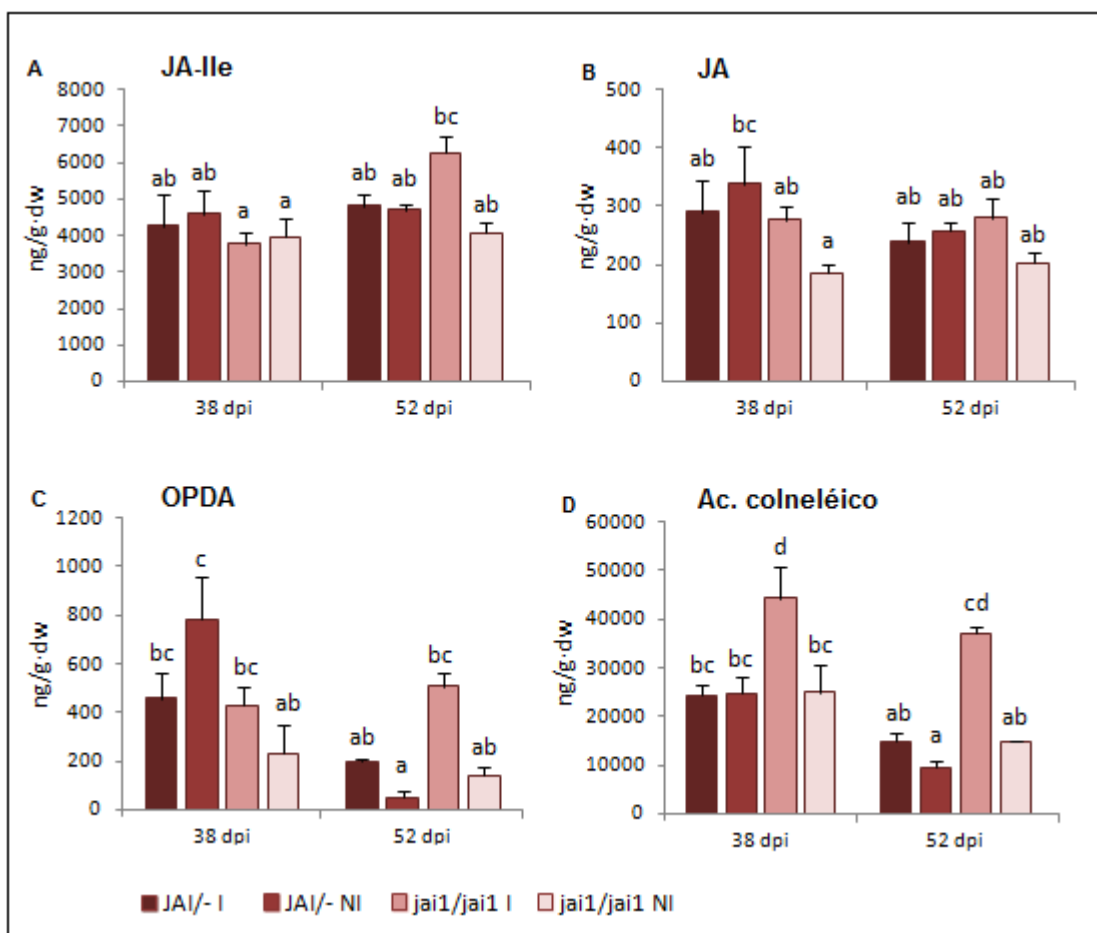


Figura X: Análisis del contenido endógeno de JA-Ile (**gráfica A**), JA (**gráfica B**), OPDA (**gráfica C**) y ácido colneléico (**gráfica D**) en raíz de plantas sensibles *JAI/-* e insensibles *jai1/jai1* a JA, inoculadas y no inoculadas con *G. intraradices*, y cosechadas a 38 y 52dpi. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

2.4.3 Efectos sobre la micorrización y el patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 9-LOX debidos a la aplicación exógena de MeJA en plantas mutantes de tomate *spr-2*.

Los resultados obtenidos en el análisis del patrón de expresión de los genes involucrados en el metabolismo 9-LOX durante el proceso de micorrización en plantas de tomate de tipo silvestre sugieren que la expresión de *LOXA*, *LeAOS3* y *PIN II* (de respuesta a JA) parecen depender de un cierto grado de colonización fúngica, si bien, este patrón no se observa para el gen *LeDES*. Por otra parte, el análisis de micorrización de las plantas mutantes deficientes en la síntesis de JA mostró una menor susceptibilidad a la colonización fúngica de estas plantas respecto al tipo silvestre, mientras que, por el contrario, las plantas mutantes alteradas en la percepción de JA se micorrizaron más rápidamente, siendo esta aparente contradicción posiblemente debida a un doble papel regulador (negativo y positivo) del JA durante el proceso de micorrización. Para comprobar si las plantas *spr-2* revertían su incapacidad parcial para formar micorrización con la aplicación de JA, se decidió estudiar el efecto sobre la micorrización y la capacidad de respuesta de las plantas *spr-2* a la aplicación exógena de MeJA con el objeto de esclarecer, en lo posible, el doble papel regulador del JA durante el proceso de colonización de los hongos AM.

Se ensayaron dos concentraciones diferentes 0,1 μ M y 5 μ M de MeJA sobre el sustrato de crecimiento de plantas de tomate Castlemart (tipo silvestre) y *spr-2* inoculadas con *G. intraradices*, añadiéndose a razón de dos veces por semana, y con un volumen de 20ml por maceta para cada aplicación, siendo las plantas cosechadas a los 40 dpi. Para este ensayo, solamente se determinó el porcentaje de raíz micorrizada como parámetro de micorrización. La aplicación de MeJA sobre el sustrato no afectó significativamente al crecimiento de las plantas (figura XI, gráficas B y C).

Los datos obtenidos del análisis del porcentaje de raíz micorrizada mostraron una recuperación parcial de la micorrización en las plantas *spr-2* tratadas con la dosis 0,1 μ M de MeJA respecto a las plantas silvestres. Sin embargo, dicha recuperación no se observó para las plantas tratadas con la dosis 5 μ M que presentaron valores similares de micorrización que las plantas *spr-2* sin tratar (figura XI, gráfica A).

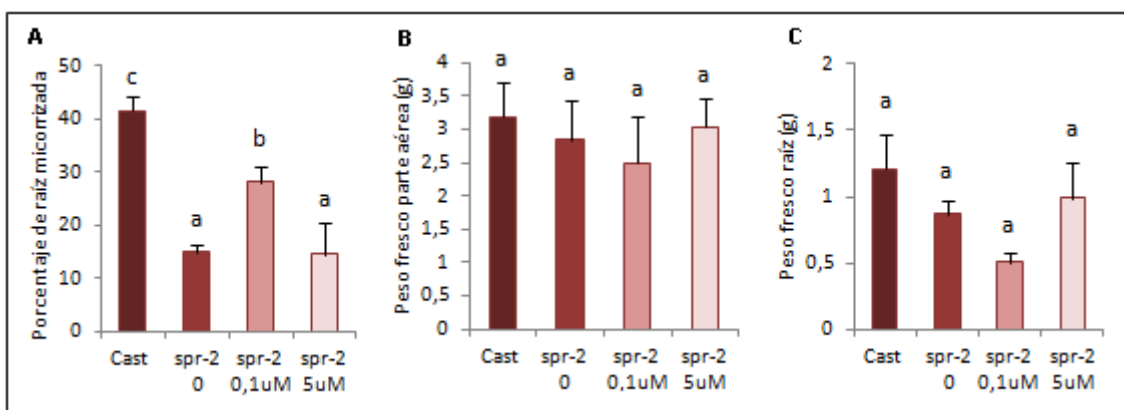


Figura XI: Porcentaje de raíz micorrizada y parámetros de crecimiento de plantas mutantes de tomate *spr-2* y su línea silvestre isogénica Castlemart, inoculadas con *G. intraradices* y tratadas con soluciones de MeJA 0,1μM y 5μM aplicadas en suelo, y cosechadas a los 40dpi. **Gráfica A:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica B:** Peso fresco de parte aérea. **Gráfica C:** Peso fresco de raíz. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas ± el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

Estos datos se confirmaron con el análisis de expresión de los genes *GinEF* y *GinGS* realizado mediante qRT-PCR, utilizando el gen constitutivo de tomate *Efa1* como gen de referencia para el cálculo de su expresión. El valor M se cuantificó usando el cociente de la expresión de cada gen para cada tratamiento respecto al valor de la expresión de las plantas *spr-2* sin tratar. Los datos obtenidos mostraron una clara correlación entre el porcentaje de raíz micorrizada cuantificado y el análisis de expresión de ambos genes, observándose una recuperación parcial de la micorrización en las plantas *spr-2* tratadas con la dosis 0,1μM de MeJA respecto a las plantas control de tipo silvestre (figura XII, gráficas A y B).

De igual modo que para los genes *GinEF* y *GinGS*, el análisis del patrón de expresión de los genes *LOXA*, *LeAOS3* y *PIN II* se realizó mediante qRT-PCR usando el gen constitutivo de tomate *Efa1* como gen de referencia. El valor M se calculó del mismo modo. Los resultados mostraron un patrón similar en los genes *LOXA*, *LeAOS3* y *PIN II*, que difiere del obtenido para *GinEF* y *GinGS*, observándose una inducción significativa de su expresión en las plantas mutantes *spr-2* tratadas con la dosis 5μM, que alcanzó valores similares a los las plantas silvestres, mientras que en las plantas *spr-2* tratadas con la dosis 0,1μM no se detectaron cambios biológicamente relevantes significativos (valor M entre 1 y -1) en la expresión de ninguno de los genes analizados (figura XII, gráficas B, C y D).

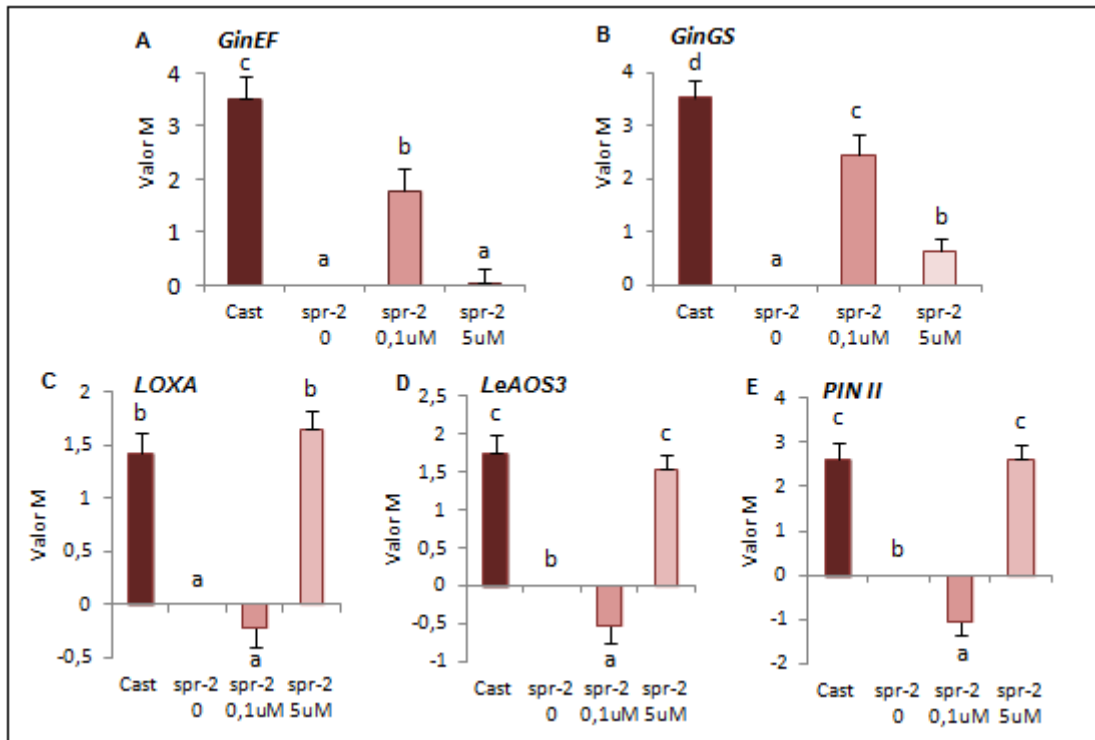


Figura XII: Análisis de expresión de *GinEF*, *GinGS*, *LOXA*, *LeAOS3* y *PIN II* en de plantas mutantes de tomate *spr-2* y su línea silvestre isogénica Castlemart, inoculadas con *G. intraradices* y tratadas con soluciones de MeJA 0,1 μM y 5 μM aplicadas en suelo, y cosechadas a los 40dpi. **Gráfica A:** Análisis de expresión del gen *GinEF* mediante qRT-PCR. **Gráfica B:** Análisis de expresión del gen *GinGs* mediante qRT-PCR. **Gráfica C:** Análisis de expresión del gen *LOXA* mediante qRT-PCR. **Gráfica D:** Análisis de expresión del gen *LeAOS3* mediante qRT-PCR. **Gráfica E:** Análisis de expresión del gen *PIN II* mediante qRT-PCR. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas ± el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

3. PARTICIPACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN EL METABOLISMO 13-LOX DE OXILIPINAS DURANTE EL PROCESO DE MICORRIZACIÓN

Una vez analizado el patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 9-LOX de oxilipinas durante el proceso de micorrización arbuscular en tomate, se planteó realizar un estudio paralelo del comportamiento de los genes implicados en la síntesis de la vía 13-LOX, con el objeto de comparar el patrón de expresión de genes de ambas rutas y, de este modo, aportar nuevos conocimientos acerca de la influencia del conjunto de oxilipinas durante el desarrollo de la simbiosis AM. La rama 13-LOX, derivada de la vía iniciada por la enzima AOS, es la responsable de la formación del JA y su conjugado activo, el ligando jasmonil-isoleucina. En plantas, el JA y sus derivados modulan múltiples aspectos del desarrollo vegetal, participando además en la mediación de procesos de respuesta frente al ataque de organismos herbívoros y procesos de defensa frente a microorganismos patógenos. Por otra parte, el JA, en coordinación con el etileno, es también mediador en la respuesta sistémica inducida (ISR) por rizobacterias y otros microorganismos simbioses. En cuanto a su participación en el proceso de formación de micorriza arbuscular, varios estudios han demostrado su implicación, señalando un papel fundamental en el desarrollo de los arbusculos arbuscular (Isayenkov y col., 2005; Tejeda-Sartorius y col., 2008) y en la regulación de la colonización de las raíces por hongos AM mediante la inducción de genes codificantes de proteínas relacionadas con la respuesta defensiva (Herrera-Medina y col., 2008).

En este contexto, se decidió llevar a cabo un análisis del patrón de expresión de los genes involucrados en la vía 13-LOX de oxilipinas durante diferentes estadios del desarrollo de la simbiosis tanto en plantas silvestres como en plantas mutantes alteradas en la síntesis y en la percepción de ácido jasmónico, así como también investigar el posible efecto sistémico sobre la expresión de estos genes, inducido en la raíz tras la micorrización. Para todo ello se utilizaron las mismas plantas de los experimentos de micorrización desarrollados para determinar el patrón de expresión de los genes involucrados en la vía 9-LOX de oxilipinas y descritos en el capítulo anterior. En este sentido, durante la exposición de los resultados de este capítulo se describirán brevemente aquellos correspondientes a los parámetros de micorrización, a modo de recordatorio y para facilitar el entendimiento del patrón de expresión de los genes de la

vía 13-LOX, ya que el análisis exhaustivo de los parámetros de micorrización se ha presentado en el capítulo anterior (capítulo 2 de resultados).

3.1 Análisis del patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX durante el proceso de micorrización en plantas de tomate.

Para determinar la participación de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX durante el proceso de micorrización se realizó un estudio de la expresión de dichos genes durante diferentes fases del desarrollo de la simbiosis de plantas de tomate silvestres de la variedad Ailsa Craig inoculadas con *G. intraradices*. De este modo, se siguió la evolución de la micorrización durante tres cosechas, 36, 50 y 65 días posteriores a la inoculación (dpi), y se analizó la expresión de los genes involucrados en la síntesis de la vía 13-LOX en esos tiempos de cosecha. Los genes analizados fueron: *LOXD*, codificante de una lipoxigenasa responsable de la adición de una molécula de oxígeno en el C-13 del ácido linoleico o linolénico; *AOS1* y *AOS2*, codificantes para aleno óxido sintetas que catalizan la conversión de 13-HPOT/D a 12,13-EOT/D en la vía 13-LOX; *AOC*, que codifica para una aleno óxido ciclasa responsable de la síntesis de 12-OPDA; y *OPR3*; codificante para una OPDA reductasa que cataliza la conversión de 12-OPDA en OPC-8:0, el cual es transformado en JA tras tres ciclos de β -oxidación (ver figura XI de introducción). Además, también se analizó la expresión del gen *PIN-II*, de respuesta a JA.

Las plantas inoculadas mostraron una dinámica de colonización típica, observándose un aumento en el tiempo de todos los parámetros de micorrización analizados (figura I). El porcentaje de raíz micorrizada osciló entre el 10% a los 36 dpi hasta el 56% a los 65 dpi (figura I, gráfica A). La frecuencia de micorrización alcanzó valores próximos al 100% a los 65 dpi, siendo la intensidad de micorrización cercana al 45% para ese mismo tiempo (figura I, gráficas B y C). La intensidad arbuscular en la zona colonizada presentó valores muy similares a la intensidad de micorrización oscilando entre el 7% a los 36 dpi y el 38% a los 65dpi (figura I, gráfica D). La actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%), mostró valores cercanos al 25% a los 50dpi y al 45% para el último tiempo de cosecha (figura I, gráfica E).

El patrón de expresión de los genes involucrados en el metabolismo 13-LOX, además de *PIN-II* de respuesta a JA, se realizó mediante qRT-PCR, usando como gen de referencia para la cuantificación de su expresión, formulada como valor M, el gen constitutivo *Efa1* de tomate. Para el cálculo del valor M se utilizó el cociente de la expresión de los genes analizados en plantas micorrizadas respecto a la expresión de dichos genes en plantas control no micorrizadas para cada tiempo de cosecha.

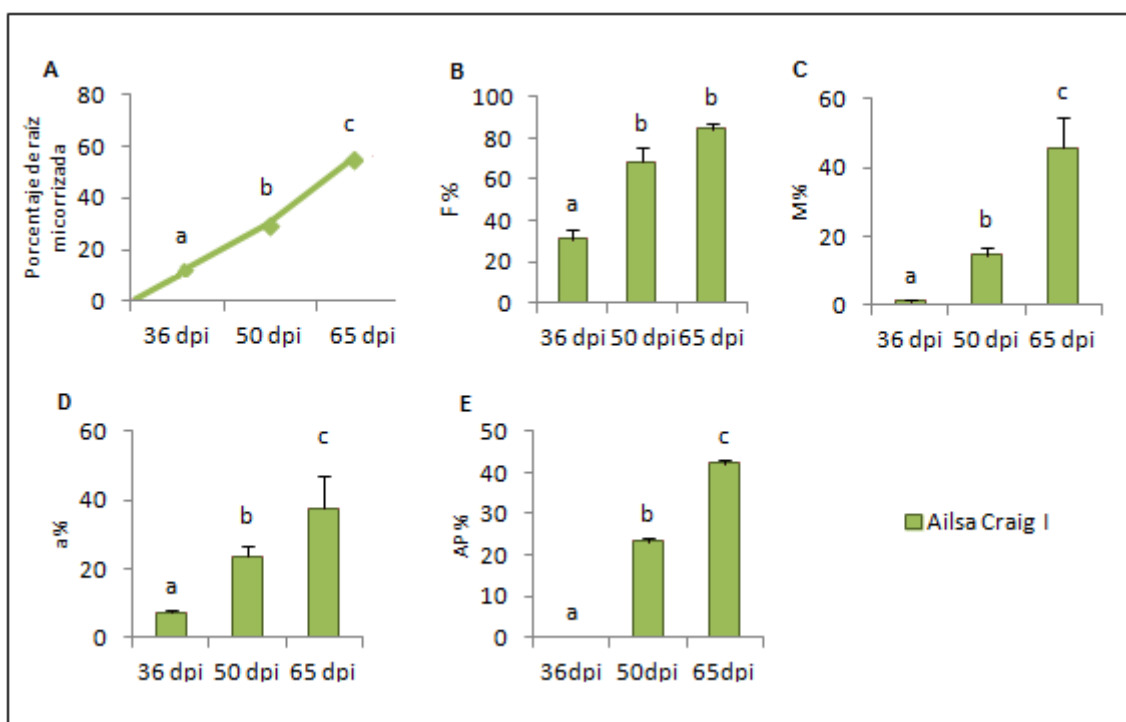


Figura I: Parámetros de micorrización de plantas de tomate silvestres de la variedad Ailsa Craig inoculadas con *G. intraradices*, cosechadas a 36, 50 y 65 dpi. **Gráfico A:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfico B:** Frecuencia de micorrización (F%). **Gráfico C:** Intensidad de micorrización (M%). **Gráfico D:** Intensidad de arbusculos en la zona colonizada. **Gráfico E:** Porcentaje de actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%). Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

La expresión de *LOXD* para los dos primeros tiempos de cosecha (36 y 50 dpi) en las plantas micorrizadas no sufrió cambios respecto a los controles no inoculados (valor $M < 1$), detectándose una ligera represión de la expresión en las plantas micorrizadas a los 65 dpi (2.3 veces; valor M -1.54) (figura II, gráfica A). El análisis de expresión de *AOS1* mostró una inducción de 2.5 veces en las plantas micorrizadas frente a las no micorrizadas a los 36 dpi, si bien para el resto de tiempos analizados en el experimento no se observaron cambios.

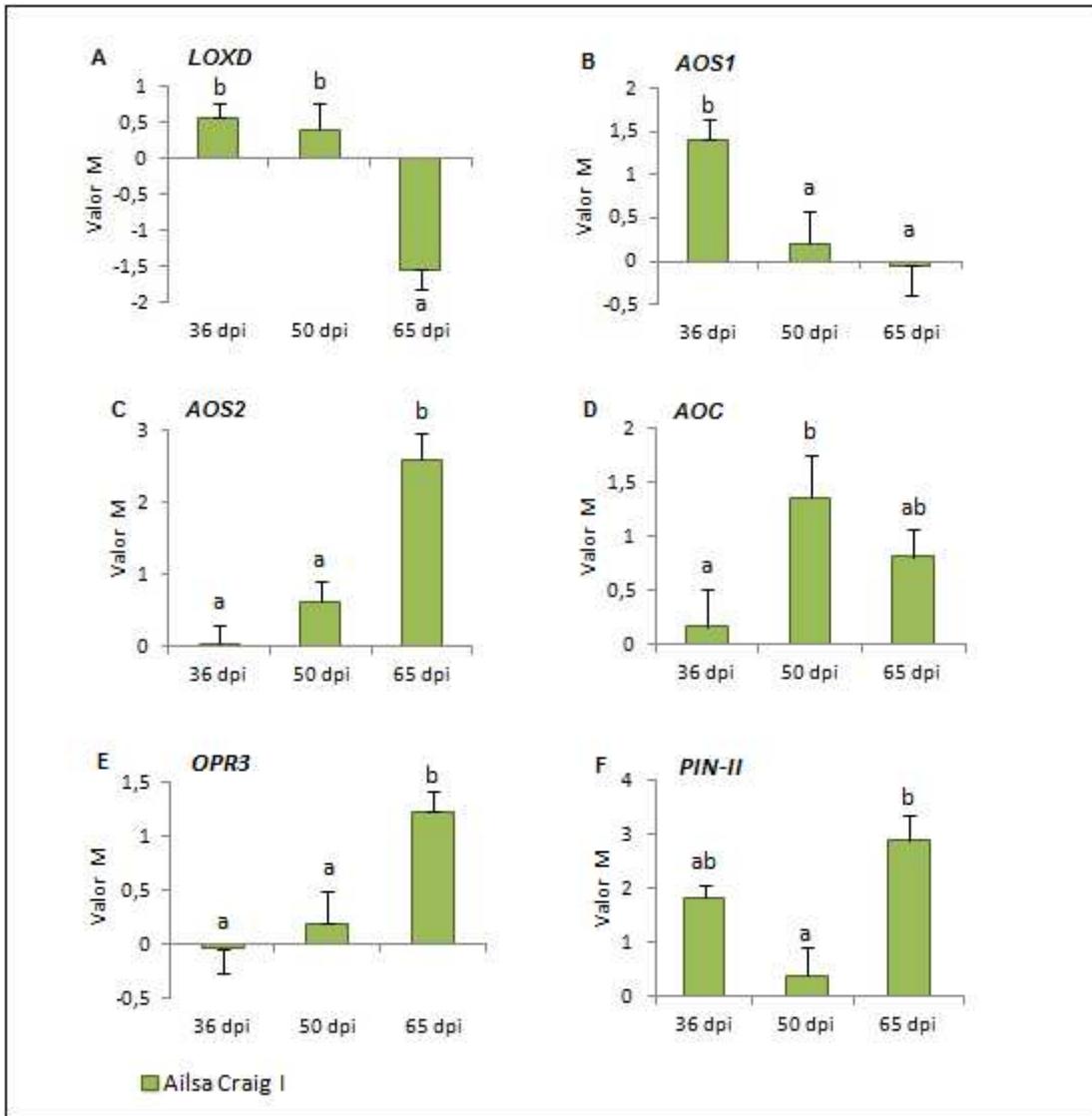


Figura II: Análisis de expresión de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX en plantas de tomate silvestres de la variedad Ailsa Craig inoculadas con *G. intraradices*, cosechadas a 36, 50 y 65dpi. **Gráfica A:** Análisis de expresión del gen *LOXD* mediante qRT-PCR. **Gráfica B:** Análisis de expresión del gen *AOS1* mediante qRT-PCR. **Gráfica C:** Análisis de expresión del gen *AOS2* mediante qRT-PCR. **Gráfica D:** Análisis de expresión del gen *AOC* mediante qRT-PCR. **Gráfica E:** Análisis de expresión del gen *OPR3* mediante qRT-PCR. **Gráfica F:** Análisis de expresión del gen *PIN-II* mediante qRT-PCR. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

Por el contrario, la expresión de *AOS2* no sufrió variaciones biológicamente relevantes (valor M entre -1 y 1) entre plantas micorrizadas y no micorrizadas durante los dos primeros tiempos de cosecha, detectándose una expresión seis veces superior en las plantas inoculadas respecto a las no inoculadas a los 65 dpi (figura II, gráfica C). Un patrón similar se observó para *OPR3*, cuya expresión solo se vio inducida (1.5 veces) a

los 65 dpi en las plantas micorrizadas (figura II, gráfica E). En cuanto al análisis de expresión de *AOC*, éste mostró una ligera inducción a los 50 y 65 dpi en las plantas micorrizadas frente a los controles no micorrizados, no apreciándose diferencias en la expresión entre plantas inoculadas y no inoculadas en el primer tiempo de cosecha (figura II, gráfica D). Por su parte, en el análisis de expresión del gen *PIN-II*, gen de respuesta a JA, se observó una inducción en las plantas inoculadas tanto a los 36 como a los 65 dpi respecto a sus controles no inoculados de la misma edad, mientras que para el segundo tiempo de cosecha no se detectaron diferencias entre la expresión en plantas micorrizadas y no micorrizadas (valor $M < -1$ y cercano a 0) (figura II, gráfica F).

3.2 Análisis del posible efecto sistémico sobre la expresión de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX debido a la formación de Micorriza Arbuscular en plantas de tomate.

Para determinar el posible efecto sistémico en la expresión de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX producido por el proceso de micorrización, se realizó un estudio de la expresión de dichos genes en el sistema de cultivo de raíces compartimentalizadas utilizado para el estudio del patrón de expresión de los genes involucrados en la vía 9-LOX (capítulo 2 de resultados). En este sistema, tan solo uno de los compartimentos de las plantas micorrizadas se inoculó con *G. intraradices*. Como control se utilizaron plantas de tomate silvestres con raíces compartimentalizadas en las que ninguno de los dos compartimentos fue micorrizado.

El análisis de los parámetros de micorrización, realizado en tres cosechas: 40dpi, 54dpi y 75dpi, mostró una dinámica de colonización típica en las plantas micorrizadas. El porcentaje de raíz micorrizada presentó valores entre un 12% a los 40dpi y un 53% a los 75dpi (figura III, gráfica B). La frecuencia alcanzó valores cercanos al 100% a los 54dpi (figura III, gráfica C), siendo la intensidad de micorrización del 7% a los 40dpi, del 35% a los 54dpi y del 48% para el último tiempo de cosecha (figura III, gráfica D). La intensidad de arbusculos en la zona colonizada, indicador indirecto de la eficiencia de la micorrización, mostró valores cercanos al 60% para el último tiempo de cosecha, presentando ya valores altos a los 54dpi (54%, figura III, gráfica E).

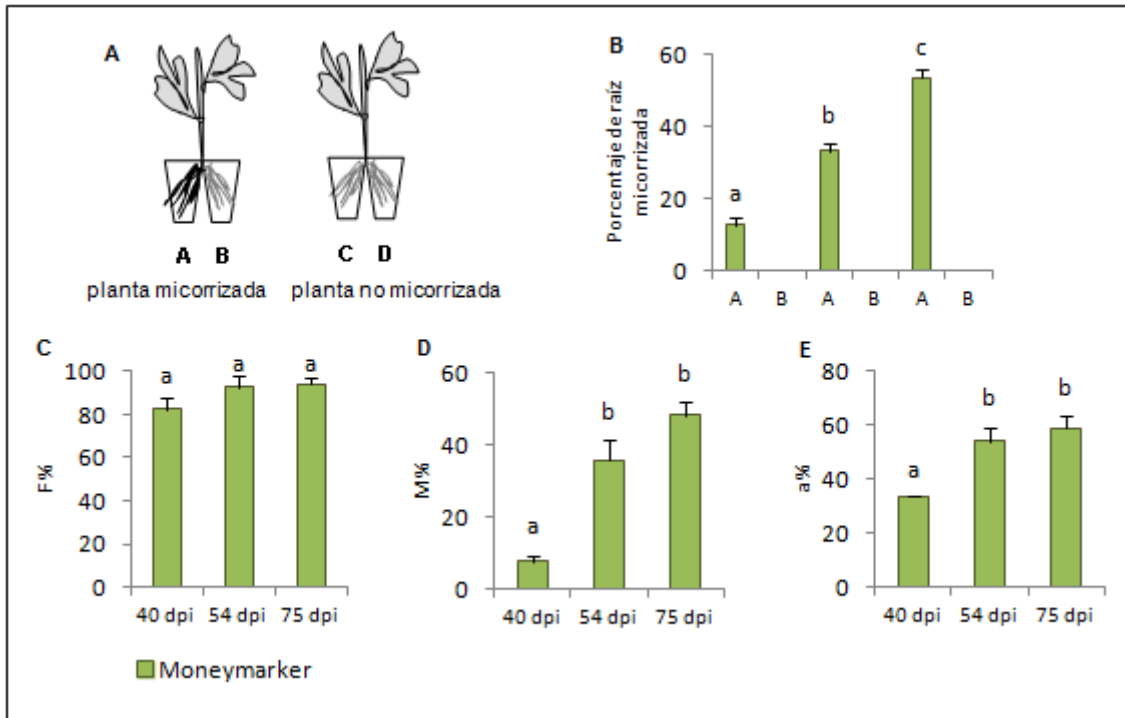


Figura III: Parámetros de micorrización de plantas de tomate silvestres de la variedad Moneymarker en sistema de compartimentalización de raíces inoculadas con *G. intraradices*. **Gráfica A:** Esquema de sistema de compartimentalización de raíces. **Gráfica B:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica C:** Frecuencia de micorrización (F%). **Gráfica D:** Intensidad de micorrización (M%). **Gráfica E:** Intensidad arbuscular en la zona colonizada (a%). Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

El patrón de expresión de los genes involucrados en el metabolismo 13-LOX se analizó mediante la cuantificación del nivel de acumulación de transcrito usando la técnica qRT-PCR. Como gen de referencia se utilizó el gen constitutivo *EFa1* de tomate. El cálculo del valor M se llevó a cabo mediante el cociente de la expresión de cada gen analizado en cada compartimento respecto de la expresión de dichos genes en el compartimento C, no micorrizado, del primer tiempo de cosecha (40dpi), de ahí que la expresión de dichos genes a 40 dpi tenga un valor $M=0$ en el compartimento C (figura IV, gráfica A). Así, la expresión de *LOXD* no sufrió grandes variaciones en su expresión entre las plantas micorrizadas y no micorrizadas a los 40 dpi (valor M entre -1 y 1), observándose una ligera inducción en el compartimento micorrizado a los 54 dpi, y una represión de su expresión también en el compartimento micorrizado a los 75 dpi (figura IV, gráfica A).

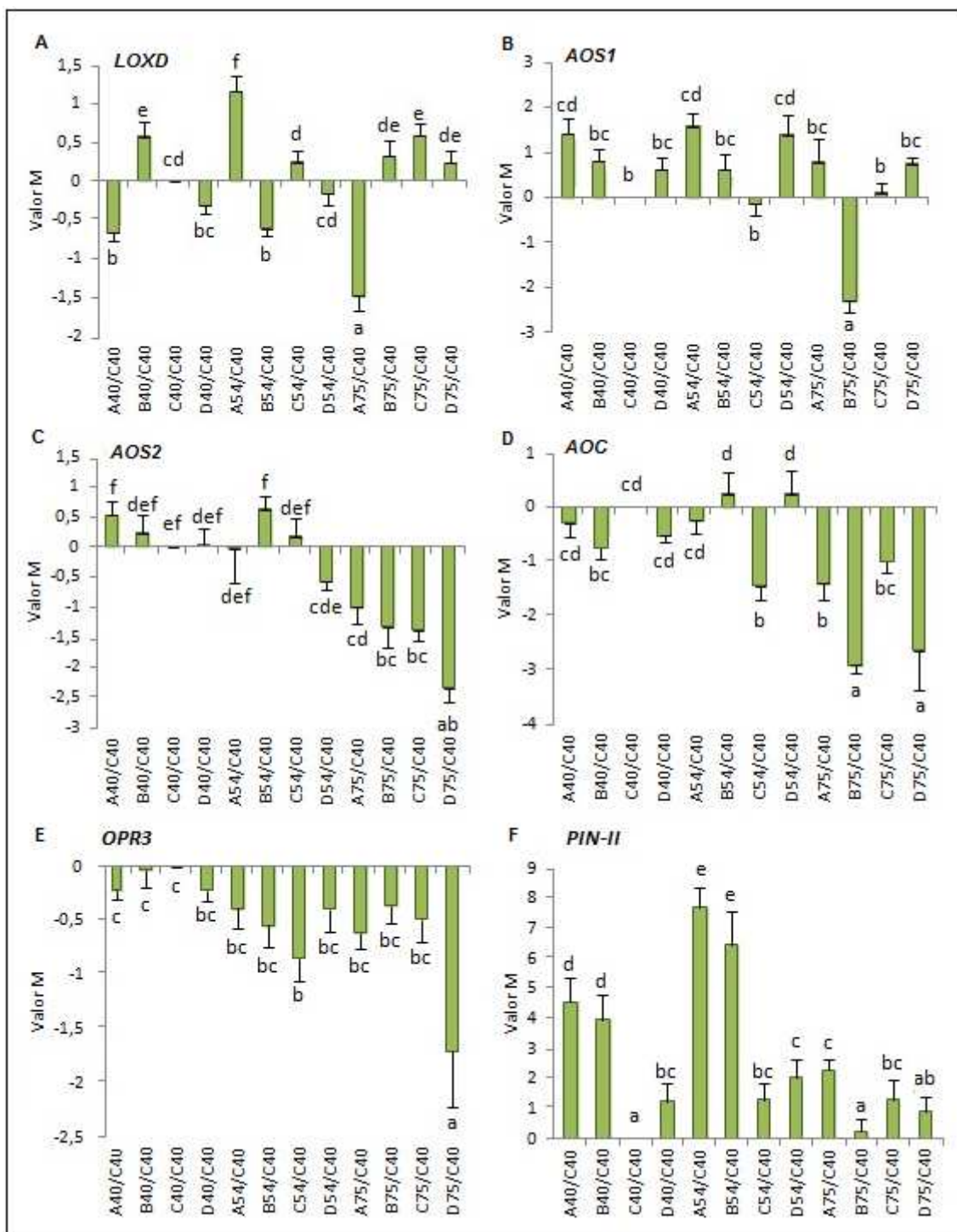


Figura IV: Análisis de expresión del efecto sistémico/local en el patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX en plantas de tomate silvestres de la variedad Moneymarker en sistema de compartimentalización de raíces. **Gráfica A:** Análisis de expresión del gen *LOXD* mediante qRT-PCR. **Gráfica B:** Análisis de expresión del gen *AOS1* mediante qRT-PCR. **Gráfica C:** Análisis de expresión del gen *AOS2* mediante qRT-PCR. **Gráfica D:** Análisis de expresión del gen *AOC* mediante qRT-PCR. **Gráfica E:** Análisis de expresión del gen *OPR3* mediante qRT-PCR. **Gráfica F:** Análisis de expresión del gen *PIN-II* mediante qRT-PCR. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas ± el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

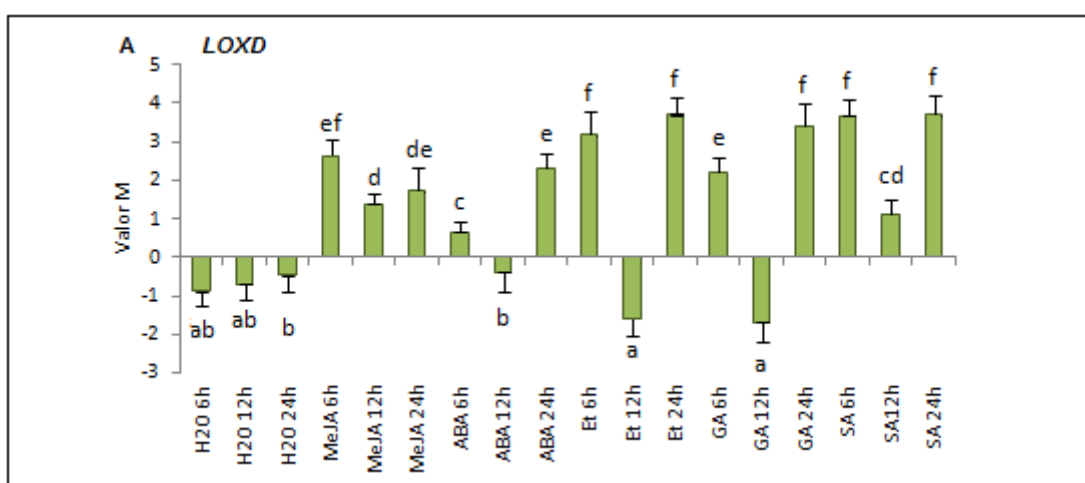
El análisis de expresión de *AOS1* mostró que dicho gen no sufrió cambios significativos de expresión en raíz de los compartimentos inoculados y no inoculados tanto de las plantas micorrizadas como de las plantas control a lo largo del ensayo, salvo una ligera represión detectada para el último tiempo de cosecha en el compartimento no inoculado de las plantas micorrizadas (figura IV, gráfica B). La evolución de la expresión en los genes *AOS2*, *AOC* y *OPR3* fue similar a lo largo del experimento, no observándose diferencias biológicamente relevantes entre los compartimentos inoculados y no inoculados de las plantas micorrizadas y no micorrizadas y advirtiéndose una tendencia significativa a la bajada de la expresión con la edad de las plantas (figura IV, gráficas C, D y E). El análisis de *PIN II* mostró un claro incremento de la expresión de dicho gen tanto en el compartimento inoculado como en el no inoculado de las plantas micorrizadas respecto a las plantas no micorrizadas a los 40 y 54 dpi, observándose en este último tiempo de cosecha un aumento de hasta 200 veces superior (valor M 7,5) en comparación con las plantas control no inoculadas. No se observaron diferencias significativas en la expresión de *PIN II* a los 75 dpi entre plantas micorrizadas y no micorrizadas (figura IV, gráfica F).

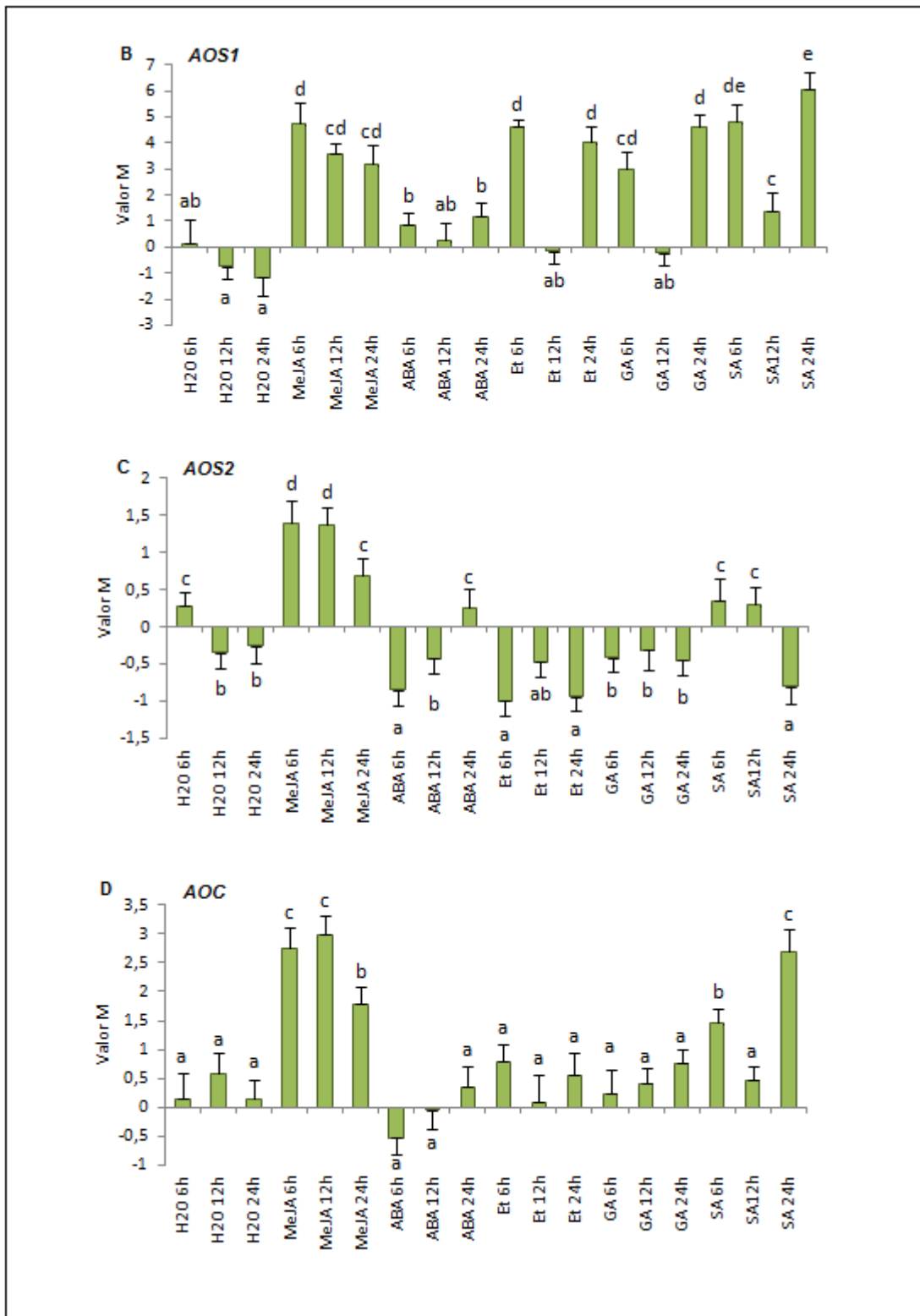
3.3 Análisis de la expresión de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX en respuesta a tratamientos con fitohormonas en plantas de tomate.

De igual modo que en el estudio sobre la participación de los genes involucrados en el metabolismo 9-LOX de oxilipinas durante el proceso de micorrización, se decidió realizar un experimento para determinar la capacidad de respuesta a tratamientos con fitohormonas de los genes involucrados en la vía 13-LOX. Para ello se utilizaron plantas de tomate silvestres de la variedad Moneymarker sin micorrizar. Las plantas de tomate fueron tratadas con una dosis única de MeJA (50 μ M), ABA (75 μ M), Et (70 μ M), GA (5 μ M) y SA (0,5mM) y cosechadas a las 6, 12 y 24 h posteriores al tratamiento. El análisis de la expresión génica de los genes de la vía 13-LOX en respuesta a los tratamientos hormonales se realizó mediante qRT-PCR, en plantas de tomate silvestres de 40 días de edad, usando como gen de referencia para la cuantificación de su expresión, formulada como valor M, el gen constitutivo *EF α 1* de tomate. Para el cálculo del valor M se utilizó el cociente de la expresión de los genes seleccionados para cada

tratamiento hormonal respecto de la expresión de dichos genes a tiempo 0 en las plantas control sin tratar.

El análisis de expresión del gen *LOXD* mostró que dicho gen incrementa su expresión de manera moderada y mantenida en el tiempo en respuesta al tratamiento con MeJA. Además, también respondió a los tratamientos con ABA, Et, GA y SA. En estos casos, se observó una respuesta temprana (6h) y moderada al tratamiento hormonal que decreció significativamente a las 12 h, detectándose un nuevo pico de inducción a las 24 h después de la aplicación (figura V, gráfica A). El patrón de expresión de *AOS1* fue muy similar al observado en *LOXD*. De este modo, se produjo un incremento de la expresión en el tratamiento con MeJA, que en este caso fue superior al detectado para *LOXD* (hasta 26 veces, valor M 4,7). En cuanto a la respuesta a los otros tratamientos hormonales, el análisis de expresión siguió el mismo patrón que el observado para *LOXD*, con excepción del tratamiento con ABA que no provocó cambios significativos en los niveles de expresión de *AOS1* (figura V, gráfica B). Por su parte, *AOS2* solo respondió positivamente al tratamiento con MeJA, siendo esta inducción leve (valor M 1,5) y transitoria (figura V, gráfica C). El análisis de expresión de *AOC* mostró que este gen incrementó su expresión de manera moderada en respuesta a MeJA a las 6h después de la aplicación, y dicha respuesta decreció ligeramente a las 24h. Además del MeJA, se observó un ligero incremento en la expresión de *AOC* en respuesta a SA a las 6 y 24 h tras la aplicación, de modo similar al detectado para *LOXD* y *AOS1* (figura V, gráfica D). En cuanto a *OPR3*, el tratamiento con MeJA provocó un incremento temprano (6h), y moderado (valor M 1,6) y transitorio de su expresión. Además, la aplicación de SA causó un ligero pero significativo incremento de la expresión de *OPR3* puntual y tardío (24 h) (figura V, gráfica E).





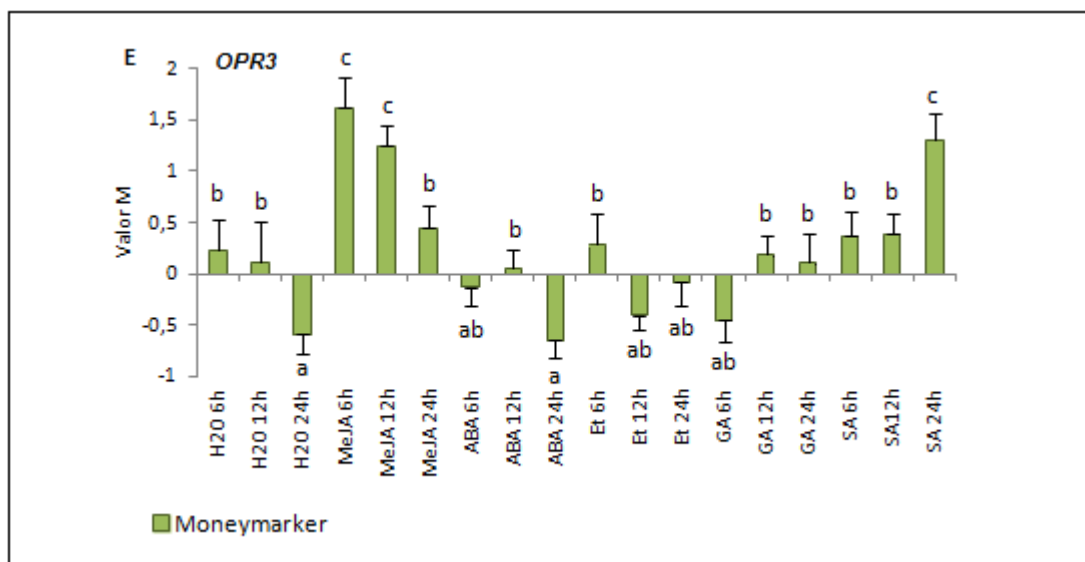


Figura V: Análisis de expresión en respuesta a tratamientos con fitohormonas de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX en plantas de tomate silvestres de 40 días de edad y de la variedad Moneymarker. **Gráfica A:** Análisis de expresión del gen *LOXD* mediante qRT-PCR. **Gráfica B:** Análisis de expresión del gen *AOS1* mediante qRT-PCR. **Gráfica C:** Análisis de expresión del gen *AOS2* mediante qRT-PCR. **Gráfica D:** Análisis de expresión del gen *AOC* mediante qRT-PCR. **Gráfica E:** Análisis de expresión del gen *OPR3* mediante qRT-PCR. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

3.4 Análisis del patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX en plantas mutantes de tomate alteradas en la vía de señalización del JA.

Estudiado el patrón de expresión de los genes involucrados en el metabolismo 13-LOX de oxilipinas, responsable de la formación del JA y su conjugado activo, así como el posible efecto sistémico en la expresión de estos genes producido por el proceso de micorrización y su respuesta a diferentes tratamientos hormonales, se decidió analizar el patrón de expresión de los mismos en plantas mutantes de tomate alteradas en la biosíntesis y/o en la percepción de JA, aprovechando aquellos experimentos realizados para el estudio de la expresión de los genes involucrados en el metabolismo 9-LOX. Así, se utilizaron dos tipos diferentes de líneas mutantes. Por un lado, las líneas *spr-2* y *def-1*, alteradas en la respuesta a JA debido a una insuficiencia en la capacidad de síntesis del mismo (Howe y col., 1996; Li y col., 2004), y por otro, la

línea *jai-1* deficiente en la percepción de JA, causada por un bloqueo de la vía de señalización de esta fitohormona (Li y col., 2001).

3.4.1 Análisis del patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX en plantas mutantes de tomate alteradas en la biosíntesis de JA.

La posibilidad de utilizar plantas alteradas en la capacidad de biosíntesis de JA permitió completar el estudio del patrón de expresión de los genes involucrados en el metabolismo 13-LOX en respuesta a la micorrización arbuscular. De este modo, se siguió la evolución de la micorrización en las plantas de tomate transgénicas *spr-2* y *def-1*, deficientes en la síntesis de JA, aunque afectadas a distinto nivel en la ruta de biosíntesis, y se analizó el patrón de expresión de los genes involucrados en el metabolismo 13-LOX seleccionados. Las plantas se inocularon con *G. intraradices*, realizándose dos cosechas a 38 y 52 dpi.

Las plantas de tomate de la variedad Castlemart, utilizadas como línea isogénica silvestre, mostraron una dinámica de micorrización típica, con valores de porcentaje de raíz micorrizada que oscilaron desde un 30% a los 38 dpi hasta un 67% a los 52 dpi (figura VI, gráfica A), alcanzando una frecuencia de micorrización cercana al 100% al final del experimento (figura VI, gráfica B). La intensidad de micorrización presentó valores del 15% a los 38 dpi, llegando hasta el 55% a los 52 dpi (figura VI, gráfica C), mientras que la intensidad arbuscular en la zona colonizada alcanzó valores del 30% en el primer tiempo de cosecha y del 45% a los 52 dpi (figura VI, gráfica D). La actividad fosfatasa alcalina fúngica mostró valores cercanos al 25% a los 50dpi y al 45% para el último tiempo de cosecha (figura VI, gráfica E). Las plantas transgénicas *spr-2* mostraron valores, para todos los parámetros de micorrización analizados, similares a los determinados para el tipo silvestre en el primer tiempo de cosecha (38dpi), observándose una reducción de todos ellos, excepto de la frecuencia de micorrización, a los 52 dpi (figura VI, gráficas A, B, C, D y E). En cuanto a *def-1*, se detectó un ligero incremento, tanto del porcentaje de raíz micorrizada como de la frecuencia e intensidad de micorrización a los 38 dpi respecto a los valores presentados por el tipo silvestre y la línea transgénica *spr-2*, sin embargo, para el segundo tiempo de cosecha (52 dpi), el análisis de estos parámetros mostró una reducción significativa del porcentaje de micorrización y la intensidad de micorrización respecto al tipo silvestre, aunque con valores superiores a los determinados para *spr-2* (figura VI, gráficas A, B y C).

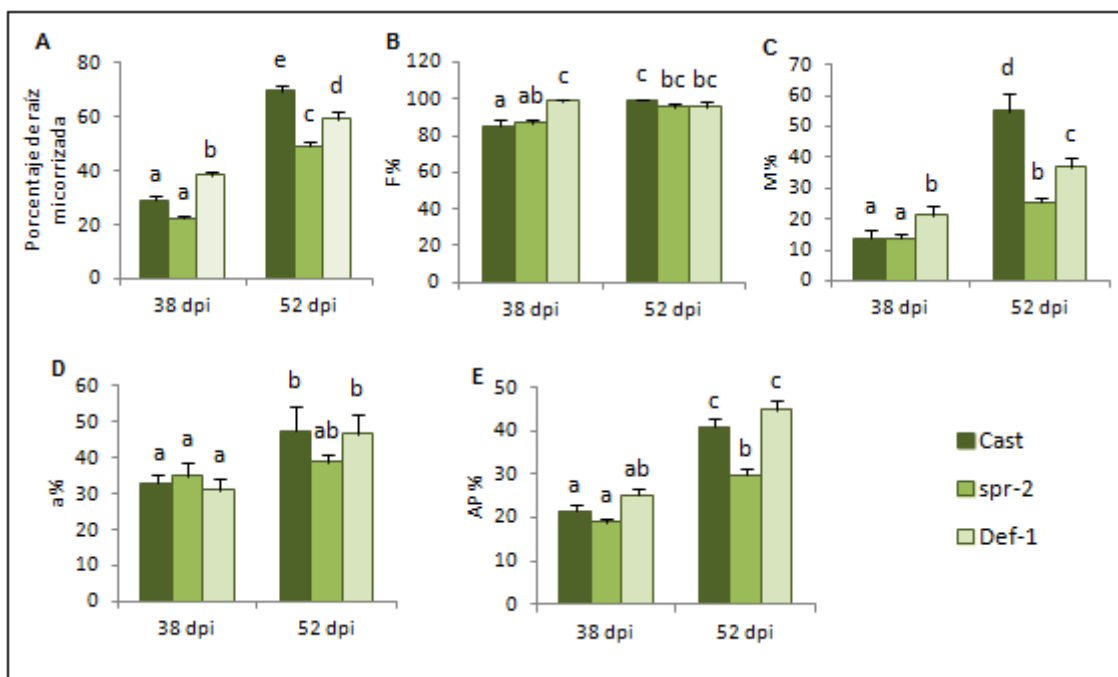


Figura VI: Parámetros de micorrización de plantas mutantes de tomate alteradas en su capacidad de biosíntesis de JA (líneas *spr-2* y *def-1*), y silvestre Castlemart, inoculadas con *G. intraradices*, y cosechadas a 38 y 52 dpi. **Gráfica A:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica B:** Frecuencia de micorrización (F%). **Gráfica C:** Intensidad de micorrización (M%). **Gráfica D:** Intensidad de arbusculos en la zona colonizada. **Gráfica E:** Porcentaje de actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%). Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

Para determinar el patrón de expresión de los genes involucrados en el metabolismo 13-LOX, se analizó el nivel de acumulación de ARNm mediante qRT-PCR, usando el gen constitutivo *EFa1* de tomate como gen marcador de referencia. El cálculo del valor M se realizó mediante el cociente de la expresión de los genes analizados en plantas micorrizadas respecto de la expresión de dichos genes en plantas control no micorrizadas para cada línea y tiempo de cosecha. Los datos obtenidos mostraron un patrón similar para todos los genes involucrados en el metabolismo 13-LOX en las plantas de tipo silvestre, incluido *PIN-II* de respuesta a JA. Así, para el primer tiempo de cosecha (38 dpi) no se observaron diferencias biológicamente relevantes (valor M entre 1 y-1) entre las plantas inoculadas y no inoculadas en la mayoría de los casos, si bien, cuando estas diferencias existieron se produjo una leve disminución de la expresión en las plantas micorrizadas respecto a las no micorrizadas (*LOXD*, *AOS1*). Sin embargo, a los 52 dpi la expresión de todos los genes analizados fue moderadamente superior en las plantas inoculadas respecto a las no inoculadas,

excepto en *AOS2*, en el cual se produjo una leve represión (figura VII, gráficas A, B, C, D, E y F).

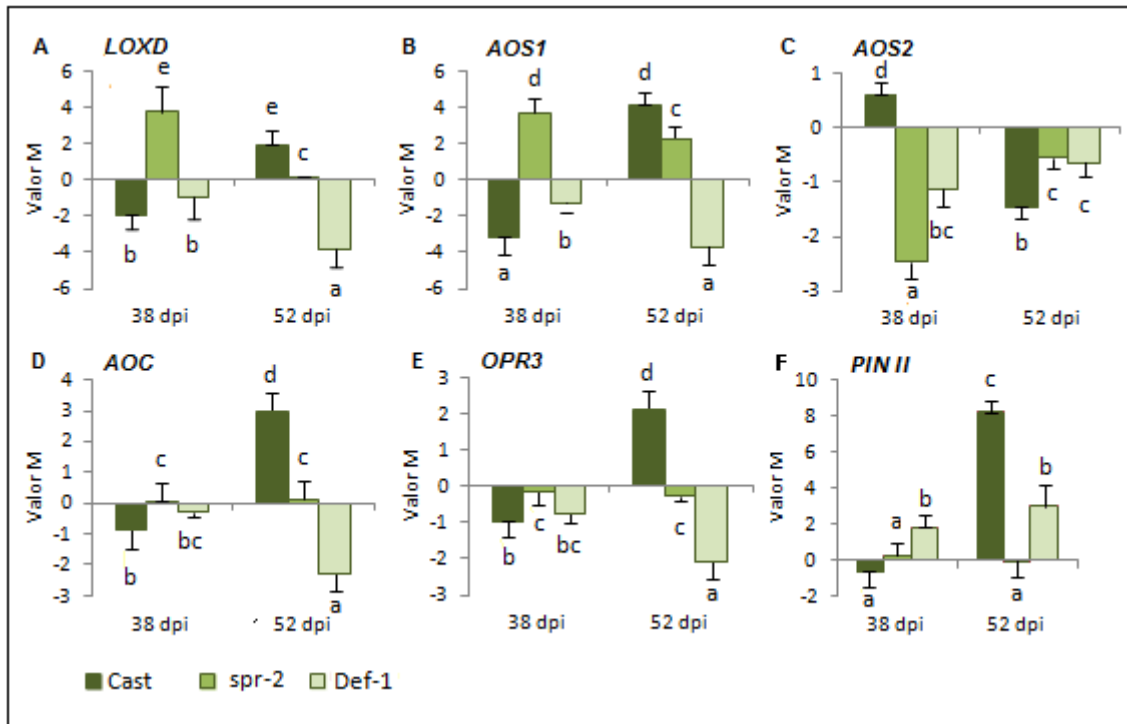


Figura VII: Análisis de expresión génica de los genes involucrados en el metabolismo 13-LOX y *PIN II*, de respuesta a JA, en plantas de tomate mutantes alteradas en la biosíntesis de JA (*spr-2* y *def-1*) y control no transgénico Castlemart, inoculadas con *G. intraradices*, y cosechadas a 38 y 52 dpi. **Gráfica A:** Análisis de expresión del gen *LOXD* mediante qRT-PCR. **Gráfica B:** Análisis de expresión del gen *AOS1* mediante qRT-PCR. **Gráfica C:** Análisis de expresión del gen *AOS2* mediante qRT-PCR. **Gráfica D:** Análisis de expresión del gen *AOC* mediante qRT-PCR. **Gráfica E:** Análisis de expresión del gen *OPR3* mediante qRT-PCR. **Gráfica F:** Análisis de expresión del gen *PIN II* mediante qRT-PCR. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

En cuanto a los mutantes *spr-2*, el análisis de expresión mostró un incremento relevante y significativo de la expresión en las plantas micorrizadas respecto a las no micorrizadas de los genes *LOXD* y *AOS1* para el primer tiempo de cosecha (38 dpi), que decreció en el tiempo (52 dpi) (figura VII, gráficas A y B). Por el contrario, el análisis de *AOS2* indicó una disminución de la expresión en las plantas inoculadas frente a las no inoculadas a los 38 dpi, no observándose esas diferencias biológicamente relevantes para el segundo tiempo de cosecha (figura VII, gráfica C). En mutantes *spr-2*, la expresión de los genes *AOC*, *OPR3* y *PIN-II* no sufrió variaciones en la expresión entre las plantas micorrizadas y no micorrizadas a lo largo de todo el ensayo (figura VII, gráficas D, E y F). El patrón de expresión en los mutantes *def-1* fue similar en todos los

genes analizados. En este sentido, no se observaron diferencias biológicamente significativas entre las plantas inoculadas y no inoculadas a los 38 dpi en ninguno de los genes analizados (valores de M siempre entre 1 y -1), con excepción de un ligero incremento en la expresión de *PIN-II*. Para el segundo tiempo de cosecha, se detectó una disminución moderada en la expresión de todos los genes involucrados en el metabolismo 13-LOX en las plantas micorrizadas respecto a no micorrizadas, salvo en *AOS2* donde no se vieron cambios. En cuanto al gen *PIN-II* de respuesta a JA, el análisis de expresión mostró un incremento en plantas *def-1* micorrizadas respecto a no micorrizadas en este segundo tiempo de cosecha (figura VII, gráficas A, B, C, D, E y F).

3.4.2 Análisis del patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX en plantas mutantes de tomate alteradas en la percepción de JA.

Estudiado el patrón de expresión de los genes involucrados en el metabolismo 13-LOX de oxilipinas en plantas alteradas en la capacidad de síntesis de JA, se procedió a analizar la respuesta de estos genes en mutantes afectados en la percepción de la señal mediada por esta fitohormona, con el objeto de completar el estudio del comportamiento de dichos genes en el proceso de micorrización. De este modo, se siguió la evolución de la micorrización en plantas de tomate silvestres *JAI/-* (sensibles a JA) y en plantas mutantes *jai1/jai1* (insensibles a JA) inoculadas con *G. intraradices*, realizándose dos cosechas: 38 y 52 dpi, y se analizó el patrón de expresión de los genes involucrados en el metabolismo 13-LOX seleccionados.

El análisis de todos los parámetros histoquímicos analizados mostró un claro incremento de la micorrización en las plantas de tomate mutantes insensibles a JA para el primer tiempo de cosecha (38 dpi) respecto a las plantas sensibles. Así, se observó un incremento del porcentaje de raíz micorrizada de hasta cuatro veces más en las plantas *jai1/jai1* respecto a la *JAI/-* (figura VIII, gráfica A), alcanzando la frecuencia de micorrización valores cercanos al 100% para las plantas insensibles ya a los 38 dpi (figura VIII, gráfica B). La intensidad de micorrización presentó valores cinco veces superior en las plantas *jai1/jai1* (figura VIII; gráfica C), mientras que la intensidad arbuscular en la zona colonizada fue dos veces mayor (figura VIII; gráfica D). Para el segundo tiempo de cosecha, 52 dpi, se siguió observando valores de todos los parámetros analizados superiores en las plantas insensibles *jai1/jai1* respecto a las

plantas sensibles *JAI*⁻, a excepción de la frecuencia de micorrización que presentaba valores del 100% para ambas líneas (figura VIII, gráficas, A, B, C y D). Además, se cuantificó la eficiencia de la simbiosis mediante la actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%), observándose un incremento tres veces superior de dicha actividad para las plantas insensibles respecto a las plantas sensibles a los 38 dpi. En el segundo tiempo de cosecha no se observaron cambios significativos en la actividad fosfatasa alcalina fúngica entre ambas líneas (figura VIII, gráfica E).

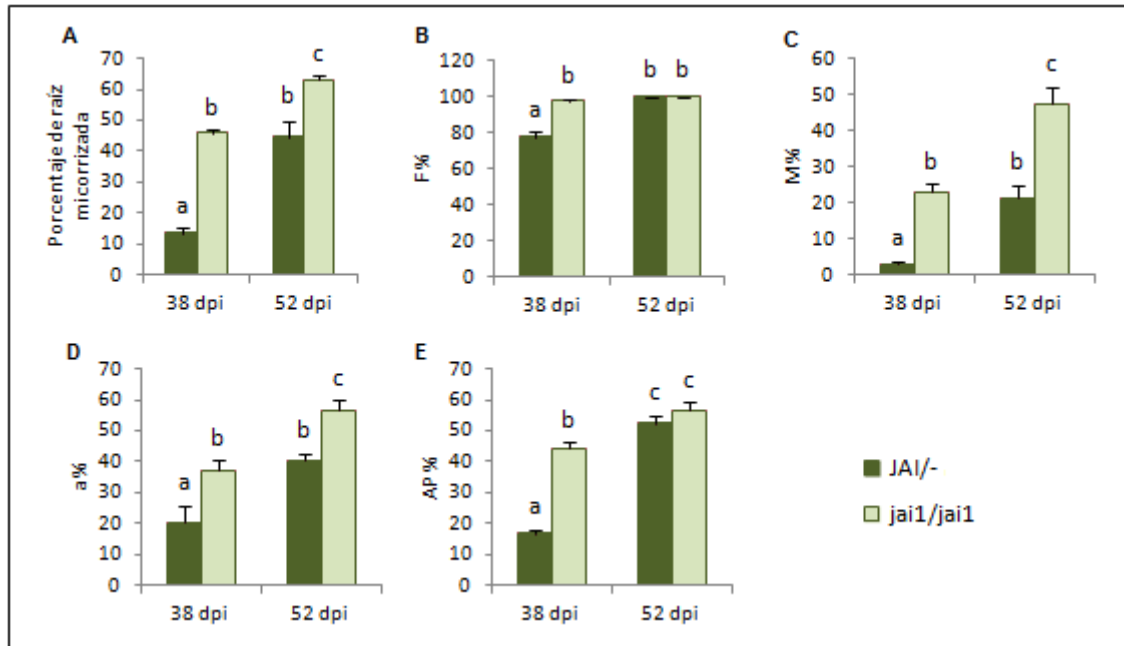


Figura VIII: Parámetros de micorrización de plantas de tomate sensibles (*JAI*⁻) e insensibles a JA (*jai1/jai1*) inoculadas con *G. intraradices*, cosechadas a 38 y 52 dpi. **Gráfica A:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica B:** Frecuencia de micorrización (F%). **Gráfica C:** Intensidad de micorrización (M%). **Gráfica D:** Intensidad de arbusculos en la zona colonizada. **Gráfica E:** Porcentaje de actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%). Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas ± el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

El patrón de expresión de los genes involucrados en el metabolismo 13-LOX se determinó mediante qRT-PCR, utilizando el gen *EFa1* de tomate como gen de referencia. Para el cálculo del valor M se utilizó el cociente de la expresión de los genes analizados en plantas micorrizadas respecto a la expresión de dichos genes en plantas control no micorrizadas para cada tiempo de cosecha. Los datos obtenidos mostraron una leve inducción de *LOXD* (valor M 1.5) en las plantas silvestres micorrizadas respecto a las no micorrizadas a los 38dpi, desapareciendo esas pequeñas diferencias de expresión entre plantas inoculadas y no inoculadas a los 52 dpi (figura IX, gráfica A).

De forma similar, se detectó una inducción moderada de *AOS1* para el primer tiempo de cosecha en las plantas micorrizadas (valor M 2.9), si bien, a los 52 dpi, se apreció un cambio de tendencia, con una ligera represión en su expresión con respecto a las plantas no micorrizadas (figura IX, gráfica B). El análisis del patrón de expresión de los genes *AOS2*, *AOC* y *OPR3* en las plantas silvestres no detectó diferencias de expresión biológicamente importantes entre plantas micorrizadas y los controles no micorrizados a lo largo de todo el experimento (Valor M entre 1 y -1) (figura IX, gráficas C, D y E). En cuanto al análisis de *PIN-II*, se observó una disminución de su expresión en las plantas micorrizadas sensibles a JA respecto a su control no inoculado a los 38 dpi, y un cambio de tendencia posterior, con un incremento significativo a los 52dpi (valor M de 1.5) (figura IX, gráfica F).

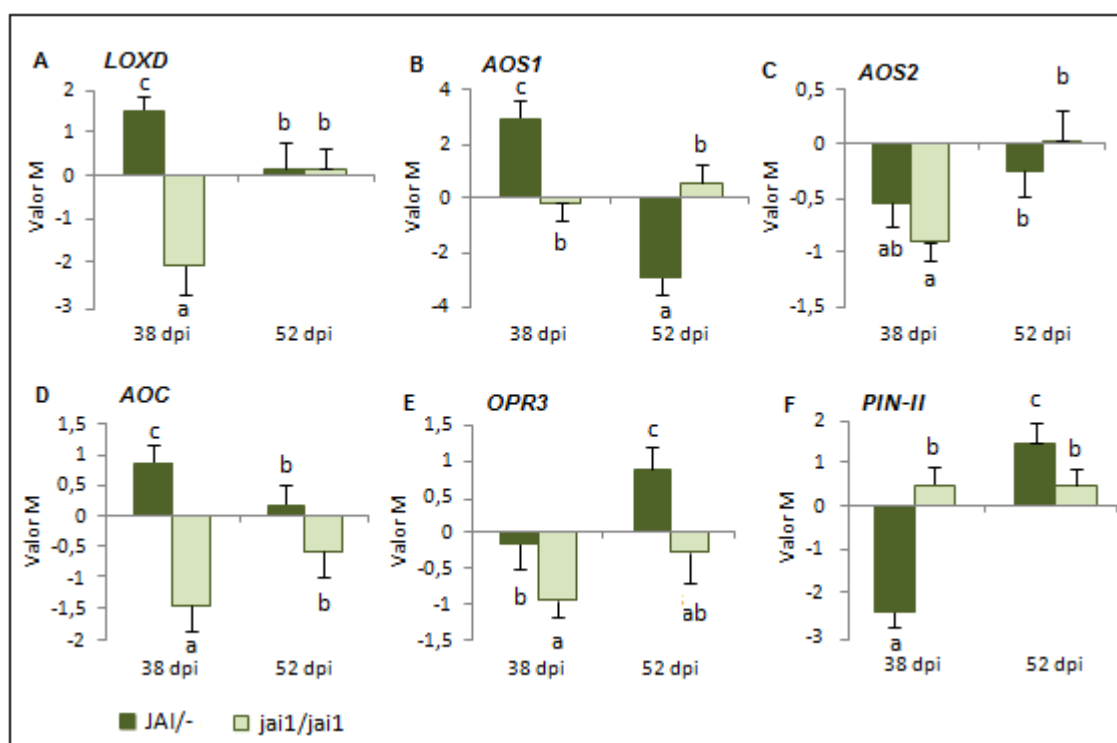


Figura IX: Análisis de expresión génica de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX y *PIN II*, de respuesta a JA, en plantas de tomate sensibles (*JAI/-*) e insensibles a JA (*jai1/jai1*), inoculadas con *G. intraradices*, y cosechadas a 38 y 52 dpi. **Gráfica A:** Análisis de expresión del gen *LOXD* mediante qRT-PCR. **Gráfica B:** Análisis de expresión del gen *AOS1* mediante qRT-PCR. **Gráfica C:** Análisis de expresión del gen *AOS2* mediante qRT-PCR. **Gráfica D:** Análisis de expresión del gen *AOC* mediante qRT-PCR. **Gráfica E:** Análisis de expresión del gen *OPR3* mediante qRT-PCR. **Gráfica F:** Análisis de expresión del gen *PIN II* mediante qRT-PCR. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

El análisis del patrón de expresión de los genes involucrados en el metabolismo 13-LOX en los mutantes *jai1/jai1* insensibles a JA mostró una ligera disminución de la expresión de *LOXD*, *AOC*, *AOS2* y *OPR3* en las plantas micorrizadas respecto a las no micorrizadas para el primer tiempo de cosecha, no observándose cambios relevantes para los genes *AOS1* y *PIN-II*. A los 52 dpi, no se detectaron variaciones biológicamente significativas en la expresión de ninguno de los genes analizados entre las plantas control y las plantas micorrizadas (figura IX, gráficas A, B, C, D y E). De igual modo, no se observaron cambios en la expresión de *PIN-II* entre plantas inoculadas y no inoculadas a lo largo de todo el experimento (figura IX, gráfica F).

3.4.3 Efectos sobre la micorrización y el patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX debidos a la aplicación exógena de MeJA en plantas mutantes de tomate *spr-2*.

Durante el desarrollo de los capítulos 2 y 3 de resultados se ha descrito el posible doble papel regulador (positivo y negativo) del JA durante el proceso de micorrización mediante la utilización de plantas de tomate alteradas en la síntesis y/o percepción de esta fitohormona. En este sentido, se realizó un ensayo de aplicación exógena de MeJA, en diferentes concentraciones, sobre plantas *spr-2* deficientes en la síntesis de JA para comprobar si éstas revertían su incapacidad parcial para formar micorrización con la aplicación de MeJA y esclarecer, en lo posible, ese doble papel regulador del JA durante el proceso de colonización de los hongos AM. En este contexto, se decidió analizar el patrón de expresión de los genes involucrados en el metabolismo 13-LOX de oxilipinas, responsables de la síntesis de JA y su conjugado activo Ile-JA.

Se ensayaron dos concentraciones diferentes, 0,1 μ M y 5 μ M de MeJA que se añadieron sobre el sustrato de crecimiento de plantas de tomate Castlemart (tipo silvestre) y *spr-2* inoculadas con *G. intraradices*, a razón de dos veces por semana, y con un volumen de 20ml por maceta para cada aplicación, siendo las plantas cosechadas a los 40 dpi. Para este ensayo, sólo se determinó el porcentaje de raíz micorrizada como parámetro de micorrización. La aplicación de MeJA sobre el sustrato no afectó significativamente al crecimiento de las plantas, determinado como peso fresco (figura X, gráficas B y C). Los datos obtenidos del análisis del porcentaje de raíz micorrizada mostraron una recuperación parcial de la micorrización en las plantas *spr-2* tratadas con

la dosis 0,1 μ M de MeJA respecto a las plantas silvestres. Sin embargo, dicha recuperación no se observó para las plantas tratadas con la dosis 5 μ M que presentó valores similares al control de las plantas *spr-2* sin tratar (figura X, gráfica A).

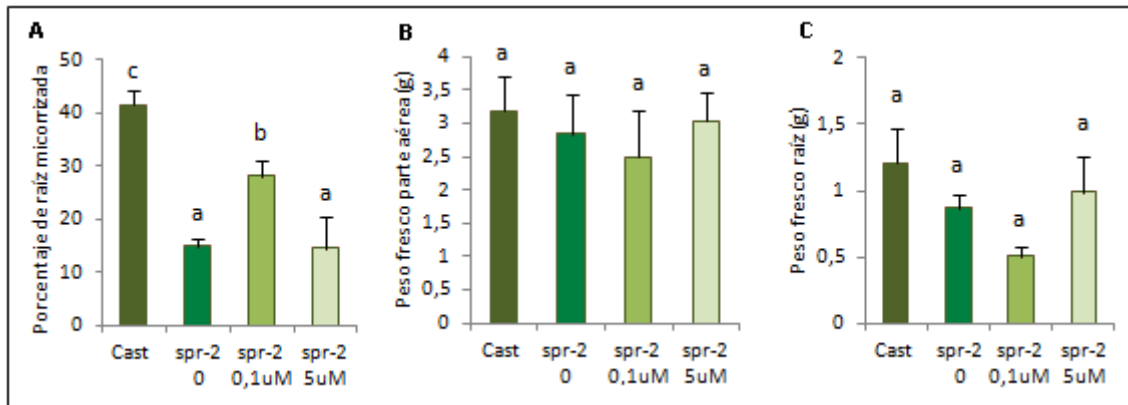


Figura X: Porcentaje de raíz micorrizada y parámetros de crecimiento de plantas mutantes de tomate *spr-2* y su línea silvestre isogénica Castlemart, inoculadas con *G. intraradices* y tratadas con soluciones de MeJA 0,1 μ M y 5 μ M aplicadas en suelo, y cosechadas a los 40dpi. **Gráfica A:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica B:** Peso fresco de parte aérea. **Gráfica C:** Peso fresco de raíz. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

El patrón de expresión de los genes involucrados en el metabolismo 13-LOX se determinó mediante qRT-PCR, utilizando el gen *EFA1* de tomate como gen de referencia. El valor M se cuantificó usando el cociente de la expresión de cada gen para cada tratamiento respecto al valor de la expresión de las plantas *spr-2* sin tratar. Los datos obtenidos mostraron una mayor expresión de todos los genes involucrados en la vía 13-LOX en las plantas de tipo silvestre respecto a la expresión de éstos en las plantas *spr-2*, deficientes en la síntesis de JA, tratadas o sin tratar con MeJA (figura XI, gráficas A, B, C, D y E). Por otra parte, la aplicación con MeJA provocó un aumento similar y moderado de la expresión de los genes *AOS1* y *AOC* (figura XI, gráficas B y D) en los mutantes *spr-2* tratados con MeJA respecto a los controles sin tratar, para ambas dosis de aplicación. Esta inducción también se observó en el gen *OPR3* en las plantas *spr-2* tratadas con la solución 0,1 μ M de MeJA (figura XI, gráfica E). En cuanto a *LOXD* y *AOS2*, no se observaron cambios en su expresión entre plantas *spr-2* sometidas a los diferentes tratamientos y plantas control (valor M entre 1 y -1) (figura XI, gráficas A y C). En cuanto al gen *PIN-II*, de respuesta a JA, se observó una inducción significativa de su expresión en las plantas mutantes *spr-2* tratadas con la

dosis 5 μ M, mientras que en las plantas *spr-2* tratadas con la dosis 0,1 μ M no se detectaron cambios respecto a los mutantes sin tratar (figura XI, gráfica F).

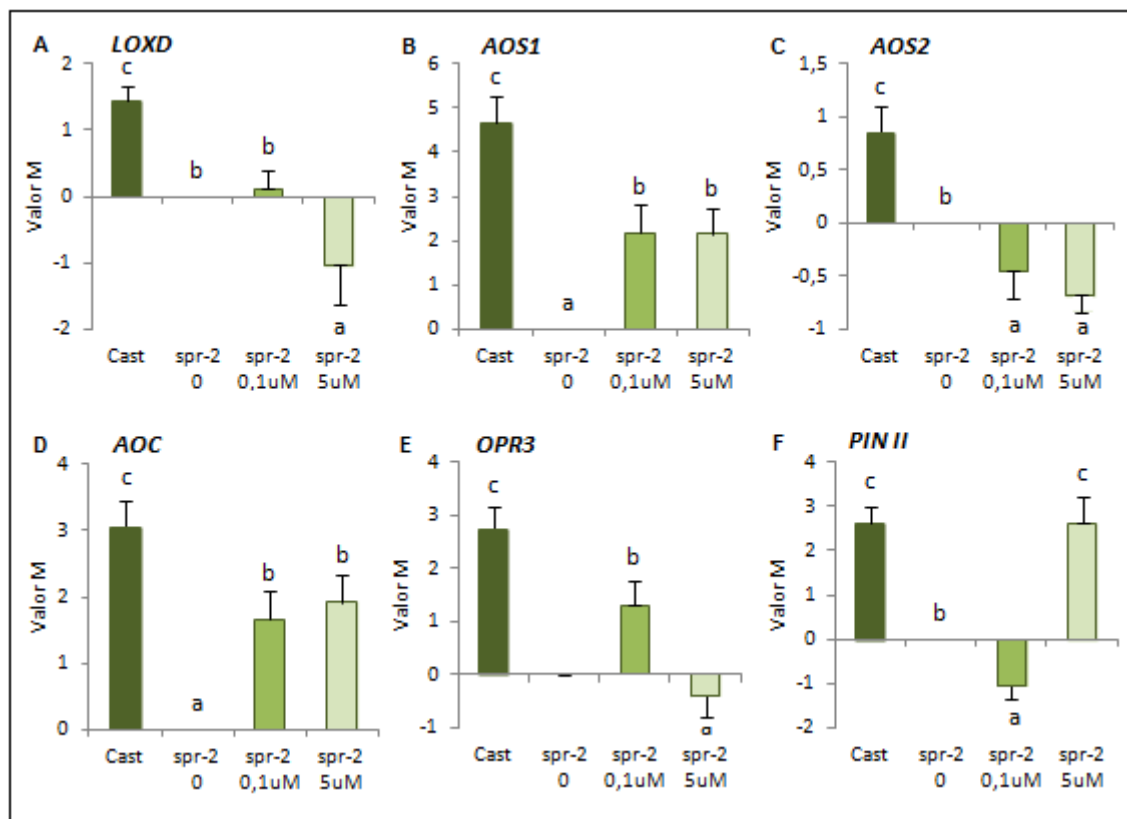


Figura XI: Análisis de expresión génica de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX y *PIN II* en de plantas mutantes de tomate *spr-2* y su línea silvestre isogénica Castlemart, inoculadas con *G. intraradices* y tratadas con soluciones de MeJA 0,1 μ M y 5 μ M aplicadas en suelo, y cosechadas a los 40dpi. **Gráfica A:** Análisis de expresión del gen *LOXD* mediante qRT-PCR. **Gráfica B:** Análisis de expresión del gen *AOS1* mediante qRT-PCR. **Gráfica C:** Análisis de expresión del gen *AOS2* mediante qRT-PCR. **Gráfica D:** Análisis de expresión del gen *AOC* mediante qRT-PCR. **Gráfica E:** Análisis de expresión del gen *OPR3* mediante qRT-PCR. **Gráfica F:** Análisis de expresión del gen *PIN II* mediante qRT-PCR. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

3.5 Análisis del patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX en plantas mutantes de tomate alteradas en la síntesis de ABA.

Diversos estudios han demostrado que el desarrollo y funcionalidad de los arbusculos están relacionados con las vías de síntesis de diferentes hormonas vegetales,

especialmente ABA (Herrera-Medina y col., 2007) y JA (Isayenkov y col., 2005). En este sentido, se decidió realizar un análisis del patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX de oxilipinas, responsable de la formación del JA, en plantas de tomate mutantes alteradas en la síntesis de ABA. Para ello, se llevó a cabo un análisis del patrón de expresión de estos genes en raíces de plantas de tomate de tipo silvestre y mutantes *sitiens*, deficientes en la síntesis de ABA, cosechadas a 37 y 56 días después de la inoculación con *G. intraradices*.

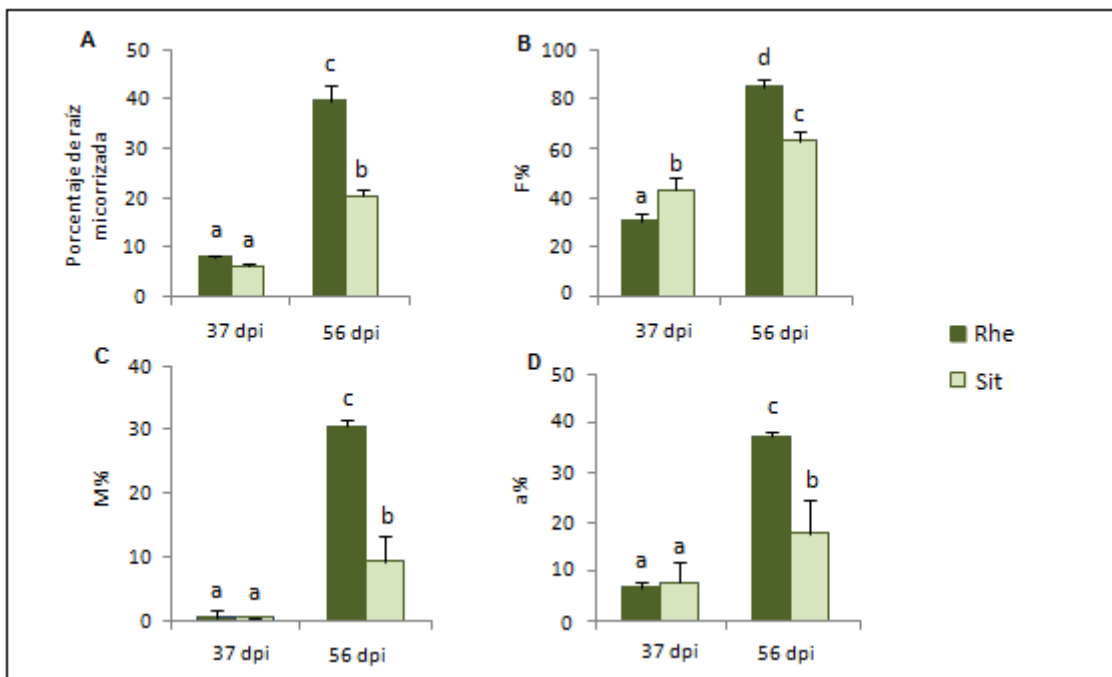


Figura XII: Parámetros de micorrización de plantas de tomate de tipo silvestre y mutantes *sitiens*, inoculadas con *G. intraradices* y cosechadas a 37 y 56 dpi. **Gráfica A:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica B:** Frecuencia de micorrización (F%). **Gráfica C:** Intensidad de micorrización (M%). **Gráfica D:** Intensidad de arbusculos en la zona colonizada. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas más/menos el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

El análisis de los parámetros de micorrización mostró una menor susceptibilidad de las plantas *sitiens* a la micorrización en comparación con las plantas de tipo silvestre. En este sentido, el porcentaje de longitud de raíz micorrizada fue de 7,5 y 9,8% en *sitiens* y plantas de tipo silvestre, respectivamente, a los 37 dpi y de 24% (*sitiens*) y 48% (silvestres) a los 56 días después de la inoculación con *G. intraradices* (figura XII, gráfica A). La frecuencia de micorrización alcanzó valores próximos al 90% a los 56 dpi en las plantas silvestres, siendo la intensidad de micorrización para ese tiempo de

cosecha de un 32% y la intensidad arbuscular de un 38% (figura XII, gráficas B, C y D). Por su parte, la frecuencia de micorrización en los mutantes *sitiens* apenas se alcanzó un 65% a los 56dpi, con valores de intensidad de micorrización e intensidad arbuscular de 9,9 y 18% respectivamente (figura XII, gráficas B, C y D)

Como gen de referencia para el cálculo de la expresión génica, formulada como valor M, se usó el gen constitutivo *EFa1* de tomate. El cálculo del valor M se realizó mediante el cociente de la expresión de cada uno de los genes analizados en plantas micorrizadas respecto a la expresión de dichos genes en plantas control no micorrizadas para cada variedad y tiempo de cosecha. El análisis del patrón de expresión de los genes involucrados con el metabolismo 13-LOX mostró un comportamiento similar para todos ellos durante las diferentes etapas del desarrollo de la micorrización en las plantas silvestres, con excepción de *AOS2*. Así, no se apreciaron diferencias biológicamente significativas en la expresión de los genes analizados entre plantas silvestres micorrizadas y no micorrizadas para el primer tiempo de cosecha (Valor M entre -1 y 1), mientras que a los 56 dpi, se observó una ligera disminución de la expresión de éstos en las plantas inoculadas respecto a los controles sin inocular (valor M < -1), con excepción de *LOXD*, en el que no se detectaron cambios biológicamente relevantes (figura XIII, gráficas A, B, D y E). En cuanto a *AOS2*, no se observaron cambios significativos de expresión para el primer tiempo de cosecha entre plantas micorrizadas y plantas control, produciéndose una moderada inducción en las plantas inoculadas a los 56 dpi (figura XIII, gráfica C).

El análisis del patrón de expresión de los mutantes *sitiens* deficientes en ABA, mostró una menor expresión de los genes *LOXD* y *AOS1* en plantas micorrizadas respecto a no micorrizadas a los 36 dpi, observándose una posterior inducción (52 dpi) (figura XIII, gráfica A y B). No se detectaron diferencias biológicamente relevantes (valor M entre 1 y -1) entre plantas inoculadas y plantas control en el análisis de expresión de *AOS2* (figura XIII, gráfica C). En cuanto al gen *AOC*, su expresión aumentó considerablemente (valor M 5.6) en plantas inoculadas respecto a no micorrizadas a los 36 dpi, no apreciándose cambios en su expresión a los 56 dpi (figura XIII, gráfica D). Por el contrario, solo se observó una inducción moderada (valor M 2.2) del gen *OPR3* en plantas micorrizadas para el segundo tiempo de cosecha (figura XIII, gráfica E).

Por su parte, el análisis de expresión de *PIN-II*, de respuesta a JA, mostró una menor expresión de este gen en plantas silvestres inoculadas frente a no inoculadas a los 38 dpi, no observándose diferencias (valor M entre 1 y -1) a los 56 dpi. En los mutantes *sitiens*, deficientes en ABA, no se detectaron cambios relevantes entre plantas micorrizadas y no micorrizadas para el primer tiempo de cosecha, produciéndose una inducción considerable (valor M 3.5) en plantas inoculadas a los 52 dpi (figura XIII, gráfica F).

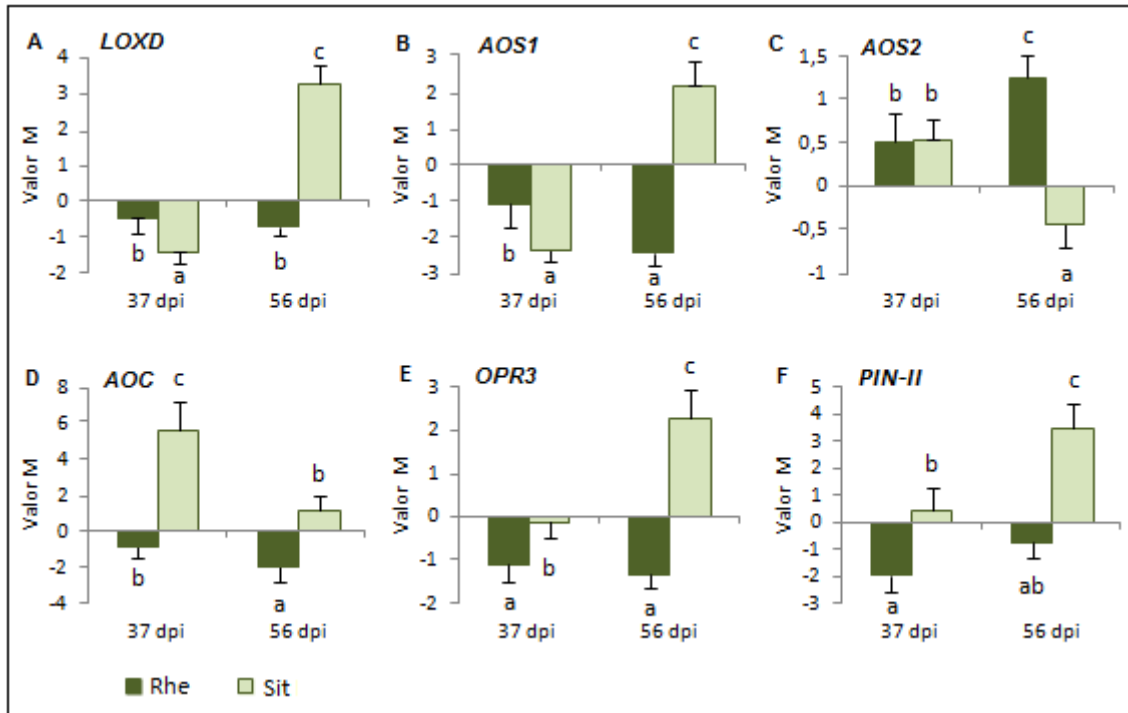


Figura XIII: Análisis de expresión génica de genes involucrados en el metabolismo 13-LOX y *PIN II*, de respuesta a JA, en plantas de tomate silvestres y mutantes *sitiens*, deficientes en la síntesis de ABA, inoculadas con *G. intraradices*, y cosechadas a 38 y 52 dpi. **Gráfica A:** Análisis de expresión del gen *LOXD* mediante qRT-PCR. **Gráfica B:** Análisis de expresión del gen *AOS1* mediante qRT-PCR. **Gráfica C:** Análisis de expresión del gen *AOS2* mediante qRT-PCR. **Gráfica D:** Análisis de expresión del gen *AOC* mediante qRT-PCR. **Gráfica E:** Análisis de expresión del gen *OPR3* mediante qRT-PCR. **Gráfica F:** Análisis de expresión del gen *PIN II* mediante qRT-PCR. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas ± el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

4. EFECTO DE LA ALTERACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN EL METABOLISMO DE OXILIPINAS SOBRE LA MICORRIZACIÓN ARBUSCULAR EN PLANTAS DE PATATA TRANSFORMADAS

En los resultados presentados en capítulos anteriores se ha evidenciado la importancia de la participación del conjunto de oxilipinas, tanto de la vía 13-LOX, responsable de la síntesis de JA, como de la vía 9-LOX, durante el proceso de micorrización arbuscular. En este sentido, y para estudiar el papel que desarrollan las oxilipinas en el establecimiento de la simbiosis desde un enfoque diferente, se decidió clonar el gen codificante para la enzima aleno óxido sintasa de tomate *LeAos3*, involucrado en la ruta de síntesis de la vía 9-LOX, para la transformación y análisis de micorrización de plantas de patata de la variedad Andígena. Así, se realizó una construcción génica de silenciamiento mediante ARN interferente de dicho gen.

En plantas, se ha demostrado que la vía 9-LOX de oxilipinas está involucrada en diversos procesos fisiológicos, como el desarrollo de raíces laterales o la tuberización (Kolomiets y col., 2001; Velosillo y col., 2007), así como en la respuesta de defensa frente a diferentes patógenos microbianos (Rance y col., 1998; Weber y col., 1999; Blee y col., 2002; Fammartino y col., 2010). En este contexto, se han realizado transformaciones en diversas especies, como *Arabidopsis* o *M. truncatula*, para estudiar el efecto de la alteración de los genes involucrados en el metabolismo 9-LOX durante diferentes aspectos del desarrollo y crecimiento de las mismas, así como en respuesta al ataque por patógenos. Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios sobre el efecto de la alteración de estos genes durante el desarrollo de la simbiosis micorriza arbuscular.

4.1 Clonación y caracterización del gen *LeAos3* en plantas de tomate.

El análisis transcriptómico realizado al principio de esta Tesis doctoral reveló la importancia de una serie de genes relacionados con la vía 9-LOX del metabolismo de oxilipinas durante el proceso de micorrización arbuscular. En este sentido, se procedió a estudiar el patrón de expresión de dichos genes durante diferentes estadios del

desarrollo de la simbiosis, tanto en plantas silvestres como en plantas mutantes alteradas en la síntesis y en la percepción de ácido jasmónico, así como el posible efecto sistémico producido por el proceso de micorrización en la expresión de éstos y su capacidad de inducción en respuesta a diferentes tratamientos hormonales (capítulo 2 de resultados). Siguiendo esta línea, y para completar el estudio de la participación de la vía 9-LOX de oxilipinas en el proceso de micorrización, se decidió llevar a cabo la clonación de un gen involucrado en el metabolismo de ésta vía, concretamente el gen *LeAOS3* de tomate, para la posterior transformación y análisis de micorrización de plantas de patata de la variedad Andígena.

La secuencia completa de la región codificante de *LeAos3* (número de acceso AW651347, GenBank™), se obtuvo como producto de RT-PCR y consta de 1473 nucleótidos que codifican para una aleno oxido sintasa, de 491 aminoácidos y 55,5 KDa, perteneciente a la subfamilia CYP74 de citocromos P450. Su función en la planta es catalizar la transformación de 9-hidroperóxidos de ácido linolénico o linoleico (9-HPOT/D) en un intermediario inestable, el ácido 9,10-epoxi-9,11,15-octadecatri(di)enoico (9,10-EOT/D) que, posteriormente, es transformado mediante una reacción no enzimática en ácido 10-oxo-11,15-fitodienoico (10-OPDA) o en su isómero 10-oxo-11-fitoenoico (10-OPEA) (Hamberg, 2000). Si bien, *LeAos3* también puede utilizar como sustrato 13-hidroperóxidos de la vía 13-LOX, un estudio cinético realizado por Itoh y colaboradores (2002), ha demostrado que esta enzima es diez veces más activa frente al sustrato 9-HPOT/D que frente a su isómero 13-HPOT/D.

Por otra parte, *LeAos3* conserva las principales características de la subfamilia CYP74 de citocromos P450. Estas enzimas, al contrario que otras enzimas P450, no requieren oxígeno molecular ni NADPH-dependiente de una citocromo P450 reductasa como cofactores para llevar a cabo la reacción enzimática, utilizando hidroperóxido de acilo tanto de sustrato como de donador de oxígeno para la formación de los enlaces carbono-oxígeno (Howe y Schilmiller, 2002; Werck-Reichhart y col., 2002). Las características conservadas en *LeAos3* comprenden algunos de los principales dominios de las enzimas CYP74 que las distinguen de otras P450 monoxigenasas, incluyendo un pequeño residuo hidrófobo de valina (V) (aspartato o isoleucina en otras enzimas CYP74), en la región conservada de la hélice I sustituyendo a un residuo de treonina (T) presente en todas las P450 monoxigenasas (Chappel, 1998; Paquette y col., 2000). Además, conserva la secuencia consenso NKQC(A/P)(G/A)K(D/N)XV, con excepción

de una sustitución de isoleucina (I) por valina, que rodea a la cisteína (C) del grupo hemo, correspondiente con el centro catalítico de la enzima, en el extremo C-terminal, característica de la subfamilia CYP74 (Itoh y col., 2002); y un tetrapeptido PPGP cerca del extremo N-terminal común a la familia de citocromos P450 importante para la estabilidad de la proteína (Werck-Reichhart y col., 2002). Por otra parte, LeAOS3 parece no conservar una región común a otras enzimas CYP74 en el extremo N-terminal de direccionamiento hacia cloroplastos, enriquecida en serina (S) y con ausencia de aspartato (D), glutamato (E) y tirosina (Y), si bien, esta secuencia tampoco está presente en otras proteínas de la subfamilia (Itoh y col., 2002) (figura I).

El análisis comparativo de las secuencias aminoacídicas de las diferentes isoformas de la proteína aleno óxido sintasa involucradas en el metabolismo de oxilipinas en tomate, LeAos3, implicada en la vía 9-LOX, LeAos1 y LeAos2, involucradas en la vía 13-LOX, y la proteína StAos3, homóloga a LeAos3 en patata, reveló la existencia de un alto porcentaje de identidad (94,7%) entre las enzimas LeAos3 y StAos3, sin embargo la homología entre las secuencias de LeAos3 y las otras dos isoenzimas presentes en tomate (LeAos1 y LeAos2), apenas llegó al 60% (Tabla I). En este sentido, el alto porcentaje de homología existente entre la proteína LeAOS3 y su homóloga en patata StAOS3, unido a la posibilidad de transformar plantas de patata mediante la metodología descrita por Banerjee y colaboradores (2006) aprendida en el laboratorio de la Dra. Salomé Prat (Centro Nacional de Biotecnología, C.S.I.C, Madrid) durante una estancia breve, permitió realizar plantas transgénicas de patata de silenciamiento génico por ARN interferente del gen *LeAOS3* de tomate, para el posterior análisis del efecto de de la alteración en su expresión sobre la micorrización.

Enzima	LeAOS1	LeAOS2	LeAOS3	StAOS3
LeAOS1	ID	69%	61%	60%
LeAOS2	69%	ID	49%	49%
LeAOS3	61%	49%	ID	94,7%
StAOS3	60%	49%	94,7%	ID

Tabla I: Grado de homología entre las secuencias aminoacídicas de LeAOS1, LeAOS2, LeAOS3 y StAOS3. Análisis realizado con el programa BioEdit *Sequence Alignment Editor*.

LeAos1	1	---MASTSLSLPSLKLQFP	SHTSSSSSRKNSSSYRVSIRPIQASVSEIPPYSSPSQSPSS
LeAos2	1	MALTLSFSLPLPSLHQKIP	SKYS-----TFRPIIVSLSDK-----
LeAos3	1	----MANTKDSYHIITMDTKES	-----
StAos3	1	----MANTKDSYHIITMDTKES	-----
LeAos1	57	←SSSPPVKQAKLPARKVPGDYGLPLVGPWKDRLDYFYNQGNKNEFFKSRIQKHQSTVFRTN	
LeAos2	36	STIEITQPIKLSTRITPGDYGLPGIGPWKDRLDYFYNQGNKNDFFESRIAKYKSTIFRTN	
LeAos3	19	-----SIPSLPMKEIPGDYGVPPFFGAIKDRYDFHYNQGADEFFRSRMKKYDSTVFRTN	
StAos3	19	-----SIPNLPMEIPGDYGVPPFLGAIKDRYDFHYNQGADEFFRSRMEKHDSTIFRTN	
LeAos1	116	MPPGPFISFNPNVVLLDGKSFVFLFCVSKVEKKDLFTGTFFMPSTDLTGGYRVLSYLDP	
LeAos2	95	MPPGPFITSNPKVIVLLDGKSFVFLFDASKVEKKDLFTGTFFVPSTELTGGYRILSYLDP	
LeAos3	72	VPPGPFNARNSKVVVLDAVSYPIFLDNSQVDKENYFEGTFMSSPSFNGGYKVCGLGT	
StAos3	72	VPPGPFNARNSKVVVLDAVSYPIFLDNSQVDKENYFEGTFMSSPSFNGGYKVCGLGT	
LeAos1	175	SEPNHAKLKKLMFYLLSSRRNEVIPEFHNSYSELFETLENELSTKGKAGLNAANDQAAF	
LeAos2	154	SEPNHEKLLKLMFFLLSSRRDHVIPEFHETYELFETLDKEMEKGTVGFNSGSDQAAF	
LeAos3	130	SDPKHTTLKGLFLSTLTRLHDKFIPIFTTSITSMFTSLEKELSEKGTSYFNPIGDNLSF	
StAos3	130	TDPKHTTLKGLFLSTLTRLHDKFIPIFTTSITQMFTSLEKELSEKGTSYFNPMSDNLSF	
LeAos1	234	NFLARSLY-GINPQDTELGTGPKLIGKVVLFQLHPLLILGL---PKVLEDLVMHTFRL	
LeAos2	212	NFLARSLF-GVNPVETKLGTDGPALIGKWILLQLHPVITLGL---PKFLDDVLLHTFRL	
LeAos3	189	EFLFRLFCEGKNPIDTSVGPNGPKIVDKWVFLQLAPLISLGLKVFVNFLEDLVLHTFPL	
StAos3	189	EFLFRLFCEGKNPVDTSVGTNGPKIVDKWVFLQLAPLISLGLKVFVNFLEDLVLHTFPL	
LeAos1	290	FPALVKKDYQRLYNFFYENSTSVLDEAEKIGTSREEACHNLLFATCFNSFGGKIFFFPN	
LeAos2	269	PPILVKKDYQRLYDFFYTNSANLFIEAEKLGISKDEACHNLLFATCFNSFGGMKIFFFPN	
LeAos3	248	PYILVKRDHQKLYNAFYNSMKDILDEAEKLGVRDEACHNFVFLAGFNSYGGKLVFFPS	
StAos3	248	PYFLVKGDHQKLYNAFYNSMKDILDEAEKLGVRDEACHNFIFLAGFNSYGGMKVFFPS	
LeAos1	349	MLKWI GRAGAKLHSQLAQEIRSVISSNSGKVTMAAMEKMLMKSVVYVESLRIEPPVASQ	
LeAos2	328	MLKSI AKAGVEIHTRLANEIRSEVKSAGGKITMSAMEKMLMKSVVYVEALRVDPPVASQ	
LeAos3	308	LIKWIGTSGPSLHARLVKEIRTA VKEAGG-VTLSAIDKMPLVKSVVYETLRMDPPVPFQ	
StAos3	308	LIKWIGTSGPTLHTRLVKEIRTA VKEAGG-VTLSAIDKMPLVKSVVYETLRMDPPVPFQ	
LeAos1	408	YGRAKHDVIESHDASFEIKEGELLYGYQPFATKDPKIFDRSEEFVADRFVIGEEGKLL	
LeAos2	337	YGRAKQDLKIESHDAVFEVKKGEILFGYQPFARKDPKIFDRPGEFVADRFVIGEEGKLL	
LeAos3	366	TVKARKNIIITNHESFLIKKDELIFGYQPLATKDSKVFKNAAEFNPDRFVGG-GEKLL	
StAos3	366	TVKARKNIIIVSNHEASFLIKKDELIFGYQPLATKDSKVFKNAAEFNPDRFVGY-GEKLL	
LeAos1	467	KHVLWSNGSEITENPSINNKQCAGKDFVVLVSRLLVFLRYDSFEIEVGASPLGAAIT	
LeAos2	446	KHVLWSNGPETESPTVGNKQCAGKDFVNVSRLLVFLRYGTLNVDVFTSALGSSIT	
LeAos3	423	KYVYWSNGKEIDNPSVNDKQCPGKDLIVLMGRLLVVEFFMRYDTFEVEFGKLLLGSKVT	
StAos3	423	KYVYWSNGKETDNPTVNDKQCPGKDLIVLLGRLLVVEFFMRYDTFEIEFGKLLLGSKVT	
LeAos1	526	LTSLRRASF	
LeAos2	505	ITSLKKA--	
LeAos3	483	FKSLIKATS	
StAos3	483	FKSLIKATS	

Figura I: Análisis comparativo de las secuencias aminoacídicas de LeAOS1, LeAOS2, LeAOS3 y StAos3. En celeste y gris se indican aquellas posiciones que contienen un aminoácido idéntico y conservado, respectivamente. Los puntos señalan cambios de aminoácidos en las secuencias de LeAos3 y StAos3. Dentro de los rectángulos se representan las secuencias conservadas NKQC(A/P)(G/A)K(D/N)XV (* señala la C del grupo hemo) y PPGP. La flecha (←) indica la región de direccionamiento hacia cloroplastos. El símbolo ^ señala la posición de la treonina conservada en la hélice I de P450 monooxigenasas. Análisis realizado con el programa BioEdit *Sequence Alignment Editor*.

4.1.1 Análisis teórico de la secuencia promotora del gen *LeAOS3*.

Para una mayor comprensión sobre el patrón de expresión y la funcionalidad del gen *LeAos3* durante el proceso de micorrización, se decidió realizar un análisis teórico de la secuencia promotora de éste, identificando aquellos elementos *cis* reguladores de la transcripción que pudieran tener un papel importante en su expresión durante la simbiosis AM. En este sentido, se llevó a cabo un análisis *in silicio* de la secuencia de 1.5 kb de la región 5' de *LeAOS3* mediante el programa PLACE (Higo y col., 1999). Las posiciones relativas de los diferentes motivos descritos vienen indicadas respecto a un teórico sitio del inicio de la transcripción (TSS), identificado según la secuencia consenso YYAN(T/A)YY (TSS subrayado, Nakamura y col., 2002; Yamamoto y col., 2007).

Elementos generales de la transcripción: se identificó una posible caja TATA, sitio de unión del complejo multimérico de iniciación de la transcripción junto con la ARN polimerasa, en la posición -32 (TATATAA); y una secuencia consenso CAAT, común en regiones 5' no codificantes de genes eucariotas e importante para determinar la tasa de transcripción del gen (Shirsat y col., 1989), en la posición -186.

Elementos específicos de raíz: en las posiciones -1415, -1244, -1130, -836, -811, -789, -621, -440 y -89 se identificaron secuencias ATATT descritas en el promotor rol D de *Agrobacterium rhizogenes*, que dirige la expresión mayoritariamente en raíces y a un nivel mucho más bajo en tallos y hojas (Elmayan y Tepfer, 1995). Además, en la posición -514 se identificó un motivo WUSATAg (TTAATGG) descrito en arroz y relacionado específicamente con la quiescencia celular en el desarrollo del meristemo apical de la raíz (Kamiya y col., 2003).

Elementos de regulación por nodulación y micorrización arbuscular: en las posiciones -111, -282, -773 y -993 se identificaron motivos OSE1ROOTNODULE (AAAGAT) y OSE2ROOTNODULE (CTCTT) específicamente activados en células infectadas en raíces colonizadas por rizobacterias y hongos micorrícicos arbusculares (Stougaard y col., 1990; Vieweg y col., 2004; Fehlberg y col., 2005). Concretamente, su regulación ha sido relacionada con etapas avanzadas del desarrollo arbuscular (Fehlberg y col., 2005).

Elementos de regulación por ácido jasmónico: en las posiciones -105 y -1364 se identificaron dos posibles cajas G (CACGTG) y T/G (AACGTG) respectivamente, presentes en otros promotores con respuesta a JA, incluidos genes de biosíntesis, genes codificantes para proteínas JAZ y genes de respuesta a JA como PIN-II (Boter y col., 2004, Lorenzo y col., 2004, Chini y col., 2007, Dombrecht y col., 2007, Fernandez-Calvo y col., 2011, Godoy y col., 2011).

Elementos de regulación por etileno y respuesta temprana: en las posiciones -1152 y -1390 se identificó un elemento *cis* de respuesta a etileno LECPLEACS2 (TAAAATAT), descritos en el gen *LeAcs2* de tomate inducible por herida, senescencia floral, maduración y ataque por hongos (Matarasso y col., 2005). Además, en las posiciones -416, -550 y -1282 se encontró un motivo TGAC o caja W descrita en los promotores de los genes WRKY1. WRKY es un factor de transcripción importante en la regulación de la respuesta frente a estrés biótico por herida o infecciones desarrolladas por patógenos y en la respuesta de defensa temprana (Chen y Chen, 2002; Eulgem y col., 2003; Nishiuchi y col., 2004; Xu y col., 2006).

Elementos de regulación por ácido abscísico: en las posiciones -668 y -1179 se identificaron dos motivos de respuesta a ABA, MYC (CAAATG) y MYB (TAACCA), respectivamente, descritos en los genes *rd22* y *AtADH1* de *Arabidopsis*. Ambos elementos *cis* actúan en la activación de la señal mediada por ABA (Abe y col., 2003).

Elementos de regulación por luz y ciclo circadiano: en las posiciones +6 y +16 se encontraron secuencias CAANNNNATC descritas en el gen *Lhc* de tomate, necesarias para la expresión circadiana (Piechulla y col., 1998). Por otra parte, en las posiciones -40, -462, -476, -531, -614, -736 y -903 se identificaron sitios consenso de unión a GT-1 (GRWAAW) descritas en muchos genes regulados por luz en diferentes plantas. Además, GT-1 puede estabilizar el complejo TFIIA-TBP-DNA (Terzaghi y Cashmore, 1995a y 1995b).


```

-1452 aggatagata catgcatttg aacaaatttt tttattaata ttggatttgt
-1402 taaaaataaa atatatatata ttaactttta aatttgttaa cgtggatttt
-1352 tctacaggct aaattgtaa aaaacacttt gttgaaacta ttattactgg
-1302 caagttccaa actttgatag tgacctgaat ttcgtgatac ctatatatat
-1252 atatatatat attatttttt tttttgttac tttttttaca gttagattttt
-1202 atttttattt ttcaatttca acgtaacca aaaaaacaat ttttttctct
-1152 atatttttatt tatagttatt aaatatttat tctccaaatt atttttcaag
-1102 acctgatact aaatatatga ataatttggg aaactatcga tatcaataat
-1052 tgttttctta atcttgatc gataagtaa atatcgacag gtaaatttgc
-1002 ggggagtata tcttttggtt ttttcaaat tttgttttta ttggaaatca
-952 gtttaaaata gttgcttttg aagaaattaa ggggtgtgtt ggtacgaaag
-902 aaaatgtttt cttggaaaat atgtggtttt taacttattt ttacatgttt
-852 gattgggtgag tagaaaatat tttttttaaa aatacttctt aatatttggg
-802 tcgtgaatga gaaatatttt tttaaaaata tctttttatt tttagctttaa
-752 aataaaaaata cttttgaaa aataatttct gatcgcccca gggagggtgg
-702 ggtgggggtgg ggggggttta ggggtgtggc ataaacaatg attttttttt
-652 tataaaaaaa ttgaaacatt tctccaaaat aatatttttt tttttggaaat
-602 ggctgagtg ggggtggggg atgatttggg ggtaggata aaaattatgc
-552 agtgcactt taaacataa agaaaaaaat tttttttttt aatgggaagg
-502 atcgtgtatg ggtatgagta gggtaagaaa aaaattaaac gataaaaatag
-452 aattttaaaa aaatattttt taattttaaa agggaaagtca ttttactccc
-402 ccgcacttta aaattattaa gtgaactatc atgttttttt catgatactt
-352 aatttagcac ttagtacctc aactaaaatt caatgattta aattcacaat
-302 acataaatcc ctactcgata aaagattctc cctataaaaa aatttatatc
-252 taaaactcaa actcgataaa agacttagat ttataaaaga aaatatagta
-202 aactcacatg gtctacaata attttaacgt ttattataac aagacaaaaa
-152 tatgccacc ctattaaata atatataatt tcaactaatta tctcttcac
-102 gtgaagaacg ataattttta tcaatttaagt gattattcta atctctagca
-52 ctatctaata attttttct atataatgac acatcctaca aacataaaat
-2 tacacatcaa aaaatccaa aaatatcata agaaaaatag tagaaATG

```

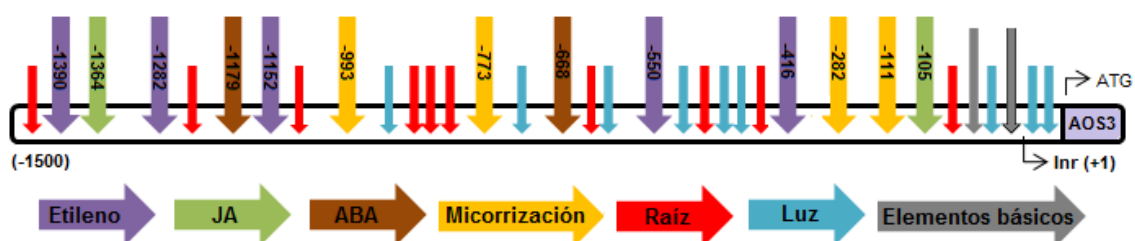


Figura II: Secuencia de nucleótidos de la región promotora del gen *LeAOS3* (1.5kb) y de sus elementos *cis* reguladores. Las cifras indican las posiciones relativas referidas a un teórico sitio de inicio de la transcripción identificado según la secuencia consenso $YY\underline{A}N(T/A)YY$ (TSS subrayado), al que se le asigna la posición +1. Los elementos reguladores más relevantes están representados con colores (rojo, elementos específicos de raíz; naranja, elementos de regulación por nodulación y micorrización; verde, elementos de regulación por JA; violeta, elementos de regulación por etileno; marrón, elementos de regulación por ABA; azul, elementos de regulación por luz y ciclo circadiano). Las cajas TATA y CAAT están sombreadas en gris oscuro y el iniciador de la transcripción (Inr) en gris claro (TSS, subrayado). Análisis realizado con el programa PLACE (Higo y col., 1999).

4.1.2 Estudio del patrón de expresión del gen *LeAOS3* por órganos.

Para complementar el estudio del gen *LeAOS3* en plantas de tomate, se realizó un análisis del patrón de expresión del mismo, mediante qRT-PCR, en diferentes órganos de la planta, concretamente, raíz, hoja, flor y fruto. Dicho análisis determinó que *LeAOS3* se expresa mayoritariamente en raíz, no observándose apenas inducción en otros órganos en tomate (figura III). Estos resultados concuerdan con el análisis realizado por Itoh y colaboradores (2002), quienes detectaron una acumulación de transcritos de *LeAOS3* solo en raíces de plantas de tomate y no en tejidos aéreos como cotiledones, tallos, hojas y flores. Por otra parte, estos autores observaron un aumento temprano de la expresión de *LeAOS3* tras la germinación, cuando la raíz acaba de salir de la cubierta de la semilla, indicando que la acumulación de transcritos del gen está estrechamente ligada a tejidos expuestos al suelo (Itoh y col., 2002). Además, el análisis del promotor de *LeAOS3* revela la presencia de posibles elementos *cis* de regulación de la expresión en raíz (figura II).

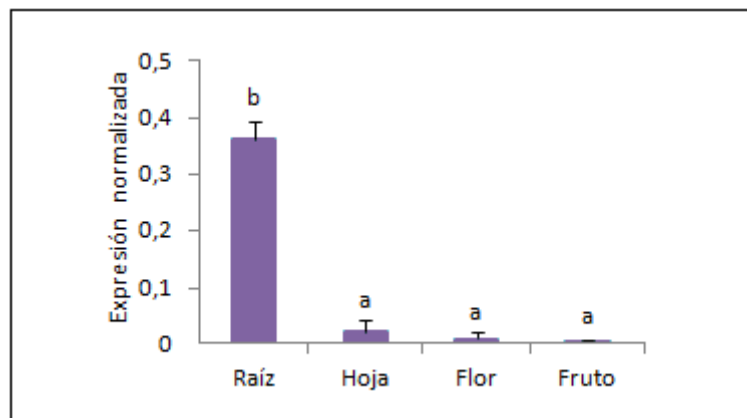
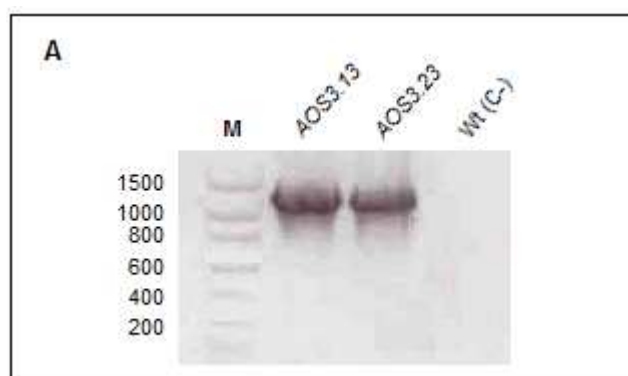


Figura III: Patrón de expresión por órganos de *LeAOS3*. Productos de qRT-PCR a partir de RNA total de raíz, hoja, flor y fruto de plantas adultas de tomate. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

4.2 Estudio de la función de *AOS3* en plantas de patata micorrizadas mediante pérdida de su expresión.

4.2.1 Obtención de líneas mutantes mediante silenciamiento génico por ARN interferente.

Para estudiar la función del gen *AOS3* y, consecuentemente, la participación de la vía 9-LOX de oxilipinas, durante el proceso de micorrización arbuscular, se llevó a cabo la transformación estable de plantas de patata de la variedad Andígena (línea 7540), para la obtención de líneas mutantes de pérdida de función mediante silenciamiento génico por ARN interferente (ARNi). Estas líneas mutantes se obtuvieron mediante la clonación de un fragmento de 636 pb del gen *LeAOS3* de tomate en el vector binario *pBin19RNAi* (Serra y col., 2009), diseñado y cedido por el laboratorio de la Dra. Salomé Prat (Centro Nacional de Biotecnología, C.S.I.C, Madrid). Por otra parte, el alto porcentaje de homología existente entre la proteína *LeAOS3* y su homóloga en patata *StAOS3* (94,7%), unido a la posibilidad de transformar plantas de patata mediante la metodología descrita por Banerjee y colaboradores (2006) aprendida en el laboratorio de la Dra. Salomé Prat durante una estancia breve, permitió realizar plantas transgénicas de patata de pérdida de función del gen *StAos3* de patata. La colección de las diferentes líneas mutantes obtenidas se rastreó mediante PCR con oligonucleótidos específicos del gen de interés y del T-DNA integrado en el genoma de la planta, y mediante análisis de expresión del mismo en respuesta al tratamiento con MeJA (50 μ M) mediante qRT-PCR. Dicho tratamiento, permitió comprobar la capacidad de inducción de *StAOS3* a MeJA y, por tanto, identificar aquellas líneas transgénicas incapaces de inducir el gen como líneas *knock out*. De este modo, se identificaron dos líneas mutantes de pérdida de función del gen *StAOS3* mediante silenciamiento génico por ARNi: *AOS3.13* y *AOS3.23*.



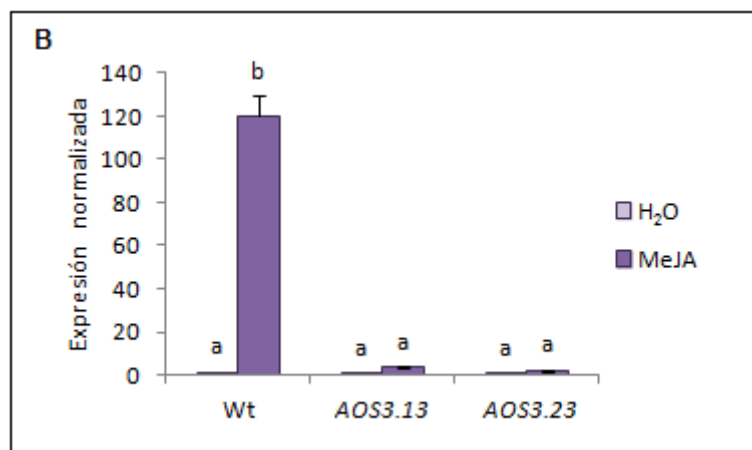


Figura IV: Identificación de líneas mutantes de patata de pérdida de función del gen *AOS3* mediante silenciamiento génico por ARNi. **Gráfica A:** PCR a partir de DNA genómico con oligonucleótidos específicos de un extremo del T-DNA y el correspondiente al gen *LeAOS3*. La línea silvestre (Wt) se incluye como control de la ausencia de T-DNA. **Gráfica B:** Expresión normalizada, respecto al gen de constitutivo *Efa1* de patata, de la expresión del gen *StAOS3* en las líneas silvestre y mutantes seleccionadas, *AOS3.13* y *AOS3.23*, en respuesta a MeJA (50 μ M). El tratamiento con agua se incluye como control. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

4.2.2 Análisis del efecto sobre la micorrización de la pérdida de función de *StAOS3* y del patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo de oxilipinas en plantas de patata.

Para determinar el posible efecto sobre la micorrización arbuscular de la pérdida de función del gen *StAOS3* y, por tanto, de la alteración de la vía 9-LOX de oxilipinas, se realizó un estudio de la evolución de la micorrización en plantas de patata silvestres de la variedad Andígena y de las líneas mutantes seleccionadas previamente como *knock out*, *AOS3.13* y *AOS3.23*, inoculadas con *G. intraradices*. Para ello, se realizaron dos cosechas a 41 y 62 dpi y se analizó el patrón de expresión de los genes involucrados en el metabolismo de oxilipinas tanto de la vía 9-LOX como de la 13-LOX. Los parámetros de micorrización analizados fueron: porcentaje de raíz micorrizada, frecuencia de micorrización (F%), intensidad de micorrización (M%) e intensidad de arúsculos en la zona colonizada (a%).

El análisis de los parámetros histoquímicos mostró un mayor porcentaje de raíz micorrizada así como de la frecuencia de micorrización en las plantas de silenciamiento génico, *AOS3.13* y *AOS3.23*, respecto a las plantas de la variedad silvestre en ambos tiempos de cosecha (figura V, gráficas A y B). Sin embargo, no se observaron cambios

significativos en la intensidad de micorrización así como en la intensidad arbuscular entre las diferentes líneas empleadas (figura V, gráficas C y D). En cuanto al peso fresco de la raíz y de la parte aérea, no se detectaron cambios significativos entre la variedad silvestre y las líneas transgénicas a lo largo de todo el experimento (figura V, gráficas D y E).

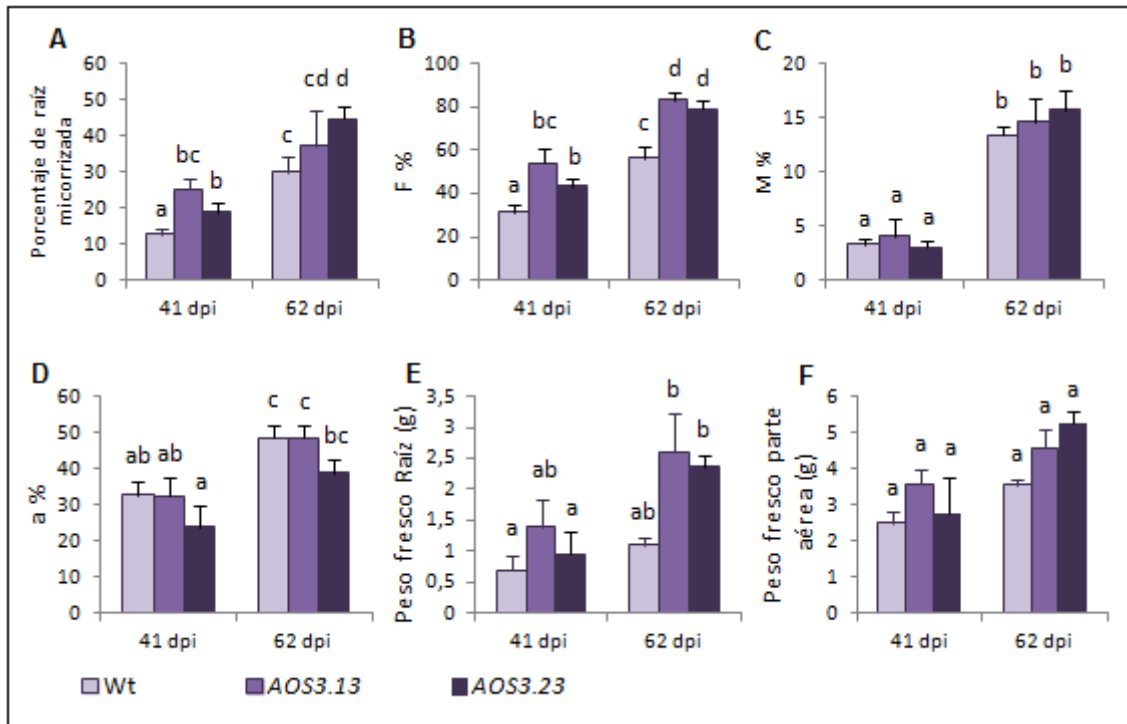


Figura V: Parámetros de micorrización de plantas de patata de silenciamiento génico de *StAOS3* por ARNi y silvestre de la variedad Andigena, inoculadas con *G. intraradices*, y cosechadas a 42 y 61 dpi. **Gráfica A:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica B:** Frecuencia de micorrización (F%). **Gráfica C:** Intensidad de micorrización (M%). **Gráfica D:** Intensidad de arbusculos en la zona colonizada. **Gráfica E:** Peso fresco de la raíz. **Gráfica F:** Peso fresco de la parte aérea. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

Por otro lado, también se realizó un análisis de la colonización fúngica mediante la medida de expresión de los genes *GinEF*, para la cuantificación del grado de colonización fúngica, y *GinGS*, para la determinación de la eficiencia de micorrización. Como gen de referencia para el cálculo de la expresión génica, formulada como valor M, se usó el gen constitutivo *EFa1* de patata. Para el cálculo del valor M se utilizó el cociente de la expresión de los genes *GinEF* y *GinGS* en cada tiempo de cosecha y línea empleada respecto al valor de la expresión en las plantas silvestres micorrizadas a los 41 dpi, de ahí que la expresión de dichos genes para este tratamiento tenga un valor $M=0$.

Los resultados del análisis mostraron un incremento significativo de la inducción de *GinEF* y *GinGS* en las líneas de silenciamiento génico respecto a la expresión de éstos en la variedad silvestre para el primer tiempo de cosecha (41 dpi). Sin embargo, a los 62 dpi, no se observaron cambios en la expresión de ambos genes entre las diferentes líneas utilizadas, transgénicas y silvestre, salvo para *GinGS* en las plantas de la línea AOS3.23 en las que se detectó un nivel de expresión superior al observado en la variedad silvestre (figura VI).

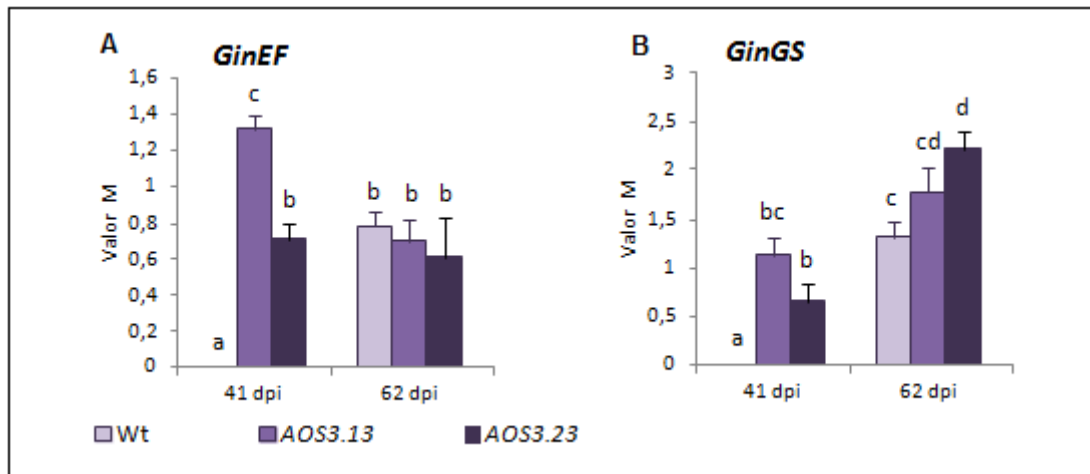


Figura VI: Análisis de expresión génica de los genes *GinEF* y *GinGS* en plantas de patata de silenciamiento génico de *StAOS3* por ARNi y silvestre de la variedad Andigena, inoculadas con *G. intraradices*, y cosechadas a 42 y 61 dpi. **Gráfica A:** Análisis de expresión del gen *GinEF* mediante qRT-PCR. **Gráfica B:** Análisis de expresión del gen *GinGs* mediante qRT-PCR. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

El patrón de expresión de los genes involucrados en el metabolismo de oxilipinas, de las vías 9 y 13-LOX, se realizó mediante qRT-PCR, usando como gen de referencia para la cuantificación de su expresión, formulada como valor M, el gen constitutivo *EFa1* de patata. Para el cálculo del valor M se utilizó el cociente de la expresión de los genes analizados en cada línea y tiempo de cosecha respecto al valor de la expresión de cada gen en el primer tiempo de cosecha (41 dpi) en las plantas de tipo silvestre. Respecto al patrón de expresión de los genes involucrados en la vía 9-LOX, los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo de la expresión de *StLOXA* (2.5 veces; valor M de 1.5) en las líneas de silenciamiento génico micorrizadas para el segundo tiempo de cosecha (62 dpi) respecto a las plantas silvestres micorrizadas, no observándose cambios biológicamente significativos (valor M entre 1 y -1) en etapas

más tempranas (41 dpi) (figura VII, gráfica A). En cuanto al análisis de *StAOS3*, como era de esperar, no se detectaron cambios en la expresión del mismo en las líneas *AOS3.13* y *AOS3.23*, produciéndose una ligera inducción (2 veces; valor M de 1) en las plantas silvestres micorrizadas a los 62 dpi (figura VII, gráfica B). Por otra parte, no se observaron cambios biológicamente significativos en la expresión de *StDES* (valor M entre 1 y -1) a lo largo de todo el experimento en ninguna de las líneas utilizadas (figura VII, gráfica C).

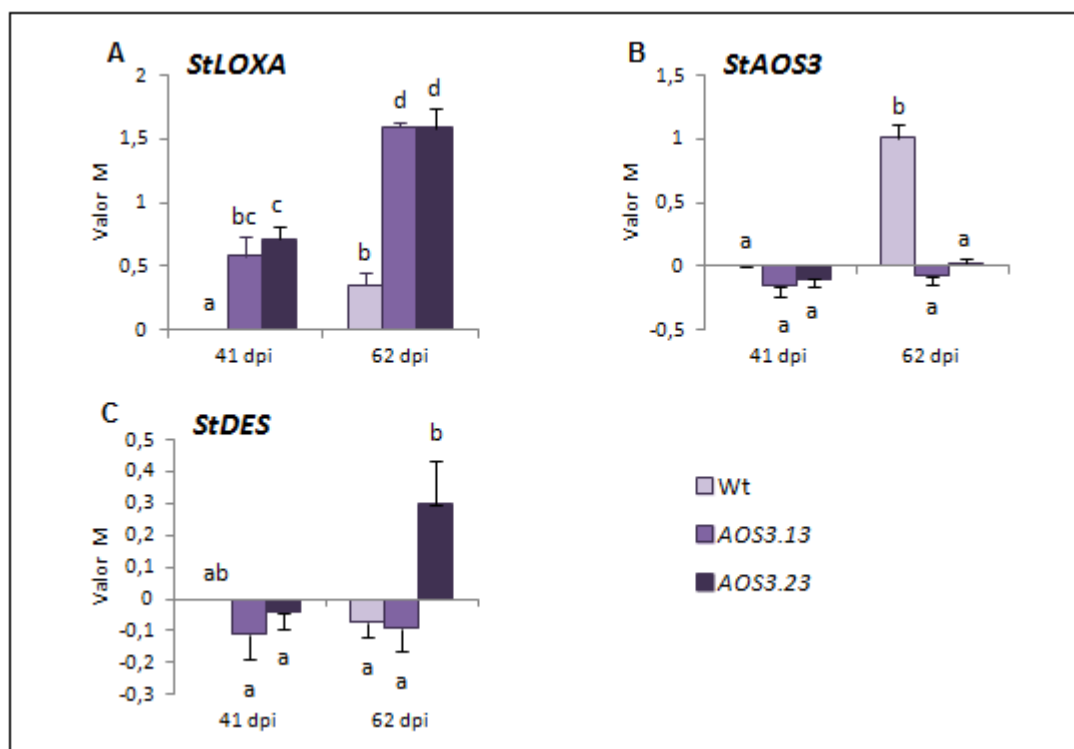


Figura VII: Análisis de expresión génica de los genes *StLOXA*, *StAOS3* y *StDES*, involucrados en la vía 9-LOX de oxilipinas, en plantas de patata de silenciamiento génico de *StAOS3* por ARNi y silvestre de la variedad Andígena, inoculadas con *G. intraradices*, y cosechadas a 42 y 61 dpi. **Gráfica A:** Análisis de expresión del gen *StLOXA* mediante qRT-PCR. **Gráfica B:** Análisis de expresión del gen *StAOS3* mediante qRT-PCR. **Gráfica C:** Análisis de expresión del gen *StDES* mediante qRT-PCR. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

En cuanto al patrón de expresión de los genes involucrados en la vía 13-LOX de oxilipinas, los resultados obtenidos mostraron un aumento moderado y significativo de la expresión de *StLOXD* y *StAOS1* en las líneas de silenciamiento génico micorrizadas para el segundo tiempo de cosecha (62 dpi) respecto a las plantas silvestres micorrizadas, no observándose cambios biológicamente significativos (valor M entre 1

y -1) en etapas más tempranas (41 dpi) (figura VIII, gráficas A y B). Para el resto de genes de la vía analizados, *StAOS2*, *StAOC* y *StOPR3*, no se detectaron cambios en su expresión biológicamente significativos (valor M entre 1 y -1) a lo largo de todo el experimento en ninguna de las líneas utilizadas, si bien, para todos ellos se observó una tendencia a un aumento de la expresión de los mismos en las líneas de silenciamiento génico, similar al patrón expresión mostrado por los genes *StLOXD* y *StAOS1*, en las etapas tardías del proceso de colonización (62 dpi) (figura VIII, gráficas C, D y E).

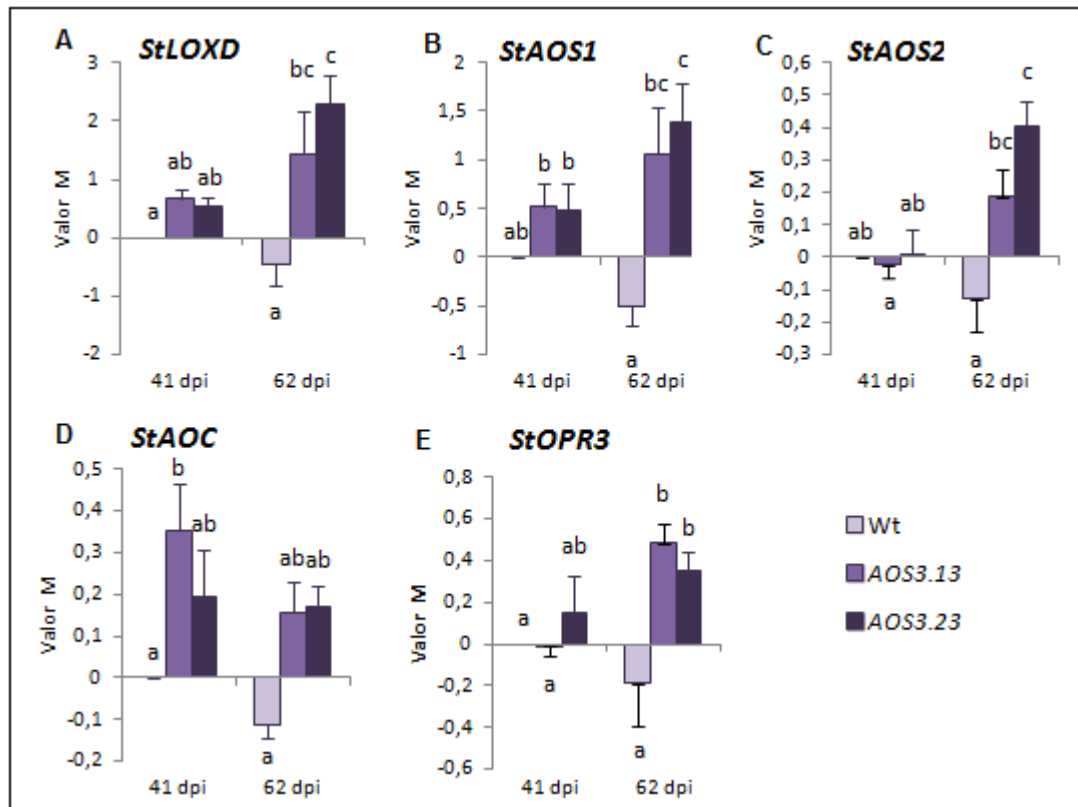


Figura VIII: Análisis de expresión génica de los genes involucrados en la vía 13-LOX de oxilipinas, en plantas de patata de silenciamiento génico de *StAOS3* por ARNi y silvestre de la variedad Andígena, inoculadas con *G. intraradices*, y cosechadas a 42 y 61 dpi. **Gráfica A:** Análisis de expresión del gen *StLOXD* mediante qRT-PCR. **Gráfica B:** Análisis de expresión del gen *StAOS1* mediante qRT-PCR. **Gráfica C:** Análisis de expresión del gen *AOS2* mediante qRT-PCR. **Gráfica D:** Análisis de expresión del gen *StAOC* mediante qRT-PCR. **Gráfica E:** Análisis de expresión del gen *StOPR3* mediante qRT-PCR. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas \pm el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0.05$).

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

1. ANÁLISIS DEL PERFIL TRANSCRIPTÓMICO ASOCIADO AL PROCESO DE MICORRIZACIÓN EN PLANTAS DE TOMATE

La formación de la simbiosis micorriza arbuscular es un proceso complejo que necesita de un entendimiento mutuo entre los organismos participantes. En este sentido, es sabido que durante su proceso de formación se generan una serie de cambios transcripcionales en la planta hospedadora encaminados al correcto establecimiento de la simbiosis (Grunwald y col., 2004; Hohnjec y col., 2005; Liu y col., 2007; Fiorilli y col., 2009; López-Ráez y col., 2010). Por otra parte, diversos estudios han demostrado que el desarrollo y funcionalidad de los arbusculos, estructuras simbióticas encargadas de la transferencia de nutrientes entre el hongo y la planta, están relacionados con la vía de síntesis de diferentes hormonas vegetales, especialmente ABA (Herrera-Medina y col., 2007) y JA (Isayenkov y col., 2005). En este sentido, y con el objetivo de determinar e identificar qué genes están involucrados en el proceso de micorrización y formación arbuscular, se realizó un análisis transcriptómico de plantas de tomate micorrizadas de tipo silvestre y mutantes *sitiens*, deficientes en la capacidad de síntesis de ABA. Los mutantes *sitiens* son menos susceptibles a la infección por hongos MA, observándose una reducción de los parámetros de micorrización analizados en éstas de aproximadamente un 70% respecto a las plantas de tipo silvestre. Además, la mayoría de los arbusculos de las plantas *sitiens* son arbusculos poco desarrollados que solo ocupan parcialmente la célula vegetal (Herrera-Medina y col., 2007). Por otra parte, la colonización de raíces de plantas por hongos AM ha sido relacionada con cambios endógenos de los niveles de JA (Hause y col., 2002; Meixner y col., 2005; Stumpe y col., 2005), sugiriéndose que un posible mecanismo por el cual los jasmonatos regulan el proceso micorrización y la formación de arbusculos sea a través de la regulación del metabolismo y transporte de los carbohidratos en la planta (Hause y col., 2000; Tejeda-Sartorius y col., 2008).

El análisis del perfil transcriptómico asociado al proceso de micorrización arbuscular en plantas de tomate reveló cambios significativos en la expresión de genes relacionados con el diferente estatus de micorrización de acuerdo con el contenido de ABA en las raíces de tomate. Así, y de igual modo que en otras plantas hospedadoras, se pudo identificar una serie de genes en tomate ortólogos a otros descritos

anteriormente como “genes básicos de la micorrización” (Liu y col., 2007; Guether y col., 2009), incluyendo genes codificantes de proteasas involucrados en el catabolismo de proteínas, los cuales se encontraron regulados positivamente tanto en las plantas silvestres como en los mutantes *sitiens* deficientes en ABA. Otro grupo de genes regulados positivamente identificados como “genes básicos de la micorrización” fueron genes codificantes para inhibidores de proteasas, así como genes codificantes para glucosiltransferasas, anexinas, acuaporinas, citocromos P-450, glutatión S-transferasas o una giberelina 20-oxidasa, cuya expresión fue inducida principalmente en las plantas de tipo silvestre con un metabolismo normal de ABA. Estos resultados a la vez que validan el análisis transcriptómico realizado, refuerzan la idea de una conservación evolutiva en los procesos genéticos asociados a la formación de la simbiosis micorriza arbuscular. Sin embargo, los resultados del microarray mostraron un escaso solapamiento con otro análisis transcriptómico realizado recientemente en plantas de tomate inoculadas con *Glomus mosseae* (Fiorilli y col., 2009). Esto podría deberse principalmente al solapamiento limitado existente entre las sondas de los dos chips de ADN utilizados para la obtención del análisis transcriptómico: “*Affymetrix Tomato GeneChip*” (Affymetrix) para nuestro estudio y “*TOM2 11K*” (Center for Gene Expression Profiling, CGEP) para el estudio de Fiorilli y colaboradores (2009); y al hecho de que ambos chips de ADN tan solo representan parcialmente el genoma de las plantas de tomate. El máximo solapamiento detectado entre ambos análisis transcriptómicos (22%) se encontró cuando se analizó el grupo de genes inducidos exclusiva y diferencialmente en las plantas silvestres micorrizadas en nuestro estudio. Teniendo en cuenta que el solapamiento máximo que puede producirse entre ambos chips de ADN es del 47%, podría calcularse, de forma hipotética, un solapamiento aproximado de un 46,2% entre los genes regulados positivamente en plantas de tomate inoculadas con *G. mosseae* y *G. intraradices*. En este sentido, un reciente estudio de análisis de hibridación de microarrays (“*Affymetrix Tomato GeneChip*”) en el que se realiza una comparación del perfil transcriptómico de plantas de tomate silvestres inoculadas con *G. mosseae* y *G. intraradices* (López-Ráez y col., 2010), reveló un solapamiento entre los genes inducidos exclusivamente en plantas micorrizadas con ambos hongos MA de un 48%. Si analizamos y comparamos de forma individual para cada especie de hongo empleada en el experimento de López-Ráez y colaboradores, los resultados del estudio presentado en esta Tesis doctoral mostraron un solapamiento de los genes regulados positivamente en plantas de tomate silvestres inoculadas con *G. intraradices* de un 38,2%, y con *G.*

mosseae de un 34,8%. Si bien el porcentaje de solapamiento entre los dos análisis transcriptómicos no puede considerarse demasiado alto, probablemente debido a la etapa de desarrollo de la simbiosis en la que se llevaron a cabo los estudios y a posibles diferencias experimentales, en ambos estudios se identificaron genes comunes pertenecientes al conjunto de “genes básicos de la micorrización” anteriormente descritos, incluidos genes involucrados en el catabolismo de proteínas, glucosiltransferasas, citocromos P-450 o glutatión S-transferasas, así como otra serie de genes relacionados con el metabolismo de hormonas vegetales, carotenoides y oxilipinas (López-Ráez y col., 2010).

Por otra parte, aunque el número de genes regulados diferencialmente en el análisis transcriptómico realizado en esta Tesis doctoral no ha sido particularmente alto, tal vez debido al número limitado de sondas contenidas en el chip de ADN (10.209), y a las condiciones restrictivas del análisis (genes comunes a tres experimentos diferentes, y no plantas diferentes del mismo experimento), si se han podido obtener diferencias claras entre las categorías de genes funcionales observadas en las plantas de tomate de tipo silvestre y los mutantes *sitiens* deficientes en ABA.

1.1 Activación de la vía 9-LOX de oxilipinas en plantas micorrizadas.

Las oxilipinas son un grupo de compuestos biológicamente activos, derivado del metabolismo oxidativo de los ácidos grasos poli-insaturados, que realizan una gran variedad de funciones durante el desarrollo y en la respuesta de las plantas frente a condiciones de estrés (Howe y Schilmiller, 2002). Se generan por la acción coordinada de lipoxigenasas y un grupo de citocromos P450 (CYP74) especializados en el metabolismo de los hidroperóxidos de ácidos grasos, dando lugar a dos vías específicas, 9-LOX y 13-LOX, derivadas de la inserción de un átomo de oxígeno en el carbono 9 ó 13 del ácido linolénico. En plantas, la rama iniciada por la enzima AOS de la vía 13-LOX da lugar a la familia de los jasmonatos incluyendo JA/MeJA y su precursor, 12-OPDA.

El análisis del perfil transcriptómico asociado al proceso de micorrización arbuscular reveló la existencia de un grupo de genes regulados positivamente e involucrados en el metabolismo de oxilipinas: *ω-6-DES*, codificante para una omega-6

ácido graso desaturasa que cataliza la conversión de ácido oleico en ácido linoleico (Okuley y col., 1994); *LOXA*, codificante de una lipoxigenasa; y *LeAOS3*, codificante de una aleno óxido sintasa. Estos genes fueron inducidos tanto en plantas de tipo silvestre como en mutantes *sitiens* colonizadas por *G. intrarradices*, sugiriendo que su inducción no requiere una plena y total funcionalidad de la simbiosis micorriza arbuscular. Por otra parte, el estudio comparativo de las secuencias nucleotídicas de estos genes, realizado con la ayuda de la base de datos de solanáceas “*Solanaceae Genomics Network*” (SGN) de la Universidad de Cornell, junto a los datos aportados por diversos estudios experimentales (Ferrie y col., 1994; Boeglin y col., 2008; Itoh y col., 2002), permitió identificar a *LOXA* y *LeAOS3* como genes involucrados principalmente en la vía 9-LOX de oxilipinas. En este sentido, un estudio estereoquímico y de afinidad a sustrato ha demostrado que el gen *LoxA* codifica para una linoleato 9S-lipoxigenasa (9-LOX), similar a la LOX1 de *Arabidopsis thaliana* (Boeglin y col., 2008), mientras que *LeAos3* codifica para una aleno óxido sintasa que utiliza principalmente el 9-hidroperoxi- α -linolénico (9-HPOT) como sustrato y que es diferente a la enzima involucrada en la síntesis de JA (Itoh y col., 2002).

El patrón de expresión de los genes involucrados en el metabolismo de oxilipinas e identificados en el análisis transcriptómico realizado en esta Tesis doctoral indica que la activación de la vía 9-LOX en raíces de tomate micorrizas parece estar relacionada con las etapas avanzadas de la colonización y, como se ha mencionado anteriormente, parece que su inducción no requiere una plena y total funcionalidad de la simbiosis. Por otra parte, otro reciente análisis de microarrays de raíces de tomate micorrizadas con diversos hongos MA corrobora nuestros resultados, pues también ha mostrado la existencia de una regulación significativa de genes implicados en el metabolismo 9-LOX durante el proceso de formación de la simbiosis (López-Ráez y col., 2010). La importancia biológica de la activación del metabolismo derivado de la vía 9-LOX de oxilipinas en plantas de tomate micorrizadas todavía es desconocida, si bien, se ha demostrado que esta vía está involucrada en diversos procesos fisiológicos, así como en la respuesta de defensa frente a diferentes patógenos microbianos (Rance y col., 1998; Weber y col., 1999; Blee y col., 2002; Fammartino y col., 2010), sugiriendo que su activación podría ser un mecanismo para controlar el desarrollo de los hongos MA en las raíces de las plantas de solanáceas, tal y como ocurre en algunas interacciones con otros hongos patógenos (Blee y col., 2002; Vellosillo y col., 2007). La

expresión de estos genes se encontró regulada positivamente en las etapas tardías de la colonización tanto en los mutantes *sitiens* deficientes en ABA como en las plantas silvestres de tomate, si bien, en estas últimas la inducción observada pareció depender de un cierto grado de colonización por el hongo MA. Estos datos sugieren que el papel de estos genes podría estar relacionado con el control de la propagación de los hongos micorrícico arbusculares en las raíces y no tanto en el establecimiento de la simbiosis. En este caso, un umbral de cierta infección debería ser necesario en las plantas de tipo silvestre para producir la inducción génica.

Por otra parte, la aplicación exógena de MeJA fue capaz de producir un aumento en la cantidad de transcritos de *LOXA* y *LeAOS3* en las raíces de plántulas de tomate de tipo silvestre, mientras que el tratamiento con etileno provocó un aumento en la expresión de *LeAos3*. Trabajos previos a esta Tesis doctoral han demostrado que la acumulación de ARNm de *LeAos3* en las raíces de plantas de tomate adultas es dependiente del producto del gen *COII*, el cual es un componente de la vía de señalización de jasmonatos en tomate (Itoh y col., 2002). En este contexto, se ha observado un aumento en los niveles endógenos de JA y sus derivados en diversas especies de plantas durante la micorrización arbuscular (Hause y col., 2007), que podría estar relacionado con la regulación de la expresión de los genes involucrados en el metabolismo 9-LOX de oxilipinas durante las etapas posteriores de la colonización, ejerciendo un control sobre la propagación de los hongos MA en el interior de las raíces. Por otra parte, el hecho de que estos genes se hayan encontrado siempre regulados positivamente en los mutantes *sitiens* deficientes en ABA podría estar relacionado con la mayor capacidad de producción de etileno que poseen estas plantas. En este sentido, y como se mencionó anteriormente, el tratamiento con etileno provocó un aumento en la expresión de *LeAOS3*, considerando que los mutantes *sitiens* tienen una mayor capacidad en la producción de esta fitohormona, tiene sentido pensar que la inducción observada de los genes involucrados en el metabolismo 9-LOX de oxilipinas en estas plantas se deba a una regulación orquestada por esta mayor cantidad de etileno contenida en las raíces de los mutantes *sitiens*.

Una segunda posibilidad sobre la participación de estos genes durante el proceso de micorrización es que la vía 9-LOX sea capaz de activar la producción de otras oxilipinas que juegan un papel importante en el desarrollo vegetal durante la colonización de las raíces por los hongos AM. En este sentido, diversos estudios han

proporcionado pruebas evidentes de la participación de la vía 9-LOX de oxilipinas en la regulación de diversos procesos fisiológicos como la tuberización, el desarrollo floral o el desarrollo de raíces laterales (Yokoyama y col., 2000; Kolomiets y col., 2001; Vellosillo y col., 2007). Concretamente, parece que el 9-HOT, o un producto estructuralmente vinculado a la vía 9-LOX, actúa como un potente inductor de la ondulación de la raíz, así como un modulador endógeno de la formación de raíces laterales, mientras que los productos derivados del metabolismo de las enzimas DES y HPL de esta vía están involucrados en la elongación y dominancia apical del sistema radicular (Vellosillo y col., 2007). No obstante, la estimulación del desarrollo de las raíces laterales para favorecer la infección por parte de los hongos MA es un proceso que se produce durante las primeras etapas de la colonización, mientras que la activación de la vía 9-LOX observada en el análisis de expresión realizado a partir del estudio transcriptómico se produce en etapas posteriores de la colonización.

Por otra parte, recientemente se ha realizado un análisis del perfil de ácidos grasos en plantas micorrizadas de *M. truncatula* inoculadas con *G. intraradices*, no observándose cambios en el metabolismo 9-LOX y sí en el metabolismo 13-LOX del que se deriva la síntesis del JA, que alcanzó altos niveles de inducción en raíces inoculadas (Stumpe y col., 2005). Esto sugiere que la activación de la vía 9-LOX podría ser más importante en Solanáceas que en otras familias de plantas.

1.2 Inducción de genes relacionados con el metabolismo de isoprenoides en plantas de tomate silvestres micorrizadas.

El análisis del perfil transcripcional también reveló la regulación positiva de diversos genes relacionados directamente con el metabolismo de isoprenoides solamente en las plantas de tomate de tipo silvestre micorrizadas, sugiriendo la necesidad de una micorrización funcional y correctamente establecida para su expresión. En este sentido, se ha demostrado que la colonización de raíces por hongos AM suele conducir a una acumulación de apocarotenoides en la mayoría de las plantas hospedadoras (Fester y col., 2002, 2005; Strack y Fester, 2006). Esta acumulación se produce preferentemente en las últimas etapas de la interacción simbiótica y está acompañada por una regulación positiva de los genes *DXS2* (1-desoxi-D-xilulosa 5-

fosfato sintasa 2) y *DXR* (1-desoxi-D-5-fosfato xilulosa reductoisomerasa) de la ruta del metileritritol fosfato (MEP) de síntesis de isoprenoides. Por otra parte, otro reciente análisis de microarrays de raíces de tomate micorrizadas con *G. intraradices* y *G. mosseae* también ha mostrado la existencia de una regulación significativa de genes implicados en el metabolismo de isoprenoides durante el proceso de formación de la simbiosis (López-Ráez y col., 2010), señalando igualmente que la activación de la vía parece depender del grado de micorrización.

La vía MEP se produce en los plastídios y da lugar a la síntesis del difosfato de isopentenilo (IPP) y el difosfato de geranylgeranilo (GGDP), a partir de los cuales se deriva la formación de importantes isoprenoides vegetales como carotenoides, apocarotenoides, ABA, estrigolactonas y giberelinas (Walter y col., 2000; Hans y col., 2004). Estudios previos a esta Tesis doctoral han detectado una regulación positiva del gen *DXS2* en raíces de plantas micorrizadas (Walter y col., 2002), observándose también un aumento en la actividad del promotor de dicho gen en células con arbusculos en plantas de *M. truncatula* colonizadas por hongos AM (Floss y col., 2008a). De forma similar, Floss y colaboradores (2008a,b) han demostrado que una supresión drástica de la expresión génica de *DXS2* y *CCD1* (9,10-9',10'-carotenoide dioxigenasa) en pelos radiculares de raíces de *M. truncatula* es capaz de producir una reducción en los niveles de acumulación de apocarotenoides que, a su vez, es acompañada por un incremento en la proporción de arbusculos degenerados en las raíces de plantas micorrizadas. Sin embargo, mientras que el silenciamiento génico de *DXS2* suprimió la expresión de genes marcadores típicos en plantas micorrizadas (Floss y col., 2008a), la represión génica, mediada por ARNi, de *CCD1* no dio lugar a cambios importantes en los marcadores moleculares de la simbiosis micorriza arbuscular (Floss y col., 2008b). No obstante, todavía no está claro si la degeneración arbuscular observada en estos mutantes de *M. truncatula* está directamente relacionada con la supresión de la expresión génica de *DXS2* y *CCD1*.

Un resultado importante derivado del análisis del perfil transcriptómico asociado al proceso de micorrización realizado en esta Tesis doctoral ha sido la identificación de varios genes involucrados en la vía MEP y de síntesis de apocarotenoides en raíces de tomate micorrizadas, homólogos a los genes inducidos en *M. truncatula* durante la micorrización arbuscular. Este resultado confirma la importancia del metabolismo de isoprenoides en la formación de la simbiosis MA. El hecho de que este grupo de genes

se encuentre inducido específicamente en raíces de plantas de tomate silvestres y no en los mutantes *sitiens* deficientes en ABA sugiere que es necesaria una colonización funcional y bien establecida para su expresión en las raíces micorrizadas. Un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio ha demostrado, mediante la utilización de mutantes *sitiens*, que el ABA es necesario para completar el proceso de formación de los arbusculos y para su correcto funcionamiento, afectando también a la capacidad de colonización del hongo (Herrera-Medina y col., 2007). Las plantas *sitiens* se ven afectadas específicamente en el último paso de la síntesis de ABA, y no en cualquier otra rama del metabolismo de isoprenoides, como en la síntesis de estrigolactonas y/o apocarotenoides, que desempeñan un papel en las primeras etapas de la simbiosis micorriza arbuscular (Akiyama y col., 2005). De hecho, los mutantes *sitiens* no tienen una afectación tan dramática en los primeros pasos de señalización de la simbiosis (Herrera-Medina y col., 2007). En este sentido, la activación de la ruta de síntesis de apocarotenoides en plantas micorrizadas podría ser una consecuencia de la formación de los arbusculos, siendo, por tanto, la no activación de esta ruta la causa del deterioro en el desarrollo arbuscular observado en los mutantes *sitiens* deficientes en ABA.

Como se ha mencionado con anterioridad, *DXS2* y *DXR* actúan en los primeros pasos de la vía MEP que da lugar a la síntesis de IPP y GGDP, a partir de los cuales se deriva la formación de importantes isoprenoides vegetales como carotenoides, apocarotenoides, ABA, estrigolactonas y giberelinas, la mayoría de ellos con relevancia en la formación y desarrollo de la micorrización arbuscular, como se ha demostrado para ABA, estrigolactonas y apocarotenoides. En este sentido, una de las conclusiones más importantes que se derivan del análisis comparativo del perfil transcriptómico realizado en plantas de tomate inoculadas con *G. mosseae* (Fiorilli y col., 2009) y el estudio transcriptómico realizado en esta Tesis doctoral con plantas de tomate micorrizadas con *G. intrarradices*, es que el proceso de micorrización produce una alteración en la biosíntesis y catabolismo de giberelinas y ABA, sugiriendo que el ABA, como se ha descrito anteriormente, está implicado en la formación y desarrollo arbuscular.

Existen pocos datos sobre la participación de las giberelinas en el proceso de micorrización arbuscular, no obstante, un estudio realizado por El Ghachtouli y colaboradores (1996) ha revelado que la aplicación exógena de bajas concentraciones de giberelinas sobre raíces micorrizadas provoca la inhibición de la formación de los

arbúsculos, y dosis más altas son capaces de afectar a la frecuencia e intensidad de la micorrización, llegando a inhibirla completamente. En este sentido, un reciente estudio realizado con plantas de guisantes alteradas en la capacidad de síntesis de giberelinas ha demostrado la existencia de un efecto negativo de la giberelinas sobre la interacción micorriza arbuscular, observándose un aumento de la colonización por hongos AM en plantas deficientes en la síntesis de esta fitohormona y siendo las proteínas DELLA esenciales en esta respuesta (Foo y col., 2013). Por otra parte, los resultados derivados del análisis del perfil transcriptómico asociado a la micorrización realizado en este trabajo muestran un papel directo de las giberelinas durante la micorrización en plantas de tomate ya que se ha observado una regulación positiva de cuatro genes relacionados con el metabolismo de giberelinas en las raíces de las plantas micorrizadas de tipo silvestre, y no en los mutantes *sitiens* deficientes en ABA, sugiriendo la necesidad de una micorrización funcional y bien establecida para su expresión. Estos datos coinciden con los obtenidos en el análisis transcriptómico de plantas de tomate micorrizadas realizado por López-Ráez y colaboradores (2010), en el cual también se observó la inducción de varios genes relacionados directamente con el metabolismo de giberelinas. Por otra parte, en un trabajo reciente con *M. truncatula* se han obtenido 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 y col., 2012).

Teniendo en cuenta estos resultados, y los anteriormente descritos, el análisis transcriptómico mostrado en este trabajo de Tesis Doctoral ha demostrado la importancia fundamental del metabolismo de isoprenoides durante el proceso de micorrización, ya que tres productos finales derivados de este metabolismo, giberelinas, ABA y apocarotenoides, parecen ser esenciales para la regulación y formación de los arbúsculos durante la simbiosis MA. Así, recientes resultados obtenidos en nuestro grupo de investigación sugieren que las giberelinas son compuestos reguladores de la formación de la Micorriza Arbuscular en tomate, y la regulación de la formación de los arbúsculos en raíces de plantas de tomate colonizadas por *G. intraradices* depende de la interacción entre ABA y giberelinas, de tal forma que coexisten efectos antagonistas y dependientes de la acción de estas hormonas (Martín Rodríguez, 2013 Tesis Doctoral).

1.3 Inducción de genes de respuesta defensiva y metabolismo de la pared celular asociada a la micorrización de mutantes *sitiens* deficientes en ABA.

El estudio comparativo de los datos obtenidos en el análisis transcriptómico de las plantas de tomate de tipo silvestre y mutantes *sitiens* deficientes en ABA, también reveló que el deterioro en la formación arbuscular de los mutantes en ABA se encuentra asociado con una regulación positiva de genes relacionados con la defensa y el metabolismo de la pared celular. En este sentido, se ha propuesto que la resistencia a patógenos en plantas con un bajo contenido en ABA puede producir una respuesta defensiva mayor y más rápida, en cuanto a una mayor acumulación de transcritos relacionados con la defensa y su posterior activación que plantas de tipo silvestre. De hecho, un análisis del perfil transcriptómico asociado a la respuesta defensiva de plantas de tomate frente a patógenos realizado por Asselbergh y colaboradores (2007) reveló que la acumulación de transcritos relacionados con la defensa frente a la infección de *Botrytis cinerea* fue mayor en mutantes *sitiens*, deficientes en ABA, que en plantas de tomate de tipo silvestre. Por otra parte, varios estudios han demostrado una regulación positiva de genes implicados en la síntesis de la pared celular en plantas durante la simbiosis micorriza arbuscular (Balestrini y Bonfante, 2005), observándose una acumulación de genes codificantes para endo-1,4- β -D-glucanasas y celulosa sintasas específicamente en células con arbusculos (Liu y col., 2003; Guether y col., 2009). Los productos de estos genes, en combinación con otras proteínas, probablemente desempeñen un papel en la modificación de la pared celular y la expansión celular durante la formación de los arbusculos (Balestrini y Bonfante, 2005), estando la expresión de estos genes regulada por la morfogénesis de los arbusculos.

Además de genes codificantes para endo-1,4- β -D-glucanasas, en el perfil transcriptómico realizado en esta Tesis doctoral, se han identificado otros genes que podrían estar implicados en la modificación y expansión de la pared celular durante el proceso de micorrización, como expansinas, extensinas y pectinasas. Curiosamente, estos genes aparecieron regulados positivamente solo en los mutantes *sitiens* deficientes en ABA, probablemente debido al desarrollo incompleto de los arbusculos que se produce en estas plantas como consecuencia del deterioro en la síntesis de ABA (Herrera-Medina y col., 2007). Posiblemente, estos genes involucrados en la

modificación de la pared celular durante la micorrización se encuentran regulados positivamente al comienzo del desarrollo de los arbusculos, produciendo la formación del espacio periarbuscular entre las membranas de las células de la planta y el hongo MA. Por el contrario, una vez se ha formado este espacio periarbuscular, cuando el arbusculo se encuentra totalmente desarrollado, la expresión de estos genes probablemente se regule negativamente no observándose su inducción. De un modo similar, durante las etapas tardías de la micorrización, parece producirse un mecanismo de activación de la respuesta de defensa de la planta, aunque solo en las células de plantas que contienen arbusculos (García Garrido y Ocampo, 2002), el cual podría estar involucrado en el control de la propagación fúngica y en el desarrollo y senescencia arbuscular. En un sentido amplio, el proceso de morfogénesis arbuscular podría regular la expresión de genes de hidrólisis de pared celular vegetal y respuesta defensiva. En este sentido, nuestros resultados sugieren que el proceso de maduración de los arbusculos juegue un papel importante en la regulación negativa de genes relacionados con la respuesta defensiva y la modificación de la pared celular. Considerando esta hipótesis, es posible que la activación o falta de regulación negativa de estos genes en plantas *sitiens*, deficientes en ABA, tal y como se observa en el análisis transcriptómico sea debida al desarrollo incompleto de los arbusculos que tiene lugar en estas plantas.

Por otra parte, el análisis de expresión del gen β -*Exp* codificante para una β -Expansina en respuesta al tratamiento hormonal con ABA, JA y etileno, mostró una clara inducción tras 24 h de la aplicación para las tres fitohormonas. En este sentido, podría pensarse que este resultado refleja una fina regulación de la modificación de la pared celular de la planta en respuesta al desarrollo de los arbusculos, en la que el ABA, JA y etileno podrían ser necesarios para el correcto establecimiento del mismo en la célula vegetal.

Existen evidencias de una interacción antagónica entre las vías de señalización de ABA y etileno (Beaudoin y col., 2000; Gazzarrini y McCourt, 2001). La deficiencia de ABA en plantas puede producir una inducción de etileno, tal y como ocurre en los mutantes *sitiens* (Hussain y col., 1999). En este sentido, se ha sugerido que uno de los mecanismos utilizados por el ABA para determinar la susceptibilidad a la infección fúngica podría ser a través de la modulación negativa de la vía de etileno (Herrera-Medina y col., 2007; Martín-Rodríguez y col., 2010; 2011). Dado este antagonismo entre ABA y etileno, es lógico pensar que la vía de etileno podría tener relevancia en la

regulación de la expresión de los genes de defensa y modificación de la pared celular, que parecen ser las categorías de genes más diferencialmente reguladas en los mutantes *sitiens* deficientes en ABA. En este sentido, los resultados obtenidos en la cuantificación de la expresión génica en respuesta al tratamiento hormonal, realizado en este trabajo, parecen apoyar esta hipótesis, ya que los dos genes seleccionados regulados positivamente en las plantas micorrizadas *sitiens* y relacionados con la respuesta defensiva (*Endo-Q*) y la modificación de la pared celular (*β -Exp*) responden al tratamiento con etileno y MeJA.

2. PARTICIPACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN EL METABOLISMO DE OXILIPINAS DURANTE EL PROCESO DE MICORRIZACIÓN

Las oxilipinas son un grupo de compuestos biológicamente activos, derivado del metabolismo oxidativo de los ácidos grasos poli-insaturados, que realizan una gran variedad de funciones durante el desarrollo y en la respuesta de las plantas frente a condiciones de estrés (Howe y Schilmiller, 2002). Se generan por la acción coordinada de lipoxigenasas y un grupo de citocromos P450 (CYP74) especializados en el metabolismo de los hidroperóxidos de ácidos grasos, dando lugar a dos vías específicas en plantas, 9-LOX y 13-LOX, derivadas de la inserción de un átomo de oxígeno en el carbono 9 ó 13 del ácido linolénico. La rama 13-LOX, derivada de la vía iniciada por la enzima AOS, es la responsable de la formación del JA y su conjugado activo, el ligando jasmonil-isoleucina (JA-Ile). Varios estudios han demostrado su participación en el proceso de formación de micorriza arbuscular señalando un papel fundamental en el desarrollo de los arbusculos (Isayenkov y col., 2005; Tejeda-Sartorius y col., 2008) y en la regulación de la colonización de las raíces por hongos MA mediante la inducción de genes codificantes de proteínas relacionadas con la respuesta defensiva (Herrera-Medina y col., 2008). En este sentido, un reciente análisis transcriptómico ha revelado la inducción de algunos de los genes involucrados en esta vía durante el proceso de micorrización en plantas de tomate (López-Ráez y col., 2010), observándose también un incremento de JA libre en raíces micorrizadas de plantas de cebada, pepino, *Medicago truncatula* y soja (Hause y col, 2002; Vierheilig y Piche, 2002; Meixner y col, 2005; Stumpe y col, 2005) pero no en plantas micorrizadas de tomate (López-Ráez y col., 2010). Por otra parte, el análisis del perfil transcriptómico asociado al proceso de micorrización realizado en esta Tesis doctoral, junto al análisis realizado por López-Ráez y colaboradores (2010), ambos en plantas de tomate, ha revelado la existencia de un grupo de genes regulados positivamente e involucrados en el metabolismo de la vía 9-LOX de oxilipinas durante etapas avanzadas de la colonización. Sin embargo, en el caso de *M. truncatula* un análisis del perfil de ácidos grasos en plantas inoculadas con *G. intraradices*, no ha detectado cambios en el metabolismo 9-LOX y sí en el metabolismo 13-LOX del que se deriva la síntesis del JA, que alcanzó altos niveles de inducción en raíces inoculadas (Stumpe y col., 2005). A parte de esto, existen pocos datos sobre la importancia del metabolismo de oxilipinas durante el proceso de

micorrización y, a tenor de los resultados mencionados anteriormente, es posible que existan algunas diferencias en la participación de las vías 9 y 13-LOX de oxilipinas entre Solanáceas y otras familias de plantas durante la formación de la micorriza arbuscular.

En este sentido, se realizó un estudio del patrón de expresión de un conjunto de genes involucrados en las vías 9 y 13-LOX con el objeto de aportar nuevos conocimientos sobre la participación del metabolismo de oxilipinas durante el proceso de micorrización arbuscular. Los resultados derivados de este análisis revelaron la existencia de una inducción en etapas tardías de la micorrización de los genes codificantes para las enzimas LOXA y AOS3, involucradas en la vía 9-LOX de oxilipinas y responsables de la formación de ketoles y 10-OPDA, siendo esta inducción, aparentemente, dependiente de un cierto grado de colonización fúngica. Estos datos corroboran los resultados obtenidos en el análisis transcriptómico llevado a cabo al comienzo de esta Tesis doctoral, así como de otro reciente análisis de microarrays de raíces de tomate micorrizadas con diversos hongos MA (López-Ráez y col., 2010), sugiriendo que el papel de la vía 9-LOX podría estar relacionado con el control de la propagación de los hongos micorrízico arbusculares en las raíces y no tanto en el establecimiento de la simbiosis. Por otra parte, esta regulación positiva de los genes *LOXA* y *AOS3* solo se observó en el compartimento micorrizado de plantas de tomate inoculadas con *G. intraradices* en un sistema de cultivo de raíces compartimentalizadas. Por lo tanto, si la activación de la ruta 9-LOX de oxilipinas es parte de la estrategia de la planta para controlar el desarrollo de los hongos micorrízicos en el interior de las raíces sus efectos deberían ser locales, como así parece ser, y no contribuir a los mecanismos de regulación sistémica por hongos MA tales como la autorregulación o resistencia sistémica a patógenos fúngicos.

Por otra parte, el patrón de expresión del gen *LeDES*, codificante para una divinil éter sintasa de la vía 9-LOX que cataliza la biosíntesis de los ácidos colneléico y colnelénico, no mostró grandes cambios en su expresión entre plantas micorrizadas y no micorrizadas para ninguno de los ensayos realizados, excepto en el segundo tiempo de cosecha (52 dpi) de las plantas de la variedad silvestre Castlemart micorrizadas, donde se observó una inducción similar y más acentuada a la detectada para los genes *LOXA* y *LeAOS3*. En relación a esto, en el análisis transcriptómico realizado por López-Ráez y colaboradores (2010) se ha descrito una regulación positiva de la expresión de *LeDES*

asociada a raíces de plantas de tomate micorrizadas, sin embargo, tanto en el análisis de microarrays llevado a cabo en esta Tesis doctoral como en otro análisis publicado por Fiorilli y colaboradores (2009), no se ha detectado dicha inducción, si bien, en plantas *jail* insensibles a JA micorrizadas se observó una cierta acumulación de ácido colnelénico respecto a plantas no inoculadas. En este sentido, es posible que la regulación de *LeDES* durante la micorrización sea diferente a la de los genes *LOXA* y *AOS3* y no tan dependiente del grado de micorrización, como parece ser en el caso de estos últimos.

El análisis de expresión de los genes involucrados en el metabolismo de la vía 13-LOX de oxilipinas no reveló un patrón claro relacionado con el proceso de micorrización, si bien, la tendencia mostrada por estos genes en los ensayos realizados con las variedades silvestre Ailsa Craig y Castlemart se asemejó al patrón obtenido para la vía 9-LOX, observándose un aumento de la expresión en plantas inoculadas en estadíos avanzados. Sin embargo, esta inducción parece ser menor en los genes de la vía 13-LOX respecto a la mostrada por los genes de la vía 9-LOX y no siendo detectada en algunos de los ensayos realizados con otras variedades silvestres de tomate. En este sentido, en el análisis transcriptómico realizado por López-Raéz y colaboradores (2010) en plantas de tomate inoculadas con varios hongos MA solo se observó un aumento moderado en la expresión de los genes *LOXD* y *AOS1*, el cual fue relacionado con un posible aumento de la cantidad de OPDA en las raíces de las plantas micorrizadas. Por otra parte, la colonización de raíces de plantas por hongos MA ha sido relacionada con incrementos endógenos de los niveles de JA (Hause y col., 2002; Meixner y col., 2005; Stumpe y col., 2005). En este sentido, Hause y colaboradores (2002) detectaron un incremento en la acumulación de JA libre y su conjugado con isoleucina en las células con arbusculos de raíces de cebada micorrizadas, relacionando dicho incremento con la inducción de los genes *AOC* y *AOS* implicados en la biosíntesis de JA y de la proteína regulada por jasmonatos JIP23. Sin embargo, tanto en el análisis transcriptómico llevado a cabo en esta Tesis doctoral como en otros dos recientes análisis transcriptómicos realizados con plantas de tomate micorrizadas no se ha observado una inducción de estos genes (Fiorilli y col., 2009; López-Raéz y col., 2010). En este sentido, es posible que existan algunas diferencias en la participación de las vías 9 y 13-LOX de oxilipinas entre Solanáceas y otras familias de plantas durante la formación de la micorriza arbuscular. Otra prueba que refuerza esta idea se deriva de un análisis del

perfil de ácidos grasos realizado en plantas micorrizadas de *M. truncatula* inoculadas con *G. intraradices*, en el que no se observó cambios en el metabolismo 9-LOX y sí en el metabolismo 13-LOX del que se deriva la síntesis del JA, que alcanzó altos niveles de inducción en raíces inoculadas (Stumpe y col., 2005), mientras que en el análisis de contenido de JA y su conjugado activo JA-Ile llevado a cabo en esta Tesis doctoral, así como en otro análisis realizado por López-Ráez y colaboradores (2010) en plantas de tomate inoculadas con distintos hongos MA no se ha visto alterado.

Por otra parte, la regulación de los genes de la vía 13-LOX, al igual que ocurre con los genes involucrados en la vía 9-LOX, parece tener un carácter local, no observándose una regulación transcripcional en el compartimento no inoculado de las plantas micorrizadas con *G. intraradices* en el sistema de cultivo de raíces compartimentalizadas, si bien, tampoco se observa una clara inducción de los genes de esta vía en el compartimento inoculado, excepto para *LOXD* en etapas intermedias (40 dpi), confirmando esta regulación menos acentuada de la vía 13-LOX de oxilipinas durante el proceso de micorrización arbuscular en plantas de tomate.

Estudiado el patrón de expresión de los genes involucrados en el metabolismo de oxilipinas, así como su no activación sistémica durante el proceso de micorrización, se realizó un experimento para determinar su respuesta a tratamientos con hormonas vegetales en plantas de tomate silvestres de la variedad Moneymarker sin micorrizar. El objeto de este experimento fue comprobar si la expresión de los genes involucrados en el metabolismo de oxilipinas puede estar mediada por ciertas fitohormonas con acción demostrada como reguladoras del proceso de formación de simbiosis micorriza arbuscular (Hause y col., 2007). En este sentido, la expresión de los genes *LOXA* y *AOS3*, involucrados en la vía 9-LOX, mostró un patrón similar en respuesta al tratamiento con fitohormonas, y diferente al observado para *LeDES*. Así, el tratamiento con MeJA provocó un aumento precoz, moderado y transitorio de la expresión de *LeDES*, mientras que causó una inducción más aguda y permanente en *LOXA* y *AOS3*. Además, los tratamientos con SA, ABA y Et regularon positivamente la expresión de *LeDES*, incluso de un modo mayor que la producida por la aplicación con MeJA, sin embargo, estos tratamientos no produjeron cambios en la expresión de *LOXA* y apenas en la de *AOS3*. Esto demuestra que la respuesta de *LeDES* es más versátil frente a tratamientos con hormonas relacionadas con la defensa y que su regulación parece ser más sensible a dichos tratamientos que la observada en *LOXA* y *AOS3*.

Respecto a la respuesta al tratamiento hormonal de los genes involucrados en la vía 13-LOX de oxilipinas, la aplicación con MeJA provocó un aumento considerable y permanente en el tiempo en la expresión de todos ellos, si bien, en el caso de *AOS2* y *OPR3*, esta inducción fue menos acentuada que en los otros genes de la vía. Además, la aplicación con ABA, Et, GA y SA produjo una inducción temprana y moderada al tratamiento hormonal que decreció significativamente a las 12 h, detectándose un nuevo pico de inducción en etapas avanzadas, en la expresión de *LOXD* y *AOS1*. Dicho patrón de expresión, sin embargo, no se observó en el resto de genes de la vía, con excepción de la respuesta al tratamiento con SA en *AOC* y *OPR3*. Este comportamiento oscilatorio en respuesta a diferentes tratamientos hormonales puede deberse a una generación rápida en la cantidad endógena de la hormona en cuestión como respuesta a la aplicación del producto inductor que, posteriormente, podría originar un balance negativo de retroalimentación limitando la producción de la misma, volviendo a producirse una inducción más tardía debido a la presencia continuada del inductor exógeno. Por otra parte, el diferente patrón de expresión observado entre los genes *LOXA* y *AOS3* de la vía 9-LOX, no inducibles por otros tratamientos hormonales además de MeJA, y los genes de la vía 13-LOX, fundamentalmente *LOXD* y *AOS1*, capaces de ser regulados por otras fitohormonas, sugiere la posibilidad de que ambas vías tengan un papel diferente durante el desarrollo de la simbiosis micorriza arbuscular en Solanáceas.

Durante los ensayos del presente trabajo, el uso de mutantes *jai-1* ha permitido estudiar la regulación de la micorrización debida a la ruta de señalización y activación génica mediada por JA. La mutación *jai1* afecta la función del gen de tomate *LeCOII*, homólogo al gen *COII* (Coratine Insensitive) de *Arabidopsis* (Feys y col., 1994), el cual es necesario para la activación de genes de defensa inducidos por JA. En este sentido, los mutantes *jai-1* de tomate son deficientes en la señalización de JA, siendo incapaces de inducir la expresión de genes relacionados con la defensa de la planta mediados por esta fitohormona en respuesta a herida o a la aplicación de MeJA (Li y col., 2004). En relación con esto, Herrera-Medina y colaboradores (2008) observaron, al igual que en este estudio, una mayor susceptibilidad a la colonización por hongos MA, especialmente en la frecuencia e intensidad de micorrización, en plantas transgénicas de tomate insensibles a JA, *jai-1*, respecto a plantas silvestres, señalando una evidencia clara y directa de que el JA contribuye a la regulación negativa de la micorrización. En

paralelo a este incremento en la colonización por hongos MA, la insensibilidad a la respuesta mediada por JA en los mutantes *jai-1* llevó aparejada una supresión de la capacidad de inducción de los genes *LOXA* y *AOS3*, involucrados en la vía 9-LOX, no detectándose la inducción típica observada en plantas de tomate silvestre sensibles a JA. Por otra parte, la expresión de *LOXA* y *AOS3* en plantas sensibles a JA mostró un patrón similar a *PIN-II*, un gen efector de la respuesta a JA que codifica para un inhibidor de proteinasas relacionado con la respuesta frente a patógenos e inducible por JA, mientras que en los mutantes *jai-1* no se detectó cambios en su expresión, como ya se ha demostrado previamente (Herrera-Medina y col., 2008). Estos resultados sugieren que la activación de los genes *LOXA* y *AOS3* durante la micorrización, aunque no la de *LeDES*, en la que no se observaron cambios significativos, depende de la activación de la vía de señalización de JA y confirman los resultados de estudios anteriores en los que no se ha podido detectar la expresión de *AOS3* en mutantes *jai-1* insensibles a JA (Itoh y col., 2002). Además, esto sugiere que *LOXA* y *AOS3* no son necesarios para el éxito de la colonización de la raíz por parte de hongos MA ya que los bajos niveles de en la expresión de ambos genes en los mutantes *jai-1* no afectó negativamente a la formación de la simbiosis micorriza arbuscular.

Por otra parte, el aumento de la colonización por hongos MA en los mutantes *jai-1* de tomate, mostró una ligera disminución de la expresión de *LOXD*, *AOC*, *AOS2* y *OPR3* en las plantas micorrizadas respecto a las no micorrizadas para el primer tiempo de cosecha, no observándose cambios relevantes en etapas más tardías en ninguno de los genes involucrados en la vía 13-LOX. Aunque *LeCOII* es esencial para la expresión génica mediada por JA en tomate, se ha demostrado que la vía de señalización JA/COII realiza diferentes funciones en el control del nivel de expresión de genes de respuesta temprana, entre los que se incluyen los genes codificantes de las enzimas biosintéticas de JA (vía 13-LOX) y otros genes de respuesta a herida, y tardía, como ciertos inhibidores de proteasas (Li y col., 2004). Así, Li y colaboradores (2004) observaron que tanto la respuesta basal como la inducida por MeJA en genes de respuesta tardía fue suprimida en mutantes *jai-1*, mientras que la expresión basal de genes de respuesta temprana se mantuvo, señalando la existencia de un mecanismo dependiente/independiente de *LeCOII* en la regulación génica mediada por JA. En este sentido, este mecanismo de control dependiente/independiente de *LeCOII* sobre la expresión de genes de respuesta temprana podría explicar la mayor expresión de los

genes de la vía 13-LOX observada en los mutantes *jai-1* no micorrizados frente a los micorrizados, en los que ésta podría estar regulada por el proceso de micorrización.

Como en el caso de las plantas de tomate insensibles a JA, *jai-1*, la deficiencia en la capacidad de biosíntesis de JA en los mutantes *spr2* y *def-1*, llevó aparejado una supresión de la capacidad de inducción de los genes *LOXA* y *AOS3*, involucrados en la vía 9-LOX, si bien, para *AOS3* se mantuvo un cierto nivel de expresión (< 2 veces) en etapas tardías. Por otra parte, aunque sería de esperar que la capacidad de micorrización en los mutantes deficientes en la síntesis de JA se viera aumentada como en las plantas *jai1* insensibles a JA, y como se observó en las primeras etapas de colonización (38 dpi) en los mutantes *def-1*, tanto los mutantes *spr2* a lo largo de todo el ensayo como los mutantes *def-1* en etapas avanzadas de la micorrización, mostraron una menor susceptibilidad a la colonización que las plantas silvestres. Esta aparente contradicción puede deberse a las diferentes funciones desempeñadas por JA en la colonización de las raíces por los hongos MA. En este sentido, la mutación de *def-1* está relacionada con una deficiencia de la síntesis de JA en procesos de respuesta de defensa frente a patógenos (Howe y col., 1996) explicando la carencia en la activación de dichos mecanismos de respuesta y favoreciendo positivamente el proceso de micorrización en los primeros estadios, observándose, sin embargo, una menor colonización en etapas más avanzadas respecto a las plantas silvestres. Curiosamente, esta reducción de la micorrización en etapas tardías estuvo acompañada por una disminución moderada en la expresión de todos los genes involucrados en el metabolismo 13-LOX en las plantas micorrizadas respecto a no micorrizadas, salvo en *AOS2* donde no se vieron cambios. Por otra parte, la mutación de *spr2* afecta a la síntesis de JA en condiciones normales de desarrollo, presentando estas plantas niveles de JA constitutivos más bajos a los de la variedad silvestre (Li y col, 2002). De acuerdo con esto, la menor susceptibilidad a la micorrización en los mutantes *spr2* concuerda con los resultados obtenidos por Tejeda-Sartorius y colaboradores (2008) que demostraron la necesidad de un cierto contenido de JA endógeno en plantas de tomate para un correcto proceso de micorrización, así como con los resultados derivados de la pérdida parcial de función de la enzima AOC en mutantes de *M. truncatula* en los que se observó una reducción drástica en la intensidad de colonización y la formación de arbusculos (Isayenkov y col., 2005). Esto indica que JA juega un papel esencial en la colonización de las raíces por los hongos MA que también podría estar relacionado con la menor colonización observada en los

mutantes *def-1* en etapas avanzadas de la micorrización. Por otra parte, en los experimentos realizados con los mutantes *def-1* y *spr2*, ambas líneas mantuvieron la capacidad de formación de arbusculos, lo que sugiere que el nivel de JA en estas plantas es suficiente para formar arbusculos pero insuficiente para generar una alta colonización en las raíces micorrizadas.

Como se ha indicado anteriormente, la menor susceptibilidad a la micorrización de los mutantes de tomate *spr2* ha sido relacionado con el contenido endógeno de JA así como con la activación de la respuesta mediada por esta fitohormona (Tejeda-Sartorius y col., 2008). En este sentido, para comprobar si las plantas *spr2* revertían su incapacidad parcial para formar micorrización con la aplicación de JA, se decidió estudiar el efecto sobre la micorrización y la capacidad de respuesta de las plantas *spr2* a la aplicación exógena de MeJA con el objeto de esclarecer, en lo posible, el doble papel regulador del JA durante el proceso de colonización de los hongos MA. Así, dosis bajas de MeJA produjeron una recuperación parcial de la micorrización, de acuerdo con los resultados obtenidos por Tejeda-Sartorius y colaboradores (2008). El análisis de expresión de los genes *LOXA*, *AOS3* y *PIN-II*, de respuesta a JA, mostró un patrón similar al tratamiento con MeJA, e inverso al obtenido para los genes marcadores del desarrollo del hongo *GinEF* y *GinGS*, observándose una inducción significativa de su expresión en las plantas mutantes *spr2* tratadas con la dosis alta, que alcanzó valores similares a los de las plantas silvestres, mientras que en las plantas tratadas con la dosis bajas no se detectaron cambios biológicamente relevantes. Por tanto, sería plausible que el nivel basal de JA en los mutantes *spr2* y *def-1* fuera el responsable de la reducción de la formación de la micorriza arbuscular, ya que la reducción de los niveles de JA debe producir, a su vez, una reducción en algún compuesto dependiente de la señal mediada por JA necesario para una mayor infectividad de los hongos MA. Sin embargo, la imposibilidad de estas plantas para acumular JA y activar la defensa mediada por dicha fitohormona, como en el caso de los mutantes *jail* insensibles a JA, podría explicar su incapacidad para inducir la expresión de los genes *LOXA* y *AOS3*, ya que ésta se ha demostrado que es dependiente de la activación de la vía de señalización de JA.

Por otra parte, la recuperación parcial de la micorrización observada en los mutantes *spr2* tratados con dosis bajas de MeJA se vio acompañada de una inducción moderada pero significativa de los genes *AOS1*, *AOC* y *OPR3* de la vía 13-LOX de oxilipinas. En este sentido, varios autores han relacionado el contenido de JA en raíces

de plantas micorrizadas con la expresión de genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos, señalando que la supresión de la vía de síntesis de esta fitohormona puede producir perturbaciones en la expresión/actividad de genes/enzimas implicadas en la hidrólisis de sacarosa y el transporte de azúcares en plantas micorrizadas alterando la colonización y/o la formación de arbusculos (Wright y col., 1998; García-Rodríguez y col., 2007; Schaarschmidt y col., 2006; 2007; Tejeda-Sartorius y col., 2008). Concretamente, Tejeda-Sartorius y colaboradores (2008) demostraron que la reducción en el grado de colonización observada en mutantes *spr2* de tomate está asociada a una regulación negativa de la expresión de genes involucrados en el transporte e hidrólisis de sacarosa y la actividad invertasa de la pared celular. Por lo tanto y en concordancia con lo anteriormente mencionado, sería plausible pensar que la inducción detectada en los genes de la vía 13-LOX en los mutantes *spr2* tratados con dosis bajas de MeJA, en los que se observa una recuperación parcial de la micorrización, estuviese relacionada con una redistribución de nutrientes en la planta que permita una mayor disponibilidad de carbohidratos para el hongo aumentando la capacidad de colonización.

En otro sentido, y como se ha mencionado con anterioridad, varios estudios han demostrado la participación del JA en la regulación de la colonización de las raíces por hongos MA mediante la inducción de genes codificantes de proteínas relacionadas con la respuesta defensiva (García-Garrido y Vierheilig, 2007; Herrera-Medina y col., 2008, este estudio). Asimismo, el estudio del análisis transcriptómico de las plantas de tomate silvestres y mutantes *sitiens* deficientes en ABA realizado durante esta Tesis doctoral, reveló que el deterioro en la formación arbuscular de los mutantes en ABA se encuentra asociado también con una regulación positiva de genes relacionados con la respuesta defensiva y el metabolismo de la pared celular, y se ha propuesto que la resistencia a patógenos en plantas con un bajo contenido en ABA puede producir una respuesta defensiva mayor y más rápida, en cuanto a una mayor acumulación de transcritos relacionados con la defensa y su posterior activación que en plantas de tipo silvestre. En este sentido, los resultados del análisis del patrón de expresión de los genes *LOXD*, *AOS1*, *AOC* y *OPR3*, de la vía 13-LOX de oxilipinas, así como del gen *PIN-II* relacionado con la respuesta frente a patógenos e inducible por JA, en plantas *sitiens* deficientes en ABA mostraron una inducción significativa de estos genes en plantas micorrizadas respecto a no micorrizadas. Esto hace posible pensar que esta inducción en plantas *sitiens*, con una capacidad de micorrización inferior a la de plantas de tipo

silvestre, estuviese relacionada en cierta medida con una activación mayor de la respuesta defensiva mediada por esta y otras fitohormonas, ya que en el análisis transcriptómico realizado en este trabajo se observó una inducción de otros genes efectores de la respuesta defensiva relacionado con otras hormonas vegetales.

Estos resultados sugieren la existencia de un doble papel regulador de la vía 13-LOX de oxilipinas, y del JA como producto final de la misma, en el proceso de formación de la micorriza arbuscular. En primer lugar, una acción positiva, derivada del uso de mutantes deficientes en la síntesis de JA, *spr2* y *def-1*, y de la aplicación de dosis bajas de MeJA sobre mutantes *spr2*, en los que se observó una recuperación parcial de la micorrización asociada a una inducción moderada pero significativa de los genes involucrados en esta vía, posiblemente mediante la activación de la síntesis de sustancias promotoras de la infectividad fúngica o mediante incrementos en la disponibilidad de carbohidratos para el hongo. En segundo lugar, una acción negativa, derivada del uso de mutantes insensibles a JA, *jai-1*, y del uso de mutantes *def-1*, deficientes en la síntesis de JA, ambos con una susceptibilidad a la micorrización mayor que la observada en plantas silvestres, que en el caso de estos últimos se manifiesta solamente en las primeras etapas. Estos estudios sugieren que la ruta de señalización y activación génica mediada por JA, importante en muchas interacciones de patógenos con plantas, también desempeña un papel importante en la interacción de los hongos MA en la colonización de raíces de plantas hospedadoras. En este sentido, el patrón irregular observado durante los diferentes ensayos en la regulación de la vía 13-LOX, podría reflejar este doble papel de la misma en el proceso de micorrización, sugiriendo la necesidad de un fino ajuste en dicha regulación que defina el papel desempeñado por la vía en cada circunstancia concreta.

Por otra parte, tal y como se ha sugerido con respecto a la respuesta frente a *Phytophthora parasitica* (Fammartino y col., 2007) y otros patógenos fúngicos (Bleé, 2002; Vellosillo y col., 2007), es concebible que la vía 9-LOX de oxilipinas juegue un papel defensivo y restrinja el crecimiento de los hongos MA en el desarrollo de la simbiosis micorriza arbuscular. La regulación de la expresión de estos genes en las raíces de plantas de tomate silvestres micorrizadas parece depender de un determinado grado de colonización por hongos MA, estando su patrón asociado al gen *PIN-II*, de respuesta a JA, y restringido a la parte colonizada de las raíces. Esto sugiere que estos genes pueden jugar un papel en el control de propagación de hongos en las raíces y que

sería necesario un cierto umbral de infección en plantas micorrizadas de tomate con el fin de provocar una respuesta de la expresión génica. Por otra parte, esta estrategia de la planta para controlar el desarrollo de los hongos MA dentro de las raíces depende, en parte, de la vía de activación/señalización de JA, como se demuestra del uso de los mutantes *spr2* y *def-1*, deficientes en la síntesis, y *jai-1*, insensibles a esta fitohormona.

En este sentido, para corroborar el papel desarrollado por la vía 9-LOX de oxilipinas durante el proceso de micorrización, se decidió realizar la transformación de plantas de patata de pérdida de función del gen codificante para la enzima aleno óxido sintasa de tomate *LeAos3*, involucrado en la ruta de síntesis de esta vía. Los resultados mostraron una mayor susceptibilidad a la colonización fúngica por parte de las plantas de silenciamiento génico con respecto a la variedad silvestre, afectando principalmente a la frecuencia de micorrización y no a la formación arbuscular. Este hecho confirma el papel regulador de la vía 9-LOX en el control de propagación de hongos MA en las raíces, si bien, esta mayor susceptibilidad a la micorrización se presentó ya en etapas tempranas del desarrollo de la simbiosis, mientras que la activación de la vía, hasta ahora, se había observado en etapas más avanzadas. Sin embargo, sería plausible considerar una participación del metabolismo de oxilipinas en la regulación de la respuesta defensiva de la planta durante los estadios iniciales del proceso de colonización necesaria para el establecimiento de la simbiosis (García-Garrido y Vierheilig, 2007). En este sentido, los mutantes *jai-1*, incapaces de inducir la expresión de genes relacionados con la defensa de la planta mediados por JA, presentan una dinámica de colonización similar. Por otra parte, es sabido que la vía de síntesis/señalización de JA está involucrada en el control de la síntesis de flavonoides en plantas de tomate, observándose un efecto negativo en el metabolismo de flavonoides por la reducción de niveles de JA (Chen y col., 2006), el cual podría afectar negativamente al efecto estimulador del crecimiento de las hifas de hongos MA que se le ha otorgado a este tipo de compuestos (Vierheilig y Piché, 2002; Abdel-Lateif y col., 2012). Por tanto, es posible pensar que la mayor susceptibilidad de las plantas de silenciamiento génico de *LeAOS3*, pudiese estar relacionada con un fallo en la regulación de la respuesta defensiva de la planta en las primeras etapas de la colonización y/o con la alteración en la síntesis de metabolitos secundarios importantes para el establecimiento de la simbiosis.

Por otra parte, el patrón de expresión de los genes involucrados en la vía 13-LOX de oxilipinas en las plantas de silenciamiento génico de *LeAOS3*, mostró una inducción de moderada pero significativa de los genes *LOXD* y *AOS1* respecto a las plantas silvestres en etapas avanzadas de la micorrización. En este sentido, esta inducción podría estar relacionada con la incapacidad de las líneas transgénicas para activar la ruta 9-LOX y, por tanto, con el control sobre la propagación del hongo MA en el interior de la raíz, siendo la vía 13-LOX la encargada de efectuar dicho control como ya se ha observado con anterioridad (García-Garrido y Vierheilig, 2007; Herrera-Medina y col., 2008, este estudio). Este hecho sugiere la existencia de una estrecha relación entre ambas vías del metabolismo de oxilipinas durante el proceso de micorrización arbuscular en Solanáceas, cuya función parece depender del estado de la simbiosis en cada momento.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. El deterioro en la formación arbuscular de los mutantes *sitiens* deficientes en ácido abscísico se encuentra asociado con una regulación positiva de genes relacionados con la defensa y el metabolismo de la pared celular.
2. La correcta funcionalidad de la micorriza arbuscular en tomate está asociada con la activación de genes relacionados con el metabolismo de isoprenoides, especialmente, con ácido abscísico, giberelinas y apocarotenoides, los cuales parecen ser esenciales para la regulación y formación de los arbusculos durante la simbiosis.
3. La vía 9-LOX de oxilipinas desarrolla un papel importante en el control de la propagación de los hongos micorrícicos arbusculares en el interior de las raíces de Solanáceas durante las etapas avanzadas de la simbiosis MA. Su activación se encuentra restringida a la parte colonizada de las raíces y depende, en parte, de la vía de activación/señalización de ácido jasmónico.
4. La vía 13-LOX, y el ácido jasmónico como producto final de la misma, poseen un doble papel regulador durante el establecimiento de la simbiosis micorriza arbuscular. Por un lado, el uso de mutantes *spr2* evidencia que la regulación de la micorrización es dependiente de la correcta funcionalidad de la vía de síntesis/señalización de ácido jasmónico. Por otro, el empleo de mutantes *jai-1* y *def-1* señala un efecto negativo de esta fitohormona sobre la micorrización como sistema de regulación de la planta frente al hongo.
5. La alteración de la vía 9-LOX, derivada de la pérdida de función del gen *LeAOS3*, aumenta la susceptibilidad de las plantas de patata a la micorrización, afectando principalmente a la frecuencia de micorrización y no a la formación arbuscular.
6. Existe una estrecha relación en la regulación de las vías 9 y 13-LOX de oxilipinas durante el proceso de micorrización arbuscular en Solanáceas. La pérdida de función del gen *LeAOS3* produce una activación de la vía 13-LOX de oxilipinas en etapas avanzadas de la micorrización, la cual podría estar relacionada con el control de la propagación del hongo en el interior de las raíces.

ANEXOS

ANEXO I

Lista de genes regulados diferencialmente en raíces de plantas de tomate silvestres y mutantes *sitiens* deficientes en ABA inoculadas con *G. intraradices*.

Genes regulados positivamente en plantas de tomate silvestres y <i>sitiens</i> deficientes en ABA				
ID	Función Molecular	Valor M		
		Rhe I/Rhe NI	Sit I/Sit NI	Rhe I/Rhe NI
AW622368	α - β hidrolasa	7,06	2,83	3,13
X72729	UDP glucosil-transferasa (ERT 1b)	6,73	2,23	4,54
BG631366	Miraculina (proteasa)	4,91	4,65	0,49
BT014524	Subtilasa (proteasa)	4,56	2,01	2,60
AI897365	Inhibidor de proteasa tipo Kunitz	4,14	3,15	1,04
BG643871	Enoil-ACP reductasa	3,93	1,85	2,14
BT014016	Cisteina sintasa (cs1)	3,82	1,16	2,63
BI931127	Miraculina (proteasa)	3,44	2,95	0,38
BG625959	Enoil-ACP reductasa	3,42	1,77	1,91
BT014379	Histidina descarboxilasa (hdc)	3,25	1,28	2,04
BG630947	β -galactosidasa	3,23	1,01	2,27
AF454634	Aleno oxide sintasa	2,86	2,99	0,00
AI895164	ω -6-desaturasa	2,60	2,01	-1,24
U30465	Quitinasa II	2,58	1,01	1,32
AA824679	Dihidrolipoamida S-acetiltransferasa	2,53	1,10	1,54
AF198390	Cistatina (inhibidor de proteasas)	2,45	2,90	0,00
BT013553	Dihidrolipoamida dehidrogenasa	2,40	1,18	1,57
U09026	Lipoxigenasa A	2,24	2,83	-2,20
BT013423	Serina-carboxi-peptidasa	1,89	1,43	0,38
CK715483	Metil-transferasa	1,69	2,23	-1,90
BI423255	Cupina	1,60	1,24	0,04
AW034398	Subtilisina	1,53	1,05	-0,30
BG628131	Metionina sulfoxido reductasa	1,00	1,00	0,00
AW928514	Peroxidasa III	4,61	1,71	2,38
X79337	Ribonucleasa	4,59	1,65	3,26
X58548	Quitinasa (PR-P2)	3,26	2,54	0,00
Y15846	TSI-1	2,25	1,14	0,14
AB015675	Copalil difosfato sintasa	3,18	1,06	2,36
BG125734	Proteína con dominio C2	2,74	1,01	1,62
AB211518	Acuaporina	2,23	1,31	0,49
BI205599	NOD26 (proteína de membrana)	1,77	1,14	0,00
BE451719	Acuaporina	1,14	1,00	0,00
AF515615	Proteína TSB	5,37	2,19	3,14

Genes regulados positiva y específicamente en plantas de tomate				
ID	Función Molecular	Valor M		
		Rhe I/Rhe NI	Sit I/Sit NI	Rhe I/Rhe NI
BG626023	Oxidoreductasa (Rieske)	4,05	0,58	3,41
AB041811	Hidrolasa (LEXYL1)	3,86	0,85	2,89
BI933750	Deoxy-D-celulosa 5-fosfato sintasa 2	3,20	0,68	2,26
AK224705	Transportador carboxibiotina	2,73	0,77	2,00
AI771939	Alcohol deshidrogenasa	2,62	0,38	1,81
AW032379	Aldehido deshidrogenasa	2,60	0,58	1,96
BT014484	Acido abscisico glucosiltransferasa	2,46	0,26	2,43

BI922195	Alcohol deshidrogenasa	2,45	0,20	2,49
AY455313	Metilesterasa	2,38	0,14	2,49
BM412307	Esterasa/lipasa/tioesterasa	2,31	0,00	1,72
BT014229	Biotina	2,24	0,93	1,32
AW094524	Epoxido-hidrolasa	2,21	0,49	1,58
AF243040	Receptor Kinasa (PRK3)	2,21	0,26	2,26
BT012835	Transferasa	2,18	0,00	2,00
BI210118	Rebital deshidrogenasa	1,95	0,26	1,81
AF195507	Citocromo P450	1,94	0,30	1,40
BT012897	Glicosilasa	1,82	0,49	1,43
AY547289	Aminotransferasa clase IV	1,79	0,00	1,72
AW223624	UDP-glucosil transferasa	1,77	0,00	1,72
BT014317	Receptor Kinasa (PRK3)	1,77	0,49	1,32
BT013211	Cisteina sintasa	1,75	0,00	1,14
BG631306	Citocromo P450	1,73	0,77	1,00
BI423262	Tropinona sintasa	1,73	0,17	1,05
BG626692	Ciclina	1,71	0,26	1,25
EF650011	Fitoeno desaturasa	1,70	0,58	1,12
BG629701	Glicerol fosfato deshidrogenasa	1,68	0,38	1,89
BI422925	UDP-glucosil transferasa	1,67	0,20	1,30
CD002771	Peroxiredoxina	1,66	0,58	1,04
BT013475	Amidasa	1,58	0,26	1,20
BE450332	Glucosil-S-transferasa	1,58	0,58	1,43
BG629612	Endoquitinasa	1,55	0,30	1,00
BM411188	Citocromo P450	1,51	0,00	1,32
AY576001	Caroteno dioxigenasa	1,49	0,11	1,26
BM413341	Piruvato deshidrogenasa E1	1,49	0,26	1,20
BT013031	Tropinona sintasa	1,49	0,00	1,63
BT014000	Cisteina sintasa	1,44	0,49	1,14
BI208228	β -ketoacil-ACP sintasa	1,43	0,77	1,00
BI209998	ketoacil-ACP sintasa III	1,41	0,49	1,06
AY007225	Transaldolasa ToTAL2	1,37	0,38	1,07
BT012988	Piruvato deshidrogenasa E1	1,35	-0,40	1,00
AW037801	Glutation transferasa	1,34	0,60	1,05
BI421294	Peptido prolil cis-trans isomerasa	1,33	0,43	1,10
AF331705	Deoxy-D-celulosa 5-fosfato sintasa	1,31	0,58	1,00
BI927125	Peptido prolil cis-trans isomerasa	1,29	-0,50	1,08
BF097880	Esterasa/lipasa/tioesterasa	1,26	0,14	1,20
BF096489	Histidinol fosfato aminotransferasa	1,26	0,10	1,03
AW623004	Metiltransferasa	1,26	-0,30	1,40
AW623542	Aldo-keto reductasa	1,26	-0,20	1,00
AW033409	UDP-glucosil transferasa	1,26	-0,20	1,20
AY442185	Proteína detección nitrógeno (GBL I)	1,20	0,20	1,05
BT013881	Citocromo P450	1,20	0,01	1,00
BT013054	Aldosa 1-epimerasa	1,20	0,60	1,20
BT014205	3-oxoacil-ACP reductasa	1,19	0,50	1,00
BT013409	Hidrolasa	1,10	0,30	1,06
AF258810	Aldehido oxidasa (AOO3)	1,05	0,38	1,00
BT014338	Aldo-keto reductasa	1,00	-0,10	1,00
AW621362	Nodulina 19	1,58	0,00	1,13
CK468696	Quitinasa clase IV	1,26	0,05	1,10
AB010991	Giberelin-3- β -hidrolasa	2,81	0,85	2,26
AI899070	Ent-kaureno oxidasa	1,88	0,38	1,38

AF049898	Giberelin-20-oxidasa	1,67	0,14	1,61
AW931003	Giberelin-2- β -oxidasa	1,08	-0,05	1,00
AW649975	Anexina	1,93	0,49	1,40
BT012906	Anexina	1,77	0,85	1,43
BM412305	Proteína de unión a calcio	1,26	0,20	1,06
BI928506	Anexina	1,18	0,77	1,24
AW039286	Fitocromo A (familia FAR1)	1,14	-0,06	1,10
BE461353	Proteína de unión a calcio	1,00	-0,09	1,06
BI210904	Purina permeasa	2,47	0,00	1,77
AF347613	Transportador de sulfato (ST1)	2,65	0,58	1,71
AY196091	LeNRAMP1	2,10	0,00	1,61
BM410464	Transportador de sodio	2,00	0,53	1,26
CK716206	Acuaporina	1,99	0,40	1,30
AI898188	Acuaporina (familia MIP)	1,32	0,80	1,00
BT012962	Endonucleasa	2,23	0,38	2,43
AI899627	Desconocido	1,94	0,40	1,50
BI922695	Desconocido	1,84	0,26	1,26
AI777695	Desconocido	1,70	0,38	1,26
BI423134	Proteína de unión a metales	1,42	0,90	1,10
BT014064	Aliaza	1,41	0,58	1,00
BM408673	Desconocido	1,41	0,39	1,00
AA824874	Ribonucleasa III	1,38	0,00	1,01
BT013195	Proteína de unión a clorofila	1,38	0,00	1,14
CD002687	Proteína del lumen del RE	1,26	-0,30	1,00
BG126607	Proteína ribosomal	1,26	0,20	1,06
BT013891	Desconocido	1,26	0,25	1,00
BG630849	Desconocido	1,20	0,30	1,07
AI782318	Proteína ribosomal L12-1a	1,18	0,19	1,04
BG628341	Proteína ribosomal L12-C	1,09	0,40	1,00
BT013846	Serina carboxipeptidasa	1,00	0,00	1,00
BT013402	Desconocido	1,00	-0,20	1,00
AW626187	Desconocido	3,40	0,76	2,77
BF113819	Desconocido	2,31	0,80	2,00

Genes regulados positiva y específicamente en mutantes <i>sitiens</i> deficientes en ABA				
ID	Función Molecular	Valor M		
		Rhe I/Rhe NI	Sit I/Sit NI	Rhe I/Rhe NI
BT013596	Subtilisina (inhibidor de proteinasas)	0,48	3,56	-2,48
BI204244	Proteína de unión a galactosa	0,48	2,58	-2,23
BT013265	Glutamina sintasa	0,84	1,65	-1,02
AI771286	Arginina descarboxilasa 2	0,46	1,43	-1,02
AW034232	Proteasa	0,17	1,43	-1,00
AI487223	Acetiltransferasa	-0,15	1,38	-1,10
AW623338	Esterol desaturasa	0,42	1,32	-1,00
Z97215	NCED3	0,50	1,32	-1,03
BG791226	Proteína síntesis brasinosteroides	0,40	1,26	-1,10
AW649205	Lipasa/hidrolasa	0,60	1,07	-1,00
BT012681	Glicosil-hidrolasa	0,08	1,07	-1,00
AW040299	Glutation-S-transferasa (In2-1)	0,21	1,14	-1,09
U34808	Proteína inducible fosfato (TPSI1)	0,92	2,63	-1,00
BI203178	Peroxidasa	0,13	2,24	-1,72
Z15141	Endoquitinasa	0,00	1,80	-2,29

AF146690	Respuesta a fosfato	-0,58	1,77	-2,13
BI921774	Cistatina (inhibidor de proteasas)	0,00	1,66	-1,07
X71593	Peroxidasa CVI1	0,67	1,66	-1,09
M69248	PR1b1-P1	-1,00	1,58	-2,56
BT013033	Peroxidasa (prx14)	-0,26	1,56	-1,62
AJ635323	Polifenol oxidasa A	0,26	1,53	-1,13
CN385433	Peroxidasa 72 (PER72)	-0,37	1,38	-1,44
X70787	PR P23	-0,48	1,35	-1,00
BG628187	Inhibidor de proteasas	1,01	1,20	-1,00
BI208926	Proteína PR	-0,57	1,14	-1,30
CN385109	Peroxidasa	-1,38	1,07	-1,20
DQ234354	β -expansina	0,13	2,76	-2,78
BT014190	Pectato liasa	0,13	1,99	-1,58
X74906	β -1,3-glucanasa TomQ	0,13	1,93	-1,58
AK224792	Extensina	0,48	1,84	-1,20
Y11268	Endo-1,4- β -D-glucanasa	0,67	1,82	-2,35
Z46674	Extensina	0,26	1,80	-1,00
X55193	Pectato liasa	0,37	1,74	-1,76
U82123	Expansina (LeEXP1)	-0,37	1,69	-2,17
AF077339	Endo-1,4- β -glucanasa (cel5)	0,13	1,63	-1,43
AF059489	Precursor de expansina 5	-0,48	1,56	-1,48
AI894578	Pectina metilesterasa	0,13	1,54	-1,58
Z46675	Extensina (Lemmi11)	-0,58	1,26	-1,13
AF079232	Anexina	0,13	1,14	-1,00
BG628248	Proteína de unión a calcio	0,22	1,00	-1,00
AI777697	Proteína respuesta fotoasimilados	0,13	2,29	-2,26
BI203873	Desconocido	0,56	1,14	-1,00
L22188	TR132. Respuesta a giberilna	0,00	1,99	-2,03
BG629434	Desconocido	0,00	1,85	-1,37
AY026037	LeGRP1	0,13	1,70	-1,37
BG630077	PRP4	-0,47	1,49	-1,20
BG135415	Nodulina familia MtN3	-0,54	1,43	-1,19
AW220237	Factor de transcripción myb	0,00	1,37	-1,00
CB751564	Invertasa/pectina	0,58	1,28	-1,80
BI203707	Proteína de unión a cobre	-0,04	1,14	-1,02

Genes regulados negativamente en plantas de tomate silvestres y <i>sitiens</i> deficientes en ABA				
ID	Función Molecular	Valor M		
		Rhe I/Rhe NI	Sit I/Sit NI	Rhe I/Rhe NI
CN385424	Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa	-1,64	-1,25	0,13
BG629066	Similar a CER1 de <i>Arabidopsis</i>	-1,00	-1,84	-0,40
AJ278765	Transportador de azúcar st3	-1,18	-1,15	0,00
BG628758	Desconocido	-2,32	-1,51	0,60

Genes regulados negativa y específicamente en plantas de tomate silvestres				
ID	Función Molecular	Valor M		
		Rhe I/Rhe NI	Sit I/Sit NI	Rhe I/Rhe NI
EF501822	Aminociclopropano caroxilato oxidasa	-2,47	-0,38	-1,03
CK715596	Fosfolipasa/carboxilesterasa	-1,51	0,13	-1,32
BG630057	O-maloniltransferasa	-1,43	-0,48	-1,75
BT013763	Permeasa	-1,40	-0,39	-1,31

AW036628	Fosfatidilinositol-4-fosfato-5-kinasa	-1,40	-0,75	-0,90
BG628343	Hidrolasa. Similar a lipasas	-1,40	0,48	-0,87
AW626171	Adenino fosforibosiltransferasa	-1,32	0,48	-0,87
AW625324	Fosfatasa inorganica	-1,29	0,18	-1,00
BT014526	Fosfoetanolamino-N-metiltransferasa	-1,25	-0,07	-1,62
BI926164	Asparginasa	-1,25	-0,98	-0,58
BG629202	Kinasa	-1,22	-0,21	-1,13
AJ002589	Kinasa (CYD3;2)	-1,22	0,77	-1,05
BG631263	Deshidroquinato sintasa	-1,15	-0,58	-0,82
BG631562	ADP/ATP translocasa	-1,00	-0,74	-0,32
YO8888	Lactato deshidrogenasa	-1,00	0,07	-1,00
AJ785323	AMP-dependiente sintasa y ligasa	-1,00	0,22	-1,30
M69248	Proteína PR (PR1b1)	-1,79	1,58	-2,58
CN385070	Proteína respuesta hipersensible	-1,40	0,23	-1,06
AI776170	Proteasa inducible <i>Phytophthora</i>	-1,32	0,84	-2,00
AY344539	Proteína PR, α -dioxigenasa	-1,29	-0,22	-1,00
BG626664	Proteína respuesta deshidratación	-1,29	-0,06	-1,30
BT012682	PDF2.3	-1,25	1,43	-2,30
J04099	Inhibidor de proteinasas I	-1,00	0,02	-1,24
BI209670	Xiloglucano endotransglucosilasa	-1,40	-0,11	-1,10
AW649076	Pectino esterasa	-1,29	0,60	-1,16
BI423433	Oxidoreductasa	-1,00	0,70	-1,50
BG125039	Poligalacturonasa	-1,00	-0,19	-1,00
BE354113	Proteína de unión a calcio	-1,18	-0,19	-1,00
AY044236	Factor de transcripción ERF1	-1,09	-0,34	-1,00
BT013786	Proteína tipo myc	-1,00	0,52	-1,43
X95098	Transportador de amonio AMT2	-1,43	-0,26	-1,30
BT014238	Proteína de transporte	-1,15	-0,00	-1,00
BM411799	Canal de potasio	-1,15	-0,09	-1,00
BT013320	Nodulina familia MtN3	-1,69	-0,70	-0,68
AF204794	Desconocido	-1,43	0,45	-1,00
BT014403	Proteína con dominio NAC	-1,43	0,03	-1,04
BG735044	Desconocido	-1,32	0,60	-1,15
BG631211	Desconocido	-1,29	0,00	-1,10
BT013407	Proteína familia glioxalasa I	-1,29	0,08	-1,00
BG123740	Desconocido	-1,22	0,24	-0,71
AI776392	Proteína con dominio DC1	-1,15	-0,76	-0,90
BM413336	Desconocido	-1,15	0,69	-0,79
BM536108	Desconocido	-1,15	0,53	-0,82
BG628285	Proteína similar a siah-1A	-1,03	-0,93	-0,44
BG631653	Proteína dedo de zinc	-1,00	0,91	-1,30
AW649749	Proteína asociada a vesícula	-1,00	0,10	-1,00

Genes regulados negativa y específicamente en mutantes <i>sitiens</i> deficientes en ABA				
ID	Función Molecular	Valor M		
		Rhe I/Rhe NI	Sit I/Sit NI	Rhe I/Rhe NI
AJ785012	ATPasa subunidad 6	-0,90	-1,51	0,08
AY344540	α -dioxigenasa 1	-0,84	-1,29	0,25
AF203481	Fosfoenolpiruvato carboxilasa	-0,30	-1,15	0,27
AW223794	Proteína respuesta a herida	-0,06	-1,29	0,42
AY497477	Endotransglucosilasa-hidrolasa	-0,90	-1,40	0,40
AF049900	Giberelin-20-oxidasa 3	-0,87	-2,32	1,20

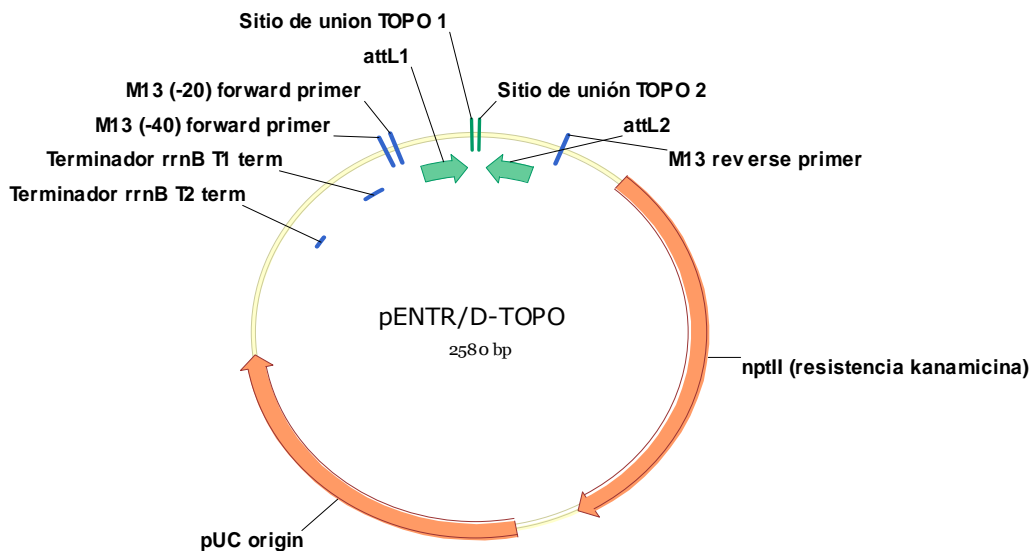
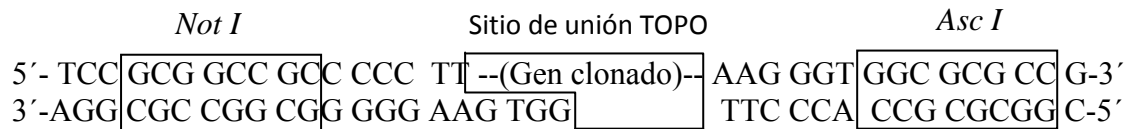
AI896266	Transportador de amonio SAT1	-0,72	-1,40	0,40
AI894551	Desconocido	-0,60	-1,74	1,16
BG713797	Desconocido	0,00	-1,51	1,01
BM409421	Desconocido	-0,05	-1,22	0,25
BG626168	Desconocido	-0,62	-1,15	1,00

ANEXO II

Esquema de plásmidos utilizados para las construcciones génicas.

pENTRTM/D-TOPO[®] (Invitrogen)

Secuencia del sitio de unión del gen clonado en vector pENTRTM/D-TOPO[®]:



Comentarios sobre pENTRTM/D-TOPO[®] (2580pb):

Terminador "rrnB T2 term": 268-295 bases

Terminador "rrnB T1 term": 427-470 bases

attL1: 569-668 bases

Sitio de reconocimiento TOPO[®] 1: 680-684 bases

Sitio de reconocimiento TOPO[®] 2: 689-693 bases

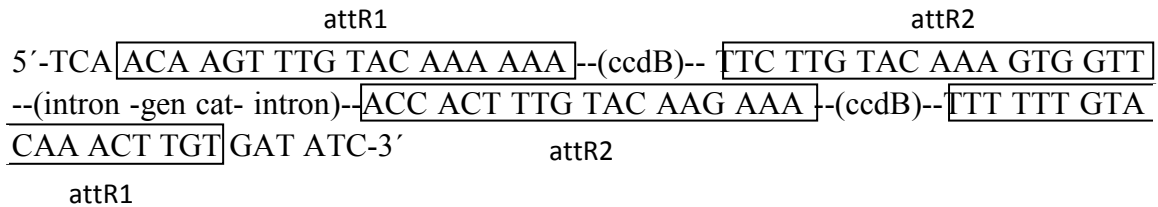
attL2: 705-804 bases

Gen Resistencia Kanamicina (*nptII*): 974-1783 bases

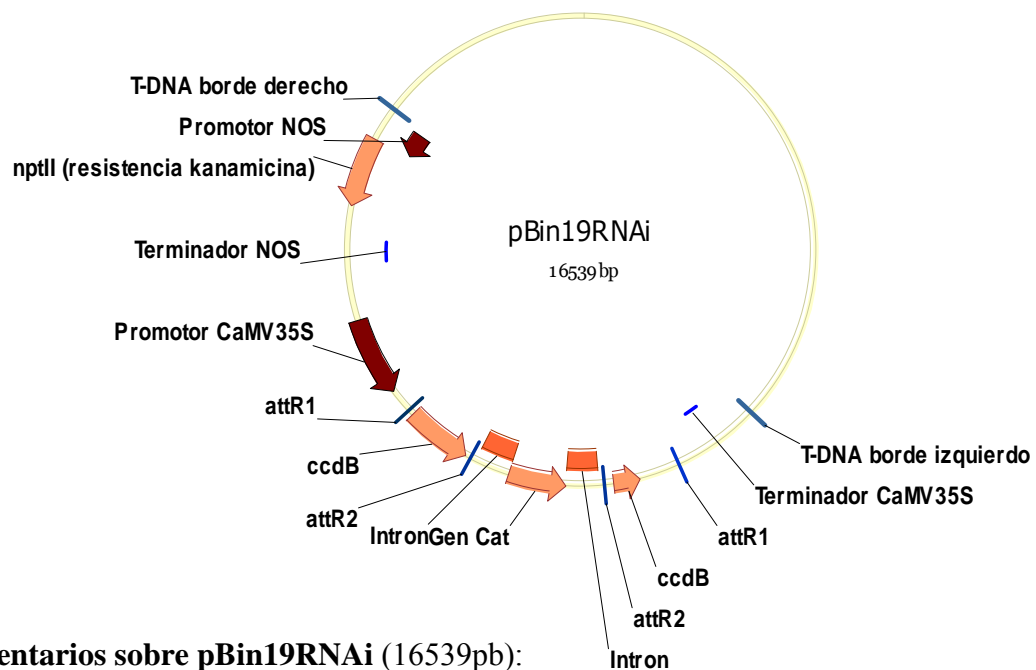
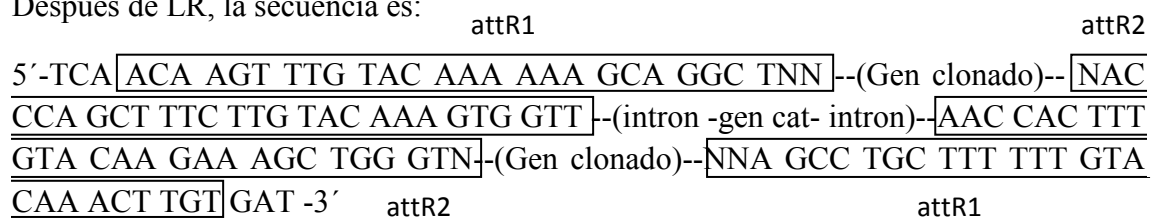
Origen de replicación pUC ori: 1904-2577 bases

Vector binario pBin19RNAi (Serra y col., 2009)

Antes de la Ligación por Recombinación (LR), la secuencia es:



Después de LR, la secuencia es:



Comentarios sobre pBin19RNAi (16539pb):

T-DNA borde izquierdo: 6043-6190 bases

attR1: 7062-7186 bases; 10378-10501 bases

attR2: 7940-8063 bases; 9500-9624 bases

intron: 8064-8437 bases; 9098-9499 bases

Gen Resistencia Cloranfenicol (*cat*): 8438-9096 bases

Gen Resistencia Kanamicina (*nptII*): 12908-13702 bases

T-DNA borde derecho: 14022-14183 bases

BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003)** Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell*. **15**: 63-78.
- Abeles, F.B., Morgan, P.W. y Sltveit, M.E. (1992)** Ethylene in plant biology. Academic Press. San Diego.
- Abdel-Lateif, K., Bogusz, D. y Hocher, V. (2012)** The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and Frankia bacteria. *Plant Signal and Behaviour*. **7**: 636-641.
- Akiyama, K., Matsuki, K. y Hayashi, H. (2005)** Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*. **435**: 824-827.
- Alexander, T., Meier, R., Toth, R., y Weber, H.C. (1988)** Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* L. with reference to *Zea mays* L. *New Phytologist*. **110**: 363-370.
- Al-Karaki, G.N., Hammad, R. y Rusan, M. (2001)** Response of two tomato cultivars differing in salt tolerance to inoculation with mycorrhizal fungi under salt stress. *Mycorrhiza*. **11**: 41-47.
- Allen, M.F., Allen, E.B. y Friese, C.F. (1989)** Responses of non-mycotrophic plant *Salsola kali* to invasion by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. **111**: 45-49.
- Allen, M.F., Moore Jr, T.S. y Christensen, M. (1980)** Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. I. Cytokinin increases in the host plant. *Canadian journal of Botany*. **58**: 371-374.
- Allen, M.F., Moore Jr, T.S. y Christensen, M. (1982)** Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. I. Altered levels of gibberellins-like substances and abscisic acid in the host plant. *Canadian journal of Botany*. **60**: 468-471.
- Amora-Lazcano, E., Vázquez, M.M. y Azcón, R. (1998)** Response of nitrogen-transforming microorganisms to arbuscular mycorrhizal fungi. *Biology and Fertility of Soils*. **27**: 65-70.

- An, G., Ebert, P.R., Mitra, A., y Ha, S.B. (1988)** Binaryvectors. *En: Plant Molecular Biology Manual A3: 1-19. Editores: Gelvin., S.B., Schilperoort, R., and Verma, D. P. Kluwer Academic Pub., The Netherlands.*
- Ane, J.M., Kiss, G.B., Riely, B.K., Penmetza, R.V., Oldroyd, G.E., Ayax, C., Levy, J., Debelle, F., Baek, J.M., Kalo, P., Rosenberg, C., Roe, B.A., Long, S.R., Denarie, J. y Cook, D.R. (2004)** *Medicago truncatula DMII* required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science. 303:* 1364-1367.
- Angle, J.S. y Heckman, J.R. (1986)** Effect of soil pH and sewage sludge on VA mycorrhizal infection of soybeans. *Plant Soil. 93:* 437-441.
- Aroca, R., Porcel, R. y Ruiz-Lozano, J.M. (2007)** How does arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and root cells of *Panax quinquefolius*: a Paris-type mycorrhizal association. *Mycologia. 94:* 587-595.
- Arriagada, C., Herrera, M., Borie, F. y Ocampo, J.A. (2007)** Contribution of arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi to the aluminum resistance of *Eucalyptus globules*. *Water, Air and Soil Pollution. 182:* 383-394.
- Asselbergh, B., Curvers, K., Francxa, S. C., Audenaert, K., Vuylsteke, M., Van Breusegem, F. y Höfte, M. (2007)** Resistance to *Botrytis cinerea* in *sitiens*, an abscissic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiology. 144:* 1863-1877.
- Azcón-Aguilar, C. y Barea, J.M. (1997)** Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Science Horticulture. 68:*1-24.
- Azcón-Aguilar, C., Jaizme-Vega, M.C., Calvet, C. (2002)** The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens. *En: Mycorrhizal technology in agriculture. Editores: Gianinazzi, S., Schüepp, H., Barea, J.M., Haselwandter, K. Birkhäuser, Switzerland pp 187-197.*
- Azcón-Aguilar, C., Rodríguez-Navarro, D.N. y Barea, J.M. (1981)** Effects of ethrel on the formation and responses to VA mycorrhiza in *Medicago sativa* and *Triticum vulgare*. *Plant and Soil. 60:* 461-468.
- Bago, A., Azcón-Aguilar, C. Goulet, A., y Piche, Y. (1998)** Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist. 139:* 375-388.

- Baier, M.C., Keck, M., Gódde, V., Niehaus, K., Küster, H. y Hohnjec, N. (2010)** Knockdown of the symbiotic sucrose synthase *MtSucSI* affects arbuscule maturation and maintenance in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*. **152**: 1000-1014.
- Balestrini, R. y Bonfante, P. (2005)** The interface compartment in arbuscular mycorrhizae: A special type of plant cell wall? *Plant Biosyst.* **139**: 8-15.
- Balestrini, R., Romera, C., Puigdomenech, P. y 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.
- Balestrini, R., José-Estanyol, M., Puigdoménech, P. y Bonfante, P. (1997)** Hydroxyproline-rich glycoprotein mRNA accumulation in maize root cells colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus as revealed by in situ hybridization. *Protoplasma*. **198**: 36-42.
- Balzerque, C., Puech-Pags, V., Bécard, G. y Rochange, S.F. (2011)** The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. *Journal of Experimental Botany*. **62**: 1049–1060.
- Banerjee, A. K., Prat, S. y Hannapel, D. J. (2006)** Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. ssp. *andigena*) plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Science*. **170**: 732-738.
- Bannenberg, G., Martínez, M., Rodríguez, M.J., López, M.A., Ponce de León, I., Hamberg, M. y Castresana, C. (2009)** Functional analysis of α -DOX2, an active α -dioxygenase critical for normal development in tomato plants. *Plant Physiology*. **151**: 1421-1432.
- Barazani, O., van Danl, C.C. y Baldwin, I.T. (2007)** *Sebacina vermifera* promotes the growth and fitness of *Nicotiana attenuate* by inhibiting ethylene signaling. *Plant Physiology*. **144**: 1223-1232.
- Barea, J.M. (1986)** Importance of hormones and root exudates in mycorrhizal phenomena. *En: Physiological and genetical aspects of mycorrhizae: proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae. Editores: Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. INRA, Dijon, Paris. 177-187.*

- Barea, J.M. y 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, J.M., Toro, M. y Azcón, R. (2007)** The use of ^{32}P isotopic dilution techniques to evaluate the interactive effects of phosphate-solubilizing bacteria and mycorrhizal fungi at increasing plant P availability. *En: First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. Series: Developments in Plant and Soil Sciences, pp. 223-227. *Editores*: Velázquez, E. y Rodríguez-Barrueco, C. Dordrecht, The Netherlands.
- Barker, S. y Tagu, D. (2000)** The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. *Journal Plant Growth Regulation*. **19**: 144-154.
- Baylis, G.T.S. (1975)** The magnolioid mycorrhizal and mycotrophy in root systems derived from it. *En: Endomycorrhiza*. *Editores*: Sanders, F.E., Mosse, B. y Tinker, P.B. Academic, London, pp 373-389.
- Beaudoin, N., Serizet, C., Gosti, F. y Giraudat, J. (2000)** Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascade. *Plant Cell*. **12**: 1103-1115.
- Becard, G., Taylor, L.P., Douds, D.D., Pfeffer, P.E. y Doner, L.W. (1995)** Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **8**: 252-258.
- Benabdellah, K., Merlos, M.A., Azcón-Aguilar, C., y Ferrol, N. (2009)** GintGRX1, the first characterized glomeromycotanglutaredoxin, is a multifunctional enzyme that responds to oxidative stress. *Fungal Genetics and Biology*. **46**: 94-103.
- Benjamini, Y. y Hochberg, Y. (1995)** Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. B*. **57**: 289-300.
- Berger, S., Bell, E. y Mullet, J.E. (1996)** Two methyl jasmonate-insensitive mutants show altered expression of *AtVsp* in response to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiology*. **111**: 525-531.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A. y Solano, R. (2002)** Constitutive expression of *ETHYLENE-RESPONSEFACTOR1* in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant Journal*. **29**: 23-32.
- Besserer, A., Puech-Pagès, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A., Roy, S., Portais, J.C., Roux, C., Bécard, G. y Séjalon-Delmas, N. (2006)**

- Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology*. **4**: 1239–1247.
- Bethlenfalvay, G.J. (1992)** Mycorrhizae in the agricultural plant-soil system. *Symbiosis*. **14**: 413-425
- Bethlenfalvay, G.J. y Linderman, R.G. (1992)** Mycorrhizae in sustainable agriculture. American Society of Agronomy: Crop Science Society of America. Madison, Wisconsin, USA.
- Bever, J.D., Morton, J.B., Antonovics, J. y Schults, P.A. (1996)** Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. *Journal Ecology*. **84**: 71-82.
- Birkett, M.A., Chamberlain, K., Guerrieri, E., Pickett, J.A., Wadhams, L.J. y Yasuda, T. (2003)** Volatiles from whitefly-infested plants elicit a host-locating response in the parasitoid, *Encarsia formosa*. *J Chem Ecol*. **29**: 1589-600.
- Blancaflor, E.B., Zhao, L. y Harrison, M.J. (2001)** Microtubule organization in root cells of *Medicago truncatula* during development of an arbuscular mycorrhizal symbiosis with *Glomus versiforme*. *Protoplasma*. **217**: 154-165.
- Blée, E. (1998)** Phytooxylipins and plant defense reactions. *Prog Lipid Res*. **37**: 33-72.
- Blée, E. (2002)** Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science*. **7**: 315-322.
- Blée, K.A. y Anderson, A.J. (1998)** Regulation of arbuscule formation by carbon in the plant. *Plant Journal*. **16**: 523-530.
- Blée, K.A. y Anderson, A.J. (2000)** Defense response in plants to arbuscular mycorrhizal fungi. *En: Current advances in mycorrhizae research. Editores: Podila, G.K. y Douds. D.D. Minnesota, USA: The American Phytological Society, pp. 27-44.*
- Blilou, I., Ocampo, J.A., García-Garrido, J.M. (2000)** 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.
- Bolan, N.S. y Abbott, L.K. (1983)** Seasonal variation in infetivity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in relation to plant response to applied phosphorus. *Australian Journal of Soil Research*. **21**: 207-210.

- Bonanomi, A., Wiemken, A., Boller, T. y Salzer, P. (2001)** Local induction of a mycorrhiza-specific class III chitinase gene in cortical root cells of *Medicago truncatula* containing developing or mature arbuscules. *Plant Biology*. **3**: 194-199.
- Bonfante, P. y Perotto, S. (1995)** Tansley Review No. 82. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytologist*. **130**: 3-21.
- Bonfante, P., Bergero, R., Uribe, X., Romera, C., Rigau, J. y Puigdomenech, P. (1996)** Transcriptional activation of a maize alpha-tubulin gene in mycorrhizal maize and transgenic tobacco plants. *Plant Journal*. **9**: 737-743.
- Bonfante, P., Genre, A., Faccio, A., Martini, I., Schauser, L., Stougaard, J., Webb, J. y Parniske, M. (2000)** The *Lotus japonicus* *LjSym4* gene is required for the successful symbiotic infection of root epidermal cells. *Mol Plant Microbe Interact*. **13**: 1109-1120.
- Bonfante, P. y Genre, A. (2010)** Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-development perspective. *Trends in Plant Science*. **13**: 492-498.
- Bonfante, P. y Requena, N. (2011)**. Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*. **14**: 451-457.
- Bonfante-Fasolo, P. (1984)** Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. *En: VA mycorrhizae. Editores: Powell, C.L. y Bagyaraj, D.J. Boca Raton, FL: CRCmPress, Floridade, pp. 5-33.*
- Bonfante-Fasolo, P., Faccio, A., Perotto, S. y Schubert, A. (1990)** Correlation between chitin distribution and cell wall morphology in the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Mycology Research*. **94**: 157-165.
- Boter, M., Ruiz-Rivero, O., Abdeen, A. y Prat, S. (2004)** Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis*. *Genes Dev*. **18**: 1577-1591.
- Bowen, G.D. (1980)** Mycorrhizal roles in tropical plants and ecosystem. *En: Tropical mycorrhiza research. Editor: Mikola, P. Clarendon Press, Oxford, pp 165-190.*
- Brash, A.R., Baertschi, S.W., Ingram, C.D. y Harris, T.M. (1988)** Isolation and characterization of natural allene oxides: unstable intermediates in the metabolism of lipid hydroperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**: 3382-3386.

- Breullin, F., Schramm, J., Hajirezaei, M., Ahkami, A., Favre, P., Druege, U., Hause, B., Bucher, M., Kretschmar, T., Bossolini, E., Kuhlemeier, C., Martinoia, E., Franken, P., Scholz, U. y Reinhardt, D. (2010)** Phosphate systemically inhibits development of arbuscular mycorrhiza in *Petunia hybrida* and represses genes involved in mycorrhizal functioning. *Plant Journal*. **64**: 1002-1017.
- Brodhagen, M. y Keller, N. P. (2006)** Signalling pathways connecting mycotoxin production and sporulation. *Mol Plant Pathol*. **7**: 285-301.
- Brodowsky, I. D., y Oliw, E. H. (1993)** Biosynthesis of 8r-hydroperoxylinoleic acid by the fungus *Laetisaria arvalis*. *Biochim Biophys Acta*. **1168**: 68-72.
- Broekaert, W.F., Delaure, S.L., De Bolle, M.F. y Cammue, B.P. (2006)** The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*. **44**: 393-416.
- Brundett, M.C., Abbott, L.K. y Jasper, D.A. (1999)** Glomalean mycorrhizal fungi from tropical Australia. I: Comparison of the effectiveness and specificity of different isolation procedures. *Mycorrhiza*. **8**: 305-314.
- Bucher, M, Wegmüller, S. y Drissner, D. (2009)** Chasing the structures on small molecules in arbuscular mycorrhizal signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. **63**: 184-194.
- Buee, M., Rossignol, M., Jauneau, A., Ranjeva, R. y Becard, 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.
- Bustin, S. A. (2005)** Real-Time PCR. *En: Encyclopedia of diagnostic genomics and proteomics. Editores: Podda, M. y Fuchs, J. Dekker. New York*, pp 1131-1135.
- Calvet, C, Pera, J. y Barea, J.M. (1993)** Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Phythium ultimum* in a peat-perlite mixture. *Plant and Soil*. **148**: 1-6.
- Campos-Soriano, L., García-Garrido, J.M. y San Segundo, B. (2010)** Activation of basal defense mechanisms of rice plants by *Glomus intraradices* does not affect the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*. **188**: 597-614.
- Catford, J.G., Staehelin, C., Lerat, S., Piché, Y. y Vierheilig, H. (2003)** Suppression of arbuscularmycorrhizal colonization and nodulation in split-root systems of

- alfalfa after pre-inoculation and treatment with Nod factors. *Journal of Experimental Botany*. **54**:1481-1487.
- Chabaud, M., Genre, A., Sieberer, B.J., Faccio, A., Fournier, J., Novero, M., Barker, D.G. y 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.
- Chabot, S., Becard, G., y Piche, Y. (1992)** Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. *Mycologia*. **84**: 315:321.
- Chapple, C. (1998)** Molecular genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. **49**: 311-343.
- Chen, C. y Chen, Z. (2002)** Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiol*. **129**: 706-716.
- Chen, H., Jones, A.D., y Howe, G.A. (2006)** Constitutive activation of the jasmonate signaling pathway enhances the production of secondary metabolites in tomato. *FEBS Letters*. **580**: 2540-2546.
- Chico, J.M., Chini, A., Fonseca, S. y Solano, R. (2008)** JAZ repressors set the rhythm in jasmonate signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. **11**: 486-494.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O-, Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R. y col. (2007)** The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*. **448**: 666-6671.
- Clapperton, M.J., Koshioka, M. y Pharis, R.P. (1985)** The effect of infection by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus on the gibberellins content of slender wheat grass. *Plant Physiology*. **77**: 79-82.
- Clarke, J.D., Aarts, N., Feys, B.J., Dong, X.N. y Parker, J.E. (2001)** Constitutive disease resistance requires EDS1 in the *Arabidopsis* mutants cpr1 and cpr6 and is partially EDS1-dependent in cpr5. *Plant Journal*. **26**: 409-420.
- Clarke, J.D., Volko, S.M., Ledford, H., Ausubel, F.M. y Dong, X. (2000)** Roles of salicylic acid, jasmonic acid and ethylene in *cpr* -induced resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **12**: 2175-2190.

- Clough, K.S. y Sutton, J.C. (1976)** Direct observation of fungal aggregates in sand-dune soil. *Canadian Journal of Microbiology*. **24**: 326-333.
- Cohen, J.D. (1984)** Convenient apparatus for the generation of small amounts of diazomethane. *Journal of Chromatography*. **303**: 193-196.
- Cooper, K.M. y Losel, D.M. (1978)** Lipid Physiology of Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza. *New Phytologist*. **80**: 141-153.
- Cooper, K.M. y Tinker, P.B. (1978)** Translocation and transfer of nutrients in vesicular arbuscular mycorrhizas. IV. Effect of environmental variables on movement of phosphorus. *New Phytologist*. **88**: 327-339.
- Corbineau, F., Rudnicki, R.M. y Come, D. (1988)** The effects of methyl jasmonate on sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed germination and seedling development. *Plant Growth Regulation*. **7**: 157-169.
- Creelman, R.A. y Mullet, J.E. (1995)** Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**: 4114-4119.
- Creelman, R.A. y Mullet, J.E. (1997)** Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. **48**: 355-381.
- Croft, K.P.C., Jüttner, F. y Slusarenko, A.J. (1993)** Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant Physiology*. **101**: 13-24.
- Cruz, A.F., Ishii, T. y Kadova, 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, A.J. y Krochko, J.E. (1999)** Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science*. **4**: 472-478.
- Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R. y Abrams, S.R. (2010)** Abscisic acid: Emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol*. **61**: 651-679.
- Daniels, B.A. y Trape, J.M. (1980)** Factors affecting spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus epigaeus*. *Mycologia*. **72**: 457-471.
- Danneberg, G., Latus, C., Zimmer, W., Hundeshagen, B., Schneider-Poetsch, H. y Bothe, H. (1992)** Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on

- phytohormone balances in maize (*Zea mays* L.). *Journal Plant Physiologist*. **141**: 33-39.
- Dathe, W., Rönch, H., Preiss, A., Schade, W., Sembdner, G. y Schreiber, K. (1981)** Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (2)-Jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. *Planta*. **155**: 530-535.
- Dave, A., Hernandez, M.L., He, Z., Andriotis, V.M.E., Vaistij, F.E., Larson, T.R. y Graham, I.A. (2011)** 12-oxo-phytodienoic acid accumulation during seed development represses seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **23**: 583-599.
- David, R., Itzhaki, H., Ginzberg, I., Gafni, Y., Galili, G. y Kapulnik, Y. (1998)** Suppression of tobacco basic chitinase gene expression in response to colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Mol Plant Microbe Interactions*. **11**: 489-497.
- Dean, J.V., Devarenne, T.P., Lee, I.S. y Orlofsky, L.E. (1995)** Properties of maize glutathione S-transferase that conjugates coumaric acid and other phenylpropanoids. *Plant Physiology*. **108**: 985-994.
- Declerck, S., Strullu, D.G., y 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.
- De León, I.P., Sanz, A., Hamberg, M. y Castresana, C. (2002)** Involvement of the *Arabidopsis* α -DOX1 fatty acid dioxygenase in protection against oxidative stress and cell death. *Plant Journal*. **29**: 61-2.
- Delker, C., Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Feussner, I. y Wasternack, C. (2006)** Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* – enzymes, products, regulation. *Plant Biology*. **8**: 297-306.
- Dellaporta, S. L., Wood, J.,y Hicks, J. B. (1983)** A plant DNA miniprep: Versión II. *Plant MolBiol Rep 1*. **14**: 19-21.
- Demchenko, K., Zdyb, A., Feussner, I. y Pawlowski, K. (2011)** Analysis of the subcellular localisation of lipoxygenase in legume and actinorhizal nodules. *Plant Biology*. **14**: 56-63.
- Demchenko, K., Winzer, T., Stougaard, J., Parniske, M. y Pawlowski, K. (2004)** Distinct roles of *Lotus japonicus* SYMRK and SYM15 in root colonization and arbuscule formation. *New Phytologist*. **163**: 381-392.

- Deoliveira, J.V. y Garbaye, J. (1989)** Microorganisms stimulating the establishment of mycorrhizal symbiosis. A review. *European Journal of Forest Pathology*. **19**: 54-64.
- Devoto, A., Nieto-Rostro, M., Xie, D., Ellis, C., Harmston, R., Patrick, E., Davis, J., Sherratt, L., Coleman, M. y Turner, J.G. (2002)** COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. **32**: 457-466.
- Doares, S.H., Narvaez-Vasquez, J., Conconi, A. y Ryan, C.A. (1995)** Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiology*. **108**: 1741-1746.
- Dodd, J.C., Boddington, C.L., Rodriguez, A., González-Chavez, C. y Mansur, I. (2000)** Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from different fenera: form, function and detection. *Plant Soil*. **226**: 131-151.
- Dombrecht, B., Xue, G.P., Sprague, S.J., Kirkegaard, J.A., Ross, J.J., Reid, J.B., Fitt, G.P., Sewelam, N., Schenk, P.M. y Manners, J.M. (2007)** MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **19**: 2225-2245.
- Douds, D.D., Galvez, L., Bécard, G. y Kapulnik, Y. (1998)** Regulation of arbuscular mycorrhizal development by plant host and fungus species in alfalfa. *New Phytologist*. **138**: 27-35.
- Drennan, D.S.H. y Norton, C. (1972)** Effect of ethrel on nodulation in *Pisumsativum* L. *Plant and Soil*. **36**: 53-59.
- Drissner, D., Kunze, G., Callewaert, N., Gehrig, P., Boller, T., Felix, G., Amrhein, N., Bucher, M. y col (2007)** Lyso-phosphatidylcholine is a signal in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Science*. **318**: 265-268.
- Drüge, U. y Schönbeck, F. (1992)** Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on transpiration, photosynthesis and growth of flax (*Linum usitatissimum* L.) in relation to cytokinin levels. *J. Plant Physiol*. **141**: 40-48.
- Duddridge, J.A. y Read, D.J. (1982)** An ultrastructural analysis of the development of mycorrhizas en *Monotropa hypopitys* L. *New Phytologist*. **92**: 203-214.
- Dugassa, G., Von Alten, H. y Schonbeck, F. (1996)** Effects of arbuscular mycorrhiza (AM) on health of *Linum usitatissimum* L. infected by fungal pathogens. *Plant and Soil*. **185**: 173-182.

- Edriss, M.H., Davis, R.M. y Burger, D.W. (1984)** Influence of mycorrhizal fungi on cytokinin production in sour orange (Nutrient uptake). *Journal of mycorrhizal fungi on Horticultural Science*. **109**: 587-590.
- Eigenbrode, S.D., Ding, H., Shiel, P. y Berger, P.H. (2002)** Volatiles from potato plants infected with potato leafroll virus attract and arrest the virus vector, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Proc. Biol. Sci.* **269**: 455-460.
- El Ghachtouli, N., Martin-Tanguy, J., Paynot, M., y 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.
- Ellis, C., Karafyllidis, I., Wasternack, C. y Turner, J.G. (2002)** The *Arabidopsis* mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *The Plant Cell*. **14**: 1557-1566.
- Ellis, C. y Turner, J.G. (2001)** The *Arabidopsis* mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell*. **13**: 1025-1033.
- Ellis, C. y Turner, J. (2002)** A conditionally fertile *coi1* allele indicates cross-talk between plant hormone signalling pathways in *Arabidopsis thaliana* seeds and young seedlings. *Planta* **215**: 549-556.
- Elmayan, T. y Tepfer, M. (1995)** Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the *rol D* promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S2 promoter. *Transgenic Research*. **4**: 388-396.
- Elsen, A., Declerck, S. y De Waele, D (2001)** Effects of *Glomus intraradices* on the reproduction of the burrowing nematode (*Radopholus similis*) in dioxenic cultura. *Mycorrhiza*. **11**: 49-51.
- Esch, H., Hundeshage, B., Schneider-Poetsch, H.J. y 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.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S. y Somssich, I.E. (2000)** The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* **5**: 199-206.
- Ewing, E.E. (1985)** Cuttings as simplified models of the potato plant. *En: Potato Physiology*. Editor: Li, P.L. Orlando, FL: Academic Press. Pp. 154-199.

- Ewing, E.E., y Struik, P.C. (1992)** Tuber formation in potato: Induction, initiation and growth. *Hortic. Rev.* **14**: 89-198.
- Fammartino, A., Cardinale, F., Göbel, C., Mene-Saffrane, L., Fournier, J., Feussner, I. y Esquerre-Tugaye, M.T. (2007)** Characterization of a divinyl ether biosynthetic pathway specifically associated with pathogenesis in tobacco. *Plant Physiology.* **143**: 378-388.
- Fammartino, A., Verdaguer, B., Fournier, J., Tamietti, G., Carbonne, F., Esquerré-Tugayé, M.T. y Cardinale, F. (2010)** Coordinated transcriptional regulation of the divinyl ether biosynthetic genes in tobacco by signal molecules related to defense. *Plant Physiology and Biochemistry.* **48**: 225-231.
- Farmer, E.E., Alméras, E. y Krishnamurthy, V. (2003)** Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr Opin Plant Biol.* **6**: 372-378.
- Farmer, E.E. y Ryan, C.A. (1990)** Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the national Academy of Sciences of USA.* **87**: 7713-7716.
- Fehlberg, V., Vieweg, M.F., Dohmann, E.M., Hohnjec, N., Puhler, A., Perlick, A.M. y Kuster, H. (2005)** The promoter of the leghaemoglobin gene Vflb29: functional analysis and identification of modules necessary for its activation in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots. *J Exp Bot.* **56**: 799-806.
- Feng, S., Ma, L., Wang, X., Xie, D., Dinesh-Kumar, S.P., Wei, N. y Deng, X.W. (2003)** The COP9 signalosome interacts physically with SCF COI1 and modulates jasmonate responses. *Plant Cell.* **15**: 1083-1094.
- Ferguson, B.J., Ross, J.J. y Reid, J.B. (2005)** Nodulation phenotypes of gibberellins and brassinosteroid mutants of pea. *Plant Physiology.* **138**: 2396-2405.
- Fernández-Calvo, P., Chini, A., Fernández-Barbero, G., Chico, J.M., Gimenez-Ibanez, S., Geerinck, J. y col. (2011)** The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell.* **23**: 701-715.
- Feussner, I. y Wasternack, C. (2002)** The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology.* **53**: 275-297.

- Fester, T., Schmidt, D., Lohse, S., Walter, M. H., Giuliano, G., Bramley, P. M., Fraser, P. D., Hause, B. y Strack, D. (2002)** Stimulation of carotenoid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots. *Planta*. **216**: 148-154.
- Fester, T., Wray, V., Nimtz, M. y Strack, D. (2005)** Is stimulation of carotenoid biosynthesis in arbuscular mycorrhizal roots a general phenomenon? *Phytochemistry*. **66**: 1781-1786.
- Feys, B., Benedetti, C.E., Penfold, C.N. y Turner, J.G. (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.
- Fiorilli, V., Catoni, M., Miozzi, L., Novero, M., Accotto, G.P. y Lanfranco, L. (2009)** Global and cell-type gene expression profiles in tomato plants colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist*. **184**: 975-987.
- Fitter, A.H. y Garbays, J. (1994)** Interactions between mycorrhizal fungi and other soil organisms. *Plant Soils*. **159**: 123-132.
- Fitze, D., Wiepning, A., Kaldorf, M. y Ludwig-Müller, J. (2005)** Auxins in the development of an arbuscular mycorrhizal symbiosis in maize. *Journal Plant Physiology*. **162**: 1210-1219.
- Floss, D., Hause, B., Lange, P. R., Küster, H., Strack, D. y Walter, M. H. (2008a)** Knock-down of the MEP pathway isogene 1-deoxy-D-xylolose 5-phosphate synthase 2 inhibits formation of arbuscular mycorrhiza-induced apocarotenoids, and abolishes normal expression of mycorrhiza-specific plant marker genes. *Plant Journal*. **56**: 86-100.
- Floss, D., Schliemann, W., Schmidt, J., Strack, D. y Walter, M. H. (2008b)** RNA interference-mediated repression of MtCCD1 in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula* causes accumulation of C27 apocarotenoids, shedding light on the functional role of CCD1. *Plant Physiol*. **148**: 1267-1282.
- Flors, V., Ton, J., van Doorn, R., Jakab, G., García-Agustín, P. y Mauch-Mani, B. (2008)** Interplay between JA, SA and ABA signaling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. *The Plant Journal*. **54**: 81-92.

- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C. y Solano, R. (2009)** (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology*. **5**: 344-350.
- Fontenelle, A.B.D., Guzzo, S.D., Lucon, C.M.M. y Harakava, R. (2011)** Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. *Crop Protection*. **30**: 1492-1500.
- Footitt, S., Slocombe, S.P., Larner, V., Kurup, S., Wu, Y., Larson, T., Graham, I., Baker, A. y Holdsworth, M. (2002)** Control of germination and lipid mobilization by COMATOSE, the Arabidopsis homologue of human ALDP. *EMBO Journal*. **21**: 2912-2922.
- Fournier, J., Pouénat, M-L., Rickauer, M., Rabinovitch-Chable, H., Rigaud, M. y Esquerré-Tugayé, M-T. (1993)** Purification and characterization of elicitor-induced lipoxigenase in tobacco cells. *Plant Journal*. **3**: 63-70.
- Frendo, P., Harrison, J., Norman, C., Jiménez, M.J.H., Van de Sype, G., Gilabert, A. y Puppo, A. (2005)** Glutathione and homoglutathione play a critical role in the nodulation process of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**: 254-259.
- Fujino, K., Koda, Y., y Kikuta, Y. (1995)** Reorientation of cortical microtubules in the subapical region during tuberization in singlenode stem segments of potato in culture. *Plant Cell Physiol.* **36**: 891-895.
- Furlan, V. y Fortin, J.V. (1977)** Effect of light intensity on the formation of vesicular-arbuscular endomycorrhizae on *Allium cepa* by *Gigaspora calospora*. *New Phytologist*. **79**: 335-340.
- Gallaud, J. (1905)** Étude sur les mycorrhizes endotrophes. *Rev. Gen. Bot.* **17**: 5-48.
- Gao, X., Shim, W-B., Göbel, C., Kunze, S., Feussner, I., Meeley, R., Balint-Kurti, P. y Kolomiets, M. (2007)** Disruption of a maize 9-lipoxygenase results in increased resistance to fungal pathogens and reduced levels of contamination with mycotoxin fumonisin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **20**: 922-933.
- García-Garrido, J.M., León Morcillo, R., Martín-Rodríguez, J.A., y OcampoBote J.A. (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, J.M. y Ocampo, J.A. (1988)** Interaction between *Glomus mosseae* and *Erwinia carotovora* and its effects on the growth of tomato plants. *New Phytologist*. **110**: 551-555.
- García-Garrido, J.M. y Ocampo, J.A. (2002)** Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*. **53**: 1377-1386.
- García-Garrido, J.M. y Vierhelig, H. (2007)** From a germinating spore to an established arbuscular mycorrhiza: Signalling and regulation. *En: Avances in mycorrhizal biotechnology: a Canadian perspective*. Editores: Khasa, D., Piche, Y. y Coughlan, A. Ottawa.
- Gazzarrini, S. y McCourt, P. (2001)** Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*. **4**: 387-391.
- Geil, R.D. y Guinel, F.C. (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, R.D., Peterson, R.L. y Guinel, F.C. (2001)** Morphological alterations of pea (*Pisum sativum* cv. Sparkle) arbuscular mycorrhizal as a result of exogenous ethylene treatment. *Mycorrhiza*. **11**: 137-143.
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P. y Barker, D.G. (2005)** Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell*. **17**: 3489-3499.
- Genre, A., Chabaud, M., Faccio, A., Barker, D.G. y 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.
- George, E. (2000)** Nutrient uptake. *En: Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Editores: Kapulnik, Y. y Douds, D.D. Kluwer, Dordrecht, 307-343.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O. y col. (2007)** The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*. **448**: 666-671.
- Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V. y Dexheimer, J. (1979)** Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. III. Ultrastructural

- localization of acid and alkaline phosphatase in onion roots infected by *Glomus mosseae* (Nicol. y Gerd.) *New Phytologist*. **82**: 127-132.
- Gianinazzi-Pearson, V., Dumas-Gaudot, E., Gollotte, A., Tahiri-Alaoui, A. y Gianinazzi, S. (1996)** Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. **133**: 45-57.
- Gidda, K.S., Miersch, O., Schmidt, J., Wasternack, C. y Varin, L. (2003)** Biochemical and molecular characterization of a hydroxy-jasmonate sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*. **278**: 17895-17900.
- Ginzberg, I., David, R., Shaul, O., Elad, Y., Wininger, S., Ben-Dor, B., Badani, H., Fang, Y., Rhijn, P.V. y Li, Y. (1998)** *Glomus intraradices* colonization regulates gene expression in tobacco roots. *Symbiosis*. **25**: 145-157.
- Giovannetti, M., Azzolini, D. y Citernesi, A.S. (1999)** Anastomosis formation and nuclear and protoplasmic exchange in arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl Environ Microbiol*. **65**: 5571-5575.
- Giovannetti, M. y Mosse, B. (1980)** An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *Symbiosis*. **25**: 145-157.
- Giovannetti, M., Sbrana, C. y Avio, L. (1993)** Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during preinfection stage. *New Phytologist*. **125**: 587-593.
- Giovannetti, M. y Sbrana, C. (1998)** Meeting a non-host: the behaviour of AM fungi. *Mycorrhiza*. **8**: 123-130
- Giovannetti, M. (2000)** Spore germination and pre-symbiotic mycelia growth. *En: Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Editores: Kapulnik, Y. y Douds, D.D. Kluwer, Dordrecht, pp 47-67.
- Giovannetti, M. (2001)** Survival strategies in arbuscular mycorrhizal symbionts. *En: Symbiosis*. Editor: Seckbach, J. Kluwer, Dordrecht, pp 293-307.
- Glazebrook, J. (2005)** Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol*. **43**: 205-227.
- Göbel, C., Feussner, I., Schmidt, A., Scheel, D., Sanchez-Serrano, J., Hamberg, M. y Rosahl, S. (2001)** Oxylin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. *J. Biol. Chem*. **276**: 6267-6273.

- Göbel, C., Feussner, I., Hamberg, M. y Rosahl, S. (2002) Oxylin profiling in pathogen-infected potato leaves. *Biochim Biophys Acta*. **1584**: 55-64.
- Göbel, C., Feussner, I. y Rosahl, S. (2003) Lipid peroxidation during the hypersensitive response in potato in the absence of 9-lipoxygenases. *J Biol Chem*. **278**: 52834-52840.
- Godoy, M., Franco-Zorrilla, J.M., Perez-Perez, J., Oliveros, J.C., Lorenzo, O. y Solano, R. (2011) Improved protein-binding microarrays for the identification of DNA-binding specificities of transcription factors. *Plant Journal*. **66**: 700-711.
- Gollotte, A., Gianinazzi-Pearson, V., Giovannetti, M., Sbrana, C, Avio, L. y Gianinazzi, S. (1993) Cellular localization and cytochemical probing of resistance reactions to arbuscular mycorrhizal fungi in a “locus a” mutant *Pisum sativum* L. *Planta*. **191**: 112-122.
- Gomez, S.K., Javot, H., Deewatthanawong, P., Torres-Jerez, I., Tang, Y., Blancaflor, E.B., Udvardi, M.K., y Harrison, M.J.(2009) *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC Plant Biology* **9**, 10.
- Gómez-Roldán, V., Fermas, S., Brewer, P.B., Puech-Pagès, V., Dun, E.A., Pillot, J.P., Letisse, F., Matusova, R., Danoun, S., Portais, J-C, Bouwmeester, H., Bécard, G., Beveridge, C.A., Rameau, C., Rochange, S.F. (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*. **455**: 189-194.
- Gorindarajulu, M., Pfeffer, P.E., Jin, H., Abubaker, J., Douds, D.D., Allen, J.W., Bucking, H., Lammers, P.J. y Shachar-Hill, Y. (2005) Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal Symbiosis. *Nature*. **435**: 819-823.
- Govrin, E.M. y Levine, A. (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*. **10**: 751-757.
- Grechkin, A (1998) Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog Lipid Res*. **37**: 317-352.
- Grunwald, U., Nyamsuren, O., Tarnasloukht, M., Lapopin, L., Becker, A., Mann, P., Gianinazzi-Pearson, V., Krajinski, F. y Franken, P. (2004) Identification of mycorrhiza-regulated genes with arbuscule development-related expression profile. *Plant Molecular Biology*. **55**: 553-566.
- Guether, M., Balestrini, R., Hannah, M., He, J., Udvardi, M. K. y Bonfante. P. (2009) Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall

- and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. *New Phytologist*. **182**: 200-212.
- Gundlach, H., Muller, M.J., Kutchan, T.M. y Zenk, M.H. (1992)** Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **89**: 2389-2393.
- Gunze, C. y Hennessy, C. (1980)** Effects of host-applied auxin on development of endomycorrhiza in cowpeas. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **74**: 247-251.
- Gupta, V., Willits, M.G. y Glazebrook, J. (2000)** *Arabidopsis thaliana* EDS4 contributes to salicylic acid (SA)-dependent expression of defense responses: Evidence for inhibition of jasmonic acid signaling by SA. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **13**: 503-511.
- Gus-Mayer, S., Naton, B., Hahlbrock, K. y Schmelzer, E. (1998)** Local mechanical stimulation induces components of the pathogen defense response in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95**: 8398-8403.
- Gutierrez, A., Morte, A. y Honrubia, M. (2003)** Morphological characterization of the mycorrhiza formed by *Helianthemum almeriense* Pau with *Terfezia clavervii* Chatin and *Picoa lefebvrei* (Pat.) Maire. *Mycorrhiza*. **13(6)**: 299-307.
- Gutjahr, C., Banba, M., Croset, V., An, K., Miyao, A., An, G., Hirochika, H., Imaizumi-Anraku, H. y Paszkowski, U. (2008)** Arbuscular mycorrhiza-specific signaling in rice transcends the common symbiosis signaling pathway. *Plant Cell*. **20**: 2989-3005.
- Gutjahr, C. y Paszkowski, U. (2009)** Weights in the balance: Jasmonic acid and salicylic acid signaling root-biotope interactions. *Mol Plant Microbe Interact.* **22**: 763-772.
- Hall, I.R. (1978)** Vesicular-arbuscular mycorrhizas on two varieties of maize and one of sweetcorn. *NZ J Agric Res.* **21**: 157-519.
- Hamberg, M. (2000)** New cyclopentenone fatty acids formed from linoleic and linolenic acids in potato. *Lipids*. **35**: 353-363.
- Hamberg, M. y Fahlstadius, P. (1990)** Allene oxide cyclase: a new enzyme in plant lipid metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **276**: 518-526.
- Hamberg, M., Ponce de León, I., Rodríguez, M.J. y Castresana, C. (2005)** Alpha-dioxygenases. *Biochem Biophys Res Commun.* **338**: 169-174.

- Hamberg, M., Sanz, A., Rodríguez, M.J., Calvo, A.P. y Castresana, C. (2003)** Activation of the fatty acid α -dioxygenase pathway during bacterial infection of tobacco leaves. Formation of oxylipins protecting against cell death. *Journal Biological Chemistry*. **278**: 51796-51805.
- Hamberg, M., Zhang, L. Y., Brodowsky, I. D. y Oliw, E. H. (1994)** Sequential oxygenation of linoleic acid in the fungus *Gaeumannomyces graminis*-stereochemistry of dioxygenase and hydroperoxide isomerase reactions. *Arch Biochem Biophys*. **309**: 77-80.
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of Escherichia-Coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. **166**: 557-580.
- Hanon, M.T. y Coenen, C. (2011)** Genetic evidence for auxin involvement in arbuscular mycorrhiza initiation. *New Phytologist*. **189**: 701-709.
- Harms, K., Ramirez, I.I. y Peña-Cortes, H. (1998)** Inhibition of wound-induced accumulation of allene oxide synthase transcripts in flax leaves by aspirin and salicylic acid. *Plant Physiology*. **118**: 1057-1065.
- Harrison, M.J. (1999)**. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **50**: 361-389.
- Harrison, M. y Dixon, R. (1993)** Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **6**: 643-659.
- Harrison, M.J. (2005)** Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology*. **59**: 19-42.
- Hart, M.M. y Klironomos, J.N. (2002)** Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and ecosystem functioning. *Mycorrhizal Ecology*. **157**: 225-242.
- Hartley, J. L., Temple, G. F., yBrasch, M. A. (2000)** DNA Cloning Using in vitro Site-Specific Recombination. *Genome Research*. **10**: 1788-1795.
- Hayashi, S., Gresshoff, P.M. y Kinkema, M. (2008)** Molecular analysis of lipoxygenases associated with nodule development in soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **21**: 843-853.

- Hase, S., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C. y Pieterse, C.M.J. (2003)** Colonization of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas fluorescens* primes the plant to produce higher levels of ethylene upon pathogen infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **62**: 219-226.
- Hause, B., Maier, W., Miersch, O., Kramell, R. y Strack, D. (2002)** Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiology*. **130**: 1213-1220.
- Hause, B., Mrosk, C., Isayenkov, S. y Strack, D. (2007)** Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry*. **8**: 101-110.
- Hause, B. y Schaarschmidt, S. (2009)** The role of jasmonates in mutualistic symbioses between plants and soil-borne microorganisms. *Phytochemistry*. **70**: 1589-1599.
- Hause, B., Stenzel, I., Miersch, O., Maucher, H., Kramell, R., Ziegler, J. y Wasternack, C. (2000)** Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers – allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles. *The Plant Journal*. **24**: 113-126.
- Hayashi, M., Nito, K., Takei-Hoshi, R., Yagi, M., Kondo, M., Suenaga, A., Yamaya, T. y Nishimura, M. (2002)** Ped3p is a peroxisomal ATP-binding cassette transporter that might supply substrates for fatty acid beta-oxidation. *Plant Cell Physiol*. **43**: 1-11.
- Hayman, D.S. (1982)** Influence of soils and fertility on activity and survival of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytopathology*. **72**: 1119-1125.
- Hayman, D.S. y Mosse, B. (1971)** Plant growth responses to vesicular arbuscular mycorrhiza. I Growth of Endogone-inoculated plants in phosphate deficient soils. *New Phytologist*. **70**: 19-22.
- Hedden, P. y Thomas, S.G. (2012)** Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochemistry*. **444**: 11-25.
- Helber, N. y Requena, N. (2008)** Expression of the fluorescence markers DsRed and GFP fused to a nuclear localization signal in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist*. **177**: 537-548.
- Hermesmeier, D., Schittko, U. y Baldwin, I.T. (2001)** Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (*Lepidoptera*, *Sphingidae*) and its natural host *Nicotiana attenuata*. I. Large-scale changes in the accumulation of growth- and defense-related plant mRNAs. *Plant Physiology*. **125**: 683-700.

- Hepper, C.M. y Smith, G.A. (1976)** Observations on the germination of *Endogone* spores. *Trans Br Mycol Soc.* **66**:189-194.
- Hepper, C.M. (1979)** Germination and growth of *Glomus caledonius* spores: the effects of inhibitors and nutrients. *Soil biology and Biochemistry.* **11**: 269-277.
- Herde, O., Atzorn, R., Fisahn, J., Wasternack, C., Willmitzer, L. y Peña-Cortés H. (1996)** Localized wounding by heat initiates the accumulation of proteinase inhibitor II in abscisic acid-deficient plants by triggering jasmonic acid biosynthesis. *Plant Physiology.* **112**: 853-860.
- Herde, O., Peña-Cortés, H., Wasternack, C., Willmitzer, L., y 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, M.J., Gagnon, H. Piché, Y., Ocampo, J.A., García-Garrido, J.M. y Vierhelig, 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, M.J., Steinkellner, S., Vierheilig, H., Ocampo, J.A. y García-Garrido, J.M. (2007)** Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist.* **175**: 554-564.
- Herrera-Medina, M.J., Tamayo, M.I., Vierheilig, H., Ocampo, J.A. y García-Garrido, J.M. (2008)** The jasmonic acid signalling pathway restricts the development of the arbuscular mycorrhizal association in tomato. *Journal of Plant Growth Regulation.* **27**: 221-230.
- Hetrick, B.A.D., Kitt, D.G. y Wilson, G.T. (1987)** Effect of drought stress on growth response in corn, sudan grass and big bluestem to *Glomus etunicatum*. *New Phytologist.* **105**: 403-410.
- Hewitt, E.J. (1952)** Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. *En: Technical communication (Commonwealth bureau of horticulture and plantation crops), 22.* Commonwealth Agricultural Bureaux (Farnham Royal, Bucks), Gran Bretaña. 547.
- Higo, K., Y. Ugawa, M. Iwamoto and T. Korenaga (1999)** Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Research.* **27**: 297-300.

- Hildebrandt, U., Regvar, M. y Bothe, H. (2007)** Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*. **68**: 139-146.
- Hohnjec, N., Vieweg, M.E., Puhler, A., Becker, A. y Kuster, 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.
- Holley, S.R., Yalamanchili, R.D., Moura, D.S., Ryan, C.A. y Stratmann, J.W. (2003)** Convergence of signaling pathways induced by systemin, oligosaccharide elicitors, and ultraviolet- B radiation at the level of mitogen-activated protein kinases in *Lycopersicon peruvianum* suspension-cultured cells. *Plant Physiology*. **132**: 1728-1738.
- Howe, G.A. (2004)** Jasmonates as signals in the wound response. *Journal Plant Growth Regulation*. **23**: 223-237.
- Howe, G.A., Lightner, J., Browse., J., y Ryan, C.A. (1996)** An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *Plant Cell*. **8**: 2067-2077.
- Howe, G.A. y Ryan, C.A. (1999)** Suppressors of systemin signaling identify genes in the tomato wound response pathway. *Genetics*. **153**: 1411-1421.
- Howe, G.A. y Schilmiller, A.L. (2002)** Oxylin metabolism in response to stress. *Current Opinion in Plant Biology*. **5**: 230-236.
- Huffaker, A., Pearce, G. y Ryan, C.A. (2006)** An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **103**: 10098-10103.
- Hussain, A., Roberts, J. A., Black, C. R. y Taylor, I. B. (1999)** Soil compaction: Is there an ABA-ethylene relationship regulating leaf expansion in tomato? *En: Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene II. Editores: A. K. Kanellis, C. Chang, H. Klee, A. B. Bleeker, J. C. Pech, and D. Grierson. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.*
- Illana, A., García-Garrido, J.M., Sampedro, I., Ocampo, J.A. y Vierheilig, H. (2011)** Strigolactones seem not to be involved in the nonsusceptibility of arbuscular mycorrhizal (AM) nonhost plants to AM fungi. *Botany*. **89**: 285-288.
- Imaizumi-Anraku, H., Takeda, N., Charpentier, M., Perry, J., Miwa, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murakami, Y., Mulder, L., Vickers, K., Pike, J., Downie,**

- J.A., Wang, T., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Yoshikawa, M., Murooka, Y., Wu, G.J., Kawaguchi, M., Kawasaki, S., Parniske, M. y Hayashi, M. (2005)** Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature*. **433**: 527-531.
- Isayenkov, S., Mrosk, C., Stenzel, I., Strack, D. y 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, Y.H., matsumoto, I. y Kadoya, K. (1996)** Effect of ethylene on the growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and on the mycorrhizal formation of trifoliolate orange roots. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. **65**: 525-529.
- Itoh, A. y Howe, G.A. (2001)** Molecular cloning of a divinyl ether synthase. Identification as a CYP74 cytochrome P-450. *Journal Biology Chemical*. **276**: 3620-3627.
- Itoh, A., Schillmiller, A.L., McCaig, B.C. y Howe, G.A. (2002)** Identification of a jasmonate-regulated allene oxide synthase that metabolizes 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids. *J Biol Chem*. **277**: 46051-46058.
- Ivanshuta, S., Liu, J., Lothar, D.P., Haridas, S., Bucciarelli, B., VandenBosch, K.A., Vance, C.P., Harrison, M.J. y Grantt, J.S. (2005)** RNA interference identifies a calcium-dependent protein kinase involved in *Medicago truncatula* root development. *The Plant Cell*. **17**: 2911-2921.
- Jakobsen, I., Abbott, L.K. y Robson, A.D. (1992)** External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. *New Phytologist*. **120**: 371-380.
- James, T.Y., Kauff, F., Schoch, C.L., Matheny, P.B., Hofstetter, V., Cox, C.J., Celio, G., Gueidan, C., Fraker, E., Miadlikowska, J. y col. (2006)** Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*. **443**: 818-822.
- Janos, D.P. (1975)** Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizae on lowland tropical rain forest trees. *En: Endomycorrhiza. Editores: Sanders, F.E., Mosse, B. y Tinker, P.B. Academic, London, pp 437-446.*

- Javot, H., Pumplin, N. y Harrison, M. (2007)** Phosphate in arbuscular mycorrhizal symbiosis: transporter properties and regulatory role. *Plant, Cell and Environment*. **30**: 310-322.
- Jentschel, K., Thiel, D., Rehn, F. y Ludwig-Müller J. (2007)** Arbuscular mycorrhiza enhances auxin levels and alters auxin biosynthesis in *Tropaeolum majus* during early stages of colonization. *Physiology Plant*. **129**: 320-333.
- Jirage, D., Zhou, N., Cooper, B., Clarke, J.D., Cong, X.N. y Glazebrook, J. (2001)** Constitutive salicylic acid-dependent signaling in *cpr1* and *cpr6* mutants requires PAD4. *Plant Journal*. **26**: 395-407.
- Johansson, J.F., Paul, L.R. y Finlay, R.D. (2004)** Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiol Ecol*. **48(1)**: 1-13.
- Joner, E., van Aarle, I.M., Vosatka, M. (2000)** Phosphate activity of extra-radical arbuscular mycorrhizal hyphae: a review. *Plant Soil*. **226**: 199-210.
- Kaldorf, M. y Ludwig-Müller, J. (2000)** AM fungi might affect the root morphology of maize by increasing indole-3-butyric acid biosynthesis. *Physiol. Plant*. **109**: 58-67.
- Kamiya, N., Nagasaki, H., Morikami, A., Sato, Y. y Matsuoka, M. (2003)** Isolation and characterization of arice WUSCHEL-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem. *Plant Journal*. **35**: 429-441.
- Kanamori, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Frantescu, M., Quitsgaard, E.M.H., Miwa, H., Downie, J.A. y col. (2006)** A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungus symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103**: 359-364.
- Kapulnik, Y., Volpin, H., Itzhaki, H., Ganon, D., Galili, S., David, R., Shaul, O., Elad, Y., Chet, I. y Okon, Y. (1996)** Suppression of defence responses in mycorrhizal alfalfa tobacco roots. *New Phytologist* **133**: 59-64.
- Kauss, H., Jeblick, W., Ziegler, J. y Krabler, W. (1994)** Pretreatment of parsley (*Petroselinum-Crispum* L.) suspension-cultures with methyl jasmonate enhances elicitation of activated oxygen species. *Plant Physiology*. **105**: 89-94.

- Kauss, h., Krause, K. y Jeblick, W. (1992)** Methyl jasmonate conditions parsley suspension cells for increased elicitation of phenylpropanoid defense responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **189**: 304-308.
- Kende, H. (1993)** Ethylene biosynthesis. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. **44**: 283-307.
- Khaosaad, T., García-Garrido, J.M., Steinkellner, S., y Vierheilig, H. (2007)** Take-all disease is systemically reduced in roots of mycorrhizal barley plants. *Soil Biology and Biochemistry*. **39**:727-734.
- Kikuchi, K., Matsushita, N., Suzuki, K y Hogetsu, T. (2007)** Flavonoids induce germination of basidiospores of the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus*. *Mycorrhiza*. **17**: 563–570.
- Kistner, C., Winzler, T., Pitzschke, A., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Webb, K.J., Szczyglowski, K. y Parniske, M. (2005)** Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. *Plant Cell*. **17**: 2217–2229.
- Knoester, M., van Loon, L.C., van den Heuvel, J., Henning, J., Bol, J.F. y Linthorst, H.J.M. (1998)** Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**: 1933-1937.
- Koeduka, T., Matsui, K., Hasegawa, M., Akakabe, Y. y Kajiwara, T. (2005)** Rice fatty acid α -dioxygenase is induced by pathogen attack and heavy metal stress: activation through jasmonate signaling. *Journal Plant Physiologist*. **162**: 912-920.
- Koide, R.T. y Kabir, Z. (2000)** Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate. *New Phytologist*. **148**: 511-517.
- Koide, R.T., y Schreiner, R.P. (1992)** Regulation of the vesiculararbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**: 557-581.
- Kolomiets, M.V., Hannapel, D.J., Chen, H., Tymeson, M. y Gladon, R.J. (2001)** Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. *Plant Cell*. **13**: 613-626.
- Koltai, H., LekKala, S.P., Bahattacharya, C. (2010)** A tomato strigolactone-impaired mutant displays aberrant shoot morphology and plant interactions. *Journal of Experimental Botany*. **61**: 1739-1749.

- Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. y Kumashiro, T. (1996)** Vectors carrying two separate T-DNAs for cotransformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant Journal*. **10** (1): 165-74.
- Kosuta, S., Chabaud, M., Lougnon, G., Gough, C., Denaire, J., Baker, D.G. y Becard, G (2003)** Diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific *MtENOD11* expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **131**: 952–962.
- Kosuta, S., Hazledine, S., Sun, J., Miwa, H., Morris, R.J., Downie, J.A. y Oldroyd, G.E.D. (2008)** Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legume. *Proc Natl Acad Sci*. **105**: 9823–9828.
- Krüger, M., Krüger, C., Walker, C., Stockinger, H. y Schüßler, A. (2012)** Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytologist*. **193**: 970-984.
- Kuhn, H., Kuster, H. y Requena, N. (2010)** Membrane steroid-binding protein 1 induced by a diffusible fungal signal is critical for mycorrhization in *Medicago truncatula*. *New Phytologist*. **85**: 716–733.
- Lambais, M.R. y Medhly, M.C. (1998)** Spatial distribution of chitinases and β -1,3-glucanase transcripts in bean arbuscular mycorrhizal roots under low and high soil phosphate conditions. *New Phytologist*. **140**: 33-42.
- Lambais, M.R. (2000)** Regulation of plant defence-related genes in arbuscular mycorrhizae. *En: Current advances in mycorrhizae research. Editores: Podila, G.K. youds, D.D.* Minnesota, USA: The American Phytopathological Society, pp. 45-59.
- Lambais MR, Mehdy MC. (1996)** Soybean roots infected by *Glomus intraradices* strains differing in infectivity exhibit differential chitinase and β -1,3-endoglucanase expression. *New Phytologist*. **134**: 531-538.
- Lambert, D.H., Cole, Jr H. y Baker, D.E. (1980)** Variation in the responses of Alfalfa clone and cultivars to mycorrhizae and phosphorus. *Crop Science*. **20**: 615-618.
- Landy, A. (1989).** Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda Site-specific Recombination. *Ann. Rev. Biochem.* **58**: 913-949.

- Laparre, J., Balzergue, C., Rochange, S., Ludwiczak, P., Letisse, F., Portais, J.C. Bécard, G. y Puech-Pages, V. (2011)** Metabolite profiling of pea roots in response to phosphate availability. *Plant Signaling and Behavior*. **6**: 837-839
- Larose, G., Chenevert, R., Moutoglis, P., Gagne, S., Piche, Y. y Vierheilig, H. (2002)** Flavonoid levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by the development stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Plant Physiology*. **159**: 1329-1339.
- Lee, G.I. y Howe, G.A. (2003)** The tomato mutant *spr1* is defective in systemin perception and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *Plant Journal*. **33**: 567-576.
- Lenzemo, V.W., Kuyper, T.W., Kropff, M.J. y 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 Res.* **91**: 51-61.
- Lenzemo, V., Kuyper, T.W., Matusova, R., Bouwmeester, H.J. y van Ast, A. (2007)** Colonization by arbuscular mycorrhizal fungi of sorghum leads to reduced germination and subsequent attachment and emergence of *Striga hermonthica*. *Plant Signal y Behavoir*. **2**: 58-62.
- Lenzemo, L., Kuyper, T.W. y Vierheilig, H. (2009)** *Striga* seed germination activity of root exudates and compounds present in stems of *Striga* host and nonhost (trap crop) plants is reduced due to root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. **19**: 287-294.
- Lerat, S., Lapointe, L., Gutjahr, S., Piché, Y. y Vierheilig, H. (2003a)** Carbon partitioning in a split-root system of arbuscular mycorrhizal plants is fungal and plant species dependent. *New Phytologist*. 157:589-595.
- Lerat, S., Lapointe, L., Piché, Y. y Vierheilig, H. (2003b)** Variable carbon sink strength of different *Glomus mosseae* strains colonizing barley roots. *Canadian Journal Botany*. **81**: 886-889.
- Levy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhoub, B., Kulikova, O., Duc, G., Journet, E.P., Ane, J.M., Lauber, E., Bisseling, T., Denarie, J., Rosenberg, C. y Debelle, F. (2004).** A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science*. **303**: 1361-1364.

- Li, L., Li, C. y Howe, G.A. (2001)** Genetic analysis of wound signaling in tomato. Evidence for a dual role of jasmonic acid in defense and female fertility. *Plant Physiology*. **127**: 1414-1417.
- Li, C., Liu, G., Xu, C., Lee, G.I., Bauer, B., Ling, H-Q., y col. (2003)** The tomato *suppressor of prosystemin-mediated responses2* gene encodes a fatty acid desaturase required for the biosynthesis of jasmonic acid and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *Plant Cell*. **15**: 1646-1661.
- Li, L., Zhao, Y., McCaig, B.C., Wingerd, B.A., Wang, J., Whalon, M.E., Pichersky, E., y Howe, G.A. (2004)** The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *The Plant Cell*. **16**: 126-143.
- Liu, J., Maldonado-Mendoza, I.E., Lopez-Meyer, M., Cheung, F., Town, C. y Harrison, M.J. (2007)** The arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant Journal*. **50**: 529-544.
- Loake, G. y Grant, M. (2007)** Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*. **10**: 466-472.
- Logi, C., Sbrana, C. y Giovannetti, M. (1998)** Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host. *Appl environ Microbiol*. **64**: 3473-3479.
- López-Ráez, J.A., Charnikhova, T., Gómez-Roldán, V., Matusova, R., Kohlen, W., De Vos, R., Verstappen, F., Puech-Pages, V., Bécard, G., Mulder, P. y Bouwmeester, H. (2008)** Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytologist*. **178**: 863-879.
- López-Ráez, J.A., Verhage, A., Fenández, I., García, J.M., Azcón-Aguilar, C., Flors, V., y Pozo, M.J. (2010)** Hormonal and transcriptional profiles highlight common and differential host responses to arbuscularmycorrhizal fungi and the regulation of the oxylipin pathway. *Journal of Experimental Botany*. **61**: 2589-2601.
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sanchez-Serrano, J.J. y Solano, R. (2004)** JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate

- between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **16**: 1938-1950.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J.J. y Solano, R. (2003)** *ETHYLENE RESPONSE FACTOR1* integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell*. **15**: 165-178.
- Lorenzo, O. y Solano, R (2005)** Señalización de ácido jasmónico e interacciones con otras hormonas. *Biojournal.net*. **1**: 1-16.
- Loscos, J., Matamoros, M.A. y Becana, M. (2008)** Ascorbate and homoglutathione metabolism in common bean nodules under stress conditions and during natural senescence. *Plant Physiology*. **146**: 1282-1292.
- Ludwig-Müller, J. (2000)** Hormonal balance in plants during colonization by mycorrhizal fungi. *En: Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Editores: Kapulnik, Y. y Douds, D. *Kluwer Academic Publishers, Amsterdam*, pp. 263-283.
- Ludwig-Müller, J. (2010)** Hormonal responses in host plants triggered by arbuscular mycorrhizal fungi. *En: Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Editores: Koltai, H. y Kapulnik, Y. pp. 169-190.
- Ludwig-Müller, J. y Güther, M. (2007)** Auxins as signals in arbuscular mycorrhiza formation. *Plant Signaling & Behavior*. **2**: 194-196.
- Ludwig-Müller, J., Kaldorf, M., Sutter, E.G. y 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., Bennett, R., García-Garrido, J.M., Piché, Y. y Vierheilig, H. (2002)** Reduced arbuscular mycorrhizal root colonization in *Tropaeolum majus* and *Carica papaya* after jasmonic acid application cannot be attributed to increased glucosinolate. *Journal Plant Physiology*. **159**: 517-523.
- Ludwig-Müller, J., Schubert, B. y Pieper, K. (1995)** Regulation of IBA synthase from maize (*Zea mays* L.) by drought stress and ABA. *Journal of Experimental Botany*. **46**: 423-432.
- Lund, S.T., Stall, R.E. y Klee, H.J. (1998)** Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell*. **10**: 371-382.

- Lutzoni, F., Kauff, F., Cox, C.J., McLaughlin, D., Celio, G., Dentinger, B., Padamsee, M., Hibbett, D., James, T.Y., Baloch, E. y col. (2004)** Assembling the fungal tree of life: Progress, classification and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany*. **91(10)**: 1446-1480.
- Mabood, F. y Smith, D.L. (2005)** Pre-incubation of *Bradyrhizobium japonicum* with jasmonates accelerates nodulation and nitrogen fixation in soybean (*Glycine max*) at optimal and suboptimal root zone temperatures. *Physiologist Plant*. **25**: 311-323.
- Mabood, F., Souleimanov, A., Khan, W. y Smith, D.L. (2006)** Jasmonates induce *Nod* factor production by *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiol. Biochem*. **44**: 759-765.
- Mada, R.J. y Bagyaraj, D.J. (1993)** Root exudation from *Leucaena leucocephala* in relation to mycorrhizal colonization. *World J Microbiol Biotechnol*. **9**: 342-344.
- Mäder, P., Fließbach, A., Dubois, D., Gunst, L., Fried, P. y Niggli, U. (2002)** Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science*. **296**: 1694-1697.
- Maherali, H. y Klironomos, J.N. (2007)** Influence of Phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *Science*. **316**: 1746-1748.
- Maillet, F., Poisont, V., Andre, O., Puech-Pages, V., Haouy, A. Gueunier, M., Giraudet, D., Forney, D., Martinez, E.A., Driguez, H y col (2011)** Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature*. **69**: 58-63.
- Mano, Y. y Nemoto, K. (2012)** The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*. **63**: 2853-2872.
- Marrs, K., Alfenito, M.R., Lloyd, A.M. y Walbot, V. (1995)** A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2. *Nature*. **375**: 397-400.
- Martin, F., Gianinazzi-Pearson, V., Hijri, M., Lammers, P., Requena, N., Sanders, I.R., Shachar-Hill, Y., Shapiro, H., Tuskan, G.A. y Young, J.P.W. (2008)** The long hard road to a completed *Glomus intraradices* genome. *New Phytologist*. **180**: 747-750.
- Martín-Rodríguez, J.A., León Morcillo, R., Vierheilig, H., Ocampo Bote, J.A., Ludwig-Müller, J., y García-Garrido, J.M. (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, J.A., León Morcillo, R., Vierheilig, H., Ocampo Bote, J.A., Ludwig-Müller, J., y García-Garrido, J.M. (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, F.W.A., Franssen, M.C.R., Beale, M.H. y Bouwmeester, H.J. (2005)** The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanch*e spp. Are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiology*. **139**: 920-934.
- Massoumou, M., van Tuinen, D., Chatagnier, O., Arnould, C., Brechenmacher, L., Sanchez, L., Selim, S., Gianinazzi, S. y Gianinazzi-Pearson, V. (2007)** *Medicago truncatula* gene responses specific to arbuscular mycorrhiza interactions with different species and genera of Glomeromycota. *Mycorrhiza*. **17(3)**: 223-234.
- Matarasso, N., Schuster, S. y Avni, A. (2005)** A novel plant cysteine protease has a dual function as a regulator of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic Acid synthase gene expression. *Plant Cell*. **17**: 1205-1216.
- Matsui, K., Minami, A., Hornung, E., Shibata, H., Kishimoto, K., Ahnert, V., Kindl, H., Kajiwara, T. y Feussner, I. (2006)** Biosynthesis of fatty acid derived aldehydes is induced upon mechanical wounding and its products show fungicidal activities in cucumber. *Phytochemistry* **67**: 649-657.
- Matsuki, T., Tazaki, H., Fujimori, T., and Hogetsu, T. (1992)** The influences of jasmonic acid methyl ester on microtubules in potato cells and formation of potato tubers. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 1329-1330.
- Mauch, F., Hadwiger, L.A. y Boller, T. (1988)** Antifungal hydrolases in pea tissue: I. purification and characterization of two chitinases and two β -1,3-glucanases differentially regulated during development and in response to fungal infection. *Plant Physiology*. **87**: 325-333.
- Maucher, H., Hause, B., Feussner, I., Ziegler, J. y Wasternack, C. (2000)** Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. *Salome*): tissue specific regulation in seedling development. *Plant Journal*. **21**: 199-213.

- McArthur, D.A.J. y Knowles, N.R. (1992)** Resistance responses of potato to vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under varying abiotic phosphorus levels. *Plant Physiology*. **100**: 341-351.
- McConn, M., Creelman, R.A., Bell, E., Mullet, J.E. y Browse, J. (1997)** Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proceeding of National Academy of Sciences of the USA*. **94**: 5473-5477.
- McGonigle, T.P. y Miller, M.H. (1996)** Development of fungi below ground in association with plants growing in disturbed and undisturbed soils. *Soil Biology and Biochemistry*. **28**: 263-269.
- McGurl, B., Pearce, G., Orozco-Cardenas, M. y Ryan, C.A. (1992)** Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science*. **255**: 1570-1573.
- Meixner, C., Ludwig-Müller, J., Miersch, O., Gresshoff, P., Staehelin, C. y Vierheilig, H. (2005)** Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant *nts1007*. *Planta*. **222**: 709-715.
- Menge, J.A., Munnecke, D.E., Johnson, E.L.V. y Carnas, D.W. (1978)** Dosage response of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus fasciculatus* and *G. constrictus* to methyl bromide. *Phytopathology*. **68**: 1368-1372.
- Meyer, J.R. y Linderman, R.G. (1986)** Response of subterranean clover to soil inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. *Soil biology and Biochemistry*. **18**: 185-190.
- Meyer, F.H. (1973)** Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests. *En: Ectomycorrhizae, their ecology and physiology. Editores: Marks, G.C. y Kozlowsky, T.T.* New York, USA.
- Michelini, S., Chinnery, L.E. y Thomas, J.P. (1989)** The effect of paclobutrazol on the vesicular-arbuscular mycorrhizae of lemon, *Citrus macrophylla* Wester, rootstocks. *Acta Hort*. **239**: 427-430.
- Miersch, O., Weichert, H., Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Feussner, I. y Wasternack, C. (2004)** Constitutive overexpression of allene oxide cyclase in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. *Lukullus*) elevates levels of jasmonates and octadecanoids in flower organs but not in leaves. *Phytochemistry*. **65**: 847-856.

- Miller, R.M. y Jatrow, J.D. (2000)** Mycorrhizal fungi influence soil structure. *En: Arbuscular mycorrhizae: molecular biology and physiology. Editores: Kapulnik, Y. y Douds, D.D. Kluwer, Dordrecht, 3-18.*
- Mok, M.C. (1994)** Cytokinins and plant development - an overview. *En: Cytokinins. Chemistry, activity and function. Editores: Mok, D.W.S. y Mok, M.C. pp. 155-166. CRC Press: Boca Raton.*
- Montillet, J.L., Chamnongpol, S., Rusterucci, C., Dat, J., van de Cotte, B., Agnel, J.P., Battesti, C., Inze, D., Van Breusegem, F. y Triantaphylides, C. (2005)** Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiology. 138: 1516-1526.*
- Morales-Vela, G., Molinero-Rosales, N., Ocampo, J.A. y García-Garrido, J.M. (2007)** Endocellulase activity is associated with arbuscular mycorrhizal spread in pea symbiotic mutant but not with its ethylene content in root. *Soil Biol Biochem. 39: 786-792.*
- Morandi, D., Bailey, J.A. y Gianinazzi-Pearson, V. (1984)** Isoflavonoid accumulation in soybean roots infected with vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Physiological Plant Pathology. 24: 357-364.*
- Morandi, D., le Signor, C., Gianinazzi-Pearson, V. y Duc, G. (2009)** A *Medicago truncatula* mutant hyper-responsive to mycorrhiza and defective for nodulation. *Mycorrhiza. 19: 435-441.*
- Morton, J.B. y Benny, G.L. (1990)** Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Zygomycota*): a new order, glomales, two new suborders, *Glomineae* and *Gigasporineae*, and two new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an emendation of *Glomaceae*. *Mycotaxon. 37: 471-491.*
- Mosblech, A., Feussner, I., Heilmann, I. (2009)** Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry. 47: 511-517.*
- Mosblech, A., Feussner, I., Heilmann, I. (2010)** Oxylipins signaling and plant growth. *En: Lipid Signaling in Plants, Plant Cell Monographs 16. Editor: T. Munnik. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.*
- Mosse, B., Stribley, D.P. y Le Tacon, F. (1981)** Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi. *En: Advances in microbial ecology. Editores: Alexander, M. New York: Plenum Press, vol. 5, New York. 137-209.*

- Mosse, B. (1959)** The regular germination of resting spores and some observations on the growth requirements of an *Endogone* sp. causing vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Trans Br Mycol Soc.* **42**: 273-286.
- Mueller, M.J. (2004)** Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **7**: 441-448.
- Mukhtarova, L.S., Mukhitova, F.K., Gogolev, Y.V. y Grechkin, A.N. (2011)** Hydroperoxide lyase cascade in pea seedlings: Non-volatile oxylipins and their age and stress dependent alterations. *Phytochemistry.* **72**: 356-364.
- Müller, J. (1999)** Mycorrhizal fungal structures are stimulated in wild type peas and in isogenic mycorrhiza-resistant mutants by tri-iodo-benzoic acid (TIBA), an auxin-transport inhibitor. *Symbiosis.* **26**: 379-389.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Plant Physiology.* **15**: 473-497.
- Nagahashi, G., Douds, D.D. y Abney, G.D. (1996)** Phosphorus amendment inhibits hyphal branching of the VAM fungus *Gigaspora margarita* directly and indirectly through its effect on root exudation. *Mycorrhiza.* **6**: 403-408.
- Nagahashi, G. y Douds, D.D. (1997)** Appressorium formation by AM fungi on isolated cell walls of carrot roots. *New Phytologist.* **136**: 299-306.
- Nagahashi, G. y Douds, D.D. (2000)** Partial separation of root exudate components and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. *Mycological Research.* **104**: 1453-1464.
- Nagy, R., Karandashov, V., Chague, V., Kalinkevich, K., Tamasloukht, B., Xu, G., Jakobsen, I., Levy, A.A., Amrhein, N. y 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.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T. y Kimura, T. (2007)** Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J. Biosci. Bioeng.* **104 (1)**: 34-41.

- Nakamura, S. y Hatanaka, A. (2002)** Green-leaf-derived C6-aroma compounds with potent antibacterial action that act on both gram-negative and gram-positive bacteria. *J agric Food Chem.* **50**: 7639-7644.
- Nakamura, Y., Matsubara, A., Miyatake, R., Okada, M. y Ueda, M. (2006)** Bioactive substances to control nyctinasty of Albizzia plants and its biochemistry. *Regulation of Plant Growth & Development.* **41**(Supplement): 44.
- Nambara, E., Okamoto, M., Tatematsu, K., Yano, R., Seo, M. y Kamiya, Y. (2010)** Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Sci Res.* **20**: 55-67.
- Narvaéz-Vásquez, J. y Ryan, C.A. (2004)** The cellular localization of prosystemin: a functional role for phloem parenchyma in systemic wound signaling. *Planta.* **218**: 360-369.
- Navazio, L., Moscatiello, R., Genre, A., Novero, M., Baldan, B., Bonfante, P. y Mariani, P. (2007)** A diffusible signal from arbuscular mycorrhizal fungi elicits a transient cytosolic calcium elevation in host plant cells. *Plant Physiology* **144**: 673-681.
- Niki, T., Mitsuhara, I., Seo, S., Ohtsubo, N. y Ohashi Y. (1998)** Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant Cell Physiol.* **39**: 500-507.
- Nishiuchi, T., Shinshi, H. y Suzuki, K. (2004)** Rapid and transient activation of transcription of the ERF3 gene by wounding in tobacco leaves: Possible involvement of NtWRKYs and autorepression. *J Biol Chem.* **279**: 55355-55361.
- Novero, M., Faccio, A., Genre, A., Stougaard, J., Webb, K. J., Mulder, L., Parniske, M. y 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.
- Ocampo, J.A. (1980)** Effect of crop rotations involving host and non-host plants vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of host plants. *Plant and Soil.* **56**: 283-291.
- O'Donnell, P.J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H.M.O. y Bowles, D.J. (1996)** Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science.* **274**: 1914-1917.

- Oehl, F. y Sieverding, E. (2004)** *Pacispora*, a new vesicular arbuscular mycorrhizal fungal genus in the *Glomeromycetes*. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. **78**: 72-82.
- Olah, B., Briere, C., Becard, G., Denarie, J. y 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. *The plant journal*. **44**: 195-207.
- Oldroyd, G.E.D. y Downie, J.A. (2004)** Calcium, kinases and nodulation signaling in legume. *Nature Reviews Molecular cell Biology*. **5**: 566-576.
- Owen, C. y Peñuelas, J. (2005)** Opportunistic emissions of volatile isoprenoids. *Trends Plant Science*. **10**: 420-426.
- Qiang, X., Weiss, M., Kogrli, K-H. y Schäfer, P. (2012)** *Piriformospora indica*-a mutualistic basidiomycete with an exceptionally large plant host range. *Molecular Plant Pathology*. **13**: 508-518.
- Palenzuela, J. y Barea, J.M. (2002)** Técnicas empleadas en el estudio de las micorrizas de plantas endémicas del tomillar dolomítico del Parque Natural de la Sierra de Baza. *Acta Granatense*. **2**: 125-138.
- Paquette, S. M., Bak, S. y Feyereisen, R. (2000)** Intron-exon organization and phylogeny in a large superfamily, the paralogous cytochrome P450 genes of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Cell Biol*. **19**: 307-17.
- Parniske, M. (2004)** Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*. **7**: 414-421.
- Parniske, M. (2005)** Cue for the branching connection. *Nature*. **435**: 750-751.
- Paszkowski, U. (2006)** Mutualism and parasitism: the ying and yang the plant symbiosis. *Current opinion in Plant Biology*. **9**: 364-370.
- Paszkowski, U., Jakovleva, L. y Boller, T. (2006)** Maize mutants affected at distinct stages of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Journal*. **47**: 165-173.
- Peterson, R., Massicotte, H.B. y Melville, L.H. (2004)** Mycorrhizas: anatomy and cell biology. NRC-CNRC. Ottawa.
- Pfaffl, M. W. (2001)** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. **29**: 45.

- Phillips, J.M. y Hayman, D.S. (1979)** Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscularmycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*. **55**: 158-161.
- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S. y Ryan, C.A. (1991)** A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science*. **253**: 995-998.
- Penninckx, I.A.M.A., Thomma, B.P.H.J., Buchala, A., Mettraux, J.-P. y Broekaert, W.F. (1998)** Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin. *Plant Cell*. **10**: 2103-2113.
- Perlick, A.M., Albus, U., Stavridis, T., Frühling, M., Küster, H. y Pühler, A. (1996)** The *Vicia faba* lipoxygenase gene *VfLOX1* is expressed in the root nodule parenchyma. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **9**: 860-863.
- Piechulla, B., Merforth, N. y Rudolph, B. (1998)** Identification of tomato Lhc promoter regions necessary for circadian expression. *Plant Molecular Biology* **38**: 655-662.
- Pieterse, C.M.J., Schaller, A., Mauch-Mani, B. y Conrath U. (2006)** Signaling in plant resistance responses: divergence and cross-talk of defense pathways. *En: Multigenic and induced systemic resistance in plants. Editores: Tuzun, S. y Bent, E. New York: Springer, 166-196.*
- Pieterse, C.M.J., Van Pelt, J.A., Ton, J., Parchmann, S., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.-P. y Van Loon, L.C. (2000)** Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **57**: 123-134.
- Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J. y van Loon, L.C. (1998)** A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **10**: 1571-1580.
- Pietikainen, A. y Kytovirta, M.M. (2007)** Defoliation changes mycorrhizal benefit and competitive interactions between seedlings and adult plants. *Journal of Ecology*. **95**: 639-647.

- Pinior, A., Wyss, U., Piche, Y. y Vierhelig, H. (1999)** Plants colonized by AM fungi regulate further root colonization by AM fungi through altered root exudation. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique*. **77**: 891-897.
- Ponce de León, I., Sanz, A., Hamberg, M. y Castresana, C. (2002)** Involvement of the *Arabidopsis* α -DOX1 fatty acid dioxygenase in protection against oxidative stress and cell death. *Plant Journal*. **29**: 61-62.
- Porta, H., Rueda-Benitez, P., Campos, F., Colmenero-Flores, J.M., Colorado, J.M., Carmona, M.J., Covarrubias, A.A. y Rocha-Sosa, M. (1999)** Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and under stress conditions. *Plant and Cell Physiology*. **40**: 850-858.
- Pozo, M.J. y Azcon-Aguilar, C. (2007)** Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*. **10**: 393-398.
- Pozo, M.J., Van Loon, L.C. y Pieterse, C.M.J. (2005)** Jasmonates – signals in plant–microbe interactions. *Journal. Plant Growth Regulation*. **23**: 211-222.
- Pozo, M.J., Van Der Ent, S., Van Loon, L.C. y Pieterse, C.J.M. (2008)** Transcription factor *MYC2* is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. **180**: 511-523.
- Prost, I., Dhondt, S., Rothe, G., Vicente, J., Rodriguez, M.J., Kift, N., y col. (2005)** Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *Plant Physiology*. **139**: 1902-1913.
- Pumplin, N., Mondo, S.J., Topp, S., Starker., C.G., Gantt, J.S. y Harrison, M.J. (2010)** *Medicago truncatula* Vapyrin is a novel protein required for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Journal*. **61**: 482-494.
- Rancé, I., Fournier, J. y Esquerré-Tugayé, M.T. (1998)** The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 6554-6559.
- Raskin, I. (1992)** Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology*. **43**: 439-463.
- Rasmussen, H.N. (2002)** Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil*. **244**: 149-163.

- Redecker, D., Kodner, R. y Graham, I.E. (2000)** Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*. **289**: 1920-1921.
- Regvar, M., Gogala, N. y Zalar, P. (1996)** Effects of jasmonic acid on mycorrhizal *Allium sativum*. *New Phytologist*. **134**: 703-707.
- Reiner, A., Yekutieli, D. y Benjamini, Y. (2003)** Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics*. **19**: 368-375.
- Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H. y Kerp, H. (1994)** Four hundred million year old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **91**: 11841-11843.
- Requena, N., Mann, P., Hampp, R. y 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 Soil*. **244**: 129-139.
- Requena, N., Serrano, E., Ocón, A. y Breuninger, M. (2006)** Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry*. **68**: 33-40.
- Rhodes, L.H. y Gerdemann, J.W. (1975)** Phosphate uptake zones of mycorrhizal and non-mycorrhizal onions. *New Phytologist*. **75**: 555-561.
- Riedel, T, Groten, K. y Baldwin, I.T. (2008)** Symbiosis between *Nicotiana attenuata* and *Glomus intraradices*: ethylene plays a role, jasmonic acid does not. *Plant Cell and Environment*. **31**: 1203-1213.
- Rillig, M.C. (2004)** Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem processes. *Ecology Letters*. **7**: 740-754.
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P. y Wittwer, C.T. (1997)** Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*. **245**: 154-160.
- Rojo, E., Leon, J. y Sanchez-Serrano, J.J. (1999)** Cross-talk between wound signalling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. **20**: 135-142.
- Rojo, E., Solano, R. y Sanchez-Serrano, J.J. (2003)** Interactions between signaling compounds involved in plant defense. *Journal of Plant Growth Regulation*. **22**: 82-98.

- Rosas, S., Soria, R., Correa, N. y Abdala, G. (1998)** Jasmonic acid stimulates the expression of nod genes in *Rhizobium*. *Plant Molecular Biology*. **38**: 1161-1168.
- Rose, S.L. y Youngberg, G.T. (1981)** Tripartite associations in snowbrush (*Ceanothus velutinus*): effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae on growth nodulation and nitrogen fixation. *Can J Bot.* 59: 34-39.
- Ruiz-Lozano, J.M., Azcon-Aguilar, R. y Gomez, M. (1996)** Alleviation of salt stress by arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species in *Lactuca sativa* plants. *Plant Physiology*. **98**: 767-772.
- Ruiz-Lozano, J.M. (2003)** Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*. **13**: 309-317.
- Rustérucci, C., Montillet, J.L., Agnel, J.P., Battesti, C., Alonso, B., Knoll, A., Bessoule, J.J., Etienne, P., Suty, L., Blein, J.P. y col. (1999)** Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogin on tobacco leaves. *J Biol Chem*. **274**: 36446-36455.
- Ryan, C.A. (2000)** The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta*. **1477**: 112-121.
- Saito, M. y Marumoto, T. (2002)** Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi: the status quo in Japan and the future prospects. *Plant and Soil*. **244**: 273-279.
- Saito, K., Yoshikawa, M., Yamo, K., miwa, H., Uchide, H., Asamizu, E., Sato, S. y col (2007)** NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbiosis, and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell*. 19: 610-624.
- Salzer, P., Bonanomi, A., Beyer, K., Vogeli-Lange, R., Aeschbacher, R., y col. (2000)** Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation and pathogen infection. *Mol. Plant-Microbe Interact*. **7**: 763-78
- Salzer, P., Corbière, H. y Boller, T. (1999)** Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus mosseae*. *Planta*. **208**: 319-325.
- Salzer, P., Hebe, G. y Hager, A. (1997a)** Cleavage of chitinous elicitors from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme* by host chitinases prevents

- induction of K⁺ and Cl⁻ release, extracellular alkalinization and H₂O₂ synthesis of *Picea abies* cells. *Planta*. **203**: 470-79.
- Salzer, P., Hübner, B., Sirrenberg, A. y Hager, A. (1997)** Differential effect of purified spruce chitinases and β-1,3-glucanases on the activity of elicitors from ectomycorrhizal fungi. *Plant Physiology* **114**: 957-68.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989)** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- Sanders, F.E., Tinker, P.B., Black, R.L.B. y Palmerley, S.M. (1977)** The development of endomycorrhizal root systems: I. Spread of infection and growth-promoting effects with four species of vesicular-arbuscular endophyte. *New Phytologist*. **78**: 257-268.
- Santner, A., Calderon-Villalobos, L.I. y Estelle, M. (2009)** Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat Chem Biol*. **5**: 301-307.
- Scervino, J.M., Ponce, M.A., Erra-Bassells, R., Vierheilig, H., Ocampo, J.A. y Godeas, A. (2005a)**. Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth of *Gigaspora* and *Glomus*. *Mycological Research*. **109**: 789–794.
- Scervino, J.M., Ponce, M.A., Erra-Bassells, R., Vierheilig, H., Ocampo, J.A. y Godeas, A. (2005b)** Arbuscular mycorrhizal colonization of tomato by *Gigaspora* and *Glomus* species in the presence of root flavonoids. *Journal Plant Physiology*. **162**: 625–633.
- Schaarschmidt, S., Kopka, J., Ludwig-Müller, J. y Hause, B. (2007)** Regulation of arbuscular mycorrhiza by apoplastic invertases. Increased invertase activity the leaf apoplast effects the symbiotic interaction. *Plant Journal*. **51**: 390-405.
- Schäfer, P., Pfiffi, S., Voll, L.M., Zajic, D., Chandler, P.M., Waller, F., Scholz, U., Pons-Kühnemann, J., Sonnewald, S., Sonnewald, U. y Kogel, K.H. (2009)** Phytohormones in plant root-*Piriformospora indica* mutualism. *Plant Signaling and Behaviour*. **4**: 669-671
- Schaller, F., Biesgen, C., Müssig, C., Altmann, T. y Weiler, E.W. (2000)** 12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta*. **210**: 979-984.
- Schaller, A. y Stintzi, A. (2009)** Enzymes in jasmonate biosynthesis – Structure, function, regulation. *Phytochemistry*. **70**: 1532-1538.

- Schenck, N.C., Graham, S.O. y Green, N.E. (1975)** Temperature and light effect on contamination and spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia*. **76**: 1189-1192.
- Schenck, N.C. y Smith, G.S. (1982)** Additional new and unreported species of mycorrhizal fungi (*Endogonaceae*) from Florida. *Mycologia* **74**: 77-92.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., y Walker, C. (2001)** A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research*. **105**: 1413-1421.
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., y col. (2002)** Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and highsalinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal*. **31**: 279-292.
- Serra, O., Soler, M., Hohn, C., Sauveplane, V., Pinot, F., Franke, R. Schreiber, L., Prat, S., Molinas, M. y Figueras, M. (2009)** *CYP86A33*-Targeted gene silencing in potato tuber alters suberin composition, distorts suberin lamellae, and impairs the periderm's water barrier function. *Plant physiology*. **149**: 1050-1060.
- Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.J., Lee, Y.H., Lee, Y.W., Hwang, I., Lee, J.S. y Choi, Y.D. (2001)** Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **98**: 4688-4793.
- Shachar-Hill, Y., Pfeffer, P.E., Douds, D.D., Osman, S.F. Doner, L.W. y Ratcliffe, R.G. (1995)** Partitioning of intermediary carbon metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizal leek. *Plant Physiology* **108**: 7-15.
- Shaul, O., Galili, S., Volpin, H., Ginzberg, I., Elad, Y., Chet, I. y Kapulnik, T. (1999)** Mycorrhiza-induced changes in disease severity and PR protein expression in tobacco leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **12**: 1000-1007.
- Shaul-Keinan, O., Gadkar, V., Ginzberg, I., Grünzweig, J., Chet, I., Elad, Y., Wininger, S., Belausov, E., Eshed, Y., Atzmon, N., Ben-Tal, Y. y Kapulnik, Y. (2002)** Hormone concentrations in tobacco roots change during arbuscular mycorrhizal colonization with *Glomus intraradices*. *New Phytologist*. **154**: 501-507.

- Shreiner, R.P. y Bethlenfalvay, J.G. (1997)** Mycorrhizae, Biocides, and biocontrol: 3. Effects of three different fungicides on developmental stages of three AM fungi. *Biol Fert Soils*. **24**: 18-26.
- Schillmiller, A.L. y Howe, G.A. (2005)** Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant*. **8**: 369-377.
- Shiojiri, K., Kishimoto, K., Ozawa, R., Kugimiya, S., Urashimo, S., Arimura, G., Horiuchi, J., Nishioka, T., Matsui, K. y Takabayashi, J. (2006)** Changing green leaf volatile biosynthesis in plants: an approach for improving plant resistance against both herbivores and pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*. **103**: 16672-16676.
- Shirsat, A., Wilford, N., Croy, R. y Boulter, D. (1989)** Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco. *Molecular and General Genetics*. **215**: 326-331.
- Siciliano, V., Genre, A., Balestrini, R., Cappellazzo, C., de Wit, J.G.M. y Bonfante, P. (2007)** Transcriptome analysis of arbuscular mycorrhizal roots during development of the prepenetration apparatus. *Plant Physiology*. **144**: 1455-1466.
- Siedow, J.N. (1991)** Plant lipoxygenase: structure and function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. **42**: 145-88.
- Siqueira, J.O., Safir, G.R. y Nair, M.G. (1991)** Stimulation of vesiculararbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. *New Phytologist*. **118**: 87-93.
- Simon, L., Bousquet, J., Lévesque, R.C. y Lalonde, M. (1993)** Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*. **363**: 67-69.
- Singh, R., Adholeya, A., Mukerji, K.G. (2000)** Mycorrhiza in control of soil-borne pathogens. *En: Mycorrhizal biology*. Editores: Mukerji, K.G., Chamola, B.P., Singh, J. Kluwer, New York pp 173-196.
- Singh, R.P., Choudhary, A., Gulati, A., Dahiya, H.C., Jaiwal, P.K. y Sengar, R.S. (1997)** Response of plants to salinity in interaction with other abiotic factors. *En: Strategies for Improving Salt Tolerance in Higher Plants*. Science Publishers, Enfield, USA pp 25-39.
- Smith, S.E. y Read, D.J. (2008)** Mycorrhizal symbiosis 3rd edn. Academic Press. London.

- Smith, F.A. y Smith, S.E. (1997)** Tansley Review No. 96. Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*. **137**: 373-388.
- Smith, S.E., Smith, F.A. y 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.Z. y Saito, M. (1997)** Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry. *New Phytologist*. **136**: 533-538.
- Spanu, P. y Bonfante-Fasolo, P. (1988)** H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance. *Trends in Plant Science*. **3**: 330-334.
- Spanu, P., Boller, T., Ludwig, A., Wiemken, A., Faccio, A. y Bonfante-Fasolo, P. (1989)** Chitinase in roots of mycorrhiza? *Allium porrum*: regulation and localization. *Planta*. **177**: 447-55
- Spichal, L. (2012)** Cytokinins - recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biology*. **39**: 267-284.
- Staswick, P.E., Su, W. y Howell, S.H. (1992)** Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **89**: 6837-6840.
- Steinkellner, S., Lenzemo, V., Langer, I., Schweiger, P., Khaosaad, T., Toussaint J.P. y Vierheilig, H. (2007)** Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant–fungus interactions. *Molecules*. **12**: 1290–1306.
- Stelmach, B.A., Müller, A., Hennig, P., Laudert, D., Andert, L. y Weiler, E.W. (1998)** Quantitation of the octadecanoid 12-oxo-phytodienoic acid, a signalling compound in plant mechanotransduction. *Phytochemistry*. **47**: 539-546.
- Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Pitzschke, A., Miersch, O., Ziegler, J. y col. (2003)** Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle specific generation of jasmonates in tomato – amplification in wound-signalling. *Plant Journal*. **33**: 577-589.

- Stintzi, A. y Browse, J. (2000)** The *Arabidopsis* male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **97**: 10625-10630.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J. y Farmer, E.E. (2001)** Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA*. **98**: 12837-12842.
- Stockinger, H., Walker, C y Schüßler, A. (2009)** “*Glomus intraradices* DAOM 197198” a model fungus in a arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New phytologist*. **183 (4)**:1176-1187.
- Stougaard, J., Jorgensen, J.E., Christensen, T., Kuhle, A. y Marcker, K.A. (1990)** Interdependence and nodule specificity of cis-acting regulatory elements in the soybean leghemoglobin lbc3 and N23 gene promoters. *Mol Gen Genet*. **220**: 353-360.
- Strack, D. y Fester, T. (2006)** Isoprenoid metabolism and plastid reorganization in arbuscular mycorrhizal roots. *New Phytology*. **172**: 22-34.
- Strack, D., Fester, T., Hause, B., Schliemann, W. y Walter, M.H. (2003)** Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical, and molecular aspects. *Journal Chem Ecol*. **29**: 1955-1979.
- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S. y col. (2002)** A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature*. **417**: 959-962.
- Strassner, J., Schaller, F., Frick, U.B., Howe, G.A., Weiler, E.W., Amrhein, N., Macheroux, P. y Schaller, A. (2002)** Characterization and cDNAmicroarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *The Plant Journal*. **32**: 585-601.
- Strittmatter, G., Gheysen, G., Gianinazzi-Pearson, V., Hahn, K., Rohde, W. y Tazcke, E. (1996)** Infections with various types of organisms stimulate transcription from a short promoter fragment of the potato *gstI* gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **9**: 68-73.
- Stumpe, M., Carsjens, J.G., Stenzel, I., Göbel, C., Lang, I., Pawlowski, K., y col. (2005)** Lipid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry*. **66**: 781-791.

- Stumpe, M., Carsjens, J.G., Göbel, C. y Feussner, I. (2008)** Divinyl ether synthesis in garlic bulbs. *Journal Experimental Botany*. **59**: 907-915.
- Stumpe, M., Göbel, C., Demchenko, K., Hoffmann, M., Klösgen, R.B., Pawlowski, K. y Feussner, I. (2006)** Identification of an allene oxide synthase (CYP74C) that leads to formation of alpha-ketols from 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acid in below-ground organs of potato. *The Plant Journal*. **47**: 883-896.
- Stumpe, M., Kandzia, R., Göbel, C., Rosahl, S. y Feussner, I. (2001)** A pathogen-inducible divinyl ether synthase (CYP74D) from elicitor-treated potato suspension cells. *FEBS Lett*. **507**: 371-376.
- Su, C., Sahlin, M. y Oliw, E. H. (1998)** A protein radical and ferryl intermediates are generated by linoleate diol synthase, a ferric hemeprotein with dioxygenase and hydroperoxide isomerase activities. *J. Biol. Chem*. **273**: 20744-20751.
- Sun, J., Cardoza, V., Mitchell, D.M., Bright, L., Oldroyd, G.E.D. y Harris, J.M., (2006)** Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and *Nod* factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *Plant Journal*. **46**: 961-970.
- Sun, Z., Hans, J., Walter, M.H., Matusova, R., Beekwilder, J., Verstappen, F.W.A., Ming, Z., van Echtelt, E., Strack, D., Bisseling, T. y Bouwmeester, H.J. (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.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2006)** Fisiología vegetal. Volumen I. Ed: Universitat Jaime I.
- Takabayashi, J., Noda, T., y Takahashi, S. (1991)** Plant produce attractants for *Apanteles kariyai*, a parasitoid of *Pseudaletia separata*, cases of "communication" and "misunderstanding" in parasitoid-plant interactions. *Appl. Entomol. Zool*. **26**: 237-243.
- Takahashi, K., Fujino, K., Kikuta, Y., y Koda, Y. (1995)** Involvement of the accumulation of sucrose and the synthesis of cell wall polysaccharides in the expansion of potato cells in response to jasmonic acid. *Plant Science*. **111**: 11-18.

- Takeda, N., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S. y Parniske, M (2010)** Apoplastic plant subtilases support arbuscular mycorrhiza development in *Lotus japonicus*. *The Plant Journal*. **58**: 766-777.
- Taki, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A., Kobayashi, K., Ainai, T., y col. (2005)** 12-Oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. **139**: 1268-1283.
- Tamasloukht, M., Sejalon-Delmas, N., Kluever, A., Jauneau, A., Roux, C., Becard, G. y 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. Physiol.* **131**: 1468–1478.
- Tawaraya, K., Hashimoto, K. y Wagatsuma, T. (1998)** Effect of root exudate fractions from P-deficient and P-sufficient onion plants on root colonisation y the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Mycorrhiza*. **8**: 67-70.
- Tawaraya, K., Watanabe, S., Vierheilig, H. y 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.B., Linforth, R.S.T., Al Naieb, R.J., Bowman, W.R., y Marples, B.A. (1988)** The wilty tomato mutants *flacca* and *Sitiens* are impaired in the oxidation of ABA-aldehyde to ABA. *Plant, Cell and Environment*. **11**: 739-745.
- Taylor, I., Sonneveld, T., Buff, T. y Thompson, A. (2005)** Regulation and manipulation of the biosynthesis of abscisic acid, including the supply of xanthophylls precursors. *Journal of Plant Growth Regulation*. **24**: 253-273.
- Teale, W.D., Paponov, I.A. y Palme, K. (2006)** Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **7**: 847-859.
- Tehler, A., Little, D.P. & Farris, J.S. (2003)** The full-length phylogenetic tree from 1551 ribosomal sequences of chitinous fungi, *Fungi*. *Mycol Res*. **107**: 901-916.
- Tejeda-Sartorius, M., de la Vega, O.M. y Delano-Frier, J.P. (2008)** Jasmonic acid influences mycorrhizal colonization in tomato plants by modifying the expression of genes involved in carbohydrate partitioning. *Physiologia Plantarum*. **133**: 339-353.

- Terzaghi, W.B. y Cashmore, A.R. (1995a)** Photomorphogenesis. Seeing the light in plant development. *Current Biology*. **5**: 466-8.
- Terzaghi, W.B. y Cashmore, A.R. (1995b)** Light-regulated transcription. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **46**: 445-474.
- Theodoulou, F.L., Job, K., Slocombe, S.P., Footitt, S., Holdsworth, M., Baker, A., Larson, T.R. y Graham, I.A. (2005)** Jasmonic acid levels are reduced in COMATOSE ATP-binding cassette transporter mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes. *Plant Physiology*. **137**: 835-840.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A. y Browse, J. (2007)** JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature*. **448**: 661-665.
- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Penninckx, I.A.M.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A. y Broekaert, W.F. (1998)** Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**: 15107-15111.
- Thoma, I., Loeffler, C., Sinha, A.K., Gupta, M., Krischke, M., Steffan, B., y col. (2003)** Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant Journal*. **34**: 363-375.
- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Tierens, K.F.M.-J., Broekaert, W.F. (1999)** Requirement of functional *Ethylene-Insensitive2* gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol*. **121**: 1093-1101.
- Thomma, B.P.H.J., Penninckx, I.A., Broekaert, W.F. y Cammue, B.P.A. (2001)** The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Immunology*. **13**: 63-68.
- Tijet, N. y Brash, A.R. (2002)** Allene oxide synthases and allene oxides. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. **68**: 423-431.
- Tinker, P.B. (1978)** Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae on plants nutrition and plant growth. *Physiology Vegetable*. **16**: 743-775.

- Tirajoh, A., Aung, T.S., McKay, A.B. y Plant, A.L. (2005)** Stress-responsive alpha-dioxygenase expression in tomato roots. *Journal Experimental Botany*. **56**: 713-23.
- Tirichine, L., Imaizumi-Anraku, H., Yoshida, S., Murakami, Y., Madsen, L.H., Miwa, H., Nakagawa, T., Sandal, N., Albrechtsen, A.S., Kawaguchi, M., Downie, A., Sato, S., Tabata, S., Kouchi, H., Parniske, M., Kawasaki, S. y Stougaard, J. (2006)** Deregulation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature*. **441**: 1153-1156.
- Tisserant, B., Gianinazzi, S. y Gianinazzi-Pearson, V. (1996)** Relationships between lateral root order, arbuscularmycorrhiza development, and the physiological state of the symbiotic fungus in *Platanusacerifolia*. *Canadian Journal of Botany*. **74**: 1947-1955.
- Tisserant, B., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. y Gollote, A. (1993)** Inplantahistochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscularmycorrhizal infections. *Mycological Research*. **97**: 245-250.
- Tisserant, E., Kohler, A., Dozolme-Seddas, P., Balestrini, R., Benabdellah, K., Colard, A., Croll, D. y col. (2012)** The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New phytologist*. **193**: 755-769.
- Tommerup, I.C. (1985)** Inhibition of spore germination of vesicular.arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Transactions of the British Mycological Society*. **8**: 267-278.
- Ton, J., De Vos, M., Robben, C., Buchala, A., Metraux, J.P., Van Loon, L.C. y Pieterse, C.M.J. (2002b)** Characterization of *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants that are affected in systemically induced resistance. *Plant Journal*. **29**: 11-21.
- Ton, J., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C. y Pieterse, C.M.J. (2002a)** 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. y 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 Soil*. **226**: 29-35.

- Toro, M., Azcón, R. y Barea, J.M. (1998)** The use of isotopic dilution techniques to evaluate the interactive effects of *Rhizobium* genotype, mycorrhizal fungi, phosphate solubilizing rhizobacteria and rock phosphate on nitrogen and phosphorus acquisition by *Medicago sativa*. *New Phytologist*. **138**: 265-273.
- Torres de los Santos, R., Vierheilig, H., Ocampo, J.A. y García-Garrido, J.M. (2011)** Altered pattern of Arbuscular Mycorrhizal formation in tomato ethylene mutants. *Plant Signaling and Behaviour*. **6**: 755-758.
- Trouvelot, A., Kough, J.L. y Gianinazzi-Pearson, V. (1986)** Measure du taux de mycorrhization VA d'un systeme radiculaire. Recherche de methods d'estimation ayant une signification fonctionnelle. *En: Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. Editores: Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. INRA, Paris, France.* 217-221.
- Turner, J.G., Ellis, C. y Devoto, A. (2002)** The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell*. Supplement: S153-S164.
- Ueda, J. y Kato, J. (1980)** Isolation and identification of a senescence promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiology*. **66**: 246-249.
- Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., Magome, H., Kamiya, Y., Shirasu, K., Yoneyama, K., Kyojuka, J. y Yamaguchi, S. (2008)** Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*. **455**: 195-200.
- Uppalapati, S.R., Ayoubi, P., Weng, H., Palmer, D.A., Mitchell, R.E., Jones, W., y Bender, C.L. (2005)** The phytotoxin coronatine and methyl jasmonate impact multiple phytohormone pathways in tomato. *Plant Journal*. **42**: 201-217.
- Vadassery, L., Ritter, C., Venus, Y., Camehl, L., Varma, A., Shahollari, B., Novák, O., Strnad, M., Ludwig-Müller, J. y 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.
- Vancanneyt, G., Sanz, C., Farmaki, T., Paneque, M., Ortego, F., Castanera, P. y Sanchez-Serrano, J.J. (2001)** Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proc Natl Acad Sci USA*. **98**: 8139-8144.

- Van Loon, L.C. (1999)** Occurrence and properties of plant pathogenesis related proteins. *En: Pathogenesis-related proteins in plants. Editores: Datta, S.K., Muthukrishnan, S. Boca Raton, Florida, USA. pp: 1-19.*
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. y Pieterse, C.M.J. (1998)** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology. 36:* 453-483.
- Van Loon, L.C., Rep, M. y Pieterse, C.M. (2006)** Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology. 44:* 1-28.
- Van Oosten, V.R., Bodenhausen, N., Reymond, P., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C., Dicke, M. y Pieterse, C.M.J. (2008)** Differential effectiveness of microbially induced resistance against herbivorous insects in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions. 21:* 919-930.
- Van Rhijn, P., Fang, Y., Galili, S., Shaul, O., Atzmon, N., Wininger, S., Eshed, Y., Lum, M., Li, Y., To, V., Fujishige, N. y Hirsch, A.M. (1997)** Expression of early nodulin genes in alfalfa mycorrhizae indicates that signal transduction pathways used in forming arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium*-induced nodules may be conserved. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94:* 5467-5472.
- Van Wees, S.C.M., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., Van Loon, L.C. y Pieterse, C.M.J. (1999)** Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Molecular Biology. 41:* 537-549.
- Velosillo, T., Martínex, M., López, M.A., Vicente, J., Castón, T., Dolan, L., Hamberg, M. y Castresana, C. (2007)** Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *The Plant Cell. 19:* 831-846.
- Venkatachalam, P., Geetha, N., Khandelwal, A., Shaila, M. S. y Lakshmi Sita, G. (2000)** *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and regeneration of transgenic plants from cotyledon explants of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) via somatic embryogenesis. *Current Science. 78 (9):* 1130-1136.

- Verhagen, B.W.M., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H-S., Van Loon, L.C. y Pieterse, C.M.J. (2004)** The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **17**: 895-908.
- Véronési, C., Rickauer, M., Fournier, J., Pouénat, M-L. y Esquerré-Tugayé, M-T. (1996)** Lipoxygenase gene expression in the tobacco-*Phytophthora parasitica* nicotianae interaction. *Plant Physiology*. **112**: 997-1004.
- Vicente, J., Cascón, T., Vicedo, B., García-Agustín, P., Hamberg, M. y Castresana, C. (2012)** Role of 9-lipoxygenase and α -dioxygenase oxylipin pathways as modulators of local and systemic defense. *Molecular Plant*. **5**: 914-928.
- Vick, B.A. y Zimmerman, D.C. (1984)** Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiology*. **75**: 458-461.
- 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. y Wiemken, A. (1994)** Ethylene biosynthesis and activities of chitinase and β -1,3-glucanase in the roots of host and nonhost plants of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after inoculation with *Glomus mosseae*. *Journal of Plant Physiology*. **143**: 337-343.
- Vierheilig, H., Alt, M., Neuhaus, J.M., Boller, T. y Wiemken, A. (1993)** Colonization of transgenic *Nicotiana sylvestris* plants, expressing different forms of *Nicotiana tabacum* chitinase, by root pathogen *Rhizoctonia solani* and by the mycorrhizal symbiont *Glomus mosseae*. *Molecular Plant-microbe Interactions*. **6**: 261-264.
- Vierheilig, H., Alt, M., Lange, J., Gut-Rella, M., Wiemken, A. y Boller, T. (1995)** Colonization of transgenic tobacco constitutively expressing pathogenesis-related proteins by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**: 3031-3034.
- Vierheilig, H., y Bago, B. (2005)** Host and non-host impact on the physiology of the symbiosis. *En: Root-organ cultures of mycorrhizal fungi. Editores: Declerck, S., Strullu, S. y A. Fortin. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. pp 139-158.*

- Vierheilig, H., Bago, B., Lerat, S. y Piché, Y. (2002)** Shoot-produced, light-dependent factors are partially involved in the expression of the arbuscular mycorrhizal (AM) status of AM host and non-host plants. *J Plant Nutr Soil Sci.* **165**: 21-25.
- Vierheilig, H., Garcia-Garrido, J.M., Wyss, U. y Piché, Y. (2000a)** Systemic suppression of mycorrhizal colonization of barley roots already colonized by AM fungi. *Soil Biol Biochem.* **32**: 589-595.
- Vierheilig, H., Maier, W., Wyss, U., Samson, J., Strack, D. y Piché, Y. (2000b)** Cyclohexenone derivative- and phosphate-levels in split-root systems and their role in the systemic suppression of mycorrhization in precolonized barley plants. *Journal Plant Physiology.* **157**: 593-599.
- Vierheilig, H., y Piché, Y. (2002)** Signalling in arbuscular mycorrhiza: facts and hypotheses. *En: Flavonoids in cell function. Editores: Buslig, B., Manthey, J.A.* Kluwer Academic, New York, pp 23-39.
- Vieweg, M.F, Fruhling, M., Quandt, H.J., Heim, U., Baumlein, H., Puhler, A., Kuster, H. y Andreas, M.P. (2004)** The promoter of the *Vicia faba* L. leghemoglobin gene VfLb29 is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants. *Mol Plant Microbe Interact.* **17**: 62-69.
- Vijayan, P., Shockey, J., Lévesque, C.A., Cook, R.J. y Browse, J. (1998)** A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**: 7209-7214.
- Vlot, A.C., Klessig, D.F. y Park, S.W. (2008)** Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology.* **11**: 436-442.
- Volpin, H., Phillips, D.A., Okon, Y. y Kapulnik, Y. (1995)** Suppression of an isoflavonoid phytoalexin defense response in mycorrhizal alfalfa roots. *Plant Physiology.* **108**: 1449-1454.
- Walker, C. y Schüßler, A. (2004)** Nomenclatural Clarifications and New Taxa in the Glomeromycota: *Pacispora*. *Mycol Res.* **108**: 981-982.
- Walker, N.J. (2002)** Tech.Sight.A technique whose time has come. *Science.* **296**: 557-559.

- Walker-Simmons, M.K., Rose, P.A., Hogge, L.R. y Abrams, S.R. (2000)** Abscisic acid ABA immunoassay and gas chromatography/mass spectrometry verification. *Methods Molecular Biology*. **141**: 33-47.
- Wasternack, C. (2004)** Jasmonates – biosynthesis and role in stress responses and developmental processes. *En: Plant cell death processes. Editor: Nooden, L.D.* New York: Elsevier/Academic Press. Pp 143-155.
- Wasternack, C. (2006)** Oxilipins: biosynthesis, signal transduction and action. *En: Plant hormone signaling. Annual Plant Reviews. Editores: Hedden, P. y Thomas, S.* Oxford: Blackwell Publishing Ltd. Pp. 185-228.
- Wasternack, C. (2007)** Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Annals of Botany*. **100**: 681-697.
- Wasternack, C. (2009)** Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*. **100**: 681–697.
- Weber, H., Chételat, A., Caldelari, D. y Farmer, E.E. (1999)** Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell*. **11**: 485-94.
- Weber, H., Vick, B.A. y Farmer, E.E. (1997)** Dinor-oxo-phytodienoic acid: a new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**: 10473-10478.
- Wei, J., Tirajoh, A., Effendy, J. y Plant, A.L. (2000)** Characterization of saltinduced changes in gene expression in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots and the role played by abscisic acid. *Plant Science*. **159**: 135-148.
- Weidmann, S., Sanchez, L., Descombin, J., Chatagnier, O., Gianinazzi, F. y 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 Interaction*. **17**: 1385–1393.
- Wells, G. y Huston, C. (1995)** High-resolution selected ion monitoring in a quadrupole ion trap mass spectrometer. *Analytical Chemistry*. **67**: 3650-3655.
- Werck-Reichhart, D., Bak, S. y Paquette, S. (2002)** Cytochromes P450. *En: The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD.*
- Werner, T. y Schmölling, T. (2009)** Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*. **12**: 527-538.

- Wettenhall, J.M., Simpson, K.M., Satterley, K. y Smith, G.K. (2006)** AffyImGUI: A graphical user interface for linear modeling of single channel microarray data. *Bioinformatics*. **22**: 897-899.
- Wilens, R.W., van Rooijen, G.J.H., Pearce, D.W., Pharis, R.P., Holbrook, L.A. y Moloney, M.M. (1991)** Effects of jasmonic acid on embryospecific processes in *Brassica* and *Linum* oilseeds. *Plant Physiology*. **95**: 399-405.
- Wisniewski, J.P., Gardner, C.D. y Brewin N.J. (1999)** Isolation of lipoxygenase cDNA clones from pea nodule mRNA. *Plant Molecular Biology*. **39**: 775-783.
- Woodward, A.W. y Bartel, B. (2005)** Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*. **95**: 707-735.
- Xavier, L.J.C. y Boyetchko, S.M. (2004)** Arbuscular mycorrhizal fungi in plant disease control. *En: Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications. Editor: Arora, D.K. Dekker, New York, pp 183-194.*
- Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M. y Turner, J.G. (1998)** COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science*. **280**: 1091-1094.
- Xu, Y., Chang, P.F., Liu, D., Narasimhan, M.L., Raghothama, K.G., Hasegawa, P.M. y Bressan, R.A. (1994)** Plant defense genes are synergically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell*. **6**: 1077-1085.
- Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W.L., Ma, H., Peng, W., Huang, D., Xie, D. (2002)** The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **14**: 1919-1935.
- Xu, G., Chague, V., Melamed-Bessudo, C., Kapulnik, Y., Jain, A., Raghothama, K.G., Levy, A.A. y Silber, A. (2007)** Functional characterization of *LePT4*: A phosphate transporter in tomato with mycorrhiza-enhanced expression. *Journal of Experimental Botany*. **58**: 2491-2501.
- Xu, X., Chen, C., Fan, B. y Chen, Z. (2006)** Physical and Functional Interactions between Pathogen-Induced *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40, and WRKY60 Transcription Factors. *Plant Cell*. **18**: 1310-1326.
- Yan, Y., Stolz, S., Chetelat, A., Reymond, P., Pagni, M., Dubugnon, L. y Farmer, E.E. (2007)** A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell*. **19**: 2470-2483.

- Yanagi, K., Sugimoto, K. y Matsui, K. (2011)** Oxylin-specific cytochrome P450s (CYP74s) in *Lotus japonicus*: their implications in response to mechanical wounding and nodule formation. *Journal of Plant Interactions*. **6**: 255-264.
- Yao, O., Zhu, H.H. y Chen, J.Z. (2005)** Growth responses and endogenous IAA and iPA changes of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) seedlings induced by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation. *Science Horticulture*. **105**: 145-151.
- Yoshihara, T., Omer, E-L.A., Koshino, H., Sakamura, S., Kikuta, Y. y Koda, Y. (1989)** Structure of a tuber-inducing stimulus from potato leaves (*Solanum tuberosum* L.). *Agriculture and Biological Chemistry*. **53**: 2835-2837.
- Yu, T., Egger, K.N. y Peterson, R.L. (2001)** Ectendomycorrhizal associations - characteristics and functions. *Mycorrhiza*. **11**: 167-177.
- Zhang, N., Venkateshwaran, M., Boersma, M., Harms, A., Howes-Podoll, M., den Os, D., Ané, J-M. y Sussman, M.R. (2012)** Metabolomic profiling reveals suppression of oxylin biosynthesis during the early stages of legume-rhizobia symbiosis. *FEBS Letters*. **586**: 3150-3158.
- Zhang, J., Subramanian, S., Zhang, Y. y Yu, O. (2007)** Flavone synthases from *Medicago truncatula* are flavanone-2-hydroxylases and are important for nodulation. *Plant Physiology*. **144**: 741-751.
- Zolman, B.K., Silva, I.D. y Bartel, B. (2001)** The *Arabidopsis pxa1* mutant is defective in an ATP-binding cassette transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid β -oxidation. *Plant Physiology*. **127**: 1266-1278.
- Zsögön, A., Lambais, M.R., Benedito, V.A., Vargas de Oliverira Figuera, A. y Pereira Peres, L.E. (2008)** Reduced arbuscular mycorrhizal colonization in tomato ethylene mutants. *Science Agriculture (Piracicaba, Brazilian)*. **65**: 259-267.