

Estudio sobre la participación y función de
moléculas señal en la regulación de la
simbiosis Micorriza Arbuscular



eeZ CSIC

Granada 2008

Tesis Doctoral

María José Herrera Medina



**Universidad de Granada
Facultad de Ciencias
Tesis Doctoral**

**ESTUDIO SOBRE LA PARTICIPACIÓN Y FUNCIÓN DE
MOLÉCULAS SEÑAL EN LA REGULACIÓN DE LA
SIMBIOSIS MICORRIZA ARBUSCULAR**

María José Herrera Medina

2008

**ESTUDIO SOBRE LA PARTICIPACIÓN Y FUNCIÓN DE
MOLÉCULAS SEÑAL EN LA REGULACIÓN DE LA
SIMBIOSIS MICORRIZA ARBUSCULAR**

Memoria que presenta la Licenciada en Ciencias Biológicas

María José Herrera Medina
para aspirar al grado de Doctor

Fdo: María José Herrera Medina

VºBº

Los directores

Fdo: Dº José Manuel García Garrido
Doctor en Ciencias Biológicas,
Investigador científico del CSIC

Fdo: Dº Juan Antonio Ocampo Bote
Doctor en Ciencias Biológicas,
Profesor de investigación del CSIC

Universidad de Granada 2008

El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Grupo de 'Microorganismos Rizosféricos que Promueven el Crecimiento y Desarrollo Vegetal', del 'Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos' de la Estación Experimental de Zaidín, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, con ayuda de una beca del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia, y a la financiación de los proyectos de investigación: MCyT-BFI2001-1678 y MEC-AGL2005-0639. Durante el período de disfrute de dicha beca se realizó una estancia breve en el Instituto de Horticultural Sciences, de la Universidad de Florida (USA), bajo la supervisión del doctor Harry Klee. Parte de los resultados presentados en esta Tesis doctoral se han publicado en los siguientes artículos científicos:

- **Herrera-Medina, M.J.**, Gagnon, H., Piché, Y., Ocampo, J.A., García-Garrido, J.M., y Vierheilig, H. (2003) Root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi is affected by the salicylic acid content of the plant. *Plant Science*. 164: 993-998
- **Herrera-Medina, M.J.**, Steinkellner, S., Vierheilig, H., Ocampo Bote, 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.J., 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*. (aceptado).

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

- X Reunión Nacional de Fijación del Nitrógeno (Granada, Junio de 2004). Tipo de participación: Póster.
- VII Reunión de Biología Molecular de Plantas (Pamplona, Julio de 2006). Tipo de participación: Póster.
- V Internacional Conference on Mycorrhiza (Granada, Julio de 2006). Tipo de participación: Póster.
- V Internacional Conference on Mycorrhiza (Granada, Julio de 2006). Tipo de participación: Ponencia.

*Dedicado a mi Familia,
mi futuro marido
y mis amigas*

*Uno crece cuando se es fuerte por carácter,
sostenido por formación,
sensible por temperamento,
¡Y humano por nacimiento!*

*Uno crece cuando enfrenta el invierno aunque pierda las hojas,
recoge flores aunque tengan espinas y
marca camino aunque se levante el polvo.*

*Uno crece cuando se es capaz de afianzarse con residuos de ilusiones,
capaz de perfumarse, con residuos de flores,
¡Y de encenderse con residuos de amor!*

...

Entonces...

Uno Crece

Susana Carizza

AGRADECIMIENTOS:

Cuando comencé este trabajo jamás imaginé su final tal y como es hoy día. Siento que he recorrido ya un largo camino en el que he aprendido mucho y esto se lo debo a bastante gente, y aunque en estas líneas puede que se me escape alguien, guardo gratos recuerdos de todas las personas que he conocido durante mi periodo de investigación y a todas ellas les doy las gracias.

En primer lugar, quiero agradecerle a Juan Antonio Ocampo la confianza depositada en mí desde el principio, y su ayuda y apoyo para entrar en su grupo de trabajo y para conseguir mi beca. Creo que es una de las personas más creativas de la FEZ y que tiene un gran espíritu investigador.

En segundo lugar, gracias a José Manuel García, con quién he compartido la mayor parte de este recorrido. Su rectitud y tesón han sido un gran ejemplo para mi persona y para mi trabajo. Él es uno de los pilares principales de esta tesis.

Gracias a la gran participación de Maribel y Nuria en el trabajo de esta tesis, y a su apoyo en los malos momentos. Por supuesto, no me olvidaré de las demás chicas del laboratorio: Julia, cariñosa y servicial, que llena el laboratorio; Inma García, la jefa mas enrollada; Y Mari Ángeles, por su simpatía y comprensión. Por supuesto, gracias también a los chicos: Rafita y Narciso, porque entre todos hemos formado un gran equipo.

Gracias a l@s compañer@s de doctorado y fatigas, que también me han aconsejado y ayudado en numerosas ocasiones, y gracias por las risas compartidas. Gracias a los más veteranos: Eli, Matín, Ana Leon, Estefanía, Cesar, Mohamed, Rosy, e Inma; y a las más jóvenes: Mercedes y Rosario. Gracias también a todos los becarios de la FEZ por la buena compañía y apoyo mostrados.

Mi querida Gloria se merece una mención especial, ya que es uno de los mejores regalos que me ha dado esta tesis. Ella ha sido una gran compañera para los buenos y los malos momentos, la mejor. No tengo palabras para agradecerle las horas que me ha escuchado, su apoyo incondicional y la fuerza que me ha dado. Sabes que desde aquí te mando mi mejor energía y los mejores deseos.

Mil agradecimientos a Nicolás Toro y a todo su equipo: José Ignacio, Francisco, Antonio, Lola, Rafa, Sensi, Tita, Pablo... No solo porque sin su ayuda material y personal no habría podido realizar gran parte de mi trabajo, sino también por ser tan buenos compañeros, y los mejores vecinos.

Gracias a Eulogio por el cromatógrafo de gases y a Pilar, Andrés, María José Soto y José Olivares por el HPLC y el speed-Vacuum, ya que se hicieron herramientas imprescindibles para este trabajo.

Gracias a la gente de Florida por adentrarme en el intrigante mundo del etileno: al jefeazo Harry Klee, a Ana por acompañarme siempre, a Michele por su dulzura, A Chiwa porque es genial y una gran persona (además de un admirable aikidoka), a Melisa por su gran disponibilidad, a Víctor por la buena compañía... Sois muchos e inolvidables. Por supuesto, no me dejaré atrás a mis amigas y flatmate Beatriz y Daisy, y al resto de la pandilla, ellas me enseñaron lo mejor de Florida al acogerme en sus vidas.

Gracias también a José María Arias que fue el culpable de que conociese a mi grupo de trabajo, y a Carmen Lluçh Plá porque siempre ha estado ahí cuando se le ha solicitado ayuda, y su esfuerzo ha dado muy buen fruto.

Como el esfuerzo y trabajo invertido en esta investigación no solo se han realizado en el laboratorio, sino que le he calentado la cabeza a mi gente fuera de él, gracias a lo cual he podido realizar este proyecto, le debo mucho a mucha gente y ellos también forman parte de este trabajo:

Empezaré por mis padres ya que, aunque suene subjetivo, son los mejores padres del mundo. Su sacrificio y amor por sus hijas no tienen precio, no se si algún día podré llegar a devolvérselo. Por lo pronto este trabajo está especialmente dedicado a ellos. Hoy, a mis 29 años, puedo decir más convencida que nunca, que son mis ídolos, y un ejemplo a seguir.

Seguiré por mis hermanas, mis inseparables amores Mati y Loli. No suelo decirlo, pero cada día aprendo más de ellas. Además, su cariño y apoyo me han dado fuerzas para terminar este proyecto junto a innumerables más. Significáis mucho para mí.

Mis chicas se merecen un hueco especial: Rosa, Inma, y Manolí. Conoceros me hace sentirme muy afortunada, porque sois las mejores amigas y siempre habéis estado ahí para escucharme (o aguantarme) y para apoyarme. Todo este cariño no tiene precio, pero yo voy a regalaros parte de esta tesis (porque aunque sea un 'libraco', está hecho con amor).

Gracias por supuesto a mis primas Ángela y Nuria, porque no solo son primas, sino grandes y fieles amigas.

Gracias también a mis compis y amigos de aikido por ayudarme a renovar energías y a recargar las pilas (Humberto, Jose y Carina, Juanjo, Oscar, Wu Fan, Cristian, Miguel y Alba, Africa y Jose, Javier, Manolo, Antonio, Víctor, Jesús...). No puedo nombraros a todos porque sois un montón, y entre todos le dais calidad a esta pasión y la hacéis cada vez mejor, así que gracias a todos.

No me voy a olvidar de mis nuevos compañeros de trabajo: todos los profes que me ayudan a ser mejor persona, y me animan para que complete este trabajo; y todos mis chicos, porque comparten conmigo sus sueños e ilusiones, y me ayudan a recordar los míos.

Para terminar, también le dedico este trabajo a mi gran ilusión y mi futuro marido, Juan, el cual ha mostrado ser una persona muy paciente aguantando mis bajones emocionales y esperándome cuando lo necesito (¿Te suena: cuando acabe la tesis...?). Gracias porque le has devuelto color a mi vida, y gracias por seguir haciéndolo cada día.



Índice

I. INTERES Y OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	3
II. INTRODUCCIÓN.....	9
1. LAS MICORRIZAS.....	9
1.1. Clasificación de las micorrizas.....	9
2. MICORRIZAS ARBUSCULARES.....	12
2.1. Clasificación de los hongos formadores de la micorriza arbuscular.....	14
2.2. Ecología de las micorrizas arbusculares.....	17
2.3. Morfología y formación de la simbiosis micorriza arbuscular.....	19
2.3.1. Fase presimbiótica.....	21
2.3.2. Fase simbiótica.....	24
2.4. Fisiología de la simbiosis micorriza arbuscular.....	30
2.4.1. Intercambio de nutrientes.....	30
2.5. Dialogo entre el hongo micorrícico y la planta.	34
2.5.1. Señalización en la micorrización.....	35
2.5.1.1. Fase presimbiótica.....	35
2.5.1.2. Fase simbiótica.....	38
2.5.2. Autoregulación de la micorrización.....	42
2.5.2.1. Participación hormonal en la regulación de la micorrización...42	
2.5.2.2. Participación del fósforo en la regulación de la micorrización...50	
2.5.2.3. Inducción/supresión de la respuesta de defensa en plantas micorrizadas.....	51
2.6. Bioprotección asociada a la simbiosis micorriza arbuscular.....	55
3. PARTICIPACIÓN DE LAS FITOHORMONAS Y OTRAS MOLÉCULAS SEÑAL EN INTERACCIONES PLANTA-MICROORGANISMO.....	59
3.1. Señalización hormonal en otras interacciones simbióticas mutualistas con plantas.....	60
3.1.1. El ácido salicílico.....	60
3.1.2. El ácido jasmónico.....	63
3.1.3. El etileno.....	64
3.1.4. El ácido abscísico.....	66
3.2. Señalización hormonal en interacciones planta-patógeno.....	68
3.2.1. El ácido salicílico.....	68

3.2.2. El ácido jasmónico.....	70
3.2.3. El etileno.....	72
3.2.4. El ácido abscísico.....	76
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	81
1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	81
1.1. Variedades de plantas.....	81
1.2. Cultivo de plantas.....	84
1.2.1. Esterilización y germinación de las semillas.....	84
1.2.1.1. Selección de semillas de los mutantes <i>jai1/jai1</i>	85
1.2.2. Sustrato de cultivo de plantas.....	85
1.2.3. Condiciones del cultivo.....	86
1.2.4. Tratamientos específicos de los cultivos.....	87
1.2.5. Cultivos hidropónicos.....	89
2. CULTIVO CON EL HONGO MICORRÍCIDO.....	87
2.1. Inóculo de <i>Glomus intraradices</i>	90
2.2. Inóculo de <i>Glomus mosseae</i>	92
2.3. Tinción y determinación de la colonización del hongo micorrízico.....	92
2.3.1. Tinción del hongo en raíces micorrizadas con azul-tripán.....	92
2.3.2. Cuantificación del porcentaje de raíz micorrizada y puntos de infección.....	93
2.3.3. Determinación de frecuencia e intensidad de micorrización y de arbúsculos.....	93
2.3.4. Determinación del estado de desarrollo de los arbúsculos.....	94
2.3.5. Tinción y cuantificación de la actividad succinato deshidrogenasa (SDH).....	95
2.4. Determinación de la eficiencia de la micorrización.....	96
3. DETERMINACIONES DE NIVELES HORMONALES EN RAÍCES.....	97
3.1. Extracción de ácido salicílico libre y total.....	97
3.2. Cuantificación de ácido salicílico.....	98
3.3. Extracción y cuantificación de la producción de etileno en raíces.....	99
4. DETERMINACIONES DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	100
4.1. Estudio de la expresión génica por RT-PCR semicuantitativa.....	100
4.1.1. Extracción de ARN de raíces.....	100
4.1.2. Cuantificación de ARN, ADN y oligonucleótidos.....	101

4.1.3. Tratamiento de ARN con desoxiribonucleasas (DNAsa I).....	101
4.1.4. Transcripción inversa de ARNm (RT).....	103
4.1.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	104
4.1.6. Cebadores utilizados y diseño de los mismos.....	105
4.1.7. Electroforesis en gel de agarosa.....	106
4.1.8. Southern blot.....	107
4.1.8.1. Transferencia de ADN a una membrana de nylon.....	108
4.1.8.2. Marcaje de sondas de ADN con dUTP-Digoxigenina.....	110
4.1.8.3. Hibridación con la sonda y lavados.....	110
4.1.8.4. Detección de la sonda sobre la membrana de nylon.....	111
4.2. Estudio de la expresión génica por Northern blot.....	112
4.2.1. Electroforesis de ARN en condiciones desnaturalizantes.....	112
4.2.2. Transferencia a la membrana de nylon.....	114
4.2.3. Marcaje radioactivo de sondas de ADN.....	114
4.2.4. Hibridación de la sonda radioactiva y lavados.....	115
4.2.5. Detección de la sonda.....	116
5. CLONACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN.....	116
5.1. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	117
5.2. Ligación de fragmentos amplificados por PCR en vectores de clonación...117	
5.3. Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	117
5.4. Transformación de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	117
5.5. Purificación de ADN plasmídico.....	119
5.6. Selección de clones mediante digestión dirigida de ADN.....	119
5.7. Secuenciación.....	120
5.8. Identificación de secuencias.....	120
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	120
IV. RESULTADOS.....	123
1. PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO SALICÍLICO (SA) EN EL PROCESO DE MICORRIZACIÓN, E IMPLICACIÓN EN LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA DE DEFENSA DURANTE LA MISMA.....	123
1.1. Participación del SA en el proceso de la micorrización.....	123

1.1.1. Micorrización en plantas transgénicas con incrementos en la producción de SA.....	123
1.1.2. Micorrización en plantas transgénicas con deficiencias en la acumulación de SA.....	124
1.2. Implicación del SA en la inducción de respuestas de defensa durante la micorrización.....	129
1.2.1. Expresión de genes de defensa inducibles por SA durante la micorrización.....	129
1.2.2. Relación entre la mutación de genes simbióticos, y la expresión de genes de defensa inducibles por SA.....	134
1.2.3. Evolución de la micorrización en plantas que sobre-expresan proteínas relacionadas con la defensa.....	136
2. PARTICIPACIÓN DEL ETILENO EN EL PROCESO DE MICORRIZACIÓN.....	208
2.1. Efectos sobre la micorrización de la alteración cuantitativa de los niveles de etileno en la planta.....	142
2.1.1. Efectos sobre la micorrización debidos a la aplicación exógena de etileno	142
2.1.2. Micorrización en plantas transgénicas alteradas en la síntesis de etileno.....	145
2.2. Efectos sobre la micorrización de la alteración en la percepción del etileno..	148
2.2.1. Efectos sobre la micorrización debidos a la aplicación exógena de STS.....	148
2.2.2. Micorrización en plantas transgénicas alteradas en la percepción de etileno.....	151
2.2.2.1. Micorrización en plantas insensibles al etileno	151
2.2.2.2. Micorrización en plantas más sensibles al etileno.....	152
3. PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO JASMÓNICO (JA) EN EL PROCESO DE MICORRIZACIÓN.....	213
3.1. Efectos sobre la micorrización debidos a la aplicación de MeJA.....	158
3.1.1. Efectos sistémicos sobre la micorrización de la raíz debidos a la aplicación de MeJA en la parte aérea de las plantas.....	158

3.1.2. Efectos sobre la micorrización debidos a la aplicación de MeJA en la rizosfera.....	160
3.1.3. Comparación de los efectos sobre la micorrización tras la aplicación de MeJA sobre la parte aérea o la rizosfera.....	162
3.2. Micorrización en plantas transgénicas alteradas en la percepción de JA.....	165
4. PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO ABCÍSCICO (ABA) EN EL PROCESO DE MICORRIZACIÓN.....	169
4.1. Micorrización en plantas transgénicas alteradas en la síntesis de ABA.....	169
4.2. Efectos sobre la micorrización debidos a la aplicación exógena de ABA...172	
4.2.1. Efectos comparados de la aplicación de ABA sobre plantas silvestres y <i>Sitiens</i>	172
4.2.2. Efectos sobre la micorrización de plantas <i>Sitiens</i> debidos a la aplicación de concentraciones crecientes de ABA.....	175
5. INTERACCIÓN ENTRE LAS DISTINTAS MOLÉCULAS SEÑAL DURANTE EL PROCESO DE REGULACIÓN DE LA MICORRIZACIÓN.....	178
5.1. Interacción entre el SA y fitohormonas	178
5.1.1. Interacción entre el SA y el etileno en el proceso de regulación de la micorrización.....	178
5.1.2. Interacción entre el SA y el JA en el proceso de regulación de la micorrización.....	179
5.1.3. Análisis del contenido de SA en raíces de plantas micorrizadas y alteradas o no en la síntesis de ABA.....	181
5.2. Interacción entre el etileno y otras fitohormonas.....	182
5.2.1. Interacción entre el etileno y el JA en el proceso de regulación de la micorrización	182
5.2.1.1. Síntesis de etileno en plantas tratadas con MeJA.....	183
5.2.1.2. Síntesis de etileno en plantas mutantes insensibles al JA.....	185
5.2.1.3. Efectos de la aplicación exógena del etileno sobre plantas mutantes de tomate alteradas en la sensibilidad al JA.....	185
5.2.2. Interacción entre el etileno y el ABA en el proceso de regulación de la micorrización.....	186
5.2.2.1. Síntesis de etileno en plantas alteradas en la síntesis de ABA...187	

5.2.2.2. Efectos sobre la micorrización debidos a la inhibición de la respuesta a etileno en plantas alteradas en la biosíntesis de ABA.....	188
6. PARTICIPACIÓN DEL SA Y EL ETILENO EN LA REGULACIÓN DE LA MICORRIZACIÓN MEDIADA POR FOSFORO.....	190
6.1. Interacción entre el fósforo (P) y el SA en la regulación de la micorrización.....	190
6.1.1. Acción del P en plantas transgénicas con alta producción de SA.....	190
6.1.2. Acción del P en plantas transgénicas con deficiencias en la acumulación de SA.....	192
6.2. Interacción entre el fósforo (P) y el etileno en la regulación de la micorrización.....	194
V. DISCUSIÓN.....	199
1. PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO SALICÍLICO (SA) EN EL PROCESO DE MICORRIZACIÓN, E IMPLICACIÓN EN LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA DE DEFENSA DE LA PLANTA DURANTE LA MISMA.....	202
2. PARTICIPACIÓN DEL ETILENO EN EL PROCESO DE MICORRIZACIÓN.....	208
3. PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO JASMÓNICO (JA) EN EL PROCESO DE MICORRIZACIÓN.....	213
4. PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO ABCSÍLICO (ABA) EN EL PROCESO DE MICORRIZACIÓN.....	219
5. INTERACCIÓN ENTRE LAS DISTINTAS MOLÉCULAS SEÑAL DURANTE EL PROCESO DE REGULACIÓN DELA MICORRIZACIÓN.....	223
VI. CONCLUSIONES.....	233
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	237



I. Interés y objetivos del trabajo

I. INTERÉS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

Uno de los principales retos de nuestra sociedad es la transformación del sistema de desarrollo actual en uno más sostenible y compatible con el medio ambiente. Un factor clave dentro de este sistema ideal de desarrollo social es la agricultura, necesitada también de un profundo cambio hacia un sistema productivo más acorde con el concepto de desarrollo sostenible. Actualmente el sistema de cultivo que prima en nuestros campos es de tipo intensivo, y utiliza grandes cantidades de abonos químicos y pesticidas, los cuales a su vez afectan al equilibrio tanto de los ecosistemas de los que forman parte, como de ecosistemas alejados. Esto es debido principalmente al transporte de los compuestos químicos disueltos en aguas superficiales o subterráneas, provocando, por ejemplo, la eutrofización de aguas cercanas. Una forma de evitar tal exceso de componentes químicos en la agricultura es la utilización de microorganismos que sustituyan los efectos positivos de tales agroquímicos, facilitando por ejemplo, la absorción de nutrientes por las plantas cultivadas, haciéndolas más competitivas respecto a otras plantas oportunistas e incrementando su resistencia a enfermedades o a estreses abióticos, como el estrés hídrico o el salino.

En este sentido, los hongos micorrízico-arbusculares son uno de los microorganismos simbiotes que aporta una mayor diversidad de beneficios, sino el que mas, a la planta con la que se asocia. Entre otros beneficios, la simbiosis micorrízico arbuscular (MA) mejora el estado nutricional de la planta, haciéndola más vigorosa y mejor competidora respecto al resto de las plantas de su entorno. Además, se ha demostrado que esta asociación hace a la planta hospedadora más resistente a estreses de tipo abiótico, como la sequía o la contaminación por metales pesados, y de tipo biótico, como el ataque de diferentes organismos patógenos (hongos, nematodos y bacterias). Estas características convierten a las MA en una potente alternativa al uso de numerosos compuestos agroquímicos, lo cual ayudaría a la transformación del sistema de cultivo intensivo en otro más sostenible y satisfactoriamente productivo.

Las MA también parecen tener una gran capacidad como estabilizadoras de suelos degradados, lo cual ha despertado el interés de muchos ecólogos, que a su vez están demostrando que juegan un importante papel como favorecedoras de los procesos de reforestación y estabilización de ecosistemas. Estos datos, junto con su potencial aplicabilidad en la agricultura, han convertido a las MA en uno de los objetivos primordiales de numerosas investigaciones dentro del área temática de la Biología Vegetal. Dichas investigaciones han estado encaminadas a la comprobación

y comprensión del efecto que tienen en las plantas hospedadoras y en el suelo en el que crecen. En este sentido, en las últimas décadas se ha avanzado significativamente en los conocimientos sobre su morfología y filogenia, así como en el estudio y caracterización de los efectos nutricionales y de incremento de tolerancia a estreses ambientales que tiene el establecimiento de la simbiosis sobre las plantas hospedadoras. Sin embargo, la información que se tiene sobre la fisiología de la simbiosis presenta demasiadas lagunas, y aún son menores los conocimientos que se tienen sobre la fisiología del hongo micorrícico, siendo estos conocimientos básicos para intentar mejorar o controlar los efectos positivos del hongo, mediante una correcta manipulación de la asociación.

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

En este sentido, son muchos los efectos descritos por hormonas vegetales u otras moléculas señal en interacciones patogénicas y mutualistas de microorganismos con plantas, destacando los debidos al etileno (ET), ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA; considerado como hormona vegetal por numerosos autores). Así, en ciertas respuestas de la planta en interacciones con microorganismos patógenos existe una coordinación de señales hormonales (principalmente ET, JA, SA) que pueden afectar la compatibilidad de la asociación, existiendo un papel diferencial de estas señales en función del microorganismo. Además, dado que el efecto bioprotector de las MA sobre la planta supone un importante beneficio para estas a nivel agrónomo y ecológico, y ya que estas moléculas están fuertemente relacionadas con diferentes procesos de defensa de la planta ante patógenos, posiblemente estas moléculas también formen parte del mecanismo de acción del efecto bioprotector que tiene la micorrización en plantas.

El objetivo general de la investigación, presentada en esta tesis, es avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la regulación y respuesta de la planta a la infección por hongos formadores de micorrizas arbusculares, con especial interés en la función que tienen las hormonas vegetales y el SA durante la formación y el desarrollo de la simbiosis MA. Con el fin de conseguir este objetivo general se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- Determinar la participación del ácido salicílico (SA) en el proceso de micorrización, y su implicación en la inducción de la respuesta de defensa de la planta.
- Determinar la participación de etileno, ácido jasmónico (JA) y ácido abscísico (ABA) en el proceso de micorrización.
- Determinar la posible interacción entre las distintas moléculas señal, SA, etileno, JA y ABA durante la regulación de la micorrización.
- Determinar la posible relación entre la regulación de la micorrización mediada por los niveles de fósforo y la regulación mediada por etileno y SA.



II. Introducción

II. INTRODUCCIÓN

1. LAS MICORRIZAS

El desarrollo de las plantas se ve afectado por numerosas interacciones de tipo biótico y abiótico con el medio en el que viven, y la mayoría de estas interacciones tiene lugar en la rizosfera, que es la parte de suelo inmediata a las raíces, e influenciada por la fisiología y los productos del metabolismo de la raíz. En la rizosfera la densidad de organismos es mayor que en resto del suelo, y estos interactúan con la planta ocasionándole tanto perjuicios, en el caso de hongos, nematodos, bacterias o virus patógenos de plantas, como beneficios. Existe una gran variedad de microorganismos rizosféricos que dan lugar a relaciones beneficiosas para las plantas, desde microorganismos que inhiben el desarrollo de patógenos, pasando por los inductores de la resistencia sistémica en plantas (ISR por las siglas de su nombre en inglés, 'Induced Systemic Resistance') (Van Loon y col, 1998), hasta aquellos que favorecen la nutrición y crecimiento de las plantas, como las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPRs por las siglas de su nombre en inglés, 'Plant Grow Promoting Rhizobacterias'). Entre estos microorganismos tienen especial importancia los implicados en la asociación simbiótica mutualista denominada micorriza, debido a su ubicuidad y a los numerosos beneficios que supone para la planta, mejorando así su nutrición mineral e incrementando su resistencia a estreses bióticos y abióticos (Smith y Read, 1997).

Las micorrizas se definieron desde un principio como la asociación entre hongos del suelo, referido con el termino griego '*mikos*', y raíces de plantas superiores, referido con el termino griego '*rriza*' (Frank, 1885). Hoy sabemos que mas del 97% de las plantas superiores se asocian con algún tipo de hongo micorrícico, y en la mayoría de los casos, el principal órgano de captación de agua y nutrientes es el hongo (Harley y Smith, 1983; Trappe, 1987; Allen, 1996). Las asociaciones micorrícicas llegan a desarrollarse en prácticamente todos los ecosistemas suelo-planta, incluso en condiciones altamente adversas (Mosse y col, 1981; Hayman, 1982).

1.1. Clasificación de las micorrizas

El termino micorrizas engloba a muchos y muy diversos tipos de asociaciones entre hongos y plantas. Desde un principio se clasificaron a las micorrizas en ectomicorrizas y endomicorrizas (Smith y Read, 1997). Las **ectomicorrizas** se caracterizan por la organización de sus hifas alrededor de la raíz, formando un manto y una compleja red, llamada red de Hartig, con estructuras de unión a la corteza de la raíz. Ambas estructuras se desarrollan cubriendo gran parte de la superficie de la raíz,

y a partir de ella el hongo se expande por la superficie del suelo formando el micelio extra-radical (Figura II.1). Por el contrario, en las **endomicorrizas** parte de las estructuras del hongo se desarrollan intracelularmente en el interior de la raíz. En este grupo se incluye una mayor variedad de especies fúngicas y plantas arbóreas y herbáceas. Actualmente este grupo se divide en seis subgrupos, atendiendo a sus diferencias morfológicas y a los distintos taxones a los que pertenecen las plantas y los hongos que dan lugar a la simbiosis (Figura II.1). Estos grupos son:

- * **Ectendomicorrizas:** Formadas por un número limitado de hongos ascomicetes y plantas coníferas de los géneros *Pinus* y *Larix* (Yu y col, 2001). Las hifas del hongo se desarrollan formando un manto, una red de Hartig, y un micelio extracelular al igual que las ectomicorrizas, pero a diferencia de las estas, el micelio también crece intracelularmente en las células epidérmicas y la zona cortical de la raíz.
- * **Micorrizas Arbusculares:** Son las de mayor distribución entre las plantas, interviniendo angiospermas, gimnospermas, helechos y briofitos. Los hongos que participan en esta simbiosis pertenecen a la división *Glomeromycota* (Schüßler y col, 2001). Existen algunas variaciones estructurales dentro de este grupo, pero la mayoría de las micorrizas arbusculares están caracterizadas por la presencia de hifas intraradicales (Inter e intracelulares), arbusculos (Formados por la ramificación dicotómica de las hifas dentro de las células vegetales), y micelio extraradical donde se forman las esporas. En el siguiente apartado se describen en mayor profundidad.
- * **Micorrizas ericoides:** En esta simbiosis intervienen varias familias de plantas del orden *Ericales*, todas formadoras de pelos radicales, que se caracterizan por la falta de crecimiento secundario y por estar compuestas por tan solo el haz vascular, una o dos capas de células corticales y una capa más de células epidérmicas. La simbiosis se produce con algunos hongos de la división *Ascomycota* que desarrollan un micelio extraradical e intraradical solo entre las células epidérmicas, donde crecen intracelularmente formando un complejo de hifas ramificadas.
- * **Micorrizas arbutoides:** Las plantas que dan lugar a esta asociación pertenecen a las familias *Ericaceae* y *Pyrolaceae* del orden *Ericales*. Los hongos formadores de arbutoides son prácticamente los mismos que los formadores de ectomicorrizas, y la simbiosis recuerda a las ectendomicorrizas pero con algunas diferencias estructurales, por esta razón y por estar formada por plantas diferentes se consideran como un grupo aparte (Peterson y col, 2004).
- * **Micorrizas monotropoides:** Participan varios géneros pertenecientes a la familia *Monotropaceae* del orden *Ericales* y hongos formadores de ectomicorrizas. Estructuralmente es parecida a las ectendomicorrizas pero con una estructura única

de este grupo llamada gancho fúngico, consistente en una hifa corta que penetra en las células epidérmicas (Duddridge y Read, 1982). Otra característica especial de este grupo es que la planta es heterotrófica e incapaz de sintetizar clorofila para realizar la fotosíntesis, con lo cual necesita que el hongo le proporcione los nutrientes carbonados que obtiene de su asociación con otras plantas cercanas. Por esta razón se ha sugerido llamar a esta asociación mico-heterotrófica (Leake, 1994).

- * **Micorrizas orquideoides:** Las plantas participantes en la asociación pertenecen todas a la familia *Orchidaceae*, y todas ellas necesitan establecer una asociación previa con el hongo para el establecimiento y la germinación de sus semillas (Peterson y col, 1998; Rasmussen, 2002). Su principal característica estructural es la formación de un ovillo de hifas dentro de las células vegetales.

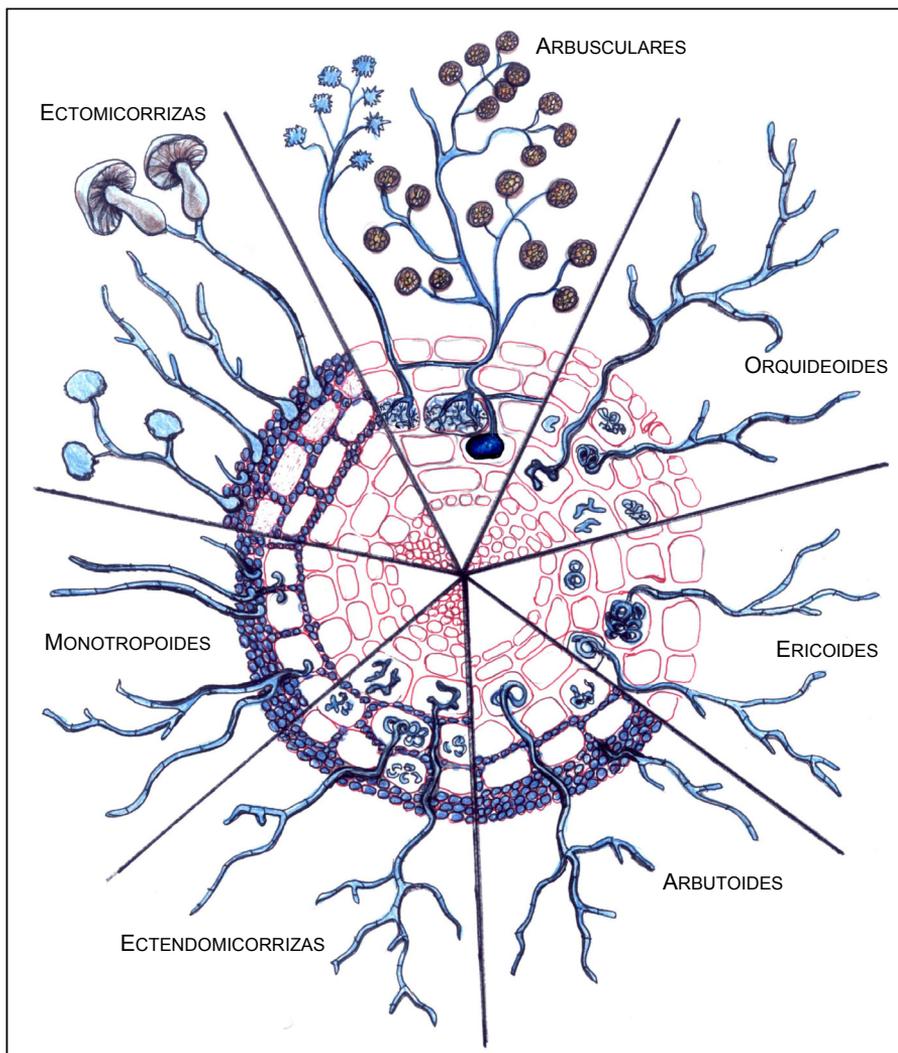


Figura II.1: Esquema de los siete tipos de micorrizas. Por Medina-Villena, M.

2. MICORRIZAS ARBUSCULARES

Las micorrizas arbusculares (MA) son un grupo de endomicorrizas cuya principal característica es la formación de estructuras fúngicas intraradicales llamadas arbusculos (Gallaud, 1905), y en muchas ocasiones forman también vesículas, por lo que originalmente fueron llamadas micorrizas vesículo-arbusculares (VAM por sus siglas en inglés) (Smith y Read, 1997). Sin embargo, aunque la mayoría de las MA forman vesículas, este no es un rasgo universal en el grupo, por lo que generalmente se les llama micorrizas arbusculares, a pesar de que en algunos casos el hongo no llega a formar arbusculos verdaderos (Smith y Smith, 1997). El hongo micorrízico arbuscular además de desarrollar el micelio inter e intracelular, desarrolla un micelio extraradical que es donde se forman las esporas.

Las MA son el grupo de micorrizas de mayor distribución en el reino vegetal, interviniendo más del 80% de las plantas terrestres, incluyendo angiospermas, gimnospermas, y plantas inferiores como helechos y briofitos. Entre los helechos se ha comprobado como la proporción de MA de los eusporangiados es considerablemente mayor que en los leptosporangiados, indicando una tendencia evolutiva a la pérdida de la micorrización (Zhao, 2000). Dentro de los Briofitos no se han encontrado asociaciones micorrízicas entre los de la clase *Briopsida*, pero si entre las clases *Marchantiopsida* y *Anthocerotopsida* (Read y col, 2000). Por último, entre las plantas con semilla son mas del 90% las que forman la simbiosis MA (Kendrick y Berch, 1985; Trappe, 1987), y solo unas pocas especies de angiospermas pertenecientes a las familias *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Chenopodiaceae* y *Urticaceae* no forman parte de esta simbiosis (Vierheilig y col, 1996; Smith y Read, 1997).

Por otro lado, los hongos formadores de la MA (AMF, según las siglas de su nombre en inglés “Arbuscular mycorrhizal fungi”) son simbioses obligados que necesitan el aporte carbonado de la planta hospedadora para su desarrollo (Shachar-Hill y col, 1995; Solaiman y Saito, 1997). Tan solo se han identificado unas 160 especies de hongos formadores de MA (Kirk y col, 2001) pertenecientes a la división *Glomeromycota* (Schüßler y col, 2001), aunque algunos análisis moleculares indican que el número puede ser mucho mayor (Daniell y col, 2001; Vandenkoornhuyse y col, 2002). Frente a la gran variedad de plantas que son micorrizadas, se han identificado pocas especies de AMF, lo cual implica que cada hongo tiene un amplio rango de hospedadores. Aunque la interacción hongo micorrízico arbuscular-planta no es específica, la compatibilidad y funcionalidad de la simbiosis no es la misma para todas las posibles interacciones entre las distintas especies de hongo y planta hospedadora.

La amplia distribución de las micorrizas arbusculares en el reino vegetal se debe en parte a sus inicios ancestrales. Se han encontrado fósiles de estructuras fúngicas y arbusculos en raíces fechados en el Devónico (Remy y col, 1994), e incluso fósiles de esporas de hongos formadores de MA fechados en 460 millones de años de antigüedad, en la época del Ordovicio, (Redecker y col, 2000). Gracias al estudio de estos fósiles y a la datación molecular, se sabe que la aparición de las micorrizas coincide con la de las primeras plantas terrestres, hace 460 millones de años (Redecker y col, 2000), por lo que se propone a los hongos formadores de MA como asistentes de las plantas en la colonización de la tierra (Pirozynski y Malloch, 1975; Simon y col, 1993; Redecker y col, 2000). De aquí podemos deducir que la ubicuidad de las MA en el reino vegetal se debe a que la mayoría de las plantas no han perdido la capacidad de micorrización, lo cual posiblemente sea consecuencia de los beneficios que esta simbiosis supone para la planta hospedadora.

Como ya se ha comentado, las MA generalmente dan lugar a una mejora en el crecimiento y desarrollo de la planta por los numerosos beneficios que conlleva la simbiosis. Principalmente estos beneficios son:

- * Incremento en la capacidad de absorción de nutrientes, debido a que micelio extraradical del hongo se extiende más allá de las raíces aumentando el volumen de suelo accesible, además de que tiene más facilidad de sustracción de nutrientes poco solubles que las raíces. Entre los nutrientes aportados por el hongo a la planta destaca el fósforo, nutriente esencial que suele ser limitante para el desarrollo de la planta (Holford, 1997) ya que generalmente su disponibilidad en el suelo es muy baja (Schachtman y col, 1998; Abel y col, 2002; Pasqualini y col, 2007).
- * La micorrización supone una mayor resistencia a estreses abióticos como el hídrico (Subramanian y col, 1995; Auge y col, 2001; Porcel y Ruiz-Lozano, 2004), salinidad, temperaturas extremas (Aroca y col, 2007; García y Mendoza, 2007) o exceso de metales pesados (Arriagada y col, 2007; Hildebrandt y col, 2007; Ultra y col, 2007; Kapoor y Bhatnagar, 2007).
- * Pueden proporcionar protección a la planta frente a diversos patógenos, como hongos (Newsham y col, 1995; Bodker y col, 1998; Cordier y col, 1998; Slezack y col, 2000), bacterias (García-Garrido y Ocampo, 1988) o nematodos (Vaast y col, 1998; Elsen y col, 2001).
- * También se ha descrito un efecto positivo en la estabilización de la estructura del suelo (Tisdall y Oades, 1979; Miller y Jastrow, 2000), lo cual tiene especial importancia en suelos degradados como las dunas (Clough y Sutton, 1976; Nicolson y Johnston, 1979).

- * La simbiosis hace a la planta hospedadora más competitiva en el medio al mejorar el desarrollo de sus semillas (Pietikainen y Kytoviita, 2007). Además se ha observado una disminución en la capacidad de competencia de plantas no hospedadoras del hongo micorrícico frente a las plantas formadoras de MA (Allen y col, 1989).
- * Existe una transferencia de nutrientes desde restos de plantas inicialmente micorrizadas a nuevas plantas colonizadas a través del hongo micorrícico (Eason y col, 1991), lo cual favorece la regeneración de la materia orgánica de los restos de raíces, y la mejora nutricional de la planta micorrizada.

Con todo esto, podemos considerar a las MA como un elemento clave en la agricultura sostenible (Bethlenfalvay y Linderman, 1992; Schreiner y Bethlenfalvay, 1995; Jeffries y Barea, 2001). Sin embargo, en los sistemas de agricultura tradicional e intensiva resulta tener una menor influencia (Bianciotto y col, 2000) por su degradación debido al uso de métodos como el arado del suelo, el barbecho o la rotación, y a la utilización de fertilizantes inorgánicos, fungicidas, pesticidas y herbicidas (Ocampo, 1980; McGonigle y Miller, 1996; Douds y col, 1997; Mäder y col, 2000). Estas prácticas afectan a la micorrización y reducen la diversidad de los microorganismos rizosféricos, y por lo tanto el rendimiento del cultivo, ya que la actividad de estos microorganismos contribuye a la bioprotección y a mejorar la nutrición de estos cultivos (Mäder y col, 2002). Por otro lado, su uso en viveros e invernaderos supone una importante ventaja, ya que las plántulas micorrizadas poseen mayor capacidad de adaptación y desarrollo en condiciones de campo.

Aparte de su posible aplicación en la agricultura, las MA se han propuesto para la restauración de zonas desérticas (Saito y Marumoto, 2002). En este caso su utilización conlleva más problemas por el modo de aplicación del inóculo del hongo micorrícico (Saito y Marumoto, 2002) y por los efectos de la interacción del inóculo con otros microorganismos beneficiosos para el crecimiento de la planta (Vázquez y col, 2000; Vassilev y col, 2001). Otra aplicación potencial para las MA está en la fitoremediación de suelos contaminados con Zn, Cu o Pb (Wang y col, 2007), así como de As. En este último caso se ha demostrado que es capaz de disminuir la toxicidad del As al transformarlo en formas orgánicas menos tóxicas (Ultra y col, 2007).

2.1. Clasificación de los hongos formadores de la micorriza arbuscular

Tradicionalmente se incluían dentro de la división *Endogonales* (*Zigomicota*) basándose en las similitudes morfológicas de sus esporas con las del género *Endogone*. Pero los AMF no forman zigosporangios (característicos del género *Endogone*) y hasta

el momento no se les ha descrito ningún estado de reproducción sexual como al resto del grupo. El estudio más profundo de sus características morfológicas llevó a Morton y Benny a agrupar a los AMF en un nuevo orden, *Glomerales*, dividido en dos subórdenes y tres familias (Morton y Benny, 1990), manteniendo al grupo en la división *Zigomicota*.

Por las escasas diferencias morfológicas entre las esporas de los AMF, y la dificultad que conlleva el estudio de estos hongos por su condición de simbiote obligado, ha sido necesario recurrir a técnicas moleculares para un estudio más profundo de la taxonomía de los AMF. El análisis filogenético de la subunidad pequeña (SSU por sus siglas en inglés) de ARN ribosómico (ARNr) ha demostrado recientemente un origen monofilético de los AMF e independiente de la división *Zigomicota*. De este modo los AMF se han agrupado en una nueva división denominada *Glomeromycota* (Schüßler y col, 2001) que comparte procedencia con *Ascomycota* y *Basidiomycota* (Figura II.2).

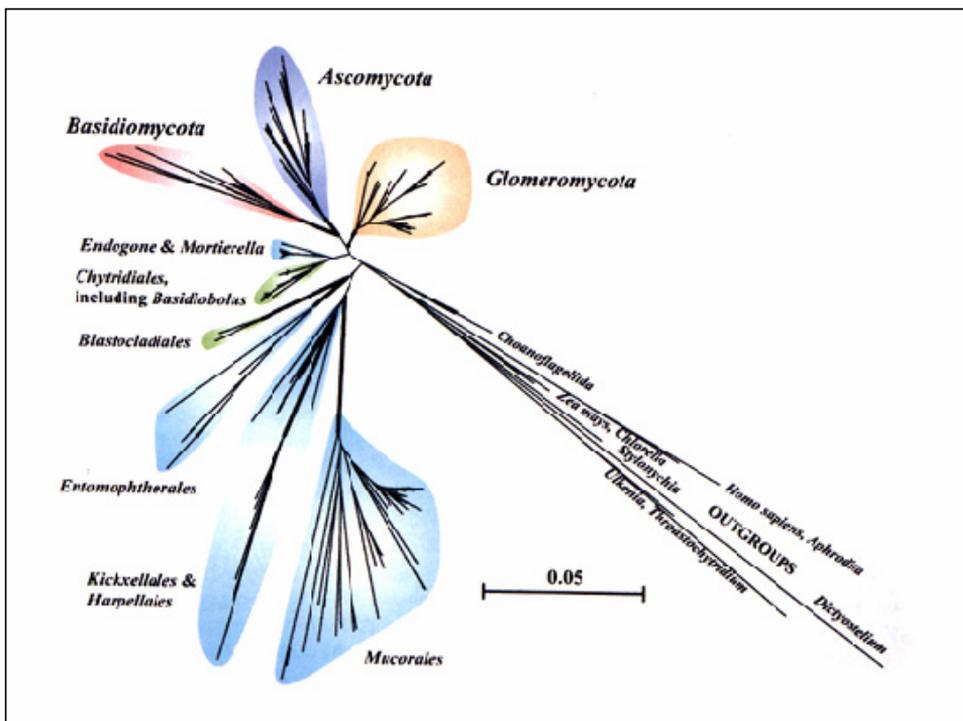


Figura II.2: Árbol filogenético de hongos basada en secuencias de la SSU del ARNr. De Schüßler y col, 2001.

Estos datos han sido confirmados por el análisis filogenético de secuencias aminoacídicas de las proteínas actina y el factor de elongación 1 (Helgason y col, 2003), y de la subunidad larga (LSU por sus siglas en inglés) del ARNr (da Silva y col,

2006). Sin embargo, el estudio de Helgason y col. contradice el origen común de los AMF con *Ascomycota* y *Basidiomycota*, mostrando a la familia *Mortierellales* (perteneciente a la división *Zigomicota*) como taxón hermano de los AMF (Helgason y col, 2003).

Dentro del phylum *Glomeromycota* Schüßler y col. distinguieron nueve familias repartidas en cuatro órdenes (*Paraglomerales*, *Archaeosporales*, *Glomerales* y *Diversisporales*, Figura II.3) (Schüßler y col, 2001). Tres de las actuales familias antiguamente pertenecían al antiguo orden *Glomerales*, y hoy se reparten entre los órdenes *Diversisporales* y *Glomerales* (Morton y Benny, 1990): *Diversisporaceae*, y *Glomeraceae*-Grupo A y *Glomeraceae*-grupo B. Estos resultados se han confirmado con el análisis filogenético de la secuencia de la LSU del ARNr (da Silva y col, 2006).

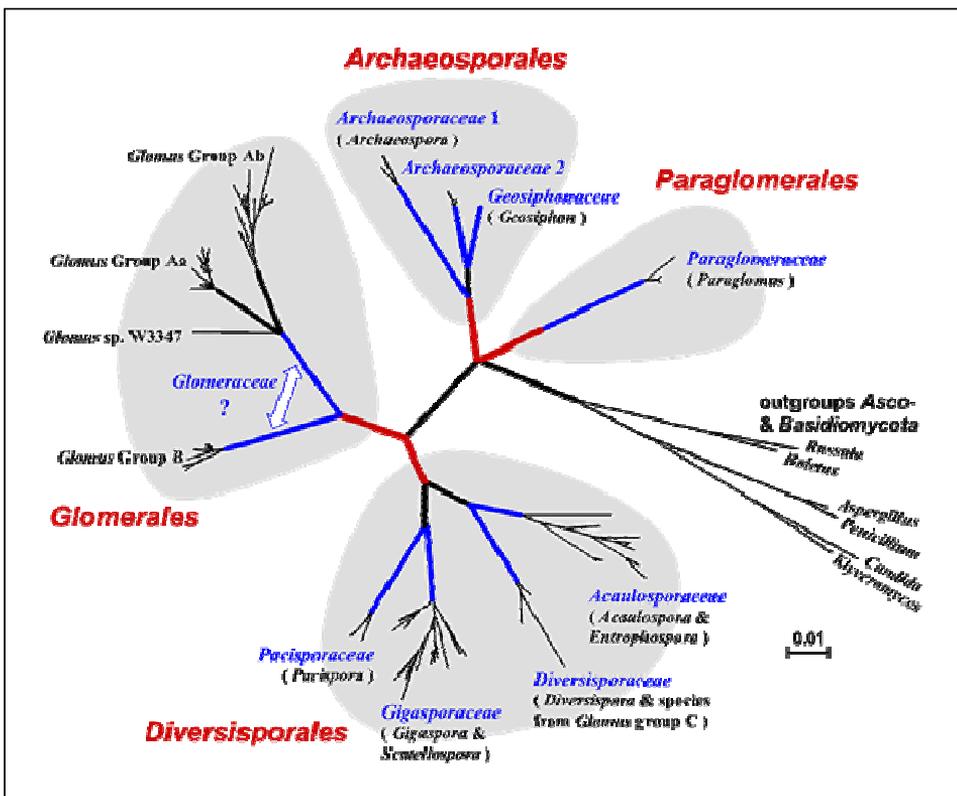


Figura II.3: Árbol filogenético de la división *Glomeromycota* basado en secuencias de la SSU del ARNr. Extraído de Schüßler y col, 2001.

Después de la clasificación establecida por Schüßler y col. ha habido algunos cambios dentro de la división, destacando la separación de *Gerdemannia scintillans* de la familia *Glomeraceae* para formar un nuevo genero y familia, *Pacispora* y *Pacisporaceae* respectivamente, con otras 6 especies de hongos diferenciadas según caracteres morfológicos (Oehl y Sieverding, 2004). Esta nueva familia también se distingue

filogenéticamente por el análisis de la SSU del ARNr y se sitúa dentro del orden *Diversisporales*, compartiendo origen con *Gigasporaceae* (Walker y col, 2004) (Figura II.3).

Aún caben esperar mas cambios dentro de esta clasificación, sobre todo en los taxones mas bajos, ya que sus esporas son multinucleadas y con una alta variabilidad genética, incluso dentro de una misma especie (Sanders y col, 1995; Kuhn y col, 2001; Pawlowska y Taylor, 2004), lo cual hace que la definición de los taxones mas bajos, como la especie o incluso el individuo, sean difícil de determinar (Clapp y col, 2002).

2.2. Ecología de las micorrizas arbusculares

En concordancia con su historia evolutiva, las MA están presentes en prácticamente todos los ecosistemas, desde ambientes acuáticos (Khan, 1993) hasta zonas desérticas (Corkidi y Rincón, 1997; Dalpé y col, 2000), pasando por bosques tropicales (Brundrett y col, 1999; Guadarrama y Álvarez-Sánchez, 1999; Siqueira y Saggin-Júnior, 2001; Zhao y col, 2001; Gaur y Adholeya, 2002) y por suelos salinos (Carvalho y col, 2001; Sengupta y Chaudhuri, 2002) y ricos en yeso (Landwehr y col, 2002). La principal causa de la relativamente escasa presencia de MA en hábitat árticos y antárticos es la falta de vectores adecuados para el transporte de las esporas del hongo micorrícico (Allen, 1996).

En los distintos ecosistemas, los hongos formadores de MA interactúan con las plantas y con otros microorganismos, de modo que se ven afectados por los mismos. De estas interacciones nace el concepto de micorrizosfera, como una ampliación del termino rizosfera en plantas micorrizadas, siendo la micorrizosfera la zona de influencia de las raíces micorrizadas (rizosfera), más la de las hifas extraradicales (hifosfera) (Rambelli, 1973). Debido a la ubicuidad de las micorrizas en los ecosistemas naturales se podría decir que prácticamente todo el suelo pertenece a la micorrizosfera. Entre las numerosas interacciones que se producen en la micorrizosfera, en este capítulo cabe destacar aquellas en las que intervienen los AMF, distinguiendo entre el efecto que las MA ejercen sobre el resto de los microorganismos, y viceversa.

El hongo micorrícico puede afectar a la dinámica de comunidades de bacterias y hongos de la micorrizosfera de forma directa o indirecta. De forma directa puede: 1- suministrar a otros microorganismos moléculas carbonatadas ricas en energía por medio de sus hifas (Andrade y col, 1997); 2- provocar cambios en el pH del suelo; 3- competir con otros microorganismos por el sustrato o por los nutrientes (Ravnskov y col, 1999; Wamberg y col, 2003); 4- liberar exudados que influyan en el desarrollo de ciertos microorganismos (Andrade y col, 1997; Söderberg y col, 2002). Mientras que

de forma indirecta puede provoca cambios en las poblaciones de la micorrizosfera: 1- al cambiar el crecimiento de la planta, por ejemplo puede mejorar la nodulación de la planta al proporcionarle más fósforo a la misma (Puppi y col, 1994); 2- al cambiar la composición y producción de los exudados radicales (Ames y col, 1984; Dixon y col, 1989; Paulitz y Linderman, 1989; Waschkies y col, 1994; Marschner y Crowley, 1996; Marschner y col, 1997; Norman y Hooker, 2000; Burke y col, 2002); 3- cambiando la estructura del suelo, al formar agregados que facilitan el desarrollo de determinadas bacterias, hongos y plantas (Forster y Nicolson, 1981; Schreiner y col, 1997; Andrade y col, 1998).

Por otro lado, el desarrollo del hongo micorrícico puede verse alterado por los microorganismos de su entorno. En este sentido, se han encontrado evidencias de microorganismos que se alimentan de sus hifas o esporas, o bien que inhiben la germinación de sus esporas por fungistasis (Tommerup, 1985), mientras que otros favorecen la germinación y el crecimiento de sus hifas (Azcón-Aguilar y col, 1986; Mayo y col, 1986; Carpenter-Boggs y col, 1995). También existen interacciones sinérgicas de los hongos MA con otros microorganismos que promueven el crecimiento de la planta hospedadora, como son las bacterias fijadoras de nitrógeno libre (Amora-Lazcano y col, 1998), las solubilizadoras de fosfatos (Toro y col, 1998), las PGPR (rhizobacterias promotoras del crecimiento vegetal) (Meyer y Linderman, 1986a), e incluso hongos saprofiticos como los del género *Trichoderma* (Calvet y col, 1993). Todos ellos pueden favorecer el establecimiento o la capacidad de colonización del otro o bien su interacción con la planta, y se les ha denominado ‘Microorganismos auxiliares de la micorrización’ (Deoliveira y Garbaye, 1989).

Curiosamente también se han encontrado endosimbiontes dentro de ciertos hongos micorrícicos. Dentro de las esporas de algunos hongos de la familia *Gigasporaceae* existen bacterias asociadas al hongo micorrícico denominadas BLOs (De sus siglas en inglés: Bacterium-Like Organisms) (Mosse, 1970; Bianciotto y col, 2000). Estas bacterias pertenecientes la mayoría al género *Burkholderia* (Bianciotto y col, 1996; Bianciotto y col, 2000) parecen crecer y reproducirse dentro de las esporas y las hijas de los AMF (Bonfante y col, 1994). Lo mas probable es que den lugar a una simbiosis con el hongo micorrícico, aportando nitrógeno al hongo (Minerdi y col, 1998) y recibiendo a cambio fósforo del mismo (Ruiz-Lozano y Bonfante, 1999).

Por todo esto podemos afirmar que dentro de los ecosistemas las MA tienen una indiscutible influencia en la interacción entre comunidades de microorganismos rizosféricos, pero también influyen de forma importante en la interacción entre comunidades de plantas (Francis y Read, 1994). Una de las causas de esta interacción está en que, aunque las MA no tienen especificidad entre los simbioses participantes

(Smith y Read, 1997), si que existe una preferencia de ciertas especies de hongos por determinadas plantas y viceversa, lo cual favorecerá el desarrollo de unas especies frente a otras. Además la micorrización posiblemente provoque cambios en la producción de exudados radicales que inhiba la germinación de plantas parásitas (Matusova y col, 2005). Por otro lado, entre las MA también hay una amplia diversidad en su función, ya que aunque la gran mayoría de las MA son mutualistas, se han descrito varias plantas no fotosintéticas que reciben sus nutrientes a través del hongo micorrícico (Imhof, 1999; Yamato, 2001) de forma similar a las micorrizas orquideoides (Rasmussen, 2002). En algunos casos este tipo de planta sobrevive parasitando a otras plantas utilizando al hongo micorrícico como un puente transportador de nutrientes entre ambas plantas (Imhof, 1999; Bidartondo y col, 2002). Finalmente el mismo hongo micorrícico puede comportarse como un parásito bajo situaciones especiales (Allen, 1996).

En resumen, dentro de cada ecosistema existe una compleja red de interacciones entre hongos MA y poblaciones de plantas que puede ser de gran importancia para el mantenimiento de la diversidad del ecosistema (Bever, 2002). El efecto de las MA en el ecosistema depende de la diversidad de poblaciones de MA (Sanders y col, 1996), y además está directamente relacionada con la diversidad de poblaciones de plantas (Heijden y col, 1998). Koide y Dickie (Koide y Dickie, 2002) resaltaron algunas consecuencias de la micorrización arbuscular en el ecosistema, como son: el incremento de la reproducción en planta, la estabilización de las poblaciones de plantas en el ecosistema, ya que los beneficios de la MA disminuyen al aumentar la densidad de la población, la selección de los individuos mas fuertes favoreciendo su crecimiento, y por último la distribución de las áreas micorrizadas a partir de plantas ya micorrizadas.

Por otro lado, el beneficio más destacado de la simbiosis MA es la mejor nutrición mineral de las plantas micorrizadas, particularmente en lo que se refiere a la adquisición de fósforo (Smith y col, 2003). Teniendo en cuenta que el fósforo es un nutriente esencial para las plantas y que en muchas ocasiones es limitante para su desarrollo (Holford, 1997), podemos afirmar que las MA son claves en muchas ocasiones para la mejora de la biodiversidad y productividad del ecosistema.

2.3. Morfología y formación de la simbiosis micorriza arbuscular

Como ya se ha explicado anteriormente, en esta asociación el hongo es un simbionte obligado, lo que significa que no puede completar su ciclo de vida sin haberse asociado con la raíz de la planta hospedadora. Esto es así hasta el punto de

que tras germinar una espora del hongo en el suelo, si no encuentra cerca una raíz de una planta hospedadora, a las 2 ó 4 semanas el crecimiento de la hifa se detiene, la hifa se tabica desde el ápice, y a la vez se produce una extensión de las vacuolas y una retracción del protoplasma hacia la espota que arrastra a los núcleos (Logi y col, 1998). En cambio, la presencia de exudados de raíz en el suelo estimula el crecimiento y la ramificación de la hifa (Giovannetti y col, 1994; Giovannetti y col, 1996), que tras encontrarse con la raíz y colonizarla consigue completar su ciclo de vida (García y Mendoza, 2007).

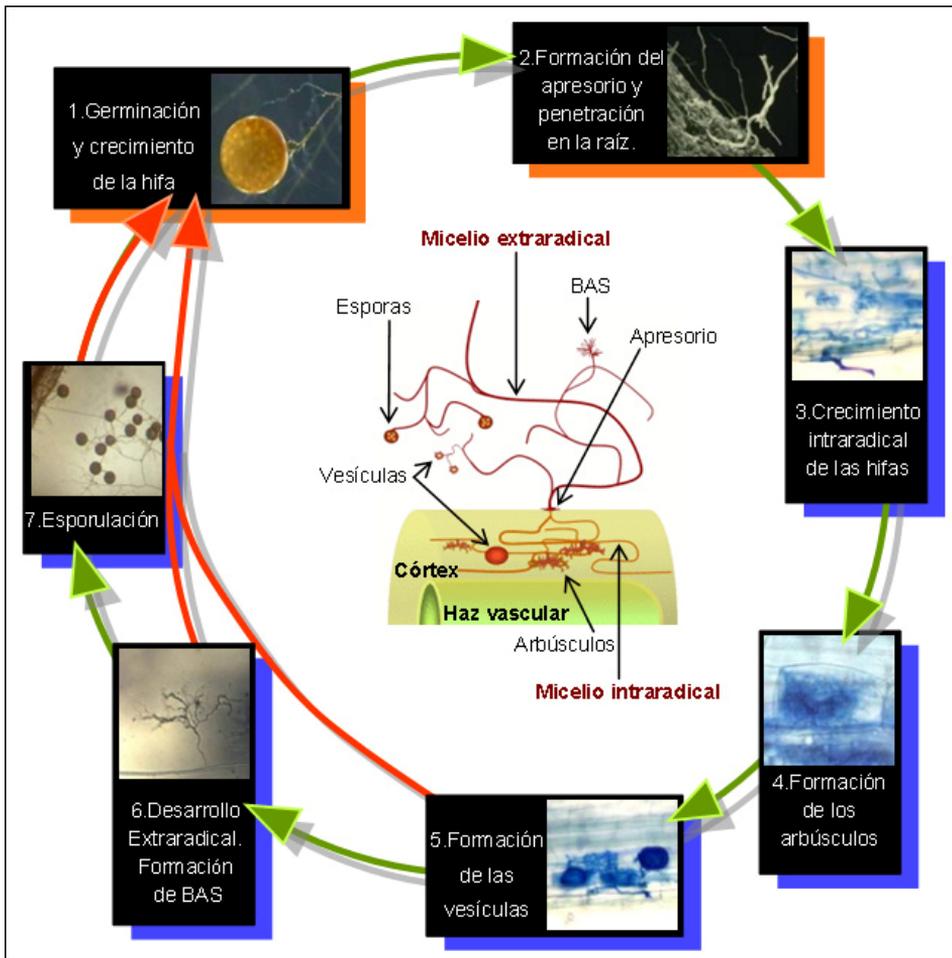


Figura II.4: Ciclo de vida de los hongos micorrízicos arbusculares. Las sombras naranjas pertenecen a las etapas de la fase presimbiótica, mientras que las azules pertenecen a las de la fase simbiótica. Las flechas naranjas indican las tres posibles fuentes para la formación de nuevos puntos de entrada del hongo a la raíz de plantas hospedadoras: esporas presentes en el suelo, micelio extraradical procedente de raíces colonizadas, o fragmentos muertos de raíces anteriormente colonizadas.

Fotografías: 1 de Aldholeya, A; 2 de Augé, B.; 3, 4 y 5 de Herrera-Medina, M.J; 6 de Nielsen J.S.; 7 de Tiwary, P.

En este apartado, la descripción de la formación y la morfología de la simbiosis se centrará principalmente en el ciclo de vida del hongo, desde la germinación de sus esporas, pasando por la penetración y el desarrollo de sus hifas y estructuras características dentro de la raíz, hasta la nueva formación de las estructuras reproductivas. Se divide el ciclo de vida del hongo en varias etapas representadas en la figura II.4 y que se agruparán en dos fases, una fase presimbiótica y otra fase simbiótica, según donde y con qué función se desarrollen las estructuras del hongo. La *fase presimbiótica* se refiere a las primeras etapas de desarrollo del hongo antes de unirse a la raíz, mientras que la *fase simbiótica* se refiere a las etapas a partir del desarrollo del hongo dentro de la raíz:

- * FASE PRESIMBIÓTICA: Etapas de germinación, desarrollo y ramificación de las hifas, y formación del apresorio.
- * FASE SIMBIÓTICA: Etapas de crecimiento intraradical de las hifas, formación de los arbusculos, formación de las vesículas, desarrollo extraradical y esporulación.

A continuación se describe cada una de las etapas morfológica y funcionalmente, y las adaptaciones citológicas entre el hongo y la planta que se conocen hasta ahora y que dan lugar a la formación de la simbiosis. Más adelante se incluye un resumen del diálogo molecular que se establece entre ambos simbioses.

2.3.1. Fase presimbiótica

● Germinación de las esporas

Las esporas son la forma de resistencia y dispersión por excelencia de los hongos, y en el caso de los hongos formadores de micorrizas arbusculares no es la única (ver apartado de las vesículas) pero sí la más importante por su mayor resistencia, ya que pueden aguantar varios años en el suelo. Los factores de dispersión de las esporas pueden ser el aire, el agua y los pequeños animales, factores que cobran especial importancia en suelos degradados con una baja densidad de esporas.

La morfología y composición de la pared de las esporas varía en los distintos géneros y se ha utilizado durante mucho tiempo como criterio para la distinción de géneros y para su clasificación, pero, como ya se ha dicho anteriormente, las diferencias morfológicas en ocasiones son escasas y poco definidas dentro de un mismo género por lo que hay que recurrir a análisis moleculares para su correcta clasificación (ver apartado de clasificación de AMF). La pared de la espора está formada por un número variable de capas y la última de ellas suele ser pigmentada e

impermeable. Entre las moléculas que la componen se encuentran polisacáridos, lípidos, proteínas y quitina. Esta última está presente en una o más capas de la pared y a veces se encuentra formando complejos con fibrillas. Dentro de la espora se encuentran numerosos cuerpos lipídicos, vacuolas, núcleos, retículo endoplasmático, e incluso, en algunos hongos micorrícicos, bacterias asociadas denominadas BLOs (ver apartado de ecología de las micorrizas arbusculares) (Figura II.5).

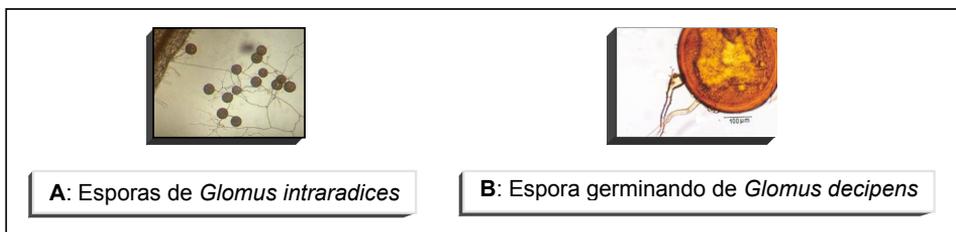


Figura II.5: Esporas de hongos micorrícicos. Fotografías: **A**, de Tiwari, P.; **B**, de Muthukumar, T.

La germinación de la espora da lugar a la formación del tubo germinativo, una hifa estrecha, multinucleada y no ramificada que crece en busca de la raíz hospedadora. El tubo germinativo puede desarrollarse bien por el mismo sitio por el que se unió la espora con la hifa anterior que la sustentaba, o bien por otras regiones específicas de la pared celular, para lo cual ha de producirse una ruptura enzimática de la pared celular (Figura II.5.B). En el proceso de germinación intervienen diversos factores externos, como son:

- * El pH, la humedad y la temperatura del suelo. Respecto a la humedad del suelo es determinante, generalmente a mayor humedad del suelo mayor germinación de las esporas. En cambio respecto a la temperatura, los AMF se adaptan a la temperatura del suelo en el que se forman, de modo que la temperatura media del suelo está relacionada con la temperatura óptima de germinación (Nemec, 1987).
- * La intensidad de la luz y la duración de fotoperiodos. A menor intensidad y menor duración del fotoperiodo, mayor es la frecuencia de germinación (Nemec, 1987).
- * La presencia de exudados de raíces hospedadoras (Gianinazzi-Pearson y col, 1989; Tsai y Phillips, 1991).
- * La presencia de hongos o bacterias parásitas de las esporas que las hacen inviables.

● **Crecimiento y ramificación de las hifas hasta alcanzar la raíz**

Durante 2 o 3 semanas y a partir de la espora germinada crece una hifa de entre 50 μ y 100 μ de longitud, y con ella varios núcleos se mueven hacia su extremo. Unos

pocos núcleos se dividen por mitosis, aunque la mayoría permanece en fase S, o entre las fases G2 y M (Bianciotto y Bonfante, 1993; Bianciotto y col, 1995; Requena y col, 2000). Durante esta etapa de crecimiento extraradical el hongo se alimenta principalmente de las reservas de triacilglicéridos de la espora, de modo que la presencia de nutrientes carbonados o nitrogenados en el medio apenas afecta al hongo (Hepper, 1979), aunque en algunos casos se ha demostrado que estos nutrientes inducen cambios en la expresión de los genes fúngicos (Requena y col, 2003; Breuninger y col, 2004).

Antes de alcanzar a la raíz hospedadora las hifas del hongo se ramifican repetidamente, y probablemente este sea una de los pasos necesarios para el establecimiento de la simbiosis, ya que al aumentar el número de ramificaciones aumenta la probabilidad de que la hifa encuentre un punto susceptible en la raíz para la colonización (Buce y col, 2000; Nagahashi y Douds, 2000).

Por otro lado, diversos estudios sugieren cambios en la raíz tras el reconocimiento del hongo micorrízico (Apartado II.2.5) para facilitar la entrada del hongo. En este sentido Larose y col. propusieron que cambios en la composición de flavonoides en los exudados radicales, crean un ambiente mas favorable para el desarrollo del hongo (Larose y col, 2002). Por su parte Olah y col. sugirieron que mediante la formación de raíces secundarias en la raíz se crean nuevas zonas mas susceptibles para la entrada del hongo (Olah y col, 2005).

● **Formación del apresorio. Entrada en la raíz**

Cuando la hifa llega a la superficie de la raíz, preferentemente de raíces secundarias o pelos radicales jóvenes (Tawaraya y col, 2007), entra en contacto con la misma, aumenta su grosor y da lugar a una estructura de unión llamada apresorio. También existe la posibilidad de que la hifa se ramifique repetidamente en la superficie de la raíz, y cada ramificación forme un apresorio (Bonfante y col, 2000). El apresorio tiene forma aplanada, es multinucleado, como el resto de las estructuras fúngicas, y destaca por la abundancia de vacuolas en su interior (Garriok y col, 1989). A partir del apresorio la hifa crece hacia el interior de la raíz, bien atravesando las células epidérmicas, o bien a través del espacio intercelular de dos células epidérmicas. A la zona de la raíz donde se forma el apresorio y penetra la hifa dentro de la raíz se le llama punto de entrada. Estos puntos de entrada se pueden formar a partir de hifas de distinta procedencia: bien de la germinación de esporas, bien de hifas más anchas procedentes de otras raíces colonizadas y vivas, o bien de hifas procedentes de

fragmentos ya muertos de raíces anteriormente colonizadas (ver el apartado de la formación de vesículas).

Recientemente, Genre y col (Genre y col, 2005) han descrito el proceso de formación del aparato de pre-penetración (PPA por las siglas de su nombre en inglés ‘Prepenetration Apparatus’) en las células epidérmicas de *Medicago truncatula* antes de la penetración de la hifa del hongo micorrícico. Según estos autores el núcleo de la célula epidérmica se desplaza hasta la zona del apresorio, donde también se produce una agregación citoplásmica. Después el núcleo migra hasta la cara más interior de la célula dejando un canal citoplásmico por el que se forma el PPA. El PPA es una estructura formada por microfilamentos, microtúbulos y retículo endoplasmático, relacionado con la penetración de la hifa, y que define el camino que seguirá la misma al atravesar la célula epidérmica (Genre y col, 2005). Al crecer la hifa hacia el interior de la célula epidérmica se produce una invaginación en la membrana de la célula vegetal que cubre a la hifa formando un compartimento apoplástico de origen vegetal (Novero y col, 2002). Finalmente, cuando la hifa ya ha atravesado la célula epidérmica el PPA se deshace. Desde el primer desplazamiento del núcleo hacia el apresorio hasta la disgregación del PPA transcurre un tiempo de siete a ocho horas (Genre y col, 2005).

2.3.2. Fase simbiótica

● Crecimiento intracelular de las hifas

Una vez que las hifas del hongo han atravesado la epidermis se dirigen hacia las células corticales para desarrollar los principales órganos que caracterizan a la simbiosis MA, los arbusculos y las vesículas. Dependiendo de la planta hospedadora implicada en la simbiosis se distinguen dos tipos de micorrizas arbusculares, el tipo *Arum* y el tipo *Paris*, referidos a dos géneros de las Familias *Araceae* y *Liliaceae* respectivamente, donde fueron descritas por primera vez (Gallaud, 1905; Smith y Smith, 1997), aunque se han encontrado algunas especies capaces de formar ambos tipos de MA, *Arum* y *Paris* (Sengupta y Chaudhuri, 2002). Morfológicamente las diferencias existentes entre ambos tipos se deben principalmente a la pérdida de la penetración intercelular en las plantas que forman la simbiosis tipo *Paris*, lo cual provoca un crecimiento diferente de las hifas dentro de la raíz.

En el tipo *Arum*, una vez atravesada la capa de células epidérmicas, la hifa puede pasar hacia el córtex bien atravesando las primeras capas de las células corticales y formando ovillos dentro de ellas, o bien por los espacios intercelulares, siendo esta última la opción más frecuente (Bonfante-Fasolo, 1984). El crecimiento intercelular

de las hifas es más rápido y permite una pronta extensión de las hifas a través del eje longitudinal de la raíz. En muchas angiospermas que forman simbiosis tipo *Arum*, entre la epidermis y el córtex existe una o varias capas de células irregulares llamada hipodermis o exodermis, en cuyas paredes se acumula suberina. Paralelamente al eje principal de la raíz, en cada capa de estas células se alternan células de menor y mayor longitud, produciendo un dimorfismo celular. En las células más pequeñas la pared celular es menos gruesa y acumula menos suberina, por lo que las hifas fúngicas pasan a través de ellas hacia el córtex. A diferencia del tipo *Arum*, en el tipo *Paris* la extensión de las hifas solo puede realizarse atravesando las células corticales, dentro de las cuales forma estructuras en forma de ovillo. La extensión de la micorrización en el tipo *Paris* es por tanto mas lenta.

Cuando las hifas alcanzan las células corticales se desarrollan los arbuscúlos y más tarde las vesículas, en aquellos casos en las que se forman. Tanto las hifas como el resto de las estructuras fúngicas quedan rodeadas de una interfase cuando atraviesan una célula vegetal, la cual está formada por una matriz que separa a la hifa de la membrana de la célula vegetal. La membrana vegetal que rodea al arbuscúlo es más fina en esta zona que en el resto de la célula (Bonfante y Perotto, 1995). La matriz interfacial está constituida principalmente por derivados de la pared vegetal, como poligalacturanos no esterificados, pectinas, xiloglucanos, arabinogalactanos, ramnogalacturonanos, glucoproteínas ricas en hidroxiprolina y homogalacturonanos no esterificados (Balestrini y col, 1994; Perotto y col, 1994; Bonfante y Perotto, 1995), lo cual es señal de que la célula vegetal no pierde su capacidad de sintetizar y liberar componentes de la pared celular. Apoyando esta teoría se ha demostrado una inducción de genes codificantes de una proteína implicada en la síntesis de arabinogalactanos, localizándose los transcritos en las células que contienen arbuscúlos (Balestrini y col, 1994). El que no se ensamblen los componentes de la pared celular en la interfase puede ser resultado de una constante actividad lítica del hongo (Perotto y col, 1995).

Como ya se ha mencionado, la membrana vegetal de la matriz interfacial es más fina y más activa metabólicamente, ya que presenta una mayor actividad ATPasa (Smith y Smith, 1990) y una mayor cantidad de transportadores de fosfato y azúcares, especialmente en la zona de los arbuscúlos.

● **Formación de los arbuscúlos**

Cuando las hifas llegan hasta las células corticales penetran en ellas para después ramificarse intensamente formando los arbuscúlos. Los dos tipos de MA que hemos

descrito anteriormente presentan algunas diferencias en la formación de los arbusculos:

- * En el tipo *Arum* la hifa penetra un poco en la célula cortical constituyendo una hifa troncal que se ramifica repetidamente de forma dicotómica dando lugar a hifas muy finas, y finalmente a una estructura a modo de árbol. En ocasiones se originan dos hifas troncales que forman dos arbusculos dentro de una misma célula. Los arbusculos se pueden desarrollar a lo largo y ancho de todo el córtex, pero son mas abundantes en la zona cortical interior, adyacente a la endodermis y a los tejidos vasculares (Figura II.6). El arbusculo crece hasta ocupar prácticamente toda la célula. Aquí la superficie de hifa cubierta por la matriz interfacial y la membrana peri-arbuscular es mucho mayor, esta membrana se expande hasta tener una superficie cuatro veces mayor que la original (Alexander y col, 1988). Además la matriz y la membrana que separa a la hifa de la célula se estrechan (Bonfante y Perotto, 1995), y en la membrana peri-arbuscular aumenta la actividad metabólica (Smith y Smith, 1990). Tanto por el aumento de superficie, como por el aumento de actividad metabólica, el intercambio de nutrientes entre ambos simbioses se incrementa al máximo, por lo que los arbusculos son los principales órganos responsables de la nutrición carbonada del hongo, y de la transferencia de fósforo y otros nutrientes a la planta.

- * Las micorrizas tipo *Paris* solo pueden crecer atravesando las células corticales, donde forman ovillos de los que crecen ramificaciones secundarias de dan lugar a estructuras similares a los arbusculos (Figura II.6). En estos arbusculos la membrana y la matriz interfaciales son más estrechas, lo que debe de estar relacionado con una mayor actividad en el intercambio de nutrientes (Armstrong y Peterson, 2002).

La formación del arbusculo va acompañada por alteraciones drásticas en la morfología de la célula corticoide: La vacuola central se fragmenta, aumenta el volumen del citoplasma y el número de orgánulos celulares, además el núcleo cambia a una posición central y se vuelve hipertrófico (Balestrini y col, 1994). El núcleo de estas células está caracterizado por ser mas accesible a los fluorocromos, aumentar su sensibilidad a las nucleasas, y la dispersión de la cromatina, con lo cual demuestra tener una gran actividad transcripcional (Gianinazzi-Pearson, 1996). La cantidad de mitocondrias, retículo endoplasmático y plastidios aumenta alrededor del arbusculo (Fester y col, 2001; Carling y Brown, 1982; Bonfante y Perotto, 1995), y los plastidios quedan interconectados entre si por medio de túbulos rellenos de estroma formando una red que cubre al arbusculo (Köhler y Hanson, 2000). Además, se produce una remodelación de los microtúbulos del citoesqueleto desde los primeros estados de

formación del arbusculo, hasta su senescencia y colapso (Genre y Bonfante, 1997; Genre y Bonfante, 1998). En las células arbusculadas podemos encontrar cuatro tipos de microtúbulos: 1- largos haces que cruzan el citoplasma entre las ramificaciones de las hifas y atravesando el arbusculo; 2- pequeños microtúbulos que conectan a las ramificaciones entre sí, con el núcleo, y con la zona celular cercana a la pared; 3- Haces de microtúbulos en la periferia de la célula cercana a la pared, y a lo largo del tronco de la hifa; y 4- haces que rodean al núcleo de la célula.

Los arbusculos tienen 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), y las vacuolas que lo rodean se alargan y deforman, indicando un cambio en su actividad (Lohse y col, 2006). Es posible que tras la senescencia del arbusculo, la célula corticoide reabsorba nutrientes del mismo durante su degeneración. Al final, el arbusculo se degrada y la célula corticoide recupera su morfología original, siendo capaz de acoger la formación de un nuevo arbusculo (Alexander y col, 1988).

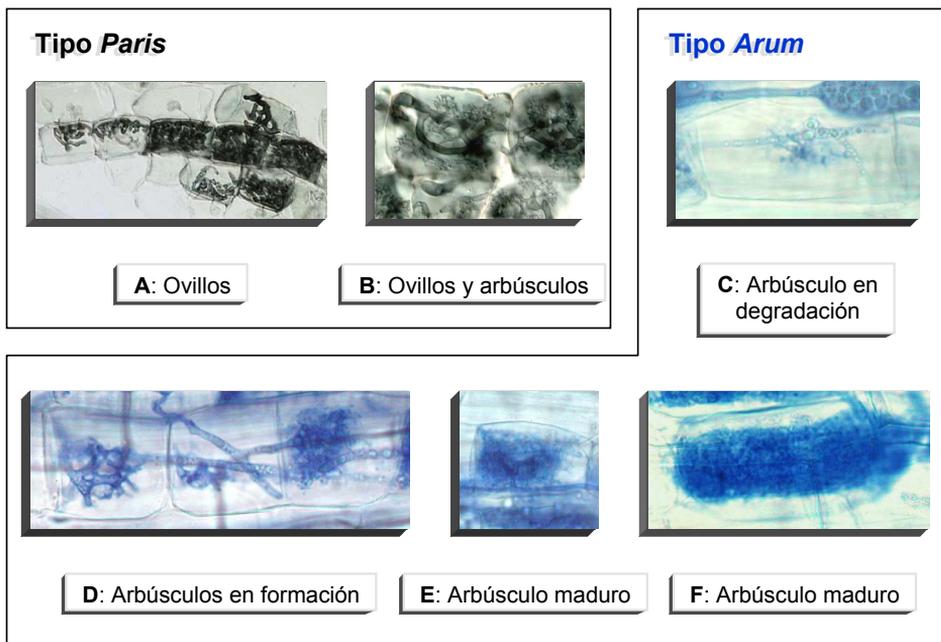


Figura II.6: Arbusculos de micorrizas arbusculares tipo *Paris* y *Arum*. Fotografías: **A** y **B** de Brundrett, M.; **C**, **D**, **E** y **F** de Herrera-Medina, M.J.

● Formación de las vesículas intraradicales

Las vesículas son estructuras globosas que en la mayoría de los hongos formadores de micorrizas, excepto en los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora*, se forman a partir del extremo de una hifa o ramificación del micelio intraradical (Figura II.7). Se

desarrollan bien en los espacios intercelulares de la raíz, bien dentro de alguna célula cortical, y en este último caso crecen hasta ocupar toda la célula e incluso pueden provocar un ensanchamiento y deformación de sus paredes al aumentar su tamaño. Dentro de ellas se encuentran gran cantidad de cuerpos lipídicos, numerosos núcleos y en algunas ocasiones BLOs.

Se conoce poco acerca de las señales desencadenantes de su formación, pero si se sabe que son necesarios la formación y funcionamiento previos de los arbusculos, luego necesitan del carbono proporcionado por la planta. Suelen formarse en la etapa final del desarrollo de la MA.

Respecto a su composición, el 58% de su peso es de naturaleza lipídica. En las vesículas se encuentran tres clases de lípidos, los más abundantes son los glucolípidos y esfingolípidos, seguidos de los neutros y por último los fosfolípidos (Jabaji-Hare y col, 1984). Esta característica les atribuye una función de reserva, aunque también se ha demostrado que tienen otras posibles funciones, como por ejemplo, dar una mayor resistencia a la micorriza ante la sequedad del suelo. Por otro lado, se ha demostrado como a partir vesículas aisladas de *Glomus intraradices*, sembradas 'in vitro', germinan nuevas hifas capaces de infectar a la raíz (Declerck y col, 1998). Estas vesículas permanecen viables incluso tras tres semanas a 5 °C. Todo esto indica que tienen una función en la resistencia del hongo a largos periodos de sequía o al invierno, y una importante función en la dispersión del hongo a través de fragmentos de la raíz cuando la planta ya ha perecido. Además, en ocasiones pueden transformarse en esporas, estando relacionada esta transformación con situaciones de estrés o muerte de la raíz.

● Desarrollo extraradical

Una vez que el hongo ha colonizado una raíz y ha formado los arbusculos que le proporcionarán la mayoría de los nutrientes carbonados, las hifas del hongo vuelven a salir de la raíz desarrollando un micelio extraradical que cubre gran parte de las raíces. 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 mas gruesas (Rhodes y Gerdemann, 1975; Jakobsen y col, 1992). Estas hifas extra-radicales son unas de las principales fuentes de inóculo para nuevas infecciones, aunque su principal función es la absorción de nutrientes minerales del suelo, debido a que su capacidad de absorción es mayor que la de las raíces de la planta (Ver apartado II.2.4.1).

Se ha estudiado el crecimiento 'in vitro' de las hifas usando medios de cultivo monoxénicos (St-Arnaud y col, 1996; Bago y col, 1998a; Bago y col, 1998b; Fortin y

col, 2002). En estos estudios se observó como primero se desarrollan unas hifas que crecen en línea recta y sin ramificar a lo largo de la placa de cultivo, mas tarde se ramifican formando hifas secundarias más estrechas, que se ramifican a su vez sucesivas veces semejando a un arbúsculo. Estas estructuras se reparten por zonas y se les ha atribuido la función de absorción de nutrientes, llamándolas BAS (de las siglas en inglés de Branched Absorbing Structures) (Bago y col, 1998a) (Figura II.7). A los BAS se les estima una media de dos o tres meses de vida.

Como ya se ha mencionado, no todos los hongos formadores de micorrizas arbusculares forman vesículas intraradicales. Los hongos pertenecientes a los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* no forman vesículas intraradicales, pero si en el micelio extraradical a las que se les ha llamado vesículas auxiliares (Figura II.7). Su formación comienza como una ramificación de una hifa exterior y en su extremo se forma esta estructura globosa de color variable, y que en este caso tiene paredes ornamentales. Aparecen aisladas o en racimos y, al igual que las vesículas intraradicales, contienen una gran cantidad de cuerpos lipídicos, además de inclusiones vacuolares, numerosos núcleos, y pueden tener BLOs asociadas. Muy probablemente su principal función esté relacionada con la dispersión, ya que en *Gigaspora margarita* se ha observado el crecimiento de nuevas hifas a partir de la hifa que las sustenta.

El micelio extraradical aporta otros beneficios a la planta además de la mejor nutrición mineral. Las hifas extra-radicales aumentan la estabilidad del suelo (Tisdall y Oades, 1979; Miller y Jastrow, 2000), entre otras cosas por tener glucoproteínas y glomalina en su pared celular a las que se adhieren las partículas del suelo (Koske y col, 1975). En estos agregados retiene mayor cantidad de agua, y por tanto el hongo ayuda a mantener la humedad del suelo favoreciendo así el desarrollo de la planta en momentos de sequía (Auge y col, 2001). Esta característica cobra especial importancia en la estabilización de suelos degradados, como por ejemplo en las dunas (Clough y Sutton, 1976; Nicolson y Johnston, 1979).

Existen especies de plantas no fotosintéticas para las cuales este micelio es imprescindible, como *Arachnitis uniflora*, *Voyriella parviflora*, y algunas especies del género *Voyria*. Estas plantas micorrizan con especies muy específicas de hongos arbusculares, cuyo micelio hace de puente entre estas plantas no fotosintéticas y otras plantas fotosintéticas con las que se asocia, para así trasportar nutrientes carbonados desde la planta fotosintéticas hasta estas plantas (Bidartondo y col, 2002).

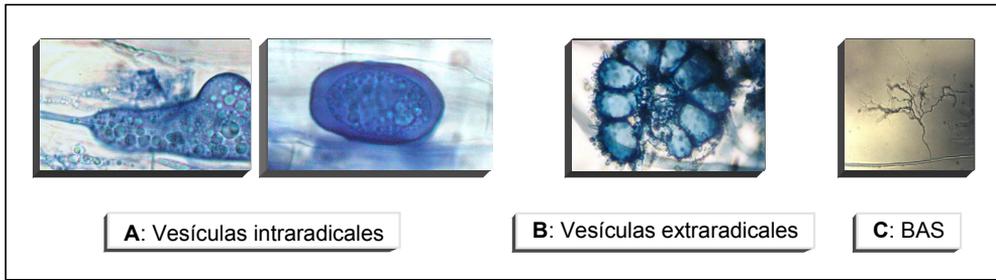


Figura II.7: Vesículas intra y extraradicales, y BAS.

Fotografías: **A** de Herrera-Medina, M.J.; **B** de Muthukumar, T.; **C** de Nielsen J.S

● Esporulación

Cerca de los BAS, y posteriormente a estos, se forman las esporas, por lo que se supone que la esporulación está relacionada con la absorción de nutrientes. Las esporas pueden crecer de forma aislada, en racimos, o en esporocarpos, una agregación de hifas donde se forman numerosas esporas. La esporulación suele ocurrir al final del desarrollo del hongo y se ve afectada por numerosos factores, como: el crecimiento de la planta, ya que una menor tasa fotosintética en la planta provoca una menor formación del micelio extraradical, y por tanto una menor esporulación; la disponibilidad de nutrientes; la intensidad de la luz; y la especie de la planta hospedadora.

2.4. Fisiología de la simbiosis micorriza arbuscular

2.4.1. Intercambio de nutrientes

La relación del AMF y la raíz hospedadora es tan íntima que se ha definido a la simbiosis MA como el órgano de la planta encargado de la absorción de nutrientes del suelo, y no la propia raíz (Harley y Smith, 1983). En esta relación el hongo absorbe minerales del suelo y los transfiere a la planta hospedadora, entre ellos destaca el fósforo seguido del nitrógeno, y dependiendo de la planta y del hongo implicados en la simbiosis también se produce transferencia de calcio, cobre, manganeso y zinc (Clark y Zeto, 2000). Por otro lado, de un 10 a un 20% del carbono fijado en la fotosíntesis por la planta es absorbido por el hongo (Johnson y col, 2002).

Como ya se ha mencionado, la interfase entre las membranas vegetal y de la hifa es la zona de mayor actividad de intercambio de nutrientes, y prueba de ello es su naturaleza altamente ácida (Guttenberger, 2000) debido a la intensa actividad de proteínas H^+ -ATPasa que se detecta en la membrana peri-arbuscular (Gianinazzi-Pearson y col, 1991a). Estas proteínas están consideradas como las principales

responsables del control del transporte iónico y molecular en plantas y en hongos. En este sentido, se han detectado H⁺-ATPasas específicas de células arbusculadas en diversas plantas (Murphy y col, 1997; Gianinazzi-Pearson y col, 2000; Benabdellah y col, 2000; Krajinski y col, 2002) y hongos arbusculares (Ferrol y col, 2000; Requena y col, 2003), así como una modulación en la expresión y localización de distintas isoformas de H⁺-ATPasas, de modo que en lugar de expresarse en mayor proporción en la epidermis de la raíz, lo hacen en las células con arbusculos (Rosewarne y col, 2007).

● Transporte y absorción de fósforo

Durante la simbiosis MA las plantas adaptan su sistema de absorción de fosfato ya que en estas condiciones la principal fuente de fósforo son los hongos micorrícicos y no la absorción radicular (Pearson y Jakobsen, 1993). La expresión de los transportadores de fosfato presentes en las plantas no micorrizadas es inhibida en las micorrizadas, incluso cuando el fosfato está presente en concentraciones no limitantes (Smith y col, 2003). Además, se ha detectado la expresión de transportadores de fosfato específicos de las células arbusculadas en plantas (Rausch y col, 2001; Harrison y col, 2002; Paszkowski y col, 2002), y en el caso de *Medicago truncatula* se han localizado específicamente en la membrana peri-arbuscular (Harrison y col, 2002). Estos transportadores de fosfato pertenecen a la familia de transportadores Pht1, de alta afinidad y dependientes de H⁺, y posiblemente sean los responsables del flujo de fósforo desde el arbusculo hacia la célula vegetal, utilizando el gradiente de pH existente entre la matriz interfacial y el citoplasma de la célula cortical. El análisis filogenético de los genes codificantes de estos transportadores de fosfato de plantas muestra una divergencia entre los transportadores de distintas especies, por lo que esta característica de la simbiosis puede haber evolucionado en momentos independientes en las distintas especies, dando lugar al menos a dos tipos de transportadores diferentes (Harrison y col, 2002; Paszkowski y col, 2002). Sin embargo, los transportadores de la familia Pth1 no son los únicos inducidos durante la simbiosis, puesto que estudios realizados con plantas de tomate y patata han puesto de manifiesto cierta redundancia funcional entre estos y al menos otros dos tipos de transportadores (Nagy y col, 2005).

Por su parte, el micelio extraradical es el encargado de la absorción de nutrientes minerales del suelo, cuya capacidad de absorción es mayor que la de las raíces de la planta, ya que las hifas del hongo cubren una superficie de suelo mayor que la raíz, y alcanza zonas difíciles para la raíz al tener un diámetro menor (Rhodes y Gerdemann,

1975; Jakobsen y col, 1992). Se ha clonado un transportador de fosfato de alta afinidad y dependiente de H^+ en hongos micorrícicos, el cual está presente en el micelio externo y no en el interno, por lo que debe ser responsable de la absorción de fósforo desde el suelo, y no del transporte hacia la raíz. Además, la expresión de este transportador está regulada por la concentración de fosfato en el sustrato, por lo que el hongo micorrícico debe tener algún sistema de detección de los niveles de fósforo en el medio externo (Harrison y Van Buuren, 1995; Maldonado-Mendoza y col, 2001).

La mejor captación de fosfato por el hongo micorrícico no solo se debe a la presencia de transportadores de fosfato de alta afinidad, y a la mayor extensión del micelio extraradical por el sustrato, ya que se ha comprobado recientemente como la solubilización de fósforo se incrementa considerablemente en suelos con hongos micorrícicos, y posiblemente se deba a la acción de los exudados del hongo (Tawaraya y col, 2006).

Una vez que las hifas externas han captado el fósforo del suelo, este es translocado a lo largo del micelio para ser transferido a las células corticales de la raíz. Este transporte se realiza en forma de gránulos formados por cadenas de polifosfatos de hasta 17 unidades, osmóticamente inactivos y localizados fundamentalmente en el interior de vacuolas fúngicas (Rasmussen y col, 2000). Al llegar a los arbusculos, los gránulos se deshacen mediante la actividad de fosfatasas alcalinas presentes en las vacuolas (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1978). Aunque no se conoce el mecanismo exacto de transferencia de fosfato a través de la matriz interfacial, lo mas probable es que sea a través de transportadores de fosfato localizados preferentemente en la membrana periarbuscular (Rausch y col, 2001; Harrison y col, 2002), y que este sea dependiente del gradiente de H^+ creado en esta matriz por las H^+ -ATPasas.

Gracias al aporte de fósforo por el hongo micorrícico, el crecimiento de plantas micorrizadas en suelos pobres en fósforo es claramente mayor al de las plantas no micorrizadas, y puede alcanzar un máximo superior al de plantas no micorrícicas cultivadas en suelos con alta disponibilidad de fósforo (Gazey y col, 2004; Schweiger y col, 2007). No obstante, no todos los hongos son igual de eficaces en la captación de nutrientes, así Jakobsen y col. demostraron que ciertos hongos transportan el fósforo de manera más eficaz a la planta, mientras que otros lo almacenan en su interior (Jakobsen y col, 1992). Sin embargo, a pesar de que el micelio de algunos hongos no es tan eficaz, representan un almacén de nutrientes importante e impide la dispersión, vía mineralización, de los mismos al morir las plantas.

● Transporte y absorción de nitrógeno

Además de fósforo, la micorrización aporta otros nutrientes minerales y agua a la plantas. En el caso de nitrógeno, el hongo es capaz de absorber el nitrógeno del suelo tanto en forma orgánica (glicina) como inorgánica (NH_4^+ o NO_3^-) (Rains y Bledsoe, 2007). Además puede liberar nitratos del suelo a partir de complejos orgánicos (Hodge y col, 2001).

Se ha identificado un gen codificante para una nitrato reductasa (NR) dependiente de NADPH en esporas de *Glomus*, cuya expresión se localizada en arbusculos. Ya que la expresión de NR de la planta se ve inhibida durante la simbiosis, probablemente esta NR del hongo sea la responsable de la reducción de nitrato antes del transporte a la planta (Kaldorf y col, 1994; Kaldorf y col, 1998). Para transportar el nitrógeno a la planta antes es incorporado al glutamato, obteniéndose glutamina, probablemente por la vía glutamato/glutamina sintasa (Johansen y col, 1996; Breuninger y col, 2004). Finalmente el nitrógeno atraviesa la matriz interfacial hacia la célula vegetal, mediante un ciclo asociado a la urea y al transporte de polifosfatos (Bago y col, 2001; Govindarajulu y col, 2005).

● Transporte de compuestos carbonados

El carbono es transferido al hongo como hexosas a través de transportadores de la planta, y prueba de ello es la inducción específica durante la micorrización de sacarosa sintetasas de localización citoplasmática (Hohnjec y col, 2003; Ravnskov y col, 2003), además de un transportador de hexosas (Harrison, 1996). A través de la matriz intersticial el hongo absorbe fructosa y glucosa, que una vez dentro del hongo la mayoría son metabolizadas hasta trealosa y glucógeno (Wright y col, 1998; Pfeffer y col, 1999).

Por otro lado se demostrado que existe una inducción de invertasas en plantas micorrizadas, tanto en las células colonizadas, como en las zonas cercanas a las estructuras fúngicas, así como en el floema de la raíz. Esta inducción de invertasas posiblemente contribuya a la captación de hexosas por parte del hongo arbuscular a partir del apoplasto (Schaarschmidt y col, 2006; Schaarschmidt y col, 2007a). Aunque no se conoce con exactitud la contribución de la actividad de estas proteínas en el proceso de micorrización, si existen pruebas de una regulación de la micorrización mediada por la actividad de las invertasas (Schaarschmidt y col, 2007b).

El hongo transporta los compuestos carbonados principalmente en forma del ácido graso 16:1 ω 5, formando triacilgliceroles que se localizan en los cuerpos lipídicos

y se mueven dentro de las hifas del hongo dando lugar a un flujo bidireccional entre el micelio intraradical y el extraradical. Este flujo se dirige mayoritariamente hacia el micelio extraradical, y durante el mismo los cuerpos lipídicos son progresivamente consumidos (Bago y col, 2002; Olsson y col, 2002). También el carbono es transportado hasta el micelio extraradical como glicógeno (Bago y col, 2003), y el ciclo de glioxilato parece ser una ruta central en el metabolismo del carbono del hongo micorrízico que se ve activado durante la etapa simbiótica del hongo (Harrier y col, 1998; Franken y col, 1997; Lammers y col, 2001).

Por otro lado, mientras que el carbono se reserva principalmente en forma de fosfolípidos en el micelio extraradical, en las esporas se reserva como los lípidos neutros. Según estudios de Olsson y col, conforme avanza la edad de la simbiosis se incrementa la proporción de lípidos neutros respecto a fosfolípidos, indicando un aumento de las reservas y propágulos de resistencia del hongo (Olsson y col, 1997).

2.5. Dialogo entre el hongo micorrízico y la planta

La simbiosis micorriza arbuscular da lugar a una relación compleja entre el hongo y la planta, por tanto se requiere un continuo intercambio de información entre los dos simbioses durante cada una de las etapas de la micorrización (Figura II.4). En este sentido, se han ido recopilando muchas pruebas de este intercambio de señales, aunque los resultados son en ocasiones confusos, posiblemente debido a las diferencias en el patrón de crecimiento y en la funcionalidad que presentan distintos hongos micorrízicos en asociación con la misma planta hospedadora (Smith y col, 2004). Otra complicación más en el estudio de este intercambio de señales es que la respuesta transcripcional de la raíz durante la micorrización difiere con la de la parte aérea, e incluso en la misma raíz entre las zonas colonizadas y las no colonizadas (Liu y col, 2007). A pesar de ello, hay pruebas de la existencia de un programa genético específico en plantas para la adaptación a la simbiosis micorriza arbuscular, y general para diferentes hongos simbióticos (Massoumou y col, 2007; Liu y col, 2007). Es más, existen incluso similitudes en la respuesta transcripcional entre grupos taxonómicos mayores como monocotiledoneas y dicotiledoneas (Güimil y col, 2005).

En este apartado se presenta un resumen de gran parte de los datos que se conocen hasta ahora sobre el intercambio de señales entre los dos simbioses. El apartado de “Señalización en la micorrización” se centra en el intercambio de señales que se lleva a cabo durante la simbiosis, y que permite la formación. A continuación, en el apartado “autoregulación de la micorrización”, se presenta una recopilación de los escasos conocimientos que se tienen sobre la participación de la planta en la

regulación de la micorrización, bien mediante el uso de moléculas señal como las fitohormonas, bien por la activación de la respuesta de defensa.

2.5.1. Señalización en la micorrización

En este apartado se exponen datos sobre señales participantes en el diálogo hongo-planta puestos de manifiesto en las etapas más estudiadas de la micorrización, dentro de la *fase presimbiótica* (Germinación de las esporas, crecimiento y ramificación de las hifas hasta alcanzar la raíz, y formación del apresorio) y en la *fase simbiótica* (Formación de los arbusculos y crecimiento intraradical de las hifas). La figura II.8 representa un resumen de las señales establecidas en ambas fases.

2.5.1.1. Fase presimbiótica

● La germinación de las esporas

El diálogo molecular entre los dos simbioses empieza desde la germinación de las esporas del hongo, donde los metabolitos secundarios de la planta y exudados de la raíz, como los flavonoides, promueven la germinación de las esporas (Gianinazzi-Pearson y col, 1989; Tsai y Phillips, 1991). Entre estos exudados, los de plantas cultivadas en condiciones de deficiencia de fosfato resultan ser mejores inductores de la germinación por la presencia de compuestos adicionales en sus raíces (Elias y Safir, 1987; Franken y Gnädinger, 1994).

● Crecimiento y ramificación de las hifas hasta alcanzar la raíz

En ausencia de la planta hospedadora, la hifa del hongo micorrízico presenta un crecimiento limitado, mientras que la presencia de exudados de raíces hospedadoras provocan una activación del crecimiento y de su ramificación (Giovannetti y col, 1993; Buee y col, 2000; Tamasloukht y col, 2003). Esta activación es mayor en presencia de raíces no micorrizadas que micorrizadas (Pinió y col, 1999), lo cual coincide con la menor capacidad de micorrización que tienen las plantas ya colonizadas (Vierheilig y col, 2000b; Vierheilig y col, 2000c; Catford y col, 2003; Vierheilig, 2004a; Meixner y col, 2005). No obstante, tal y como han demostrado Scervino y col, el efecto de los mismos exudados no es igual para todos los hongos micorrízicos, ya que los flavonoides, tienen un efecto específico en diferentes especies de hongos (Scervino y col, 2005a; Scervino y col, 2005b; Scervino y col, 2005c).

Las hifas responden rápidamente a la aplicación de extractos de raíz purificados, cambiando su expresión génica en menos de una hora, y aproximadamente entre una hora y media y tres horas, se observan cambios fisiológicos como el incremento en la tasa de respiración del hongo. Finalmente, a las 5 horas, ya se observa la ramificación de sus hifas (Tamasloukht y col, 2003). Durante mucho tiempo se ha intentado extraer de los exudados radicales el factor que activa el crecimiento y la ramificación de las hifas del hongo, denominando de forma general a este factor como ‘**Branching Factor**’ (BF) (Buee y col, 2000; Nagahashi y Douds, 2000), y recientemente se han identificado a las estrigolactonas, moléculas orgánicas pertenecientes al grupo de los sesquiterpenos, como los productos responsable de la activación de esta fase de ramificación y crecimiento presimbótico (Akiyama y col, 2005; Besserer y col, 2006). Akiyama y col. caracterizaron la estrigolactona 5-deoxi-estrigol como el BF de *Lotus japonicus*, aunque otras moléculas con la misma estructura de sus anillos, como la sintética GR24, tienen un efecto parecido. Estos autores concluyeron que el 5-deoxi-estrigol es percibido por un receptor fúngico gracias a su estructura de anillos, donde es esencial el anillo D (Akiyama y col, 2005). Esta conclusión se apoya en resultados anteriores de Poulin y col, que dieron las primeras pruebas sobre la importancia de la estructura del BF, al comprobar que el efecto de los flavonoides puede ser mimetizado por estrógenos y bloqueado por antiestrógenos (Poulin y col, 1997). Se han detectado estrigolactonas en una amplia variedad de plantas como soja, guisante, zanahoria (Matusova y col, 2005), maíz, mijo (Siame y col, 1993) y *Lotus japonicus* (Akiyama y col, 2005), lo cual apoya su papel general como señal de reconocimiento entre hongo micorrízico y raíz (Akiyama y col, 2005). Probablemente el carácter lábil de estas moléculas y su baja concentración en los exudados radicales han dificultado su detección en exudados de más plantas (Sato y col, 2003). Curiosamente, las estrigolactonas son sustancias activadoras de la germinación de semillas de las especies de plantas parásitas *Striga* y *Orobanchae*. Este doble papel de las estrigolactonas como inductoras de la germinación de las semillas de plantas parásitas y factores de bifurcación del micelio de hongos MA sugiere que las plantas parásitas de la familia *Orobanchaceae* han copiado o adaptado parte de la señalización molecular entre la raíz y los hongos MA para su propio beneficio.

Por otro lado, aunque se ha sugerido que la ramificación de las hifas del hongo mediada por flavonoides es uno de los procesos de reconocimiento de la raíz hospedadora necesarios para una buena colonización (Buee y col, 2000; Nagahashi y Douds, 2000), el uso de mutantes de maíz deficientes en flavonoides indica que no son esenciales para el desarrollo de la simbiosis (Becard y col, 1995). Sin embargo, si que es necesario el encuentro con la raíz hospedadora. En este sentido se ha buscado

alguna señal quimiotrópica que atraiga al hongo hacia la raíz, pero poco se sabe al respecto debido a la dificultad en el cultivo de estos hongos. Tan solo se ha demostrado que existe cierto crecimiento direccional hacia la raíz a una distancia menor de $910\mu\text{m}$ (Vierheilig y col, 1998; Sbrana y Giovannetti, 2005).

Por su parte, se cree que la planta se prepara para la infección, antes de entrar en contacto físico con el hongo, mediante la percepción de una molécula fúngica denominada ‘**factor Myc**’, de forma similar a como lo hace durante la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa reconociendo al ‘factor Nod’ (Blilou y col, 1999; Vierheilig, 2004b). En el caso de *Rhizobium*, la bacteria al percibir los flavonoides liberados por la raíz, sintetiza el llamado factor Nod que da lugar a cambios en la raíz para permitir la entrada de *Rhizobium* (Garg y Geetanjali, 2007). Las primeras evidencias sobre la existencia del factor Myc se basaron en cambios en la síntesis de nuevos polipéptidos antes de la penetración del hongo, y en la activación de enzimas hidrolíticas de plantas ante la presencia de extractos de esporas o hifas de hongos micorrícicos (Vierheilig y col, 1994; Simoneau y col, 1994; Vierheilig y col, 2000a). Además, se han observado alteraciones en los exudados liberados por raíces en presencia de hifas o esporas de hongos micorrícicos (Larose y col, 2002), que en ocasiones son similares a los provocados por el factor Nod (Vierheilig, 2004b).

Al igual que ocurrió en un principio con el BF, hasta hoy no se conoce la posible estructura del factor Myc. Olah y col. también demostraron que algún factor difusible, y no perteneciente al grupo de las auxinas, estimula la formación de raíces laterales en *M. truncatula*, lo cual facilita la penetración del hongo micorrícico (Olah y col, 2005). Kosuta y col. demostraron la existencia de algún factor liberado por distintos hongos y que es capaz de inducir la expresión del gen simbiótico MtENOD11 en *M. truncatula*, con un patrón de expresión diferente al de *Rhizobium*, lo cual demuestra que este factor es diferente al factor Nod (Kosuta y col, 2003). Una prueba más que aleja al factor Myc del Nod, es la existencia de ciertos mutantes afectados en la expresión de los receptores NFR1 y NFR5 (de las siglas en inglés ‘Nod Factor Receptor’) e incapaces de responder al factor Nod, y sin embargo la mutación no afecta a su capacidad de micorrización (Radutoiu y col, 2003).

● **Formación del apresorio**

El hongo micorrícico es capaz de formar el apresorio cuando entra en contacto con células epidérmicas, tanto de raíces hospedadoras como no hospedadoras cultivadas en oscuridad (Vierheilig y col, 2002), e incluso con fragmentos de raíces (Nagahashi y Douds, 1997). Por lo tanto, no es necesario un reconocimiento químico

para la formación del apresorio, basta con el contacto físico entre el hongo y la pared celular (Douds y Nagahashi, 2000).

2.5.1.2. Fase simbiótica

● Entrada de la hifa en la raíz

Se ha demostrado que la célula vegetal se prepara citológicamente para la infección del hongo micorrícico mediante la formación del PPA en *M. truncatula* (Genre y col, 2005). Se relaciona la formación del PPA con la correcta transcripción de los genes *dmi* (de las siglas en inglés ‘Does not Make Infections) de *M. truncatula*, ya que la mutación de estos impide la formación del PPA, y el bloqueo total o parcial de la penetración de la epidermis por el hongo micorrícico (Morandi y col, 2005; Catoira y col, 2000). Además de los mutantes DMI de *M. truncatula*, se han encontrado otros mutantes donde también se bloquean tanto la micorrización como la nodulación en esta primera etapa de penetración. Por ejemplo en guisante (Duc y col, 1989; Gianinazzi-Pearson y col, 1991b), y en *M. truncatula* (Sagan y col, 1995) se han descrito mutantes en los que el hongo forma un apresorio que frecuentemente es alargado, y sus hifas se tabican cuando no consiguen penetrar en la raíz (Duc y col, 1989; Bradbury y col, 1991; Gianinazzi-Pearson y col, 1991b). También en *Lotus japonicus*, el desarrollo de la micorrización se detiene en el momento en el que la hifa ha de penetrar la célula epidérmica en los mutantes LjSYM15 (Demchenko y col, 2004). Asimismo, en otras plantas no leguminosas como en tomate, se han encontrado mutantes donde la hifa no puede penetrar la célula epidérmica (Barker y col, 1998; David-Schwartz y col, 2003).

En guisante, a los fenotipos alterados en la penetración del hongo se les ha llamado *myc*⁽⁻¹⁾, y en todos ellos se ve afectada la formación de la simbiosis con *Rhizobium*. Se han descrito más de 21 mutantes, por lo que la entrada en la raíz debe de estar bajo un complejo control genético, común en numerosos casos para ambas simbiosis. En muchos de ellos se produce una deposición de calosa, fenoles y otros componentes en la zona de la pared celular adyacente al apresorio, la cual que no se forma en las variedades silvestres (Gollotte y col, 1993; Peterson y Bradbury, 1995). Estos datos indican la activación de un mecanismo de defensa en dichos mutantes. Es posible que la mutación haya afectado a algún supresor de la respuesta de defensa, por lo que la planta reconocería al hongo micorrícico como un patógeno (García-Garrido y Ocampo, 2002).

Tratando de comprender y de ordenar en el espacio y en el tiempo la participación de los genes simbióticos durante la entrada de *Rhizobium* y del hongo micorrícico en la raíz, se han utilizado marcadores celulares activados durante la nodulación como referentes en el orden de actuación de los genes simbióticos, dentro de la cascada de acontecimientos que da lugar a la penetración de *Rhizobium* u hongos arbusculares. Así, se ha tomado como referencia el fenómeno de la alteración en la concentración de calcio intracelular en las células radicales producida por el reconocimiento del factor Nod de *Rhizobium* durante las primeras etapas de la nodulación, lo que se ha venido a llamar “calcium spiking” (Walker y col, 2000; Oldroyd y Downie, 2004). Probablemente esta sea una señal más específica de la nodulación, aunque también se supone durante la formación del apresorio de la micorrización. El gen *DMI1* de *M. truncatula* y sus ortólogos *PsSym 8* de guisante, y *LjCASTOR* y *LjPOLLUX* de *L. japonicus*, se cree que codifican para un canal iónico de membrana que actúa antes de la activación de los picos de calcio (Ane y col, 2004; Imaizumi-Anraku y col, 2005), ya que su mutación altera dicha respuesta al Ca^{2+} , y podrían mediar los cambios en los flujos iónicos activados en la membrana celular vegetal tras el reconocimiento del factor Nod. Previo del canal iónico *DMI1*, actuarían las proteínas codificadas por los genes ortólogos *DMI2* de *M. truncatula*, *PsSym19* de guisante, y *SYMRK* (de las siglas de su nombre en inglés ‘symbiosis receptor like kinase’) de *L. japonicus*, que poseen la estructura de un receptor con actividad quinasa y que actuarían como transmisores de la señal percibida por los receptores del factor Nod (NFR), por lo que podrían estar directamente implicados en la recepción del factor Myc (Ane y col, 2004; Parniske, 2004). En cambio, las proteínas codificadas por los genes *DMI3* de *M. truncatula*, y sus ortólogos *PsSym9* y *PsSym30* de guisante, siendo proteín-quinasas dependientes de calcio y calmodulina (CCaMK), actuarían después de los picos de calcio, interpretando dichos picos y activando su capacidad de fosforilación (Levy y col, 2004; Mitra y col, 2004). Se ha especulado con que el patrón de picos de calcio sea diferente en ambas simbiosis, micorrización y nodulación, y que *DMI3* sea capaz de interpretar dicha diferencia y así activar diferentes rutas de señalización en cada simbiosis (Harrison, 2005).

Aunque el proceso de micorrización y nodulación tenga similitudes a nivel genético y molecular, también se han descrito diferencias en la señalización y activación de ciertos genes simbióticos comunes. Tal es el caso del gen *ENOD11*, activado tanto durante la micorrización, como en la nodulación (Journet y col, 2001) (Morandi y col, 2005; Catoira y col, 2000). Se ha demostrado que los genes *dmi* no son necesarios en el caso de la micorrización para la activación de *ENOD11* a través de un factor difusible producido por el hongo, aunque sí para la penetración de las

células epidérmicas por dicho hongo (Kosuta y col, 2003). Sin embargo la activación de *ENOD11* por el factor Nod es totalmente dependiente de la funcionalidad de los genes *dmi*. Por lo tanto, la activación de *ENOD11* debe de estar controlada en diferentes momentos de la colonización por el hongo micorrícico, y además difiere de la señalización mediada por el factor nod. No se conoce si el factor difusible producido por hongos arbusculares es capaz de activar *ENOD11* por dos rutas diferentes, una independiente de genes *dmi* y que antecede la formación del apesorio, y otra dependiente de *dmi* (similar a la activada por el factor Nod) y activada previa formación del apesorio. También cabe la posibilidad de que participen varios factores activadores, uno difusible e independiente de *dmi*, y otro (Factor Myc) similar al factor Nod y dependiente de *dmi*.

● Crecimiento intraradical de las hifas

Durante esta etapa se conoce poco de la señalización entre ambos simbios, pero hay pruebas de la necesidad de un reconocimiento de la planta durante esta etapa: las mutaciones de los genes *LjSym4*, *LjSym15* y *LjSymRK* provocan un fenotipo en el que la hifa no puede profundizar en la raíz más allá de las células epidérmicas de *L. Japonicus* (Novero y col, 2002; Demchenko y col, 2004). En el caso de los mutantes *LjSYM4* la hifa muere al penetrar en el córtex junto con las células corticales adyacentes (Bonfante y col, 2000), de forma similar a lo que ocurre con los mutantes de guisante *brz* (o *E107*) (Resendes y col, 2001). También la mutación de los genes *taci1* y *CDPK1* de maíz y *M. truncatula* respectivamente, limita el crecimiento de la hifa a lo largo de los ejes horizontal y longitudinal de la raíz en cada caso (Ivashuta y col, 2005; Paszkowski y col, 2006).

● Formación de los arbusculos

La formación de los arbusculos provoca cambios drásticos en la célula cortical, entre ellos la reorganización del citoesqueleto, la cual no solo se debe a una reacción pasiva ante la formación del arbusculo, sino que existe algún tipo de señalización previa. Prueba de ello es que se ha encontrado un gen codificante de una α -tubulina en plantas de maíz que se induce específicamente en las células en las que se está desarrollando el arbusculo (Bonfante y col, 1996). Además, Blancaflor y col. han observado una reorganización de microtúbulos del citoesqueleto en las células corticales no colonizadas pero adyacentes a las que contienen los arbusculos, y adyacentes a las hifas intercelulares (Blancaflor y col, 2001), para lo cual es necesario

una señalización que indique a estas células no colonizadas la presencia del hongo y del arbúsculo.

En plantas de guisante también se hace patente la necesidad de la correcta señalización durante la formación de los arbúsculos. La mutación en guisante del gen *PsSym36* provoca la formación de arbúsculos incompletos (Gianinazzi-Pearson, 1996; Guinel y Geil, 2002), y además la membrana periarbuscular de estos arbúsculos apenas presenta actividad ATPasa, por lo que probablemente no sean funcionales (Gianinazzi-Pearson y col, 1995).

Por otro lado, la formación de arbúsculos debe de estar regulada por la planta hospedadora, ya que en los mutantes HAR1 de *L. japonicus*, nts 1007 de soja (supernodulantes), y en plantas de *M. truncatula* que sobre-expresan el gen *ENOD40*, se incrementa la colonización de la raíz por el hongo arbuscular y la formación de arbúsculos (Solaiman y col, 2000; Staehelin y col, 2001; Meixner y col, 2005). También los mutantes de guisante PsSYM33 y PsSYM40 muestran alteraciones en el control y renovación de los arbúsculos (Jacobi y col, 2003a; Jacobi y col, 2003b).

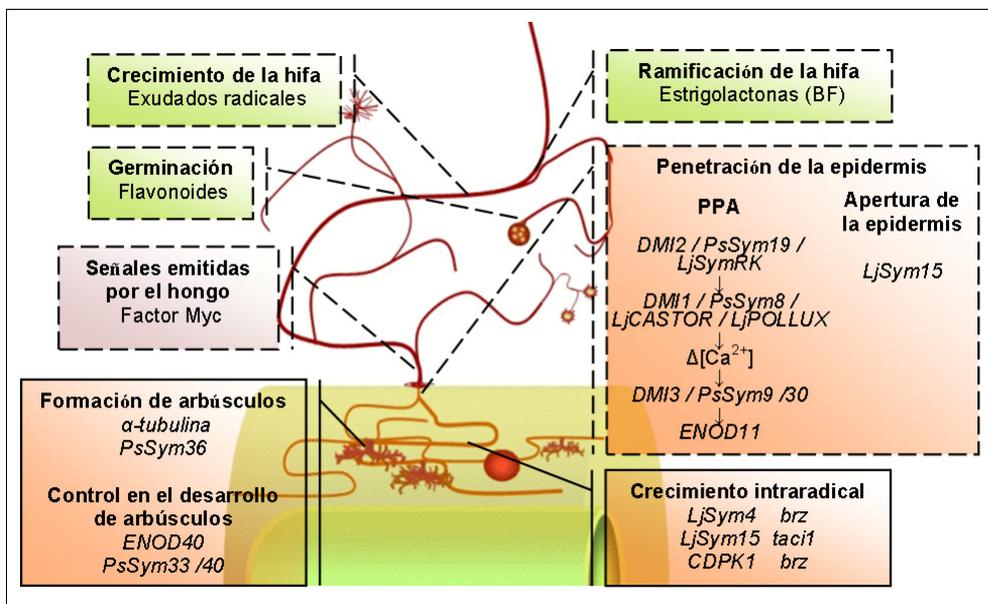


Figura II.8: Señalización en la micorrización. Las viñetas con línea discontinua corresponden a la fase presimbiótica, y las de línea continua a la simbiótica. Los cuadros en lila representan a las señales emitidas por el hongo micorrícico; los cuadros verdes, a las señales emitidas por la raíz hospedadora; y los cuadros naranjas, a genes y señales de la raíz esenciales para el desarrollo de la micorrización correspondientes a las plantas: *M. truncatula* (*DMI1/2/3*, *ENOD11/4* y *CDPK1*), guisante (*PsSym8/9/19/30/33/36/40*), maíz (*taci1* y *α-tubulina*), y *L. japonicus* (*LjSym4/15/RK*, *LjCASTOR* y *LjPOLLUX*). PPA, aparato de prepenetración.

2.5.2. Autoregulación de la micorrización

Como ya se ha mencionado, la simbiosis micorriza arbuscular requiere un continuo intercambio de información entre los dos simbioses para poder llevarse a cabo. De acuerdo con esto, el reconocimiento de la presencia del hongo micorrízico activa diversas respuestas en la planta encaminadas a permitir y favorecer el desarrollo del hongo dentro de la misma, pero también destinadas al control del desarrollo intraradical del hongo para que la colonización no sea excesiva y el hongo no llegue a comportarse como un patógeno. Parte de este proceso posiblemente se debe a la activación de ciertas respuestas de defensa, que en muchos casos está mediada por la disponibilidad de nutrientes como el fósforo en el suelo. Por analogía al mecanismo de autorregulación en el número de nódulos en leguminosas, a este fenómeno de control del desarrollo del hongo micorrízico en la raíz se le ha llamado “autoregulación de la micorrización (Vierheilig, 2004b; García-Garrido y Vierheilig, 2007).

Las fitohormonas son moléculas esenciales como señales e inductoras de los cambios que suceden en la planta, como crecimiento, maduración, defensa, y de demás procesos de adaptación morfofogenética de la planta. Por tanto es lógico pensar que también ejerzan un papel importante durante el desarrollo y la regulación de la micorrización. Por ello, en este apartado además de contener un resumen sobre los conocimientos actuales de la participación del fósforo en la regulación, y de la inducción o supresión de la respuesta de defensa en las plantas micorrizadas, se estudiará la participación hormonal en este proceso.

2.5.2.1. Participación hormonal en la regulación de la micorrización

Probablemente las hormonas vegetales y otras moléculas con propiedades similares, como el ácido salicílico, tengan una función central en la regulación de la micorrización, así como lo tienen en la regulación de respuestas en otras muchas interacciones entre plantas y microorganismos (ver apartado II.3). Se han estudiado ciertas variaciones internas en la concentración de estas moléculas en raíces de plantas durante la micorrización, y en algunos casos también se han realizado trabajos de investigación sobre el efecto que tiene la aplicación de estas sobre el desarrollo del hongo, aunque en numerosas ocasiones los resultados son contradictorios. Por otro lado, poco se sabe sobre el modo de acción de estas moléculas señal en la micorrización. Al final de este apartado se muestra un esquema resumen en el que figuran las hormonas y su posible efecto sobre la micorrización, así como las hormonas sintetizadas por el hongo (Figura II.9)

● **Giberelinas y poliaminas:** La acción de las giberelinas sobre el hongo micorrícico se ha comprobado a distintos niveles, primero inhibiendo la germinación de esporas (Barea, 1986), y segundo inhibiendo el desarrollo de la simbiosis. Aplicadas exógenamente a muy bajas concentraciones sobre las raíces micorrizadas provocan la inhibición de la formación de arbusculos, y con dosis mayores afectan negativamente tanto a la frecuencia como a la intensidad de la micorrización, llegando incluso a la inhibición completa de la infección (El Ghachtouli y col, 1996).

Por su parte, la aplicación de altas concentraciones de poliaminas inhibe igualmente el crecimiento del hongo (El Ghachtouli y col, 1996), y ya que la aplicación de giberelinas induce incrementos en los niveles de poliaminas en raíces, se ha relacionado la acción de ambas durante la micorrización (El Ghachtouli y col, 1996). A pesar de todo, las poliaminas parecen ser esenciales para la infección de las raíces por el hongo, concretamente la poliamina putrescina, cuya aplicación suprime la fuerte inhibición que se produce en la micorrización por la reducción de la actividad de la ornitina descarboxilasa (ODC) (El Ghachtouli y col, 1996).

Se ha observado que durante la micorrización los niveles de giberelinas disminuyen en raíces de *Bouteloua gracilis*, permitiendo así el avance del hongo, pero aumentan en sus hojas (Allen y col, 1980). Contradictoriamente, Se han detectado incrementos en su producción en plantas de *Linum usitatissimum* y tabaco micorrizadas (Dugassa y col, 1996; Shaul-Keinan y col, 2002). Cabe la posibilidad de que estos incrementos se deban a giberelinas sintetizadas por el hongo micorrícico ya que están presentes en sus hifas (Delp y col, 2000).

● **Citoquininas:** Igual que las giberelinas, las citoquininas provocan una inhibición en la germinación de esporas del hongo micorrícico (Barea, 1986), aunque en posteriores etapas de la micorrización parecen tener un efecto positivo en su desarrollo. Su aplicación sobre hojas de tabaco provocó que, durante la micorrización, disminuyeran las cantidades de la PR1a (denominadas así por las siglas de su nombre en inglés 'Pathogenesis-Related Protein'), y de una quitinasa básica (David y col, 1998) (también están relacionada con la defensa de plantas contra la infección de hongos (Mauch y col, 1988). Esto, junto con el hecho de que el incremento de citoquininas coincide con la reducción en la producción de quitinasas y PR1a en plantas de *Allium porrum* y tabaco micorrizadas (Spanu y col, 1989; Ginzberg y col, 1998), indica que las citoquininas pueden estar relacionadas con el control de la respuesta de defensa en plantas. Por otro lado, se ha relacionado a las citoquininas con la expresión de las nodulinas tempranas *MsENOD2* y *MsENOD40*, y se sugiere

la participación de estas en la inducción de la formación de raíces laterales durante la simbiosis micorriza-arbuscular (Hirsch y col, 1997; Fang y Hirsch, 1998).

Por su parte, el hongo micorrícico también tiene la capacidad de sintetizar citoquininas (Barea y Azcón-Aguilar, 1982), posiblemente para facilitar su propio desarrollo en la raíz. Apoyando esta hipótesis, se ha comprobado como las medidas de los niveles de citoquininas muestran aumentos en las raíces micorrizadas de *Bouteloua gracilis*, naranjos, tabaco y alfalfa (Allen y col, 1980; Edriss y col, 1984; Van Rhijn y col, 1997; Ginzberg y col, 1998).

- **Blumenina:** Los metabolitos secundarios formados a partir de compuestos carotenoides también tienen un efecto regulador sobre la MA. Este es el caso de la blumenina, derivado de la ciclohexenona cuya ruta de síntesis aún no está clara pero puede ser similar a la del ABA aunque con la ruptura de un precursor de los carotenoides por una digoxigenasa (Maier y col, 1998; Walter y col, 2000) (ver figura II.13). Se ha visto como los niveles de blumenina en la raíz aumentan proporcionalmente al grado de micorrización (Maier y col, 1995), y como la aplicación exógena de blumenina tiene un efecto sistémico e inhibe fuertemente la colonización desde las primeras etapas, así como la formación de los arbusculos (Fester y col, 1999).

- **Ácido salicílico (SA):** El ácido salicílico (SA por las siglas de su nombre inglés ‘salicylic acid’) es una molécula con propiedades parecidas a las fitohormonas, y que está estrechamente ligada a la respuesta de defensa en plantas frente a patógenos, (Boller, 1991; Raskin, 1992). Concretamente el SA juega un importante papel en la activación de la resistencia sistémica adquirida en plantas (SAR por las siglas de su nombre en inglés ‘Systemic Acquired Resistance’). Por ello, el papel del SA en la micorrización también se ha relacionado con la inducción de la respuesta de defensa en la planta (García-Garrido y Ocampo, 2002). Blilou y col. comprobaron como la aplicación exógena del SA provoca un retraso en el desarrollo de la micorrización de arroz proporcional al SA añadido al suelo, aunque no observaron ningún efecto sobre la capacidad infectiva del hongo (Blilou y col, 2000b). Por el contrario, su aplicación sobre la parte aérea en plantas micorrizadas de *Carica papaya*, *Tropeolum majus*, y en *Cucumis sativus* no provocó ningún efecto sobre la micorrización (Ludwig-Müller y col, 2002). Una posible explicación es que el efecto del SA en la micorrización no sea sistémico, sino local y al aplicarlo sobre la parte aérea de la planta no afecte a la raíz.

Respecto a las variaciones detectadas en las raíces micorrizadas, Blilou y col. encontraron aumentos transitorios en los niveles de SA en raíces de guisante, tabaco y arroz durante la formación de los apresorios y la penetración de las células

epidérmicas por las hifas del hongo (Blilou y col, 1999; Blilou y col, 2000a; Blilou y col, 2000b). Los incrementos transitorios en SA detectados se relacionaron con la inducción de la actividad catalasa y ascorbato peroxidasa en tabaco (Blilou y col, 2000a), e inducción en la expresión de los genes Ltp (Lipid Transfer Protein) y Pal (Phenylalanine Ammonia-Lyase) en arroz (Blilou y col, 2000b), todos ellos relacionados con la respuesta de defensa en plantas.

Estos resultados sugieren la participación del SA en la inducción de la respuesta de defensa durante la micorrización, pero esta inducción debe de ser suprimida de alguna manera para permitir la colonización por el hongo micorrízico en la raíz. Prueba de ello es que la acumulación de las proteínas PR1a, quitinasa, PR-1, PR-2 y PR-3 (relacionadas con la defensa mediada por SA), provocada por la aplicación de análogos del SA fue inferior en plantas micorrizadas que en las no micorrizadas (David y col, 1998; Ginzberg y col, 1998; Shaul y col, 1998). Además, en mutantes incapaces de micorrizarse y no nodulantes se produce un aumento en los niveles de SA en sus raíces ligado a la inoculación con hongos micorrízicos (Blilou y col, 1999). Es posible que en la raíz micorrizada se produzca una regulación de la respuesta de defensa inducida por SA como consecuencia de la infección, puesto que los incrementos de SA detectados durante la micorrización han sido todos breves o de baja intensidad en comparación a los producidos tras infecciones con microorganismos patógenos (Blilou y col, 1999; Blilou y col, 2000a; Blilou y col, 2000b).

● **Etileno:** Respecto al etileno, igual que el SA, está muy relacionado con la respuesta de defensa en plantas, por lo que también se ha sugerido su participación en la generación y regulación de esta respuesta durante la micorrización (McArthur y Knowles, 1992). Generalmente, su aplicación como ethephon (compuesto químico que al solubilizarse libera etileno) (Azcón-Aguilar y col, 1981; Morandi, 1989) o en gas (Ishii y col, 1996; Geil y col, 2001; Geil y Guinel, 2002) suprime el desarrollo de la micorrización. Sin embargo, la acción del etileno puede depender de la dosis aplicada, ya que Ishii y col. demostraron que bajas concentraciones de etileno estimulan la germinación de esporas del hongo, mientras que altas concentraciones inhiben el crecimiento de la hifa (Ishii y col, 1996).

También se han observado variaciones en su producción durante la micorrización, pero con resultados contradictorios. Así, se han detectado disminuciones en su producción en plantas de papaya bajo estrés hídrico, y aumentos en cultivos bien irrigados (Cruz y col, 2000). Igualmente se han detectado incrementos en otras plantas micorrizadas (Dugassa y col, 1996). Por el contrario,

McArthur y Knowles comprobaron que en plantas de patata se produjo una reducción en la actividad de la ACD oxidasa durante la micorrización (Ácido 1-amino-ciclopropano-1- carboxílico oxidasa, enzima que cataliza el último paso en la ruta de síntesis del etileno; figura II.12), que podría deberse a la alteración en el metabolismo de los fenoles ocasionados por la simbiosis (McArthur y Knowles, 1992). En plantas de tomate, en cambio, no se han detectado cambios en la producción de etileno tras la inoculación con los hongos *Glomus intraradices* y *G. mosseae* (Alexander y col, 1988; Vierheilig y col, 1994).

El papel del etileno durante la micorrización aún es desconocido, pero durante la nodulación parece actuar en las primeras etapas de reconocimiento de la bacteria simbiótica, posiblemente modulando la frecuencia de los picos de calcio (Oldroyd y col, 2001). Geil y col. proponen dos posibles vías de regulación de la micorrización debidos al etileno comparando con la nodulación, bien durante el reconocimiento de los simbiontes a nivel de los picos de calcio, o bien activando la respuesta de defensa en plantas frente al hongo micorrízico (Geil y Guinel, 2002).

● **Ácido jasmónico (JA):** En el caso del ácido jasmónico (JA por las siglas de su nombre inglés 'Jasmonic Acid') existen resultados contradictorios respecto a su función durante la micorrización, pues se ha demostrado que tiene tanto efectos positivos como negativos. La aplicación exógena y frecuente de JA sobre las hojas de plantas micorrizadas de *Carica papaya*, *Tropeaolum majus*, y *Cucumis sativus* causa una importante inhibición sistémica de la micorrización (Ludwig-Müller y col, 2002). Teniendo en cuenta la participación del JA en la respuesta de defensa en plantas (Gundlach y col, 1992; Wasternack y Hause, 2002), lo más probable es que los efectos negativos del JA sobre la micorrización estén relacionados con la inducción de la respuesta de defensa. Contrariamente a estos resultados, Regvar y col observaron como la aplicación exógena del JA sobre la parte aérea en plantas micorrizadas de *Allium sativum* promueve la colonización y el desarrollo del hongo en su raíz (Regvar y col, 1996). La diferencia principal entre éste y los ensayos de Ludwig-Müller y col. estriba en la dosis de JA aplicada, ya que Regvar y Col. utilizaron dosis mas bajas y en menor frecuencia que Ludwig-Müller y col. (Ludwig-Müller y col, 2002).

Hause y col. han observado un incremento en la acumulación del JA libre y conjugado con isoleucina en raíces de cebada micorrizadas, relacionando este incremento con la inducción de la proteína regulada por jasmonatos JIP23, y de la enzima AOS (de las siglas de su nombre en inglés 'Allene oxide synthase'), implicada en su biosíntesis. Además, comprobaron que ambas proteínas, AOS y JIP23 son inducidas específicamente en las células que contienen arbusculos, y la inducción se

produce a los cuatro o seis días después de la aparición de los primeros arbusculos (Hause y col, 2002). Estos autores proponen que la participación del JA en la micorrización se produce una vez que la simbiosis ya está completamente establecida, y no en el reconocimiento ni establecimiento de la simbiosis, luego el JA estaría más relacionado con el desarrollo de los arbusculos, que en el reconocimiento del hongo. Por el contrario, Vierheilig y Piché trataron raíces de pepino con un sistema de raíces separadas en dos compartimentos (split-root) micorrizando sólo las raíces de uno de los compartimentos, encontrando un incremento de JA en ambos compartimentos, y por lo tanto a nivel sistémico (Vierheilig y col, 2002). Es posible que el JA tenga la función de regular el desarrollo de los arbusculos en la raíz, y que la extensión del hongo provoque un aumento de JA a nivel sistémico que entre otras funciones ayude a la bioprotección de la planta ejercida por la micorrización (ver apartado II.2.6).

- **Estrigolactonas:** A las estrigolactonas, derivadas de los carotenoides, se les ha atribuido recientemente una función como inductores de la germinación y del desarrollo extraradical de hongo micorrízico (Akiyama y col, 2005; Tawarayama y col, 2006). Gómez-Roldán y col, también las han relacionado con la regulación de la micorrización, ya que la inhibición de la ruta de síntesis de los carotenoides mediante la aplicación de Fluridona, provoca un fuerte descenso en la micorrización que es restituido con la aplicación de un análogo sintético de las estrigolactonas, el GR24 (Gómez-Roldán y col, 2006).

- **Auxinas:** Se ha comprobado que la micorrización induce cambios selectivos en la producción de ciertas auxinas, dependiendo del estado de la micorrización. Jentschel y col, trabajando con plantas de capuchina, comprobaron que durante las primeras etapas de la micorrización se producen descensos en los niveles del ácido indol-acético (IAA de las siglas de su nombre en inglés 'indole-3-acetic acid'), y especialmente del ácido indol-butírico (IBA de las siglas de su nombre en inglés 'indole-3-butyric acid'), mientras que los niveles del ácido fenilacético (PAA de las siglas de su nombre en inglés 'phenylacetic acid') incrementaron. En etapas más avanzadas los cambios fueron inversos, los niveles de IBA aumentaron, y los de PAA disminuyeron (Jentschel y col, 2007). Estos autores también han detectado la inducción de promotores inducibles por auxinas durante la micorrización. Otros autores, en cambio, han detectado incrementos en IBA e IAA en las primeras etapas de la micorrización de plantas de maíz y soja respectivamente (Kaldorf y Ludwig-Müller, 2000; Meixner y col, 2005).

Entre las auxinas parece tener especial importancia el IBA, ya que su aplicación exógena induce la germinación de las esporas del hongo micorrízico y el crecimiento

de las hifas en condiciones axénicas (Barea, 1986), del mismo modo que se incrementa el porcentaje de colonización en *Citrus aurantium* y el peso seco de la raíz (Dutra y col, 1996). En raíces de maíz, Kaldorf y Ludwig-Müller comprobaron que los cambios en la morfología de la raíz provocados por la micorrización (Tisserant y col, 1996; Yano y col, 1996) son similares a los obtenidos con la aplicación de bajas concentraciones de IBA, además de que la aplicación de un inhibidor del IBA, el trifluoro-IBA, suprimió los cambios provocados en la morfología de la raíz por la micorrización e inhibió a la formación de la propia MA (Kaldorf y Ludwig-Müller, 2000). Con estos datos, Ludwig-Müller propone que las auxinas favorecen la micorrización de tres formas: activando la germinación de las esporas del hongo micorrícico, induciendo del crecimiento de las hifas extra-radicales, e induciendo del desarrollo de raíces secundarias que favorece a la infección del hongo (Ludwig-Müller, 2000).

Otra de las posibles funciones de las auxinas durante la micorrización puede estar relacionada con la respuesta a estreses, ya que se ha observado como en las células arbusculadas se incrementa la transcripción de un gen inducible por auxinas y codificante de una glutation S-transferasa (GST) (Strittmatter y col, 1996), siendo la GSTS una enzima de respuesta a estreses que añade glutation a diversos compuestos potencialmente citotóxicos para facilitar su transporte a la vacuola (Dean y col, 1995; Marrs y col, 1995).

● **Ácido abscísico (ABA):** Se han descrito diversos efectos sobre la micorrización debidos a la acumulación de fitohormonas producidas por del hongo micorrícico, como es el caso de ácido abscísico (ABA). Este compuesto se ha localizado tanto en las esporas como en las hifas extra e intraradicales del hongo, aunque en estas últimas se encontró en menor concentración (Esch y col, 1994). Además, se ha comprobado como en raíces micorrizadas de maíz la concentración de ABA es mayor que en las no micorrizadas (Danneberg y col, 1992). Curiosamente, en *Bouteloua gracilis* los niveles de ABA no variaron en las raíces micorrizadas mientras que disminuyeron en las hojas (Allen y col, 1980). Una posible explicación es que la planta disminuyese la síntesis de ABA por adaptarse al ABA producido por el hongo.

Hasta ahora no se conocen los efectos del ABA sobre la micorrización, aunque ya que puede inducir la biosíntesis de auxinas como el IAA (Ludwig-Müller y col, 1995), y se ha visto como la síntesis de IAA aumenta en plantas de soja micorrizadas (Meixner y col, 2005), y otra auxina, el IBA, es inducida en plantas de maíz micorrizadas (Ludwig-Müller y col, 1997; Kaldorf y Ludwig-Müller, 2000), se ha postulado que la inducción de estas auxinas durante la micorrización esta regulada

por el ABA, sintetizado o inducido por el hongo. Sin embargo, mientras que la concentración de ABA disminuyó en las hojas de plantas de *Bouteloa gracilis* micorrizadas (Allen y col, 1980), recientemente se ha comprobado como se produce una inducción en la síntesis de IBA y sus conjugados en las hojas de maíz y soja micorrizadas (Meixner y col, 2005; Fitze y col, 2005).

● **Esteroles:** Se sabe poco sobre la función de los esteroides en la micorrización, aunque se ha postulado su participación durante el reconocimiento de los simbiontes, ya que se han encontrado receptores específicos de determinados esteroides en el AMF (Poulin y col, 1997; Vierheilig y col, 1998). Además, el establecimiento de la micorrización causa incrementos en la concentración de esteroides como el campesterol y el 24-metilen-colesterol, los cuales son proporcionales a los niveles de micorrización en plantas de cebolla y *Tagetes*. Por esta razón se han propuesto como una medida bioquímica de los niveles de micorrización, sin embargo esta proporcionalidad no se cumple en todas las especies (Schmitz y col, 1991; Bothe y col, 1994).

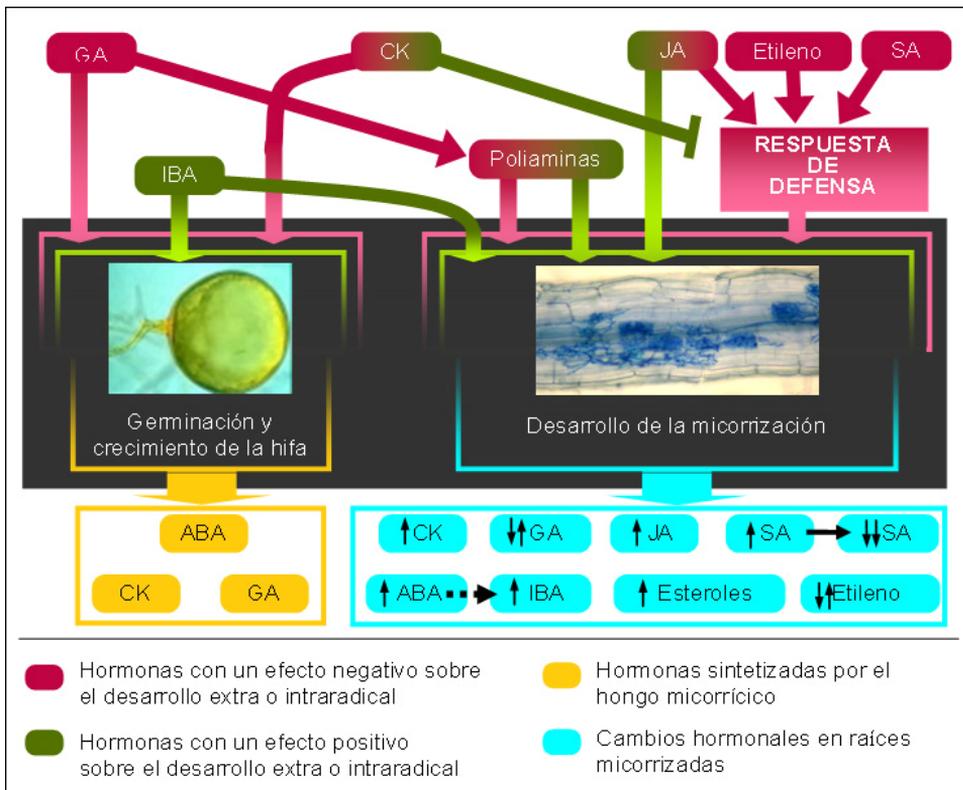


Figura II.9: Participación hormonal en la micorrización.

Fotografías: La espora por Aldholeya, A.; la raíz micorrizada por Herrera-Medina, M.J.

2.5.2.2. Participación del fósforo en la regulación de la micorrización

Como ya hemos visto, el transporte de fósforo desde el hongo micorrícico arbuscular a la planta es uno de los principales objetivos de la micorrización, por lo que es de suponer que la disponibilidad de fósforo afecte a la misma. El hecho de que altas concentraciones de fosfato soluble en el sustrato inhiben la formación de las micorrizas arbusculares es un fenómeno demostrado (McArthur y Knowles, 1992), pero los mecanismos mediante los cuales las plantas cultivadas en medios con alta disponibilidad de este nutriente inhiben la formación de la micorrización no están claros.

Estudiando el efecto que tienen los exudados radicales de plantas cultivadas con alta o limitada disponibilidad de fósforo sobre la micorrización, se ha demostrado como el fósforo ocasiona cambios en la composición de estos exudados que disminuyen su capacidad de estimular el crecimiento del hongo. Así, los exudados procedentes de plantas cultivadas en suelos con poco fósforo accesible inducen el crecimiento de la hifa en mayor proporción que los de plantas cultivadas con altas disponibilidad de fósforo (Tawaraya y col, 1998; Pinior y col, 1999), del mismo modo que tampoco estimulan la ramificación de las hifas en estas últimas condiciones (Nagahashi y col, 1996; Nagahashi y Douds, 2000). Yoneyama y col. comprobaron como la producción de estrigolactonas, que estimulan el crecimiento y la ramificación de las hifas del hongo, es inducida en mayor proporción en plantas cultivadas con bajos niveles de fósforo (Yoneyama y col, 2001; Yoneyama y col, 2007). De acuerdo con estos resultados, los exudados procedentes de plantas con poco fosfato inducen la colonización de la raíz, pero no los de plantas con alta disponibilidad de fosfato en el suelo (Tawaraya y col, 1998).

Recientemente, Olsson y col. demostraron que en condiciones de alta disponibilidad de fósforo, en un principio el transporte de fósforo a la planta y carbono al hongo micorrícico es mayor que en condiciones normales, es decir, que la alta disponibilidad de fósforo beneficia al hongo durante un tiempo. Pero en etapas más avanzadas, cuando la planta parece disponer del suficiente fósforo, el flujo de carbono al hongo cesa, y con él, el progreso del hongo micorrícico en la raíz (Olsson y col, 2006). Este resultado indica que probablemente no sería la cantidad de fósforo en el suelo, sino en la planta, la que determine la disponibilidad de la planta a la micorrización.

Entre los mecanismos de regulación de la micorrización activados por el fósforo se ha sugerido la participación de hormonas. Por ejemplo, en patata se ha comprobado que la actividad de la ACD oxidasa (Ácido 1-amino-ciclopropano-1-

carboxílico oxidasa, enzima que cataliza el último paso en la ruta de síntesis del etileno) disminuye en plantas micorrizadas respecto a las no micorrizadas. Sin embargo, la actividad ACD oxidasa incrementa de forma lineal junto con la actividad peroxidasa extracelular al aumentar las cantidades de fosfato en el sustrato, a la vez que se inhibe la micorrización. Estos datos sugieren una activación de la respuesta de defensa durante la micorrización inducida por el fósforo en la que posiblemente participe el etileno (McArthur y Knowles, 1992).

El nivel de fosfato posiblemente también influya en la activación de genes de defensa por otras vías, como por medio de la regulación de citoquininas y SA. El aumento de fósforo parece producir una disminución en los niveles de citoquininas, y con ello aumentar la respuesta de defensa de la planta. Prueba de ello es que en plantas de tabaco crecidas con altos niveles de fosfato disponible no se reducen los niveles de PR, mientras que si lo hacen en condiciones normales (Kapulnik y col, 1998), lo cual coincide con la reducción en los niveles de citoquininas en naranjos cuando se aumenta la disponibilidad de fosfato en el suelo (Edriss y col, 1984). Por otro lado, ya se ha explicado como la respuesta de defensa inducida por SA es inhibida por la micorrización. Sin embargo, en plantas de tabaco micorrizadas y cultivarlas con altas cantidades de fosfato no se produce la supresión en la expresión de quitinasa, inducida por análogos de SA, mientras sí ocurre en condiciones normales de cultivo (David y col, 1998). También en judías se ha observado que la expresión de endoquitinasa ácida durante la micorrización es mayor en suelos enriquecidos en fosfato, mientras que la expresión de β 1-3 glucanasa disminuye (Lambais y Mehdy, 1998).

2.5.2.3. Inducción/supresión de la respuesta de defensa en plantas micorrizadas

En muchas interacciones entre plantas y hongos, la invasión por el hongo provoca la activación de diversas respuestas de defensa en la planta dirigidas a la detención del crecimiento del hongo, y a la prevención de posteriores invasiones (Dixon y Harrison, 1994). Sin embargo, algunos hongos, aun siendo patógenos, consiguen establecer una interacción compatible al evitar la respuesta de defensa mediante la segregación de enzimas hidrolíticas de la pared celular, que rompen a las moléculas inductoras de la defensa, y minimizando el daño a la planta (Mendgen y col, 1996). Se cree que algo parecido ocurre en el caso de los hongos formadores de MA, donde se distinguen dos tipos de respuesta defensiva durante su desarrollo: Una respuesta inicial, en las primeras etapas del establecimiento de la simbiosis, débil y

transitoria; y otra más tardía y efectiva, que se limita a las células que contienen los arbusculos (Gianinazzi-Pearson y col, 1996; Kapulnic y col, 1996; García-Garrido y Ocampo, 2002). Tras las etapas iniciales de micorrización, la respuesta de defensa baja hasta unos niveles incluso menores que en las plantas no micorrizadas, coincidiendo con el desarrollo de los arbusculos, y se mantiene así mientras lo hace la renovación de los arbusculos en la simbiosis MA. Por esta razón se cree que los arbusculos participan de alguna manera en la regulación de esta respuesta de defensa (Harrison, 2005).

En algunos casos el hongo micorrícico puede penetrar las raíces de plantas no hospedadoras, desencadenando una fuerte respuesta de defensa que detiene su crecimiento. Este es el caso de *Salsola kali*, planta no micorrícica, donde tras la entrada del hongo micorrícico y la formación de los primeros ovillos y arbusculos, la planta sintetiza compuestos relacionados con la defensa y las zonas colonizadas se oscurecen y mueren (Allen y col, 1989). Algo parecido sucede en *Medicago sativa*, que a pesar de ser hospedadora de numerosos hongos micorrícicos, desencadena una respuesta hipersensible en las células colonizadas por *Gigaspora margarita*, durante la cual se almacenan compuestos fenólicos e isoflavonoides y finalmente las células se vuelven necróticas y mueren (Douds y col, 1998). Estos resultados confirman que el hongo micorrícico induce la respuesta de defensa en la raíz de la planta hospedadora, pero debe de controlarla e inhibirla durante las interacciones compatibles.

Apoyando esta hipótesis se han encontrado numerosos mutantes en guisante denominados *myc*⁻, donde se bloquean tanto la micorrización como la nodulación en las primeras etapas de penetración. En estos mutantes la micorrización no suele llevarse a cabo y se ha observado una mayor inducción de la respuesta de defensa en la planta. Por ejemplo, en algunos de estos mutantes se produce una deposición de calosa, fenoles y otros componentes en la zona de la pared celular adyacente al apresorio que no se forma en las variedades silvestres (Gollotte y col, 1993; Peterson y Bradbury, 1995). Lo más probable es que la mutación afecte a un supresor de esta respuesta de defensa.

Las nuevas técnicas moleculares permiten realizar estudios generales sobre el estado transcripcional de la plantas en determinados momentos. En el caso de la micorrización, han permitido identificar la expresión de numerosos genes relacionados con la defensa durante la micorrización (Brechenmacher y col, 2004; Güimil y col, 2005; Hohnjec y col, 2005). En maíz, por ejemplo, el 40% de los genes inducidos durante la micorrización lo hacen de forma similar durante las infecciones de hongos patógenos (Paszkowski, 2006). Básicamente, los mecanismos de defensa detectados durante la micorrización se reducen a la activación de algunas proteínas,

cómo enzimas hidrolíticas, antioxidantes, y enzimas relacionadas con la síntesis de flavonoides y proteínas PRs. A continuación se profundizará un poco más en el efecto de la micorrización sobre estas proteínas y la posible función de las mismas durante la micorrización.

● **Enzimas hidrolíticas**

En las raíces micorrizadas solo se han encontrado variaciones en la expresión de unas pocas isoformas de enzimas como quitinasas y β -1,3-glucanasas (Spanu y col, 1989; Lambais y Mehdy, 1993; Blee y Anderson, 1996; Pozo y col, 1998; David y col, 1998; Lambais y Mehdy, 1998). En algunos casos se produce un incremento transitorio en la expresión de quitinasas durante las primeras etapas de la micorrización, seguido de un descenso hasta niveles inferiores a los de las plantas no micorrizadas (Spanu y col, 1989). En otros, se ha detectado una supresión en la expresión de quitinasas durante la micorrización (Vierheilg y col, 1994; David y col, 1998; Lambais y Mehdy, 1998). Lambais y Mehdy estudiaron la supresión de endoquitinasas en raíces de soja por distintas cepas del hongo micorrícico *Glomus intraradices*, concluyendo que el grado de supresión de endoquitinasas es directamente proporcional a la capacidad de infección de la cepa utilizada (Lambais y Mehdy, 1996). Esta hipótesis podría explicar los resultados contradictorios obtenidos entre las distintas especies de plantas y hongos micorrícicos utilizados en cada experimento, puesto que la capacidad infectiva del hongo variará dependiendo de la especie e incluso la cepa a la que pertenezca, así como de la planta hospedara, y por tanto también será diferente la respuesta de la planta frente a cada cepa del hongo.

Posiblemente, la expresión de quitinasas esté relacionada con la formación o degradación de arbusculos, especialmente con la formación puesto que su expresión se ha localizado específicamente en células que contienen arbusculos activos (Blee y Anderson, 1996; Salzer y col, 2000; Bonanomi y col, 2001).

Del mismo modo, se han detectado aumentos en la actividad endocelulasa en raíces micorrizadas de guisante, relacionados con la extensión del AMF en el córtex de la raíz y con la formación de arbusculos (Morales-Vela y col, 2007). En estos casos, su función hidrolítica puede ser la degradación selectiva de moléculas, contribuyendo así a la no activación de la respuesta de defensa de la planta. La ruptura selectiva de los propios polímeros de la pared vegetal impide la liberación masiva de 'elicitors' de respuesta defensiva (tal y como ocurre con la acción de hidrolasas de hongos patógenos). Prueba de ello es la baja producción de enzimas que degradan la pared vegetal por parte del hongo micorrícico (García-Romera y col, 1991; García-Garrido

y col, 1992). Además, se ha detectado la expresión de genes en la planta específicos de la simbiosis MA, cuyos transcritos dan lugar a proteínas de degradación de la pared celular de la planta (Maldonado-Mendoza y col, 2005), y que podrían participar en los procesos de cambio y adaptación de la estructura de la pared celular vegetal, permitiendo al hongo crecer sin dar lugar a una degradación masiva de dicha pared.

● **Enzimas antioxidantes**

También se han descrito incrementos en la actividad de enzimas antioxidantes durante la micorrización, algunos durante la formación del apresorio (Arines y col, 1994; Spanu y Bonfante-Fasolo, 1988; Blilou y col, 2000a). Ciertos aumentos de dicha actividad podrían estar relacionados con la acumulación de peróxido de hidrogeno detectada en las células arbusculadas (Salzer y col, 1999; Fester y Hause, 2005). Probablemente la función de estas enzimas sea regular el desarrollo del hongo una vez ha llegado al córtex. La acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en el citoplasma de células cercanas a las estructuras fúngicas, y en la superficie del hongo, sugiere la participación de ROS en la senescencia de los arbusculos (Fester y Hause, 2005).

● **Enzimas relacionadas con la síntesis de flavonoides**

En raíces micorrizadas se han encontrado incrementos en la transcripción de genes codificantes de la fenilalanina amonioliasa (PAL por las siglas de su nombre en inglés ‘Phenylalanine Ammonia-Lyase’) y de la chalcona isomerasa (CHS por las siglas de su nombre en inglés ‘chalcone isomerase’) (Harrison y Dixon, 1993; Volpin y col, 1994; Blee y Anderson, 1996; Blilou y col, 2000b). Sin embargo, también se han encontrado disminuciones de los niveles transcripcionales del gen *chs* durante la micorrización (Lambais y Mehdy, 1993). También se han detectado descensos en las células arbusculadas de la transcripción de la isoflavona reductasa (IFR), enzima específica de reacciones de defensa, relacionados con la disminución en la acumulación de la fitoalexina medicarpina (Harrison y Dixon, 1993). Por todo ello se cree que la función de la PAL y de la CHS está más relacionada con la síntesis de flavonoides que estimulen el crecimiento del hongo, que con la respuesta de defensa, mientras que la inhibición de la IFR en las células arbusculadas puede ser un síntoma de la inhibición de la respuesta de defensa.

● Enzimas relacionadas con la respuesta a patógenos (PR)

Se ha observado una inducción de ciertas proteínas relacionadas con la respuesta a patógenos PR (denominadas así por las siglas de su nombre en inglés ‘Pathogenesis-Related Protein’) durante la micorrización, pero esta inducción es marcadamente menor a la producida durante la interacción de la planta con patógenos (Gianinazzi-Pearson y col, 1992; Tahiri-Alaoui y col, 1993). Vierheilig y col. ensayaron la evolución de la micorrización en transgénicos de tabaco en los que se sobre-expresaron quitinasas, glucanasas y proteínas PR sin encontrar diferencias en la infección entre las distintas variedades (Vierheilig y col, 1993; Vierheilig y col, 1995), aunque sí una inhibición del crecimiento de hongos patógenos (Alexander y col, 1988; Brogue y col, 1991; Vierheilig y col, 1993). El único gen cuya sobre-expresión inhibió la colonización del hongo micorrízico fue el PR-2, codificante de una β -1,3 glucanasa (Vierheilig y col, 1995). Posiblemente, la supresión de la respuesta de defensa durante la micorrización se realice a distintos niveles, por lo que la sobre-expresión individual de cada uno de estos genes no basta para activar una respuesta de defensa eficaz frente al hongo micorrízico en la planta.

2.6. Bioprotección asociada a la simbiosis micorriza arbuscular

La infección de las plantas por microorganismos no patógenos puede dar lugar a la movilización, acumulación o síntesis de compuestos que contribuyen a la resistencia de la planta, de modo que esta queda ‘sensibilizada’ ante una próxima infección por un microorganismo patógeno, y así puede responder rápidamente presentando mayor resistencia a nivel local y sistémico. A este fenómeno se le denomina **resistencia sistémica inducida (ISR)** por las siglas de su nombre en inglés ‘Induced Systemic Resistance’). La ISR se desarrolla de diferentes formas dependiendo de la planta y del microorganismo inductor de la ISR. En algunas ocasiones se debe a la formación de barreras que restringen el desarrollo del patógeno (por ejemplo por la acumulación de suberina, calosa o lignina en la pared celular), y en otras a la síntesis de componentes antimicrobianos (como especies reactivas del oxígeno o radicales libres, polifenol-oxidasas, quitinasas, β -1,3-glucanasa, ribonucleasas, proteasas o proteínas PR) (Kuc, 2001). Por ejemplo, en el caso de rizobacterias inductoras de ISR, en función de la especie de bacteria, planta y patógeno implicados, la respuesta dependerá de distintas hormonas como el JA o el etileno, y dará lugar a la expresión de distintos genes relacionados con la defensa (Van Loon y col, 1998).

Las micorrizas arbusculares también son capaces de inducir la resistencia en plantas frente a ciertos patógenos de raíces, como hongos (Newsham y col, 1995; Bodker y col, 1998; Cordier y col, 1998; Slezack y col, 2000), nematodos (Vaast y col, 1998; Elsen y col, 2001) o bacterias (García-Garrido y Ocampo, 1988; García-Garrido y Ocampo, 1989). Recientemente también se ha demostrado que la MA ofrece resistencia sistémica a patógenos de hojas, como es el caso del hongo *Alternaria solani* (Fritz y col, 2006) o la bacteria *Xhantomonas campestris* (Liu y col, 2007). Aunque el espectro de patógenos frente a los que ofrece protección es muy amplio, también se han descrito casos en los que no hay efecto (Baath y Hayman, 1983; Baath y Hayman, 1984), o incluso favorece al desarrollo de la enfermedad (Ross, 1972; Davis y col, 1979; Shaul y col, 1999). Posiblemente en estos casos en que aumenta la susceptibilidad a enfermedad en plantas micorrizadas, se deba a la inhibición de la respuesta de defensa por el hongo micorrícico (Guenoune y col, 2001).

El mecanismo mediante el cual la MA induce resistencia no se ha caracterizado hasta ahora. Se han elaborado algunas hipótesis al respecto, la mayoría de ellas basadas en los efectos de la MA sobre el crecimiento de la planta, por lo que la micorrización tendría un papel indirecto en dicha resistencia. Lo que sí está claro es que es necesario un establecimiento completo de la simbiosis MA para que esta sea efectiva (Slezack y col, 2000). A continuación se describen los posibles mecanismos implicados en el efecto bioprotector de la MA.

● Mejora en la nutrición

Como se ha explicado, las MA proporcionan a la planta un mejor estado nutricional, haciéndola más resistente o tolerante a la infección por patógenos. Puesto que el fósforo es el principal mineral transferido a las plantas por los hongos micorrícicos, la influencia de este nutriente sobre la mayor resistencia de las plantas micorrizadas ha sido la más estudiada (Davis y col, 1978; Davis y Menge, 1980). Sin embargo, el incremento en la nutrición fosforada en algunas plantas no ha tenido ningún efecto protector a la infección por hongos como *Phytophthora* y *Fusarium*. Por todo esto, el incremento en la nutrición fosforada no es suficiente para explicar todos los procesos de bioprotección conferida por los hongos MA (Trotta y col, 1996; Caron y col, 1986a; Caron y col, 1986b; Graham y Egel, 1988). Además, al ser las plantas micorrizadas más vigorosas pueden ser un mejor sustrato para el desarrollo de microorganismos patógenos, existiendo casos en los que la MA beneficia al desarrollo del patógeno, sobre todo a patógenos de la parte aérea (Shaul y col, 1999). Se ha postulado que debido a la mejora en su nutrición mineral y a las alteraciones en la fotosíntesis e hidratación de sus hojas, sería lógico pensar que estas plantas son más

tolerantes a la infección por patógenos, además de un mejor sustrato para patógenos obligados (Dehne, 1982). Esta misma razón explicaría otros casos en los que el hongo patógeno se ha dispersado y crecido mejor en raíces y hojas de plantas micorrizadas, pero disminuyendo o incluso anulando los síntomas de la enfermedad (Dugassa y col, 1996; Kjoller y Rosendahl, 1997).

● **Modificaciones en la estructura de las raíces micorrizadas**

Las raíces de muchas plantas cambian su estructura de crecimiento al micorrizarse, en la mayoría de los casos estas raíces se ramifican más y presentan mayor número de raíces cortas y de mayor diámetro que las plantas no micorrizadas (Norman y col, 1996; Schellenbaum y col, 1991; Berta y col, 1993; Berta y col, 1995). La alteración en el patrón de desarrollo de la raíz podría ser la causa de la alteración en la infección por hongos patógenos del suelo. Sin embargo, estudios realizados por Norman y col, concluyeron que los cambios en la estructura de raíces de fresa no están relacionados con la protección a la infección por *Phytophthora* (Norman y col, 1996).

La micorrización también provoca cambios localizados en la raíz, como incrementos en la lignificación de la pared de raíces micorrizadas, lo cual puede actuar como bioprotección frente a la penetración de la raíz por patógenos (Dehne y Schonbeck, 1979; Schwob y col, 1999). Además, la micorrización está relacionada con la activación del metabolismo de fenoles en raíces (Morandi, 1996; Cordier y col, 1998), lo cual se ha relacionado con la resistencia a la infección por hongos como *Fusarium* (Benhamou y col, 1994).

● **Competición por los sitios de infección**

Los hongos patógenos de suelo, los nematodos y los hongos micorrícicos colonizan los mismos tejidos radicales aunque se desarrollan en células corticales separadas, por lo que son competidores directos del espacio (Azcón-Aguilar y Barea, 1997; Cordier y col, 1996; Smith, 1988), lo cual ha demostrado ser una eficiente forma de reducción de la infección del patógeno en numerosas ocasiones (Cordier y col, 1996; Davis y Menge, 1980; Rosendahl, 1985). Cordier y col. demostraron que el patógeno no solo no infecta a las células colonizadas por el hongo micorrícico, sino también a las adyacentes (Cordier y col, 1996). Además, el número de unidades de infección del patógeno determina la extensión de la infección, luego la bioprotección es mayor al disminuir los posibles sitios de entrada por estar ocupados por el hongo

micorrícico, tal y como se ha observado con *Phytophthora* y *Glomus mosseae* (Vigo y col, 2000).

● **Competición por los compuestos carbonados**

El hongo micorrícico consume de un cuatro a un veinte por ciento de los compuestos carbonados sintetizados por la planta (Smith y Read, 1997), e igual que él, los nematodos y hongos parásitos de plantas requieren de estos compuestos carbonados (Azcón-Aguilar y Barea, 1997; Smith, 1988). Aunque no ha sido muy estudiado, es bastante probable que la competencia nutricional sea una de las causas que afecte al desarrollo de patógenos en la raíz, ya que si el hongo micorrícico se establece antes que ellos tendrá un acceso prioritario a los componentes carbonados (Azcón-Aguilar y Barea, 1997).

● **Modificación de la rizosfera**

En las raíces micorrizadas se altera tanto la tasa de respiración, como la liberación de exudados de forma cuantitativa y cualitativa. Esto da lugar a cambios en el pH y en la composición de nutrientes de la rizosfera, los cuales afectan a la composición de los microorganismos que la habitan. Por ejemplo, el número facultativo de bacterias anaeróbicas, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y actinomicetos productores de quitinasas cambian en la rizosfera de las plantas micorrizadas, dependiendo de la planta y el hongo micorrícico (Ames y col, 1984; Meyer y Linderman, 1986b; Paulitz y Linderman, 1989; Waschkies y col, 1994; Marschner y Crowley, 1996; Andrade y col, 1997; Burke y col, 2002). Estos cambios podrían enriquecer a la micorrizosfera de microorganismos antagonistas de patógenos (Azcón-Aguilar y Barea, 1997). Los cambios en la producción de exudados y la alteración del pH en la rizosfera pueden afectar también de forma negativa a la quimiotaxis de muchos patógenos, que en condiciones normales se ven atraídos por los exudados radicales (Graham y col, 1981; Dixon y col, 1989; Marschner y col, 1997). Estos cambios incluso pueden afectar a la reproducción de patógenos (Norman y Hooker, 2000).

● **Activación de la respuesta de defensa**

En el apartado II.2.4.3 se ha visto como los hongos micorrícicos activan la respuesta de defensa en la planta hospedadora. Esta respuesta se genera de forma transitoria y descoordinada, pero su previa activación podría preparar a la planta para responder más rápidamente ante la presencia de un microorganismo patógeno

(Gianinazzi, 1991). Un buen ejemplo de ello se observó en plantas de tomate, donde se relacionó a la micorrización con una respuesta de defensa a nivel local y sistémico frente al ataque de *Phytophthora*. Paralelamente al incremento de resistencia al patógeno, se observó la activación de mecanismos de defensa como: la deposición de calosa en la pared de las células que contenían arbusculos, de PR1a y pectinas no específicas en las paredes de las células alejadas del hongo micorrícico y cercanas a *Phytophthora*; además de la síntesis de nuevas isoformas de quitinasa, quitosanasa, glucanasa y superóxido-dismutasa (Cordier y col, 1998; Pozo y col, 2002).

Una de las características de la ISR inducida por rizobacterias en *Arabidopsis* es el denominado efecto ‘priming’ (Rápida capacidad de respuesta celular frente a la infección de un patógeno). En la mayoría de los casos estudiados, moléculas señal como el JA o etileno participan como mediadores de la respuesta de defensa generada durante la ISR (Van Wees y col, 1999; Conrath y col, 2002; Hase y col, 2003). En el caso de la MA, también se ha observado cierta capacidad de ‘priming’ en la respuesta frente a patógenos, sobre todo en los casos de inducción de resistencia mediante activación de la respuesta defensiva (MIR, de las siglas de su nombre en inglés ‘Micorrhiza Induced Resistance’). Dado que además del efecto ‘priming’, también se han detectado alteraciones en los niveles de JA y Etileno durante la micorrización, se ha sugerido la participación del JA como mediador de la respuesta de inducción de resistencia en plantas micorrizadas (Wasternack y Hause, 2002; Pozo y Azcón-Aguilar, 2007). Por otra parte, la especificidad de la bioprotección en plantas micorrizadas mediada por el mecanismo MIR (hongos necrotróficos principalmente) sugiere la participación de la vía JA/etileno, ya que precisamente esta vía es la activada en plantas frente a este tipo de patógenos (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007).

3. PARTICIPACIÓN DE LAS FITOHORMONAS Y OTRAS MOLÉCULAS SEÑAL EN INTERACCIONES PLANTA-MICROORGANISMO

En su medio natural las plantas interactúan con multitud de microorganismos, algunos de ellos patógenos, y otros beneficiosos que actúan estimulando su crecimiento y potenciando sus defensas naturales. La planta debe actuar ante la interacción con cada uno de estos microorganismos de distinta forma según su naturaleza, lo cual implica generalmente la regulación de la expresión génica y la activación de rutas de señalización molecular mediadas por moléculas señal entre las que destacan las fitohormonas. Principalmente las interacciones entre plantas y microorganismos están relacionadas con la activación de tres rutas de señalización en las que están implicadas las hormonas etileno y ácido jasmónico (JA), además del

ácido salicílico (SA), si bien es cierto que en los últimos años al ácido abscísico está cobrando cierta importancia como molécula señal y reguladora de la respuesta a microorganismos.

Normalmente, tras el reconocimiento del microorganismo, se produce una alteración en la síntesis de las moléculas señal, cambiando por tanto los niveles de dichos compuestos, lo que tras un proceso de percepción desencadena una respuesta que afecta tanto al desarrollo de los mecanismos de defensa, como al desarrollo de los síntomas de la infección. Asimismo, en la respuesta de la planta a cada organismo suelen participar varias rutas de señalización que interactúan entre sí, interviniendo una en la regulación de las otras, o bien compartiendo pasos. La concentración de hormonas y SA, su proporción y coordinación determinarán el tipo de respuesta adecuada para cada microorganismo (Reymond y Farmer, 1998; Devadas y col, 2002; Thaler y col, 2002; Rojo y col, 2003).

Casi todos los conocimientos a nivel molecular que se tienen sobre este proceso se deben al estudio de las respuestas de la planta a la adicción de moléculas señal tras su aplicación exógena, así como al empleo de plantas mutantes alteradas en la producción o percepción de estas moléculas. La mayoría de estos estudios se han realizado sobre interacciones de *Arabidopsis* con microorganismos patógenos que desencadenan una respuesta de defensa. Sin embargo, existen indicios de alteraciones en las mismas fitohormonas, JA y etileno, y del SA durante la micorrización (ver apartado II.2.5.2.1), compartiendo rutas de señalización ambos procesos (Liu y col, 2007), por lo que los conocimientos de su participación durante las interacciones con patógenos pueden ayudar a la comprensión de su participación en la micorrización. A continuación se profundizará más en la participación de las fitohormonas tanto en otras relaciones simbióticas mutualistas, principalmente la nodulación, como en interacciones planta-patógeno. Aunque el SA no se ha reconocido ampliamente como fitohormona, su comportamiento es similar al de este tipo de moléculas, y además afecta a la síntesis o señalización de las mismas, por lo que se incluye en este apartado un resumen de su participación en estos procesos.

3.1. Señalización hormonal en otras interacciones simbióticas mutualistas con plantas

3.1.1. El ácido salicílico

Durante el desarrollo de la planta, el SA actúa como inhibidor del crecimiento y de la germinación de las semillas, prolonga la vida de las flores, facilita la polinización de ciertas plantas e inhibe la síntesis de etileno (Harbone, 1980). En la respuesta de la

planta a la interacción con microorganismos, su principal función es la activación de la respuesta de defensa en interacciones con microorganismos patógenos, principalmente biotrofos, además de ser una molécula esencial en el proceso SAR, pero en el caso de las interacciones simbióticas mutualistas su participación y modo de acción no están muy claros.

En la simbiosis MA el SA parece estar relacionado con la inducción transitoria de la respuesta de defensa en la planta durante las primeras etapas de penetración del hongo MA en la raíz, pues se han observado incrementos en la producción de SA en estas etapas (ver apartado II.2.5.2.1). Una actuación parecida es la que se sugiere para el caso de la simbiosis con las rizobacterias del género *Rhizobium*, pero en este caso se ha relacionado más con el proceso de autorregulación, o regulación de la extensión de la bacteria en la raíz, referida como el número de nódulos formados y el nitrógeno fijado y transferido (Martínez-Abarca y col, 1998; Lian y col, 2000; Van Spronsen y col, 2003), que con la etapa de penetración. El uso de plantas transgénicas NahG (deficientes en su capacidad de acumulación de SA) en leguminosas ha puesto de manifiesto un papel regulador negativo del SA en la formación de nódulos, tanto de tipo indeterminado, como de tipo determinado (Stacey y col, 2006). El mecanismo de acción del SA en el proceso de autorregulación de la nodulación puede estar relacionado con la inducción de la síntesis y secreción de isoflavonoides mediada por SA (Kneer y col, 1999). Ciertos flavonoides y el SA son tóxicos para *Rhizobium*, pero algunas especies como *Rhizobium etli* tienen bombas de expulsión de estas sustancias, con lo cual estas bacterias son más infectivas que el resto (Kneer y col, 1999; González-Pasayo y Martínez-Romero, 2000).

Durante la etapa de penetración en las interacciones compatibles con *Rhizobium*, no se han encontrado incrementos en los niveles de SA, pero sí con especies de *Rhizobium* incompatibles o deficientes en la síntesis del factor Nod (Martínez-Abarca y col, 1998), así como en los mutantes de guisante Sym30, no nodulantes, ni formadores de MA (Blilou y col, 1999). Blilou y col. concluyeron que la alteración de la nodulación y micorrización por mutación del gen *Sym30* provoca un mecanismo de resistencia mediado por el SA, mientras que en interacciones compatibles, la correcta funcionalidad de los genes simbióticos posibilita la activación de un mecanismo regulador de esta respuesta de defensa (Blilou y col, 1999).

El SA se sintetiza por la vía de la fenilalanina amonio-liasa (PAL de las siglas de su nombre en inglés ‘Phenylalanine Amonia-Lyase’) que transforma a la fenilalanina en ácido transcinámico, y en pasos posteriores se formará SA a partir del ácido benzoico por la acción de la ácido benzoico 2-hidroxilasa (BA2H por las siglas de su nombre en inglés ‘Benzoic Acid 2-Hydroxylase’) (Figura II.10). La PAL es una

enzima clave en la ruta de síntesis de flavonoides e isoflavonoides que están relacionados con los procesos de adaptación de la plantas al medio. Se ha comprobado como la PAL es inducida durante la interacción de la plantas con hongos micorrícicos (Harrison y Dixon, 1994; Beyrle y col, 1995; Volpin y col, 1995; Blilou y col, 2000b; Garmendia y col, 2006), y en muchos casos esta inducción está relacionada con incrementos en los niveles de SA (Beyrle y col, 1995; Blilou y col, 2000b). En el caso de la formación de nódulos, ambos parámetros, los niveles de SA y la actividad PAL, se ven incrementados en las mismas etapas (Estabrook y Sengupta-Gopalan, 1991; Martínez-Abarca y col, 1998; Lian y col, 2000; Van Spronsen y col, 2003).

Los pasos intermedios de la ruta de síntesis de SA, desde el ácido transcinámico hasta el ácido benzoico, no están definidos y se han propuesto dos alternativas, una vía oxidativa (similar a la β -oxidación con la participación del acetilCoA), y otra no oxidativa (Yalpani y col, 1993a). A la hora de determinar la síntesis de SA en la planta, es importante tener en cuenta que tanto el SA, por acción de la SA glucosiltransferasa (SAGT de las siglas de su nombre en inglés ‘Salicylic Acid Glucosyltransferase’), como el ácido benzoico, pueden formar conjugados inactivos con la glucosa. Estos conjugados sirven de almacén de estos compuestos, que los libera rápidamente en el momento en que se necesitan (Leon y col, 1993; Yalpani y col, 1993b) (Figura II.10).

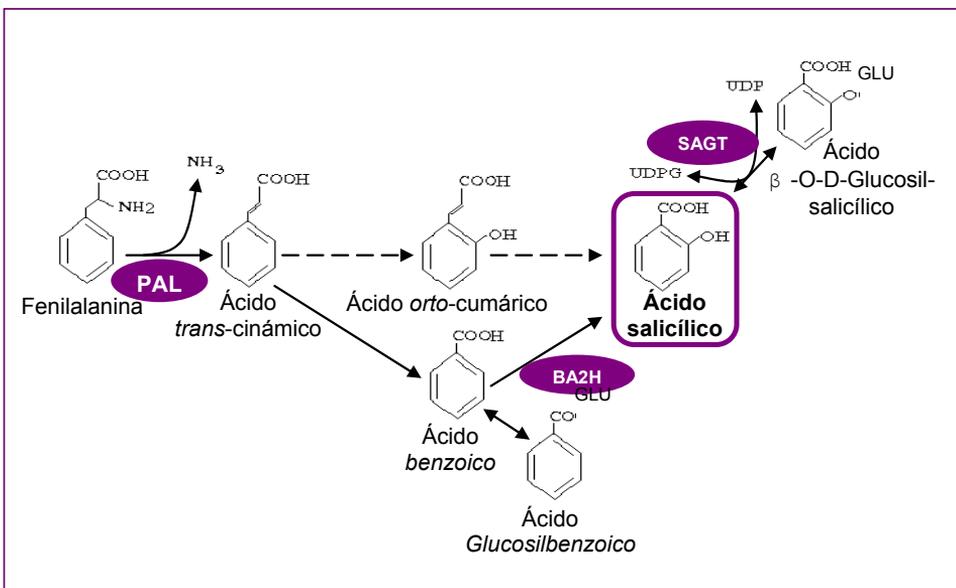


Figura II.10: Ruta de síntesis del ácido salicílico en plantas. Enzimas: PAL (fenil alanina amonioliasa), BA2H (ácido benzoico 2-hidroxilasa), SAGT (ácido salicílico glucosil transferasa).

3.1.2. El ácido jasmónico

Durante el desarrollo de la planta, el ácido jasmónico (JA por las siglas de su nombre inglés: Jasmonic Acid) tiene una participación importante en la señalización entre plantas, la señalización ante estreses abióticos (Farmer y Ryan, 1990; Conconi y col, 1996; Rao y Davis, 2001), la respuesta frente al ataque de herbívoros (Gundlach y col, 1992), la maduración del polen, y la dehiscencia de las anteras (Parthier, 1991; McConn y Browse, 1996). El JA se sintetiza a partir del ácido linoléico (Vick y Zimmerman, 1983), y su metilación da lugar a la formación de metiljasmonato (MeJA), que es un compuesto gaseoso clave en la señalización del JA, y que además induce la síntesis de mismo JA por retroalimentación (Sasaki y col, 2001; Cheong y Choi, 2003) (Figura II.11).

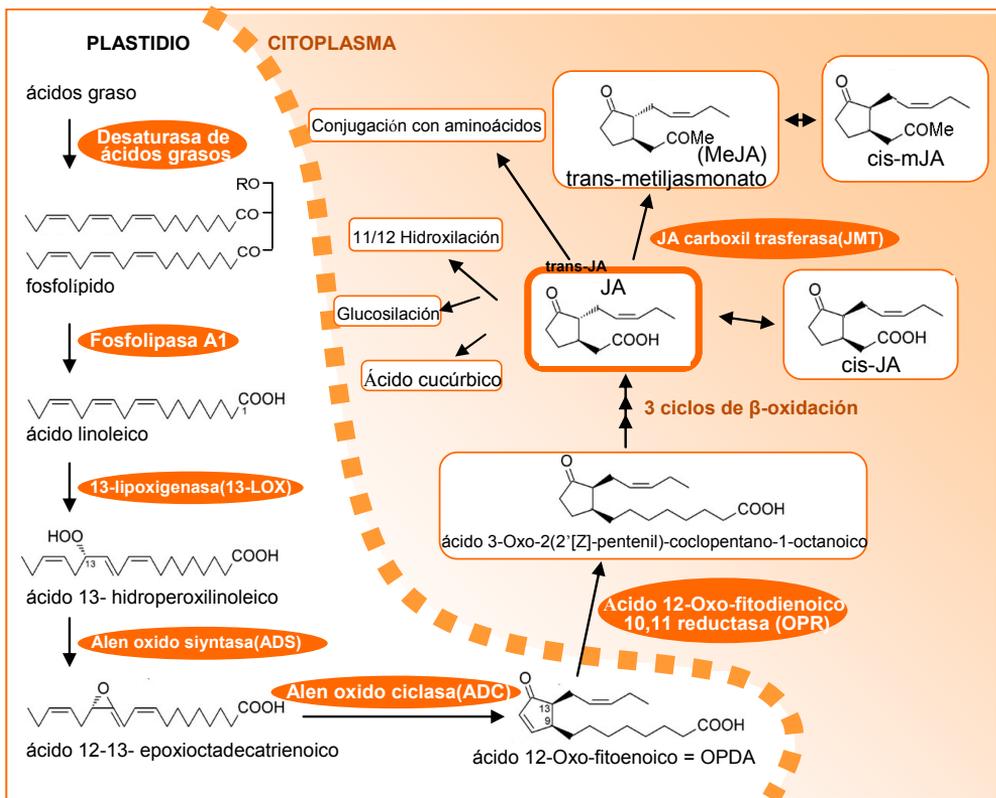


Figura II.11: Ruta de síntesis del ácido jasmónico (JA) en plantas.

Respecto a su relación con microorganismos simbióticos mutualistas, en el caso de la micorrización, la función del JA no está clara y ha sido poco estudiada (ver apartado II.2.4.2.1). Sin embargo, durante la interacción con rizobacterias, esta molécula es clave en la inducción de ISR. Así, la aplicación de MeJA (Metiljasmonato,

molécula inductora de la respuesta al JA) proporciona una protección frente a diversas bacterias parecida a la que proporciona la ISR (Van Wees y col, 1999; Ton y col, 2002b), mientras que plantas mutantes de *Arabidopsis* poco sensibles al MeJA son incapaces de activar la respuesta ISR (Ton y col, 2002a).

El JA y el etileno están estrechamente ligados a la activación de la ISR mediada por *Pseudomonas* (Thomma y col, 2000), respuesta que es independiente del SA (Press y col, 1997; Zhang y col, 2002; Iavicoli y col, 2003; Ryu y col, 2003). Por su parte, el etileno parece actuar después que el JA en este tipo de señalización, puesto que es capaz de activar la ISR en los mutantes *jar1*, con menor sensibilidad al JA (Van Wees y col, 2000). Además los mutantes *isr1*, incapaces de desarrollar la ISR, han resultado ser insensibles a etileno (Ton y col, 2001). A pesar de ello, no se han encontrado variaciones en los niveles de JA o etileno en plantas que expresan la ISR (Pieterse y col, 2000), con lo cual el efecto de las rizobacterias sobre la planta debe de estar más relacionado con incrementos en la sensibilidad de la planta a estas hormonas que con la inducción de su síntesis.

3.1.3. El etileno

El etileno es una hormona vegetal gaseosa que afecta a numerosos procesos del desarrollo de la planta, como son la germinación de semillas, la senescencia de flores y hojas, la abscisión de las hojas, la maduración del fruto, y la respuesta a numerosos estreses abióticos y bióticos (Abeles y col, 1992). Las plantas sintetizan etileno a partir de la metionina en solo tres reacciones enzimáticas (Figura II.12), y esta síntesis está regulada por numerosos factores, debido a la plasticidad funcional del etileno. La enzima limitante y principalmente regulada es la ácido 1-aminociclopropano-carboxílico sintetasa (ACS) (Kende, 1993). La ACS es una enzima lábil y está presente en bajas concentraciones, lo cual refuerza la teoría del alto control al que está sometida la síntesis de etileno. Pertenece a una familia multigénica de enzimas que requieren del cofactor piridoxal 5-fosfato (PLP) (Nakatsuka y col, 1998). Varias isoformas de la ACS se ven reguladas de forma diferente por distintos factores (Oetiker y col, 1997; Barry y col, 2000), por ejemplo, el mismo etileno puede tanto inducirla como reprimirla (Kende, 1993; Nakatsuka y col, 1998; Barry y col, 2000). Así, las isoenzimas Le-ACS2 y Le-ACS4 de tomate se ven reguladas positivamente por él, mientras que inhibe a la Le-ACS6 (Kieber y col, 1993). A nivel post-transcripcional la adición de moléculas liberadas por hongos son capaces de inducir su actividad, y es rápidamente inhibida por la acción de fosfatasas (Spanu y col, 1994). Por otro lado, la actividad quinasa incrementa su actividad, bien haciéndola más

activa metabólicamente, o bien haciéndola más estable y retrasando su degradación (Spanu y col, 1994; Tatsuki y Mori, 2001).

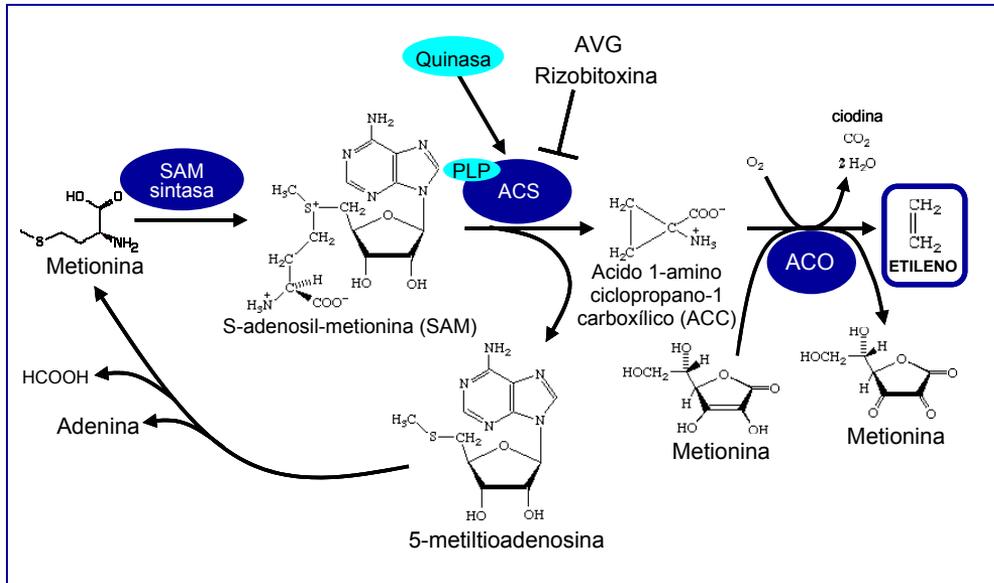


Figura II.12: Ruta de síntesis del etileno en plantas. La enzima ACS (ACC sintasa) necesita del cofactor piridoxal 5-fosfato (PLP) y es activada por fosforilación mediante la acción de quinasa, mientras que es inhibida por la aminoethoxyvinylglycine (AVG) y por la toxina de *Bradyrhizobium*, rizobiotina. La enzima ACO (ACC Oxidasa) es inhibida por el cobalto.

En lo que se refiere a la participación del etileno en la interacción con microorganismos mutualistas, la interacción más estudiada es la llevada a cabo por plantas leguminosas con *Rhizobium*. Durante esta simbiosis se ha demostrado que el etileno interviene en la regulación del desarrollo de los nódulos. La infección por *Rhizobium* produce incrementos en la producción de etileno en algunas leguminosas (Liger y col, 1986; Vanworkum y col, 1995), lo cual se ha interpretado como una inducción inicial de la respuesta de defensa. De hecho, la aplicación de etileno o sustancias que lo liberan, provoca una inhibición en la organogénesis de los nódulos en muchas leguminosas (Drennan y Norton, 1972; Lee y LaRue, 1992a; Penmetsa y Cook, 1997; Nukui y col, 2000), aunque en otras no tiene efecto (Lee y LaRue, 1992a; Smith y col, 1999; Nukui y col, 2000). En concordancia con estos resultados, la aplicación de inhibidores de la síntesis de etileno (como el AVG), o de su percepción (como el ión plata), provocan un incremento en el número de nódulos en muchos casos (Peters y Cristestes, 1989; Lee y LaRue, 1992b; Caba y col, 1998; Nukui y col, 2000), y también restaura el fenotipo de mutantes poco nodulantes como el SYM5, el SYM21 y el SYM16 (Fearn y LaRue, 1991; Markwei y LaRue, 1997; Guinel y Sloetjes, 2000). Sin embargo, no es capaz de restaurar la nodulación en el mutante SYM17 que sobre-produce etileno (Lee y LaRue, 1992a). Probablemente, en respuesta a esta

activación del mecanismo de defensa mediado por etileno en plantas, es por lo que la bacteria *Bradyrhizobium elkanii* sintetiza la toxina rizobiotina, que inhibe la síntesis de etileno para potenciar así la nodulación (Yuhashi y col, 2000). Se ha propuesto que la inducción de quitinasas mediada por etileno es la causante de la inhibición de la nodulación, ya que destruirían al factor Nod (Stachelin y col, 1994; Mellor y Collinge, 1995).

La función del etileno durante la nodulación no está muy clara, podría ser la de controlar el número de puntos de infección por la bacteria (Guinel y LaRue, 1992; Penmetsa y Cook, 1997; Oldroyd y col, 2001). Sin embargo, Lee y LaRue no observaron cambios en el número de puntos de infección tras la aplicación de etileno, pero sí un bloqueo del canal de infección a nivel de las células epidérmicas (Lee y LaRue, 1992a). Según algunos autores, el etileno podría actuar antes de las alteraciones en la concentración de calcio intracelular que ocurre en las células epidérmicas durante la transducción de señales de la nodulación (Oldroyd y col, 2001), igual que lo haría el JA, aunque con efectos diferentes sobre el control del periodo de duración de los picos de calcio (Sun y col, 2006). Por su parte Guinel y Geil postulan que el etileno también actúa afectando a la disposición del citoesqueleto de las células vegetales durante la formación del canal de infección (Guinel y Geil, 2002). Finalmente, otros autores creen que participa en la regulación del desarrollo de los nódulos, concretamente en la determinación de la posición de los nódulos (Zaat y col, 1989; Heidstra y col, 1997).

3.1.4. El ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA de las siglas de su nombre en inglés ‘Abscisic Acid’) es una hormona lipolítica que modula el desarrollo de la planta, la dormancia de las semillas y su germinación, la división celular, así como la respuesta a estreses ambientales provocados por sustancias químicas, alta concentración de sales, sequía, frío, y la alta radiación UV (Zeevaart y Creelman, 1988; McCarty, 1995; Ueno, 1998; Albinsky y col, 1999; Zhang y col, 2006). El ABA se sintetiza a partir de β -carotenoides, y de la misma ruta se sintetizan las giberelinas, los α -carotenoides, y probablemente también las estrigolactonas. Dentro de esta compleja ruta se han definido diversas moléculas capaces de activar o inhibir a enzimas importantes de la misma (Taylor y col, 2005; Cutler y Krochko, 1999; Cowan y col, 1999; Jiang y col, 2004) (Figura II.13).

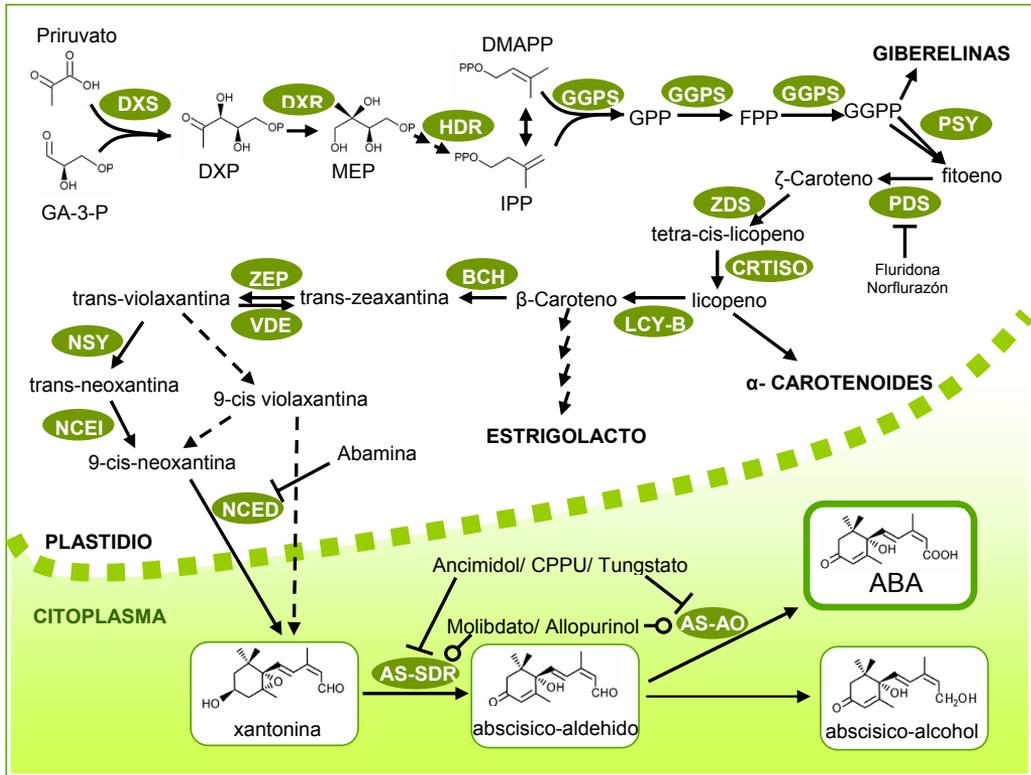


Figura II.13: Ruta de síntesis del ABA en plantas. Las flechas discontinuas se refieren a pasos hipotéticos en la ruta. La fluridona, norflurazón, abomina, ancimidol, CPPU (N-(2.cloro-4piridil)-N-fenilurea), y tungstato son compuestos sintéticos que inhiben a las enzimas PDS, NCED, AS-SDR y AS-AO. El molibdato y el allopurinol son compuestos que activan a las enzimas AS-SDR y AS-AO. Las abreviaturas de los productos se refieren a: GA-3-P, gliceraldehído 3-fosfato; DXP, 1-desoxi-D-xiloglucosa 5-fosfato; MEP, 2-C-Metil-D-eritriol 4-fosfato; IPP, isopentenil difosfato; DMAPP, dimetilalil difosfato; GPP, geranil difosfato; FPP, farnesil difosfato; GGPP, geranilgeranil difosfato; ABA, ácido abscísico. Las abreviaturas de las enzimas se refieren a: DXS, DXP sintetasa; DXR, DXP reductoisomerasa; HDR, hidroximetilbutenil difosfato reductasa; GGPS, GGPP sintetasa; PSY, fitoeno sintetasa; PSD, fitoeno sesaturasa; ZDS, ζ-caroteno desaturasa; CRTISO, carotenoide isomerasa; LCY-B, licopeno β- ciclasa; BCH, β-caroteno hidroxilasa; ZEP, zeaxantina epoxidasa; VDE, violaxantina depoxidasa; NSY, neoxantina sintetasa; NCEI, 9-cis-epoxicarotenoide isomerasa; NCED, 9- cis-epoxicarotenoide dioxigenasa; AS-SDR, ABA específica deshidrogenasa/reductasa; AS-AO, ABA específica aldehído oxidasa.

En los últimos años se ha demostrado que el ABA también participa en la regulación del desarrollo de microorganismos dentro de la planta. Así, se ha observado que el ABA regula el proceso de nodulación en tres niveles distintos: la dispersión de la bacteria medida por el número de nódulos, el crecimiento de los nódulos, y la senescencia de los nódulos. De este modo, la aplicación del ABA inhibe el número de nódulos en la raíz e incluso su iniciación, desarrollo y funcionamiento (Phillips, 1971; Bano y col, 2002; Bano y Harper, 2002). Se ha postulado que esa función del ABA está realmente controlada por la relación ABA/citoquininas en la

raíz (Caba y col, 2000; Bano y col, 2002), de forma que al inicio de la infección por *Rhizobium* se produce una caída en esta relación que se transmite hasta la parte aérea provocando la síntesis de ABA. Esta síntesis de ABA hace aumentar de nuevo la relación ABA/citoquinina que al llegar a la raíz inhibe la formación de los nódulos (Bano y col, 2002). Lo mas probable es que las variaciones de la relación ABA/citoquinina en la raíz no se perciban en la parte aérea por su transporte directo vía floema, sino por el transporte de alguna otra señal (Bano y Harper, 2002).

Por otro lado, tanto la actividad lipooxigenasa (LXO) como la acumulación de ABA se han localizado en el ápice de los nódulos en desarrollo (Wisniewski y col, 1999; Charbonneau y Newcomb, 1985), y a LXO se le ha implicado en los procesos de acumulación y reparto de nitrógeno (Stephenson y col, 1998). También se ha relacionado la aplicación de ABA con incrementos en la actividad LXO en los nódulos en desarrollo, pero no en los maduros (Porta y col, 1999). Estos resultados sugieren una participación de LOX en el crecimiento y el desarrollo del nódulo que podría estar regulada por ABA.

Finalmente, se ha detectado una acumulación de ABA en los nódulos mas maduros y viejos de diversas leguminosas, sugiriendo su participación en la senescencia de los mismos (Watts y col, 1983; Dangar y Basu, 1984; Dangar y Basu, 1987). Los resultados de Charbonneau y Newcomb mostraron variaciones en los niveles de ABA en nódulos de guisante que encajan con estas tres etapas en las que participaría el ABA (Charbonneau y Newcomb, 1985): Primero, se detectó un incremento en los niveles de ABA a las dos semanas del desarrollo de los nódulos, el cual se podría relacionar con la regulación y el control de estos; Seguidamente, se observó una estabilización en los niveles de ABA de dos semanas, que correspondería con el periodo de fijación de nitrógeno; Y finalmente se produjo un segundo aumento en los niveles de ABA que podría relacionarse con la senescencia de los nódulos.

3.2. Señalización hormonal en interacciones planta-patógeno

3.2.1. El ácido salicílico

La activación de la respuesta de defensa mediada por SA está estrechamente relacionado con la activación de la **respuesta sistémica adquirida (SAR** por las siglas de su nombre en inglés ‘Systemic Acquired Resistence’), que es el proceso mediante el cual la planta se protege a si misma de la invasión por futuros patógenos, tras la formación anterior de lesiones necróticas provocadas por otro patógeno. La

SAR suele activarse por un mecanismo de reconocimiento específico entre la planta y el patógeno en el que un receptor de la planta, codificado por un gen *avr* (Avirulencia), reconoce a una molécula del patógeno, codificada por el gen *R* (Resistencia). A este mecanismo se le llama resistencia gen a gen y desencadena una respuesta de defensa basal (Dangl y Jones, 2001). El SA se acumula tanto a nivel local, donde se produce la infección del patógeno, como a nivel sistémico (Ryals y col, 1996; Mur y col, 1996), siendo necesario para la resistencia a diversos patógenos (Delaney y col, 1994). Algunos estudios indican que la acumulación del SA en tejidos no infectados no se debe al transporte del SA desde los tejidos infectados, sino de otra molécula señal que activa la producción del SA a nivel sistémico (Vernooij y col, 1994; Meuwly y col, 1995).

La cadena de señalización de la SAR mediada por SA se ha estudiado en su mayoría con el uso de mutantes de *Arabidopsis*, y gracias a ello sabemos que antes de la acumulación del SA es necesaria la expresión de los genes *eds4*, *5*; *pad4*; *sid1*, *2*; y *cpr1* (Glazebrook y col, 1996; Rogers y Ausubel, 1997; Nawrath y Mettraux, 1999; Clarke y col, 2000). Además, su señalización depende de los genes *npr1*, *lsd1*, *sai1*, *nim1*, *sni1*, *acd5*, *ssi1* y *brl1* (Cao y col, 1994; Dietrich y col, 1994; Delaney y col, 1995; Shah y col, 1997; Rate y col, 1999; Li y col, 1999; Delaney, 2000; Devadas y col, 2002). Con la utilización de dobles mutantes se sabe que la respuesta SAR se produce por dos vías diferentes cuya activación depende del tipo de patógeno, una vía es dependiente del gen *npr1*, y otra independiente (Rate y col, 1999; Shah y col, 1999; Clarke y col, 2000). El uso de dobles mutantes también ha demostrado que la mutación en *sni1* suprime el fenotipo de los mutantes NPR1, y por tanto SNI1 debe de ser un supresor de la expresión de PRs, cuya expresión en la variedad silvestre estaría regulada por NPR1 (Li y col, 1999). El resultado final es la activación de los genes *PR* codificantes de las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR de las siglas de su nombre en inglés ‘Pathogenesis-Related Protein’) (Van Loon y Van Strien, 1999) (Figura II.15).

Se ha comprobado como la PAL, enzima clave en la síntesis de SA, es inducida durante la interacción de la plantas con microorganismos patógenos (Smith-Becker y col, 1998; Zeier, 2005; Ballester y col, 2006), y en muchos casos esta inducción está relacionada con incrementos en los niveles de SA (Smith-Becker y col, 1998; Zeier, 2005). Otra enzima clave en la síntesis del SA es la que cataliza la última reacción por la vía del ácido benzoico, la BA2H (Figura II.10), la cual también se induce en plantas ante la presencia de patógenos como virus (Leon y col, 1993).

3.2.2. El ácido jasmónico

El JA es una hormona altamente volátil que se ha relacionado principalmente con la defensa a insectos, hongos y bacterias, además de la respuesta a heridas en la planta (Gundlach y col, 1992). De hecho, la participación del JA en la respuesta de defensa ante patógenos es de las más estudiadas. Si bien el SA está implicado generalmente en la activación de respuestas defensivas frente a patógenos biotróficos (aquellos que requieren de las células vivas de la planta) (Seo y col, 2001), el JA se relaciona principalmente con la activación de la defensa frente a patógenos necrotróficos (los que se alimentan de los tejidos muertos de la planta). Una de las razones es que el JÁ no induce la respuesta de hipersensibilidad que lleva a la aparición de necrosis y tejidos muertos, los cuales servirían de sustrato a los microorganismos necrotróficos (Govrin y Levine, 2000; Thomma y col, 2001). La utilización de plantas mutantes alteradas en la síntesis o en la percepción del JA (*jar1*, *jai1* y *coi1*), pertenecientes al género *Arabidopsis*, ha servido para demostrar la necesidad del JA en la activación de la respuesta de defensa (Staswick y col, 1998; Vijayan y col, 1998; Thomma y col, 1998; Norman-Setterblad y col, 2000; Berrocal-Lobo y Molina, 2004; Ryu y col, 2004) (Figura II.15), y se han obtenido resultados parecidos en mutantes de tomate (como *def1*, afectado en la síntesis de JA) (Thaler y col, 2004).

El MeJA (inductor de la respuesta a JA y de su síntesis) se ha utilizado en muchos ensayos para investigar el papel del JA en la regulación de la respuesta de defensa, comprobando como la aplicación de MeJA proporciona mayor protección frente a diversos patógenos (Cohen y col, 1993; Thomma y col, 1998; Pieterse y col, 1998; Meir y col, 1998; Kozlowski y col, 1999; Droby y col, 1999; Thaler y col, 2002), además de recuperar fenotipos más susceptibles a la infección de mutantes alterados en la síntesis o en la percepción del JA (Vijayan y col, 1998). Por otro lado, se ha demostrado que la respuesta de defensa mediada por JA frente a algunos patógenos es independiente de la respuesta desencadenada por el SA o el etileno (Thomma y col, 2000; Brader y col, 2001; Buzi y col, 2004).

Frente a microorganismos biotróficos, el efecto del JA no es homogéneo, así se han descrito casos en los que le es indiferente al patógeno (Thomma y col, 1998), y otros en los que el MeJA proporciona protección (Walters y col, 2002). También el JA puede provocar una mayor susceptibilidad a la infección, como con la bacteria patógena *Pseudomonas syringae* (Feys y col, 1994; Kloeck y col, 2001), donde además la correcta señalización del JA llega incluso a ser necesaria para la infección durante sus primeras etapas (He y col, 2004). Sin embargo, estudios realizados con el mismo patógeno y mutantes *jar1*, con menor sensibilidad al JA, y *cev1* que constitutivamente activan la respuesta a JA, demostraron un efecto negativo de la respuesta mediada por

JA sobre su infección (Pieterse y col, 1998; Ton y col, 2002b). Estos resultados contradictorios indican la participación de algún otro factor desconocido en la regulación de respuesta de defensa mediada por JA.

El JA está estrechamente ligado al etileno en la activación de la defensa en plantas, y en muchas ocasiones sus cadenas de señalización se solapan (Penninckx y col, 1998; Pieterse y col, 1998; Van Wees y col, 1999; Thomma y col, 2001; Ellis y Turner, 2001; Berrocal-Lobo y col, 2002). En algunos casos sus interacciones son sinérgicas (Rojo y col, 2003; Lorenzo y Solano, 2005), aunque no siempre estén relacionadas (Buzi y col, 2004). Ambas hormonas son necesarias para la inducción del gen codificante de la defensina *PDF1.2* (Kauss y col, 1992; Kauss y col, 1994), y antes de la inducción de *PDF1.2*, la señalización del JA y del etileno convergen en la inducción de *ERF1* (codificante del factor de respuesta a etileno1), cuya sobreexpresión provoca la inducción de numerosos genes de respuesta a ambas fitohormonas (Lorenzo y col, 2003). Además, la aplicación de ambas hormonas induce también la expresión de defensinas y tioninas, las cuales son inducidas durante la infección por patógenos necrotróficos (Epple y col, 1995; Penninckx y col, 1998; Bohlmann y col, 1998). Esta respuesta de defensa mediada por JA y etileno se produce tanto a nivel local, como sistémico (Clarke y col, 2000) (Figura II.15).

Al contrario que con el etileno, el SA y el JA suelen ser antagonistas. Ciertos patógenos que activan la SAR son incapaces de activar la respuesta de defensa mediada por JA (Devadas y col, 2002; Thaler y col, 2002). Además, análogos funcionales del SA, como INA y BTH, actúan como supresores de la acción del JA (Bowling y col, 1997; Van Wees y col, 1999; Fidantsef y col, 1999), y posiblemente lo hagan a través de la inhibición de su síntesis o de su señalización (Doares y col, 1995; Harms 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; Gupta y col, 2000; Jirage y col, 2001; Clarke y col, 2001). Uno de los factores que median esta inhibición es el factor de transcripción WRKY70 de *Arabidopsis*, que es un activador de los genes de respuesta al SA, e inhibidor de los del JA (Li y col, 2004a). Otro posible punto de interacción está en la proteína NPR1 (Kinkema y col, 2000), que aunque en su localización nuclear no presenta ningún efecto sobre la respuesta a JA, en su localización citosólica se ha propuesto como inhibidor del complejo SCF^{COIL}, el cual regula a los genes de defensa del JA a través de la ubiquitinación y posterior degradación de un regulador negativo de la señalización del JA (Xu y col, 2002; Devoto y col, 2002). Por el contrario Pieterse y Van Loon demostraron que los mutantes *npr1* no solo afecta negativamente a la señalización del SA, sino también a la del JA y etileno (Pieterse y Van Loon, 2004).

A pesar del antagonismo entre SA y JA, esta interacción negativa no se observa en algunas ocasiones frente a patógenos saprofiticos (Thomma y col, 2000), e incluso se produce un efecto aditivo entre ambas hormonas frente a patógenos biotróficos como *Pseudomonas* (Pieterse y col, 1998; Shah y col, 1999; Van Wees y col, 2000).

La compleja relación entre estas hormonas se ha puesto de manifiesto con el análisis de microarrays en *Arabidopsis*, el cual ha permitido identificar un gran número de genes que se expresan de forma común tanto tras el tratamiento con patógenos, como con SA y JA, mientras que con el tratamiento de etileno y patógenos se comparten pocos genes inducidos. La mayoría de los genes de defensa se expresan con el tratamiento común de dos o mas hormonas, mientras que el tratamiento de cada una por separado induce un menor numero de genes (Schenk y col, 2000).

3.2.3. El etileno

Igual que el SA y el JA, el etileno está implicado en la reacción de defensa frente a patógenos (Figura II.15). Se han determinado incrementos en su producción en algunas plantas durante la infección con patógenos (Cristescu y col, 2002), aunque su implicación real se ha determinado en gran parte con el uso de plantas mutantes en la percepción o síntesis. Dependiendo del microorganismo patógeno y de la especie de la planta, la función del etileno puede ser muy diferente. Así, mutantes con una menor sensibilidad al etileno han presentado mayor resistencia a distintos patógenos en distintas especies (Hoffman y col, 1999; Asai y col, 2000; Greenberg y col, 2000), mientras que en otros la insensibilidad a etileno provoca un aumento de sensibilidad al patógeno (Hoffman y col, 1999). Por lo general, el etileno parece inhibir los síntomas de la enfermedad frente a patógenos necrotróficos, mientras que en otros provoca un aumento de la muerte celular.

En el caso de la inducción de la respuesta de defensa gen a gen, es posible una participación del etileno. Se ha encontrado en plantas de tomate la presencia del gen de avirulencia *avrPto* que interacciona con el gen R de patógenos (Scofield y col, 1996; Frederick y col, 1998), y recientemente se ha demostrado como Pto interacciona específicamente con el factor de transcripción Pti4, el cual comparte numerosas similitudes con la secuencia de aminoácidos de las proteínas EREBPs (proteínas de unión a promotores de la respuesta a etileno). Pti4 se induce rápidamente por etileno y es capaz de unirse específicamente a la caja GCC a la que se unen muchas EREBPs, para así inducir la expresión de proteínas PR. La fosforilación de Pti4 por la Pto quinasa hace que esta unión se produzca aún con mayor afinidad (Gu y col, 2000).

Ya se ha comentado en el apartado anterior la participación del etileno en colaboración con el JA en la activación de la respuesta de defensa en planta, y también se ha observado una interacción de la respuesta del etileno con el SA. Así, el etileno es capaz de antagonizar la señalización del SA independiente de NPR1 a través de los genes *opr5* y *opr6* (Clarke y col, 2000). Sin embargo, en algunas interacciones planta-patógeno son necesarias tanto la participación del etileno, como la del SA (Berrocal-Lobo y col, 2002).

● Mecanismo de acción del etileno

El mecanismo de acción del etileno ha sido ampliamente estudiado en *Arabidopsis* gracias al estudio de mutantes alterados en su percepción o señalización, de modo que se ha creado un modelo de la señalización del etileno en *Arabidopsis*, con pasos comunes con otras especies vegetales (Figura II.15). A continuación se describe este mecanismo de acción en *Arabidopsis*, y mas adelante se comentarán algunos datos de su homología con otras especies como el tomate.

En *Arabidopsis* se han encontrado dos tipos de receptores de etileno, bien caracterizados: los del tipo I que incluyen a ETR1 y ETR2, y los del tipo II que incluyen a ERS1, ERS2 y EIN4. Los del tipo I tienen un dominio con actividad histidín-quinasa bien conservado que en el tipo II ha degenerado (Chang y col, 1993; Hua y col, 1995; Sakai y col, 1998; Hua y col, 1998). La actividad histidín-quinasa se ha demostrado que no es necesaria ni para la percepción del etileno, ni para su señalización, por lo que podría estar relacionada con otros procesos de regulación sobre la señalización del etileno. El funcionamiento de estos receptores depende de RAN1, una proteína encargada del transporte del ión cobre, cofactor que se une al extremo amino terminal de los receptores y es necesario para la percepción de la hormona (Woeste y Kieber, 2000). Estos receptores se localizan en la membrana del retículo endoplasmático de la célula, y su extremo carboxilo terminal se encuentra libre en el citoplasma (Chen y col, 2002; Gao y col, 2003). Presumiblemente cuando los receptores no están unidos al etileno se encuentran en su forma activa, de modo que por su dominio carboxilo-terminal se unen al dominio amino-terminal de la proteína CTR1, proteína que tiene mayor afinidad por los receptores tipo I que por los del tipo II (Cancel y Larsen, 2002). Cuando CTR1 se encuentra unido al receptor de etileno, está activo e inhibe los pasos siguientes en la señalización que llevaría a la activación de la respuesta de etileno. Esta inhibición parece mediada por la actividad serín-trehonina-quinasa, localizada en el dominio carboxilo Terminal de CTR1. Por el contrario, cuando el etileno se une a los receptores provoca un cambio de conformación en estos que libera a CTR1 al citosol. La forma soluble de CTR1 es

inactiva, posiblemente por la unión de un dominio regulador negativo de la misma proteína. Al estar CTR1 inactivo, este deja de inhibir los siguientes pasos en la señalización de etileno, y esta respuesta se llevará a cabo (Kieber y col, 1993; Hua y Meyerowitz, 1998; Woeste y Kieber, 2000; Wang y col, 2003; Gao y col, 2003) (Figura II.15).

Después de CTR1 se ha propuesto la participación de un grupo de proteín-quinasas llamadas MAPK (de las siglas de su nombre en inglés ‘Raf-like Mitogen Activated Protein Kinase’) y MAPKKK (de las siglas de su nombre en inglés ‘Raf-like Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase’). Aunque no está muy claro el sentido bioquímico de su participación, podrían estar relacionadas con la bifurcación de las distintas respuestas mediadas por el etileno ante los distintos estímulos (Kovtun y col, 1998; Novikova y col, 2000; Kazuya y col, 2002; Ouaked y col, 2003). Homólogos de las MAPK también se han encontrado en *Medicago* y en tabaco (Kazuya y col, 2002; Kim y col, 2003; Ouaked y col, 2003). Después de estas MAPK se activan los reguladores positivos EIN2, EIN5 y EIN6, y más tarde los factores de transcripción EIN3 y EIL1 (Alonso y col, 1999; Alonso y col, 2003). Los niveles de estas proteínas se ven inducidos por el etileno, aunque la inducción no parece llevarse a cabo a nivel la traducción de ARN, sino a nivel transcripcional (Yanagisawa y col, 2003). Según parece, la degradación de EIN3 se lleva a cabo por medio de una ubiquitin-proteasa, proteasa que se ve inhibida tras el tratamiento con ACC y activada por el tratamiento con glucosa (Yanagisawa y col, 2003). Factores de transcripción parecidos a EIN3 se han encontrado en plantas de judía, tabaco y tomate, y la mayoría de ellos tiene la misma función biológica (Lee y Kim, 2001; Tieman y col, 2001; Rieu y col, 2003). Todos estos pasos en la señalización, a excepción de las MAPKK, son comunes y necesarios para la activación de las distintas respuestas a etileno, además hasta hoy no se ha demostrado que ninguno de estos pasos sea compartido por otra señal distinta del etileno (Figura II.15).

EIN3 y EIL1 inmediatamente se unen a los *EREBP* (de las siglas de su nombre en inglés ‘Ethylene Response Element Binding proteins’), por medio de los cuales se adhieren al promotor del elemento de la respuesta primaria a etileno (PERE) (Riechmann y Meyerowitz, 1998). Uno de los *EREBP* es *ERF1*, el cual también es activado por JA, y lo mas probable es que necesite de la unión de algún factor de transcripción regulado por JA para su transcripción (Solano y col, 1998; Turner y col, 2002). Muchas proteínas *EREBP* regulan la expresión de genes a través de la interacción con la caja-GCC de su promotor, que se encuentra en numerosos genes de respuesta a etileno como el *ERF1* (Ohme-Takagi y Shinshi, 1995). Todos estos

genes codifican proteínas efectoras necesarias para la ejecución de la gran variedad de respuestas a etileno (Figura II.15).

Además de las proteínas descubiertas en *Arabidopsis*, se han encontrado análogos de varios participantes en esta ruta de señalización en otras especies, como receptores de etileno en melón, mango, y tabaco (Gutierrez-Martínez y col, 2001; Terajima y col, 2001; Tejeda-Sartorius y Délano-Fier, 2006), o análogos de EIN3 en tabaco (Kosugi y Ohashi, 2000; Rieu y col, 2003).

En tomate se han descrito seis receptores de etileno, LeETR1, LeETR2, LeETR3, LeETR4, LeETR5 y LeETR6, de los cuales LeETR3 fue descubierto en primer lugar y nombrado inicialmente como NR en el mutante insensible a etileno *Never ripens* (Wilkinson y col, 1995; Zhou y col, 1996; Lashbrook y col, 1998; Tieman y Klee, 1999; Klee y Tieman, 2002). Estructuralmente son similares a los de *Arabidopsis* y al menos en tres de ellos, LeETR4-6, el dominio histidín-quinasa está degenerado, igual en que en los receptores tipo II de *Arabidopsis*. A excepción de LeETR6, por haber sido el último encontrado, la función de los demás como receptores de etileno se ha comprobado, y el que mayor afinidad a etileno presenta es Le-ETR3 (O'Malley y col, 2005). El patrón de expresión de LeETR1-5 se ha analizado durante el desarrollo de la planta y en los distintos tejidos (Figura II.14) (Lashbrook y col, 1998; Tieman y Klee, 1999). Los genes *LeETR4-6* se expresan preferentemente en los tejidos reproductivos, y solo *LeETR3* y *4* son inducidos durante la infección por patógenos (Tieman y Klee, 1999).

	LeETR1	LeETR2	LeETR3	LeETR4	LeETR5
Raíz	☆☆	☆☆		***	****
Brotos de flores	☆☆	☆☆	***	****	****
Fruto verde	***	☆☆	☆☆	****	***
Fruto maduro	***	☆☆	****	****	***
Hojas	☆☆	☆☆	☆☆	*	☆☆
Tratamiento con etileno	☆☆	☆☆	***	☆☆	☆☆
Tratamiento con cepa avirulenta de <i>Xanthomonas</i>	☆☆	☆☆	***	***	**
Tratamiento con cepa virulenta de <i>Xanthomonas</i>	☆☆	☆☆	***	☆☆	☆☆

Figura II.14: Patrón de expresión de los genes de receptores de etileno en tomate LeETR1-LeETR5. Los niveles de expresión: ☆ $2 \cdot 10^{-5} - 9 \cdot 10^{-5}$ %ARNm; ☆☆ $1 \cdot 10^{-4} - 9 \cdot 10^{-4}$ %ARNm; *** $1 \cdot 10^{-3} - 9 \cdot 10^{-3}$ %ARNm; **** $1 \cdot 10^{-2} - 5 \cdot 10^{-2}$ %ARNm. Extraído de (Klee, 2002).

La vida media del etileno una vez unida a los receptores de etileno es de unas 12h (Schaller y Bleecker, 1995), lo cual implica una activación a la respuesta a etileno de demasiado tiempo, por lo que la planta ha de controlar esta activación tan prolongada.

Lo más probable es que lo haga mediante la síntesis de nuevos receptores que inhiban la respuesta a etileno. De este modo la planta controlaría la señalización por el etileno con una rápida respuesta tras la inducción de su síntesis, y una posterior inhibición mediante la síntesis de nuevos receptores. Un hecho que apoya esta hipótesis es la inducción de etileno y posteriormente la de LeETR4 durante la respuesta de hipersensibilidad del tomate a *Xanthomonas* (Ciardi y col, 2001). Inhibiendo la síntesis de novo de LeETR4 en el transgénico LeETR4-AS, y por tanto no inhibiendo la respuesta a etileno, la respuesta a etileno es tal que los daños provocados por la respuesta de hipersensibilidad son mucho mayores que en la variedad silvestre.

Curiosamente, la disminución de la expresión de LeETR3 en plantas de tomate transgénicas LeETR3-AS no provoca importantes cambios en el fenotipo de las mismas, lo que se debe a un efecto compensatorio en la expresión de *LeETR4*. Así, Los niveles de LeETR4 aumentan hasta compensar la ausencia de LeETR3 (Tieman y col, 2000). Por el contrario este efecto no se observa cuando el receptor ausente es LeETR4, mostrando los transgénicos una respuesta constitutiva a etileno. Una posible explicación sería que LeETR4 controla la síntesis de novo de los receptores de etileno en tomate, y por lo tanto su ausencia impide que se produzca un efecto compensatorio por el resto de receptores.

También en tomate se han encontrado otros genes pertenecientes a la ruta de señalización del etileno análogos a los de *Arabidopsis*. Se han encontrado tres genes homólogos a *EIN3*, denominados *Le-EIL* (de 'EIN3-like') (Tieman y col, 2001), y otros genes homólogos a *CTR1* pertenecientes a una misma familia en tomate (Adams-Phillips y col, 2004; Leclercq y col, 2002). A diferencia de *Arabidopsis*, donde solo se ha encontrado un gen *CRT1* que se expresa de forma constitutiva (Kieber y col, 1993), en tomate *LeCTR1* es inducible durante la maduración del fruto (Zegzouti y col, 1999; Leclercq y col, 2002). La presencia de distintos genes de la familia LeCTR1 en tomate y su expresión diferencial puede ser otro medio de regulación para la señalización del etileno.

3.2.4. El ácido abscísico

En el caso de la interacción con ciertos microorganismos patógenos, se ha propuesto que el nivel de ABA es determinante de la susceptibilidad de la planta al patógeno, debido a que la aplicación de ABA incrementa la sensibilidad de la planta a numerosos hongos patógenos (Kettner y Dörffling, 1995; McDonald y Cahill, 1999; Henfling, 1980; Ward y col, 1989; Audenaert y col, 2002). Por otro lado, la infección

por bacterias, virus y hongos patógenos provoca incrementos en los niveles de ABA en los tejidos de la planta infectada (Kettner y Dörffling, 1995; Steadman y Sequeira, 1970; Whenham y col, 1986). Una de las causas del incremento en los niveles de ABA en plantas infectadas por hongos puede ser la síntesis de ABA por el propio hongo, ya que son varios los hongos que sintetizan esta hormona (Assante y col, 1977; Dorffling, 1984; Crocoll y col, 1991; Audenaert y col, 2002), aunque no es la única causa, porque algunos hongos patógenos incapaces de sintetizar esta hormona siguen induciendo la producción de ABA (Audenaert y col, 2002).

Se ha sugerido que el ABA interviene en la regulación de la respuesta de defensa de la planta de forma negativa, y aunque se sabe poco acerca del modo en que lleva a cabo esta función, en algunos casos parece estar relacionado con la inhibición de la respuesta de defensa mediada por JA y Etileno (Anderson y col, 2004), y en otros con la del SA (Audenaert y col, 2002) (Figura II.15). Apoyando la hipótesis de Audenaert y col, los resultados de Ward y col. también demostraron una supresión de la expresión y la actividad de PAL (enzima clave en la síntesis de SA) por el ABA (Ward y col, 1989). Por otro lado, Anderson y col. demostraron que la relación entre el ABA y el etileno es mutuamente antagonista en muchas interacciones patógenas, como también lo es en otros procesos como la germinación de semillas, en los que la falta de etileno incrementa la sensibilidad al ABA (Anderson y col, 2004), o en el desarrollo y crecimiento de la planta, donde los efectos de la carencia de ABA parecen estar provocados en parte por incrementos en etileno (Sharp y col, 2000; LeNoble y col, 2003).

En los últimos años, el papel del ABA como regulador de procesos de respuesta de la planta a estreses bióticos, principalmente al ataque de patógenos, ha tomado relevancia, aunque su función en este sentido es aún bastante desconocida y controvertida (Mauch-Mani y Mauch, 2005). La conclusión de todos estos trabajos es que otros factores, aparte del carácter necrotrófico o biotrófico del patógeno, intervienen en el mecanismo de actuación del ABA en cada interacción planta-patógeno particular, y que el mecanismo de acción del ABA puede deberse en parte a interferencias con otras rutas de señalización (SA, JA o etileno) (Mohr y Cahill, 2007; Adie y col, 2007a), aunque ciertas funciones biológicas relacionadas con la defensa, como la regulación de la apertura de los estomas o la inducción en la síntesis de callosa, han sido relacionadas con la acción directa del ABA (Ton y Mauch-Mani, 2004; Melotto y col, 2006). Se ha sugerido que los niveles de ABA pueden ser claves en la regulación y función que esta hormona pueda tener en los diferentes sistemas planta-patógeno estudiados (Adie y col, 2007a), tal y como se ha demostrado en el caso del Etileno (Pierik y col, 2006).

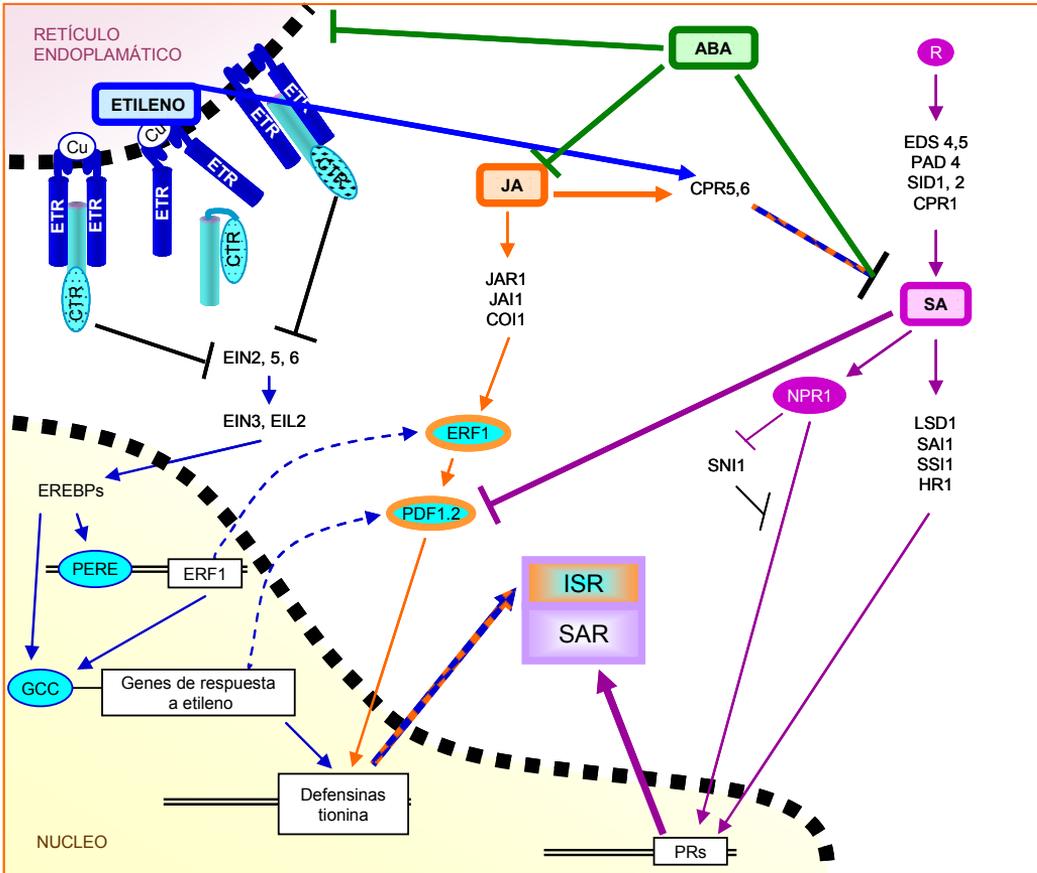


Figura II.15: Ruta de señalización de las distintas hormonas durante la respuesta de defensa de plantas frente a microorganismos patógenos en *Arabidopsis*. En azul se representa la vía de señalización del etileno, en la que participan diversas proteínas y genes; En naranja la de JA; En morado la del SA; En verde la del ABA. La activación de la ruta del etileno y del JA desencadenan en la ISR (Respuesta sistémica inducida). La activación de la ruta de señales del SA desencadena en la SAR (Respuesta sistémica adquirida). En el esquema también se representan las posibles vías de interacción entre las distintas rutas.



III. Materiales y métodos

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

1.1. Variedades de plantas

En el trabajo de esta tesis se han utilizado plantas de tomate, tabaco, arroz, guisante y *Lotus japonicus* de distintas variedades, muchas de ellas alteradas genéticamente. A continuación se detallan las plantas utilizadas y los mutantes o transgénicos de cada variedad.

● Líneas de **tomate** silvestres: *Solanum lycopersicum* L. variedades Moneymarker, Pearson, Floradade, UC82B, Rheinlands Ruhm y un cruce entre Castlemart y MicroTom. Las líneas de tomate con alteraciones genéticas usadas, han sido:

- * **NahG:** Línea transgénica de la variedad Moneymarker En ella se ha insertado el gen *nahG* de *Pseudomonas putida* codificante de la enzima salicilato hidroxilasa, enzima que rompe el ácido salicílico (SA) en catecol, H₂O y CO₂. Estas plantas muestran un fenotipo con una reducida capacidad de acumulación de SA (Brading y col, 2000).
- * **NR:** Mutante natural del receptor de etileno LeETR3 de la variedad Pearson. La incapacidad del receptor mutado NR (LeETR3) de percibir el etileno ocasiona un fenotipo con una marcada reducción en la sensibilidad a etileno por parte de estas plantas (Lanahan y col, 1994).
- * **LeETR4 AS:** Línea transgénica de la variedad Floradade en la que se ha introducido la secuencia completa y en la orientación anti-sentido del gen *LeETR4* (Receptor de etileno). Esta línea presenta un fenotipo incapaz de producir LeETR4 y muy sensible al etileno (Tieman y col, 2000).
- * **LeETR6 AS:** Línea transgénica de la variedad Floradade a la que se ha introducido la secuencia completa en la orientación anti-sentido del gen *LeETR6* (Receptor de etileno). Su fenotipo no está aún bien caracterizado (Facilitada por Harry Klee).
- * **ACD:** Línea transgénica de la variedad UC82B en la que se ha introducido la secuencia completa del gen codificante para la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa (ACD) de *Pseudomonas*, cuya actividad rompe a la molécula precursora del etileno impidiendo así la formación del etileno. La baja producción de etileno no afecta al crecimiento vegetativo de



la planta, pero sí a ciertas funciones fisiológicas del etileno como la maduración del fruto y su senescencia (Klee y col, 1991).

* **Sitiens:** (Cod. LA0575 del Tomato Genetics Resource Center, TGRC), mutante de la variedad Rheinlands Ruhm (col. LA0535 del TGRC) que impide la correcta actividad de la enzima ácido abscísico-específica aldehído oxidasa, última responsable de la síntesis del ácido abscísico (ABA) en plantas (Taylor y col, 1988; Okamoto y col, 2002). En ellas la síntesis de ABA es inferior al 8% de la síntesis en la línea silvestre, y han perdido la capacidad de inducción de síntesis de ABA por heridas, calor, o corrientes eléctricas (Herde y col, 1999).

* **jai 1:** Mutante obtenido del tratamiento de irradiación sobre semillas de tomate. La mutación es recesiva y afecta a la señalización del ácido jasmónico (JA), siendo las plantas homocigotas *jai1/jai1* insensibles a la acción del JA o metil jasmonato (MeJA). Estas plantas no se ven alteradas en el crecimiento vegetativo aunque presentan esterilidad en el órgano reproductor femenino (Li y col, 2001).

Las semillas de tomate variedades Floradade, Pearson y UC82B, con sus respectivas líneas mutantes y transgénicas han sido cedidas por el Dr. Harry Klee (Horticultural Sciences, Universidad de Florida, Gainesville, USA). Las semillas de tomate de las líneas cruce de las variedades Castlemart y MicroTom, con sus respectivas líneas mutantes *jai1*, han sido cedidas por el Dr. Gregg Howe (Universidad del Estado de Michigan).

● Líneas de **tabaco** silvestres: *Nicotiana tabacum* L. variedades Xhanti nc, Samsun NN y Petit Havana SR1. Las líneas transgénicas de tabaco utilizadas han sido:

* **NahG:** Línea transgénica de la variedad silvestre Xanthi nc. En ella se ha insertado el gen *nahG* de *Pseudomonas putida* codificante de la enzima salicilato hidroxilasa, que rompe el ácido salicílico (SA) en catecol, H₂O y CO₂. Estas plantas tienen reducida su capacidad de acumulación de SA (Gaffney y col, 1993).



* **CSA:** Línea transgénica de la variedad silvestre Samsun NN. En ella se han insertado los genes *entC* de *Escherichia coli* y *pmsB* de *Pseudomonas fluorescens* codificantes de las enzimas isocorismato sintasa e isocorismato piruvato liasa respectivamente, ambas responsables de la síntesis de SA en los cloroplastos a

partir del corismato. Estas plantas sobre-producen SA que se acumula en la vacuola en su forma conjugada con glucosa (Verberne y col, 2000).

* **PRms 123, PRms 143 y PRms 351:** Líneas transgénicas de la variedad silvestre Petit Havana SR1. En ellas se ha insertado el gen *PRms* codificante de una proteína relacionada con la patogénesis de maíz y con una alta homología con el grupo PR1 de tabaco (Casacuberta y col, 1991), de modo que estas plantas sobre-expresan *PRms*. La proteína PRms se localiza alrededor de los plasmodesmos y está implicada en el movimiento de sacarosa en la planta (Murillo y col, 1997; Murillo y col, 2003). Estas plantas Presentan un fenotipo resistente a diversos hongos fitopatógenos como *Cercospora nicotianae*, *Fusarium tabacinum* y *Phytophthora nicotianae* (Murillo y col, 2003).

Las semillas de las variedades Xanthi y Samsun NN, con sus respectivas líneas transgénicas, fueron cedidas por el Dr. Linthorst (Universidad de Leiden); Las semillas de la variedad Petit Havana SR1, y las líneas mutantes de la misma, han sido cedidas por la Dr. Blanca San Segundo (Departamento de Genética Molecular del Instituto de Biología Molecular de Barcelona, Centro de Investigación y Desarrollo (CID), CSIC, España).

● Línea de **arroz** silvestre, *Oryza sativa* variedad Senia. Además se uso la línea mutante PRms:

* **PRms:** Línea transgénica de la variedad silvestre Senia en la que se ha insertado el gen *PRms* codificante de una enzima relacionada con la respuesta a patógenos de plantas de maíz con una alta homología con el grupo PR1 de tabaco (Casacuberta y col, 1991), con lo cual estas plantas sobre-expresan *PRms*.



Las semillas de arroz han sido cedidas por la Dr. Blanca San Segundo (Departamento de Genética Molecular del Instituto de Biología Molecular de Barcelona, Centro de Investigación y Desarrollo (CID, CSIC, España).

● Línea de **Lotus japonicus L** silvestre, ecotipo Gifu. Las variedades transgénicas han sido:

* **GK6.7, GI3.8, GB3.B:** Líneas transgénicas del ecotipo silvestre Gifu. En ellas se ha insertado una (GI3.8) o tres (GB3.B) copias del gen *nabG* de *Pseudomonas putida* codificante de la enzima salicilato hidroxilasa, que rompe el ácido salicílico



(SA) en catecol, H₂O y CO₂. Estas plantas tienen reducida su capacidad de acumulación de SA (Stacey y col, 2006).

● Línea de **guisante** silvestres, *Pisum sativum* L. variedad Finale, y líneas mutantes:

* **RisNod 2:** mutantes del gen *Sym19* de la variedad silvestre Finale, incapaz de desarrollar tanto asociaciones micorrízico arbusculares como nodulación con *Rhizobium*. La incapacidad se manifiesta desde las primeras etapas de la interacción (Engvild, 1987).



* **RisNod 19:** mutantes del gen *Sym30* de la variedad silvestre Finale, incapaz de desarrollar tanto asociaciones micorrízico arbusculares como nodulación con *Rhizobium*. La incapacidad se manifiesta desde las primeras etapas de la interacción (Engvild, 1987).

Las semillas de las plantas de guisante de la variedad Finale, y las líneas mutantes de esta variedad, han sido cedidas por el Dr. Borisov (Instituto de Investigación en Microbiología agrícola, San Petersburgo, Rusia), y por el Dr. Duc (INRA, Dijon, Francia).

1.2. Cultivo de plantas

1.2.1. Esterilización y germinación de semillas

Las semillas se esterilizaron en superficie, sumergiéndolas en una solución de lejía (hipoclorito de sodio) con una concentración de cloro activo de 1,75 % (p:v), durante 15 minutos. Tras enjuagarlas con agua estéril de 3-4 veces, se sumergieron en una solución de H₂O₂ al 7% durante otros 15 minutos. Posteriormente se enjuagaron bien con agua estéril y se dejaron en imbibición durante al menos hora y media. Transcurrido este tiempo y en condiciones asépticas, las semillas se extendieron sobre papel de filtro húmedo y en placas de petri, donde germinaron tras incubarlas en oscuridad y a 25°C durante dos o tres días. Una vez germinadas, las semillas se trasladaron a semilleros de vermiculita estéril.

Las plántulas de tabaco permanecieron en los semilleros de 4 a 5 semanas antes de su trasplante a las macetas, mientras que las de tomate, arroz, y guisante estuvieron solo de 1 a 2 semanas antes de ser transplantadas. La selección de plántulas transplantadas a maceta se realizó procurando la mayor homogeneidad en el grado de desarrollo.

La esterilización de las semillas de *L. japonicus* presentó ciertas particularidades en relación al resto de plantas. En concreto, las semillas fueron escarificadas en H₂SO₄ durante 3 minutos, y una vez eliminado cuidadosamente el ácido, lavadas con agua estéril varias veces. Posteriormente se esterilizaron en superficie con una solución de lejía (hipoclorito de sodio) con una concentración de cloro activo de 0,5 %, y Tween 20 al 0,02% durante 20 minutos. Seguidamente se enjuagaron bien con agua estéril y se dejaron en imbibición durante al menos hora y media. Transcurrido este tiempo y en condiciones asépticas, las semillas se extendieron sobre papel de filtro húmedo y en placas de petri, donde germinaron tras incubarlas a 22°C y en luz durante siete días.

1.2.1.1. Selección de semillas de los mutantes *jai1/jai1*.

La mutación recesiva *jai1* causa esterilidad en las flores femeninas de las plantas homocigotas para la mutación, por lo que las semillas tuvieron que seleccionarse de la generación F₂ (Li y col, 2004b). Las plántulas de los homocigotos recesivos e insensibles al ácido jasmónico (JA), *jai1/jai1*, y los heterocigotos (*Jai1/jai1*) u homocigotos dominantes (*Jai1/Jai1*) de fenotipo normal y sensibles a JA, se distinguieron mediante la observación del efecto de una solución 1mM de metil jasmonato (MeJA) sobre las semillas germinadas. La solución de MeJA se preparó disolviendo primero MeJA en etanol, siendo el volumen de etanol el 0,75% del volumen final, y añadiendo después agua destilada hasta el volumen final. El MeJA se aplicó cuando el hipocotilo ya había emergido, y la raíz tubo al menos 1cm de longitud. Las semillas germinadas se mantuvieron en la solución de MeJA durante 1-1,5 días hasta que se diferenciaron claramente ambos fenotipos: en ³/₄ de las plantas, de fenotipo normal y sensible, se inhibió el crecimiento de la raíz y se produjo una acumulación de antocianinas en su hipocotilo, dándole un color violáceo; mientras que ¹/₄ de las plántulas, insensibles y homocigotas *jai1*, no se afectaron y mostraron un crecimiento normal.

1.2.2. Sustrato de cultivo de plantas

El sustrato utilizado en prácticamente todos los ensayos fue una mezcla de suelo:arena:turba:vermiculita en proporciones 1:1:1:1 (v:v). La arena utilizada fue arena de cuarzo de menos de 2mm. La arena y la vermiculita se lavaron y secaron, y posteriormente se esterilizaron junto a la turba en autoclave durante 20 minutos a 120°C, con el fin de eliminar todos los microorganismos y propágulos microbianos que pudieran interferir en los ensayos.

El suelo, procedente de la finca experimental de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC, Granada), presentaba las características mostradas en la tabla III.1. Antes de mezclarlo con el resto de los componentes del sustrato, el suelo se tamizó y se esterilizó por tinalización bajo vapor fluente durante tres días consecutivos, 1h a 100°C cada 24 h. De este modo se eliminaron todos los propágulos de microorganismos del suelo que pudieran interferir en los ensayos, pero sin degradar sus propiedades físico-químicas. El tamizado se hizo en dos pasos, primero con una maya de 1cm de luz para eliminar las partes más gruesas y después con otra de 4mm.

Tabla III.1: Características del suelo

pH en agua	8,1
Proporción de materia orgánica	1,81%
Concentración de nutrientes (mg/kg)	
Fósforo (extraíble con NaHCO ₃)	6,2
Nitrógeno	2,5
Potasio	132
Textura del suelo	
Arena	35,8%
Limo	43,6%
Arcilla	20,5%

1.2.3. Condiciones de cultivo

Una vez en maceta, las plantas se cultivaron bajo condiciones controladas de luz, humedad y temperatura. El periodo de luz/oscuridad fue de 16/8 horas, con una alternancia de temperatura de 25°C/19°C respectivamente. La humedad relativa fue del 50%, y la intensidad de la luz de 450 μmol de fotones $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, con una longitud de onda de 400-700nm.

Las plantas se regaron tres veces por semana y, dependiendo del tamaño de la planta, una o dos de los riegos se hicieron con 20ml de la solución nutritiva de Hewitt cuya composición se muestra en la tabla III.2 (Hewitt, 1952). El riego se realizó por capilaridad con el fin de no alterar las propiedades físico-químicas del sustrato. Para las plantas inoculadas con el hongo micorrícico se aplicó la solución nutritiva Hewitt modificada (con $\frac{1}{4}$ de la concentración de PO₄H₂Na original) con dos objetivos: compensar el aporte nutritivo de fósforo en las plantas no micorrizadas respecto de

las micorrizadas, y a la vez evitar que una mayor concentración de fósforo en el suelo inhiba el desarrollo de la micorrización.

Tabla III.2: Solución Hewitt

	Concentración (μM)	Solución madre (g/100 ml)	Volumen (ml) de sol. madre para 1l
KNO_3	$2,99 \cdot 10^3$	3,03	10
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	$8,63 \cdot 10^3$	7,08	20
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$1,49 \cdot 10^3$	1,84	20
$\text{Na H}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (*)	$1,33 \cdot 10^3$	2,08	10
EDTA-Fe (II)	67	0,25	10
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	9,86	0,22	1
H_3BO_3	30,08	1,86	0,1
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,96	0,24	0,1
$\text{ZnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,47	0,29	0,1
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,12	0,03	0,1

(*)Para plantas micorrizadas se aplicó $\frac{1}{4}$ de la concentración de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
El pH se llevó a 7 con una solución de NaOH al 10%

1.2.4. Tratamientos específicos de los cultivos

Dependiendo del ensayo, los distintos cultivos fueron tratados de la siguiente forma:

- **Cultivos de arroz:** Debido al alto requerimiento nutricional de las plantas de arroz, las plántulas fueron tratadas durante su crecimiento en el semillero con la solución Hewitt descrita en la tabla III.2 modificada con una cuádruplo de la concentración de EDTA-Fe (II). Además, una vez preparada la mezcla de sustrato se homogenizó con carbonato cálcico (1g de CO_3Ca /kg de sustrato), fosfato disódico (0,58g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ /kg de sustrato) y nitrato potásico (0,3g de KNO_3 /kg de sustrato). Posteriormente se humedeció el suelo y se dejó reposar una semana antes de repartirlo en las macetas. Una vez transplantadas las plantas se trataron con la misma solución Hewitt modificada, con una cuádruplo de la concentración de EDTA-Fe (II).

- **Cultivo de los mutantes de tomate *Sitiens*:** Debido a la casi nula resistencia de estos mutantes al estrés hídrico (Taylor y col, 1988), su parte aérea se pulverizó todos los días con agua para prevenir su desecación.

● **Cultivos con altas concentraciones de fosfato:** Después de preparar la mezcla de sustrato, se homogenizó con fosfato disódico en distintas concentraciones según el tratamiento: 150ppm (1,73g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ /kg de sustrato) y 300ppm (3,46g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ /kg de sustrato).

● **Tratamiento con tiosulfato de plata ($\text{Ag}_2\text{S}_2\text{O}_3$, silver thiosulphate o STS):** El STS se aplicó tras la primera semana de inoculación del hongo micorrícico. Se regaron las macetas dos veces por semana con 20-40ml de solución 50 μM STS según el tamaño de la planta. La solución se preparó a partir de una solución madre de STS 40mM a pH 7, la cual se obtuvo agregando gota a gota una solución de nitrato de plata (0,34g de AgNO_3 en 25ml de H_2O - milliQ), a otra ya preparada y en agitación de tiosulfato sódico (1,98g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 25ml de H_2O - milliQ). La disolución de STS se preparó protegida de la luz y justo antes de cada tratamiento, previniendo la posible precipitación del STS. Los tratamientos control, sin STS, de los mismos ensayos se regaron con el mismo volumen de H_2O -milliQ con pH 7.

● **Tratamientos con ethephon ($\text{C}_2\text{H}_6\text{ClO}_3\text{P}$, ácido 2-cloroetilfosfónico o CEPA):** Pasada una semana de la inoculación del hongo micorrícico, se aplicaron diluciones 30 μM y 70 μM de 20ml de ethephon (Sigma) por maceta y a razón de dos veces por semana. La dilución de ethephon se preparó en agua destilada y posteriormente se llevó a pH 7. El ethephon al encontrarse en un pH superior a 3,5 sufre una reacción fisicoquímica que libera etileno, ácido fosfórico y cloro; Por esta razón, para prevenir una posible inhibición de la micorrización por el ácido fosfórico liberado en los tratamientos con ethephon, los tratamientos control de los mismos ensayos se regaron con diluciones de concentraciones equivalentes de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada, y pH 7.

● **Tratamientos con ácido abscísico (ABA):** Inicialmente se preparó una solución madre de 250ppm (0,94mM) de ABA (Sigma-Aldrich, Steinhein) a pH 7, en agua destilada con el 1% de etanol y 0,1% de tritón X-100 (sigma). Para la preparación de la solución madre se disolvió el ABA en el etanol, después se añadió el tritón, y finalmente se agregó el agua destilada y se ajustó el pH. La aplicación se realizó pasada una semana del trasplante las plántulas a maceta, regando con una solución de 40 μM , 50 μM o 100 μM ABA, dependiendo del experimento, dos veces por semana, aplicando de 20 a 40ml cada vez en función del tamaño de la planta. Los tratamientos control, sin ABA, de los mismos ensayos se regaron con el mismo volumen de diluciones a partir de una solución madre de agua destilada con el 1% de etanol y 0,1% de tritón X-100, y llevada a pH 7.

- **Tratamientos con metil jasmonato (MeJA):** Se preparó una solución madre de MeJA (Aldrich) 0,5mM a pH 7, en agua destilada con Tween 20 al 0,01%. La aplicación de MeJA se realizó pasada una semana de la inoculación con el hongo micorrízico, dos veces por semana y de dos formas: Pulverizando sobre la parte aérea de la planta con diluciones de la solución madre de MeJA a concentraciones de 0,0 μ M, 0,5 μ M, 5 μ M, 50 μ M y 500 μ M; Y como solución sobre el sustrato, de 20 a 40ml según el tamaño de la planta, a las concentraciones 0,5 μ M, 5 μ M y 50 μ M. Para los tratamientos control, sin MeJA, se aplicaron diluciones de una disolución madre de agua destilada con Tween 20 al 0,01% y con un pH 7.
- **Tratamientos con ácido salicílico (SA):** La aplicación de SA se realizó como solución de 25ml sobre el sustrato a la concentración 1mM. Dicha dilución se obtuvo a partir de una solución madre 10mM en agua destilada a pH 6,5, que se preparó disolviendo el SA previamente en un volumen de etanol del 0,1% del volumen final. Los tratamientos control se regaron con el mismo volumen de agua destilada a pH 6,5, con igual proporción de etanol.

1.2.5. Cultivo hidropónico

En experimentos dedicados a la obtención de ADN copia (ADNc) a partir de plantas tratadas con ácido salicílico, se utilizó un cultivo hidropónico en solución Hewitt descrita en la tabla III.2, suplementada con 1mM de ácido salicílico (Preparado en un stock 30mM en tampón KH_2PO_4). La solución nutritiva se repartió en tubos de ensayo estériles de 40ml de volumen a razón de 15ml por tubo. En cada tubo se colocó una tira de papel de filtro suficientemente larga como para sobresalir por encima de la solución, y así servir de soporte a una semilla estéril y a la plántula germinada. Los tubos se taparon con algodón y se autoclavaron a 120° durante 20 minutos, para así eliminar posibles contaminantes en el cultivo. Para evitar que la luz incida directamente sobre las semillas, y las raíces una vez germinadas estas, los tubos se cubrieron en su mitad inferior con un papel opaco. Las plantas se cultivaron bajo condiciones controladas de luz, humedad y temperatura. El periodo de luz/oscuridad fue de 16/8 horas, con una temperatura de 25°C/19°C respectivamente. La humedad relativa fue del 50%, y la intensidad de la luz de 450 μmol de fotones $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, con una longitud de onda de 400-700nm.

2. CULTIVO CON EL HONGO MICORRÍCICO

2.1. Inóculo de *Glomus intraradices*

El hongo micorrícico utilizado en la mayor parte de los ensayos fue *Glomus intraradices* (DAOM 197198), perteneciente al grupo A de la familia *Glomeraceae*. El hongo se cultivó en un sistema monoxénico con raíces transformadas de zanahoria en el medio de cultivo M (composición se muestra en la tabla III.3) (Chabot y col, 1992).

Tabla III.3: Medios M y MW

	Concentración			Preparación de 500ml	
	M (g/l)	MW (g/l)	Soluciones 1000X(g/l)	M (500ml)	MW (500ml)
Macro-nutrientes					
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,731	0,731		0,365g	0,365g
KNO ₃	80 · 10 ⁻³	80 · 10 ⁻³		40 · 10 ⁻³ g	40 · 10 ⁻³ g
KCl	65 · 10 ⁻³	65 · 10 ⁻³		32 · 10 ⁻³ g	32 · 10 ⁻³ g
KH ₂ PO ₄	4,8 · 10 ⁻³	-		2,4 · 10 ⁻³ g	-
Na ₂ SO ₄ anhidro	-	0,199		-	99 · 10 ⁻³ g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	-	19 · 10 ⁻³		-	9,5 · 10 ⁻³ g
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0,288	0,288		0,144g	0,144g
EDTA-NaFe	8 · 10 ⁻³	8 · 10 ⁻³	8	0,5ml*	0,5ml*
KI	0,75 · 10 ⁻³	0,75 · 10 ⁻³	0,75	0,5ml*	0,5ml*
Micro-elementos					
MnCl ₂	6 · 10 ⁻³	6 · 10 ⁻³	6	0,5ml*	0,5ml*
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2,65 · 10 ⁻³	2,65 · 10 ⁻³	2,65	0,5ml*	0,5ml*
H ₃ BO ₃	1,50 · 10 ⁻³	1,50 · 10 ⁻³	1,5	0,5ml*	0,5ml*
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,13 · 10 ⁻³	0,13 · 10 ⁻³	0,13	0,5ml*	0,5ml*
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	2,4 · 10 ⁻⁶	2,4 · 10 ⁻⁶	2 · 10 ⁻³	0,5ml*	0,5ml*
Vitaminas					
Glicina	3 · 10 ⁻³	3 · 10 ⁻³	3	0,5ml*	0,5ml*
Tiamina	0,1 · 10 ⁻³	0,1 · 10 ⁻³	0,1	0,5ml*	0,5ml*
Piridoxina	0,1 · 10 ⁻³	0,1 · 10 ⁻³	0,1	0,5ml*	0,5ml*
Ácido nicotínico	0,5 · 10 ⁻³	0,5 · 10 ⁻³	0,5	0,5ml*	0,5ml*
Mio-inositol	50 · 10 ⁻³	50 · 10 ⁻³	50	0,5ml*	0,5ml*
Sacarosa	10	30	-	5g	15g
pH 5,5 (ajustado con soluciones al 10% de KOH/HCl)					
Gel-Gro	4	4	-	2g	2g

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

*volumen tomado de las soluciones 1000X

La inoculación de las plantas crecidas en maceta de 250ml se hizo agregando un trozo del medio de cultivo monoxénico de *G. intraradices* a cada maceta. El inóculo contenía una media de 50 esporas y trozos de raíz de zanahoria micorrizada. A los controles no inoculados con el hongo se les agregó un trozo de medio de cultivo MW con raíces de zanahoria transformadas, pero sin el hongo micorrízico, cuya composición se muestra en la tabla III.3.

En ciertos experimentos se utilizó un sistema de micorrización por compartimentos (Figura III.1), en el cual el inóculo provino de plantas de cebolla previamente micorrizadas, obteniendo así un micelio mucho más infectivo. Las raíces de cebolla se dejaron crecer de seis a ocho semanas en un compartimento central de 390cm³ con el inóculo de *G. intraradices* proveniente del cultivo monoxénico, hasta que alcanzaron un alto nivel de micorrización. Después se unieron los dos compartimentos con las plantas a ensayar a ambos lados del compartimento de las cebollas. Cada compartimento con las plantas problema estaba dividido en otros 5 compartimentos menores de 63cm³ y con 1 plántula cada uno, teniendo un total de 10 plantas problema. El compartimento de las plantas de cebolla pre-infectadas se separó de los de las plantas problema por una maya de nylon de 60 micras de luz, de modo que se permitió el paso de las hifas de un compartimento a otro, pero no el de raíces (Figura III.1). Los tratamientos control no micorrizados se cultivaron de la misma forma, pero en lugar de inocular las plantas de cebolla con el cultivo del hongo micorrízico y raíces transformadas, a las plantas de cebolla se le añadió la misma cantidad del medio de cultivo MW con raíces transformadas sin micorrizar. Este sistema permitió una colonización rápida y más sincronizada de las plantas problema.

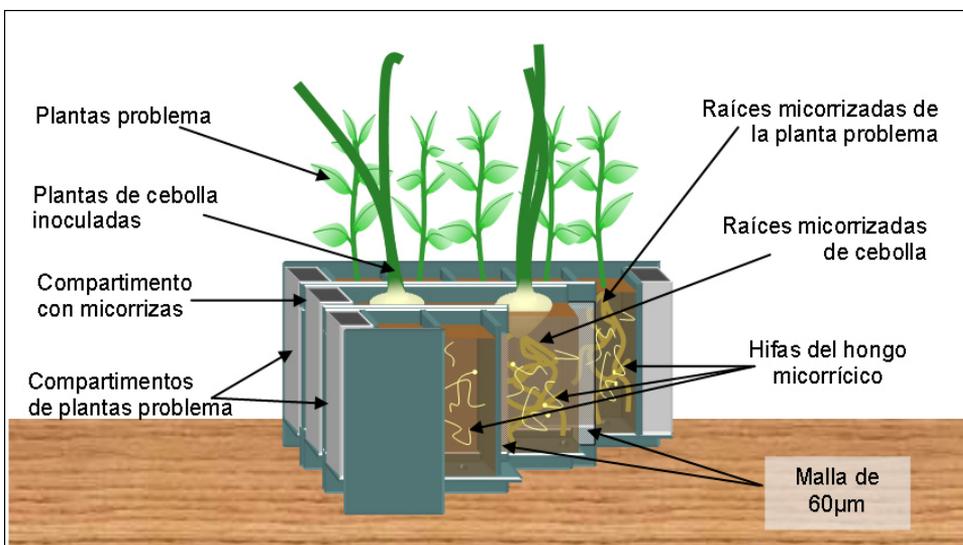


Figura III.1: Sistema de inoculación por compartimentos.

2.2. Inóculo de *Glomus mosseae*

En algunos ensayos se utilizó el hongo micorrízico *Glomus mosseae* (BEG 12; La Banque Européenne des Glomales), perteneciente al grupo A de la familia *Glomeraceae*. El inóculo utilizado fue una mezcla de suelo, esporas, micelio y fragmentos de raíces colonizadas por el hongo micorrízico, presentando el suelo de 25-35 esporas/g, y las raíces una infección de 60-75% de longitud. Para la inoculación de las plantas se utilizó un sistema por compartimentos igual al utilizado con *G. intraradices*, en el cual el inóculo provino de plantas de cebolla vivas y previamente micorrizadas, de modo que el inóculo fue mucho más infectivo (apartado III.2.1, figura III.1).

2.3. Tinción y determinación de la colonización del hongo micorrízico

A lo largo de los ensayos se realizaron varias cosechas en tiempos consecutivos, y en cada una de ellas se detectó la presencia del hongo micorrízico en las raíces mediante la observación de las mismas en la lupa, previa tinción histoquímica de las estructuras fúngicas. En cada cosecha las raíces fueron troceadas en fragmentos de aproximadamente 1 centímetro de longitud, mezclándolos bien hasta tener una mezcla lo mas homogénea posible entre las distintas zonas de la raíz. De estos trozos se seleccionó una porción representativa del total de la raíz para tener una muestra significativa de la misma. La observación de la micorrización fue posible gracias a la tinción de las estructuras fúngicas con las distintas metodologías que se describen a continuación:

2.3.1. Tinción del hongo en raíces micorrizadas con azul tripán.

Se basa en la tinción de la quitina de las paredes del hongo con azul tripán, según la metodología de Phillips y Hayman (1979), de modo que todas las estructuras fúngicas se tiñen de azul oscuro, distinguiéndose con facilidad. Para la tinción, las raíces se incubaron a 100°C durante 15 minutos en una solución de KOH al 10% para hidrolizar las paredes celulares de la raíz, transcurrido este tiempo las raíces se enjuagaron tres o cuatro veces con agua corriente y se incubaron 2 minutos más en HCl 0,1N para neutralizar los restos de KOH. Seguidamente se incubaron las raíces con la disolución del colorante azul trypan (Sigma) al 0,5% en ácido láctico durante 15 minutos a 100°C. Terminado el proceso se retiró la disolución con el colorante y las raíces se conservaron en ácido láctico (Phillips y Hayman, 1970).

2.3.2. Cuantificación del porcentaje de raíz micorrizada y puntos de infección

El nivel de infección en las raíces micorrizadas se determinó de dos formas, una de ellas da información del tanto por ciento de raíz infectada respecto del total de la raíz, y la otra es una medida de la intensidad y frecuencia de la micorrización de la raíz (ver apartado III.2.2.3). La primera determinación se realizó según el método descrito por Giovannetti y Mosse (Giovannetti y Mosse, 1980). Siguiendo esta metodología los trozos de las raíces ya teñidas se tendieron en placas de 10x10cm² divididas en cuadrículas de 1,2cm de lado. El número de cruces de la raíz con las líneas de la cuadrícula es directamente proporcional a la longitud de la raíz en la placa, según la fórmula de Newman (Newman, 1966), y del mismo modo el número de cruces de raíz micorrizada con la cuadrícula es directamente proporcional a la longitud de la raíz micorrizada. Por lo tanto el número de cruces de la raíz micorrizada multiplicado por 100, entre el número de cruces del total de la raíz, dio como resultado el tanto por ciento de la longitud de la raíz colonizada respecto al total.

Esta metodología también se utilizó para determinar el porcentaje de puntos de infección como el tanto por ciento de raíz donde se localizó un punto de entrada respecto del total de raíz, entendiendo como punto de entrada a cada apresorio que ha dado lugar a la formación de hifas intraradicales.

2.3.3. Determinación de frecuencia e intensidad de micorrización y de arbusculos

Para llevar a cabo un estudio más exhaustivo del desarrollo de la micorrización se realizó un conteo de las estructuras fúngicas en microscopio (10X y 40X) según la metodología de Trouvelot y col. (Trouvelot y col, 1986). Para ello se montaron 30 trozos de las raíces teñidas con 'trypan blue' sobre un porta-objetos, y se cuantificó tanto la proporción de estructuras fúngicas (dando valores de 0 a 5, según el grado de ocupación del fragmento de raíz por el hongo), como la proporción de arbusculos (con valores de 0 a 3, según la ocupación de arbusculos en el fragmento) (Figura III.2). Finalmente mediante la aplicación de las fórmulas estadísticas expresadas en la figura III.3, y calculadas con la ayuda del programa MYCOCALC, se obtuvieron los siguientes datos: frecuencia de micorrización (F%), intensidad de micorrización en el sistema radical (M%), intensidad de micorrización por fragmento (m%), abundancia de arbusculos en el sistema radical (A%), y abundancia de arbusculos en la zona

colonizada ($a\%$). Para más información visitar la página web: <http://www.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocal-prg/download.html>.

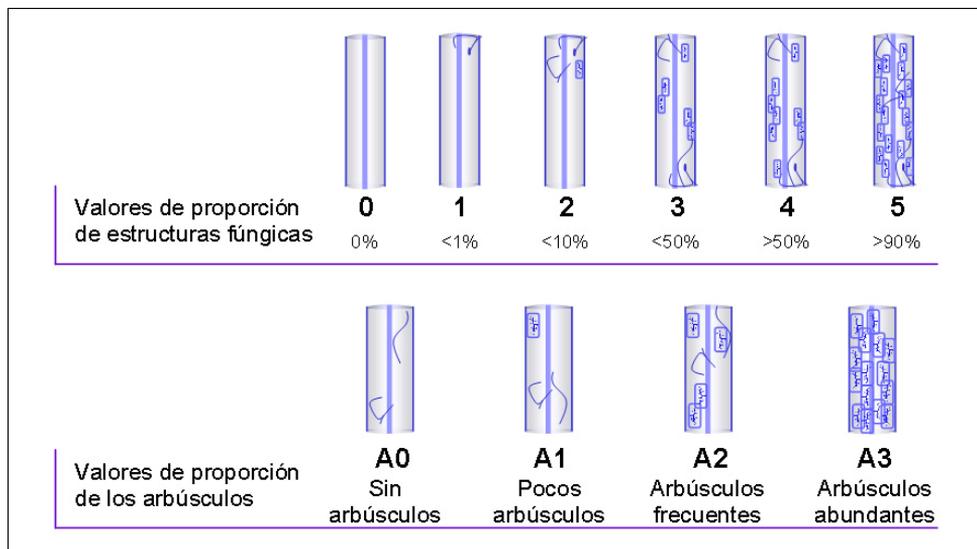


Figura III.2: Método de determinación de la intensidad y frecuencia de la micorrización, y abundancia de arbuscúlos según Trouvelot y col. (1986).

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

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

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

$a\% = \frac{100 \cdot m_{A3} + 50 \cdot m_{A2} + 10 \cdot m_{A1}}{100}$

$m_{A3} = \frac{(95 \cdot n_5 \cdot A_3 + 70 \cdot n_4 \cdot A_3 + 30 \cdot n_3 \cdot A_3 + 5 \cdot n_2 \cdot A_3 + n_1 \cdot A_3) \cdot 100}{\text{n}^\circ \text{ fragmentos con micorrización}}$

$m_{A2} = \frac{(95 \cdot n_5 \cdot A_2 + 70 \cdot n_4 \cdot A_2 + 30 \cdot n_3 \cdot A_2 + 5 \cdot n_2 \cdot A_2 + n_1 \cdot A_2) \cdot 100}{\text{n}^\circ \text{ fragmentos con micorrización}}$

$m_{A1} = \frac{(95 \cdot n_5 \cdot A_1 + 70 \cdot n_4 \cdot A_1 + 30 \cdot n_3 \cdot A_1 + 5 \cdot n_2 \cdot A_1 + n_1 \cdot A_1) \cdot 100}{\text{n}^\circ \text{ fragmentos con micorrización}}$

$A\% = \frac{a \cdot M}{100}$

Figura III.3: Fórmulas utilizadas para el cálculos de $F\%$, $M\%$, $m\%$, $a\%$ y $A\%$. En ellas 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 arbuscúlos en el sistema; Y m_{A3} , 2 y 1 representan la intensidad media por fragmento con una abundancia de arbuscúlos 3 , 2 y 1 respectivamente.

2.3.4. Determinación del estado de desarrollo de los arbuscúlos

Para la determinación del estado de desarrollo de los arbuscúlos se establecieron tres grupos o clases pertenecientes a estados morfológicos diferentes: La clase 'a' se

correspondió con arbusculos en formación, o degradación, sin ramificaciones finas y que ocupaban parcialmente la célula hospedadora; La clase 'b', lo hizo con arbusculos con algunas ramificaciones estrechas, que se teñían con cierta intensidad con el colorante azul tripán (ver apartado III.2.2.1), y que ocupaban la mayor parte de la célula cortical; Y la clase 'c', correspondió a arbusculos con abundancia de ramificaciones finas, que se teñían con gran intensidad con el colorante azul tripán, y que ocupaban la totalidad de la célula cortical (Figura III.4). La determinación se realizó por cuantificación directa bajo microscopio (40X) de las tres clases de arbusculos, contabilizándose al menos 100 arbusculos de cada muestra, y obteniendo el porcentaje de cada uno de ellos.

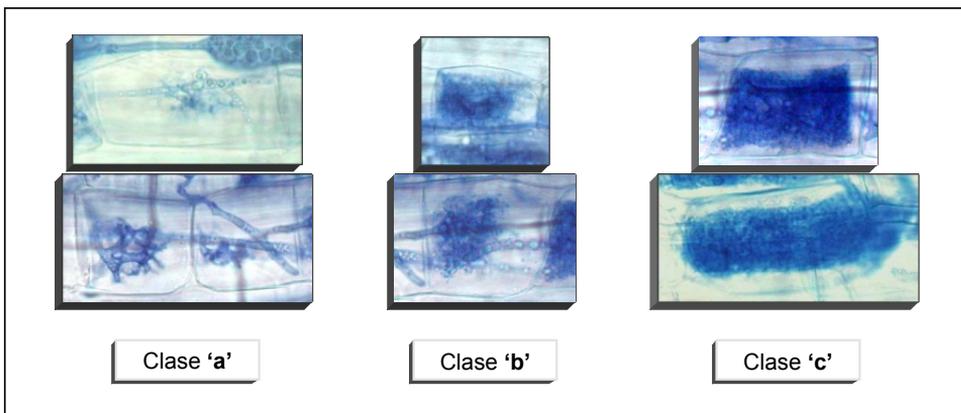


Figura III.4: Arbusculos de las clases a, b y c.

2.3.5. Tinción y cuantificación de la actividad succinato deshidrogenasa (SDH)

La determinación de la cantidad de hongo vivo dentro de la raíz se llevó a cabo gracias a la tinción de la actividad succinato deshidrogenasa (SDH) mitocondrial del hongo arbuscular (MacDonald y Lewis, 1978). Esta tinción está basada en la reducción de las sales de tetrazolio (amarillo, soluble) a formazán (violeta, insoluble) a partir del succinato disódico, provocando la precipitación de formazán en las estructuras del hongo activo que les da un color azul violeta.

Se tomaron de 0,2-0,5g de raíz lavada y cortada en trozos de aproximadamente 1cm, que se mantuvieron en hielo hasta la tinción. Los trozos de raíz se sumergieron, hasta dejarlos bien cubiertos, en la solución descrita en la tabla III.4. Las raíces se colocaron en una campana de vacío durante unos 5 minutos, para que así la solución penetrara a través de las paredes celulares, y después se incubaron de 16-20 horas a

37°C. Transcurrido dicho tiempo las raíces se lavaron con agua y volvieron a incubarse 15-20 minutos a temperatura ambiente en lejía con una concentración de cloro activo del 3% (p:v). Finalmente las raíces se volvieron a lavar con agua y se mantuvieron en ácido láctico hasta su conteo.

El conteo se realizó según el método descrito por Trouvelot y col. (1986). Se montaron 30 fragmentos de raíz en porta y se cuantificó la tinción SDH mediante observación en microscopio (10X y 40X), dando valores de 0 a 5 en función de la proporción de actividad SDH presente en el fragmento. Los datos se analizaron con el programa MYCOCALC, obteniendo información sobre la frecuencia de la actividad SDH (F-SDH %), la intensidad de la actividad SDH en el sistema (SDH %) y la intensidad de la actividad SDH por fragmento (sdh %) (Ver apartado III.2.2.3).

Tabla III.4: Solución para la tinción de SDH

	Solución madre	Para 50ml
MgCl	5mM	5ml
Succinato disódico	2,5mM	5ml
Tris-HCl pH 7,4	200mM	12,5ml
Azul de nitro tetrazolio (Aldrich)	4,9mM	12,5ml
H ₂ O destilada		hasta 50ml

Se conservó a -20°C

2.4. Determinación de la eficiencia de la micorrización

Para determinar la eficiencia de la acumulación y transporte de fósforo, y por tanto la eficiencia de la micorrización, se midió la actividad fosfatasa alcalina (AP) del hongo micorrízico *G. intraradices*, principalmente localizada en las vacuolas del micelio intraradical (Gianinazzi y col, 1979), según la metodología descrita por Tisserant y col. (Tisserant y col, 1993). La tinción de la actividad AP provoca la precipitación del ácido α -naftil fosfato, observándose en el microscopio como un precipitado marrón oscuro.

Después de lavar con agua y cortar las raíces en fragmentos de 1cm, se tomaron de 0,2 a 0,5g de raíz y se mantuvieron en hielo hasta la tinción. Para la tinción los trozos de raíz se sumergieron en la solución descrita en la tabla III.5 hasta dejarlos bien cubiertos. Las raíces se colocaron en una campana de vacío durante unos 5 minutos, para que así la solución penetrara a través de las paredes celulares. Después se incubaron de 16-24 horas a 37°C. Transcurrido dicho tiempo las raíces se lavaron

con agua y volvieron a incubarse 15-20 minutos a temperatura ambiente en lejía con una concentración de cloro activo del 1%. Finalmente las raíces se volvieron a lavar con agua y se mantuvieron en ácido láctico hasta su conteo.

El conteo se realizó de dos formas: bien según el método descrito por Giovannetti y Mosse (Giovannetti y Mosse, 1980), con el que se obtiene el tanto por ciento de la longitud de la raíz con actividad AP respecto al total (Ver apartado III.2.2.2); bien según el método descrito por Trouvelot y col. en 1986. Para este último, se montaron 30 fragmentos de raíz en porta y se cuantificó la actividad AP mediante observación en microscopio (10X y 40X), dando valores de 0-5 en función de la proporción de actividad AP presente en el fragmento. Finalmente los datos se analizaron con el programa MYCOCALC obteniendo información sobre la frecuencia de la actividad AP (F-AP%), la intensidad de la actividad AP en el sistema (AP%) y la intensidad de la actividad AP por fragmento (ap%) (Ver apartado III.2.2.3).

Tabla III.5: Solución para la tinción de AP

	Solución madre	Para 50ml
MgCl	5,3mM	2,5ml
MnCl	4mM	2,5ml
Tris-ácido cítrico pH 9,2	50mM	45ml
Ácido α -naftil fosfato		50mg
Sal de Fast blue RR		50mg
H ₂ O destilada		hasta 50ml

Se preparó y filtró en el momento de la tinción

3. DETERMINACIONES DE NIVELES HORMONALES EN RAÍCES

3.1. Extracción de ácido salicílico libre y total

La metodología utilizada para la extracción del ácido salicílico (SA) libre y glucosidado (SAG) se basó en la descrita por Malamy y col. (Malamy y col, 1992). Se tomó 1g de raíz, previamente lavada y cortada, y se homogeneizó en N₂ con mortero y pistilo hasta conseguir una textura de polvo fino. El polvo se homogeneizó con 3ml de metanol 100% y se centrifugó 15 minutos a 12.000rpm. Se recogió el sobrenadante, y el precipitado se volvió a homogeneizar con 1ml de etanol 100%, y a centrifugar en las mismas condiciones. Ambos sobrenadantes se juntaron, y se secaron al vacío a

40°C con la ayuda de un condensador tipo speed-vac, para después resuspender el precipitado en 1ml de agua milliQ (precalentada a 80°C para facilitar la resuspensión).

La mitad de la muestra acuosa se conservó para la extracción del SA libre, y la otra mitad se trató con la enzima β -glucosidasa (Sigma) para la extracción del SA a partir del SAG. El tratamiento con β -glucosidasa se hizo añadiendo 5 unidades de enzima preparada en tampón acetato sódico 0,2M a pH 4,5, por cada 0,5ml del extracto acuoso correspondiente a la extracción de 0,5g de tejido, en un volumen final de 1ml. La mezcla se dejó incubar al menos 16 horas a 37°C.

Los extractos del SA libre y total (el libre con el tratado con β -glucosidasa) se llevaron a un volumen final de 1ml y se les sometió a un proceso de partición de fenoles: Tras añadirles 50 μ l de HCl concentrado y agitarlos, para acidificar los extractos hasta un pH de aproximadamente 1, se les sometió a dos extracciones consecutivas con 2ml de acetato de etilo:ciclopentano:isopropanol (50:50:1/v:v:v). En cada extracción la muestra se agitó vigorosamente y se dejó reposar para que se separasen las fases acuosa y orgánica, recogiendo la fase orgánica (superior). La fase orgánica de las dos extracciones se juntó y se secó en una campana de vacío a 40°C, recogiendo luego el precipitado en 50 μ l de metanol de grado HPLC, donde se encontraban el SA entre otros fenoles.

3.2. Cuantificación de ácido salicílico

La separación del SA del resto de componentes fenólicos presentes en la muestra y su cuantificación se realizó mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC de las siglas de su nombre en inglés ‘High Performance Liquid Chromatography’, también referida como ‘High Pressure Liquid Chromatography’). Se utilizó una columna C18 de fase inversa (Varian), que se mantuvo a 40°C, y un detector fluorescente (Varian) programado a una longitud de onda de excitación de 310nm, y una de emisión de 405nm.

La fase móvil se desplazó con un flujo constante de 1ml/minuto y se compuso por una mezcla de dos eluyentes: El eluyente A, formado por ácido acético grado HPLC al 1%, filtrado con un filtro de 45 μ m y desgasificado en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos; Y eluyente B, formado por metanol 100% grado HPLC. La composición de la fase móvil fue cambiando de modo gradual con la siguiente temporalización: en el momento inicial 80 % A, 20 % B; a los 10 minutos 70 % A, 30 % B; a los 12 minutos 66 % A, 34 % B; a los 20 minutos 59 % A, 41 % B; a los 21 minutos 0 % A, 100 % B; con un tiempo total de 36 minutos. El tiempo de retención aproximado del SA con este método fue de 13,4 minutos.

La determinación cuantitativa del SA se realizó por interpolación de una curva patrón preparada con muestras de cantidades conocidas de SA (Sigma) (de 0 a 13ng) y el área de sus picos. Se inyectaron al menos 3 alícuotas de 10 μ l por muestra extraída (de 50 μ l de volumen final), se calculó la media de cada muestra, se multiplicó por el volumen total del extracto de metanol por muestra, y se dividió entre la cantidad de tejido utilizada para la extracción, obteniendo los resultados finales como ng de SA por gramo de tejido.

3.3. Extracción y cuantificación de la producción de etileno en raíces

La determinación de la producción de etileno se basó en la metodología descrita por Lund y col. para la producción de etileno en hojas y rosetones de *Arabidopsis thaliana* (Lund y col, 1998). Se analizó la composición del aire de un contenedor herméticamente cerrado de 16 a 45ml de volumen, en el que se dejó la raíz en incubación durante una hora a temperatura ambiente, tras haberla lavado, cortado por debajo del cuello del tallo y dejado reposar 30 minutos en el contenedor abierto (con el fin de que se liberase el etileno acumulado en la raíz y no falsear los resultados). Se analizaron un mínimo de tres replicas independientes por tratamiento, y tres tomas de 1ml del volumen del contenedor de cada muestra (Figura III.5).

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 H₂ con una presión de 2bar y 1bar respectivamente. La fase móvil se basó en un flujo de N₂ de 45ml/minuto, y una presión de 2bares. La columna se mantuvo a 70°C, el inyector a 120°C, y el detector a 105°C. El tiempo de retención del etileno en estas condiciones fue de aproximadamente 2,30 minutos.

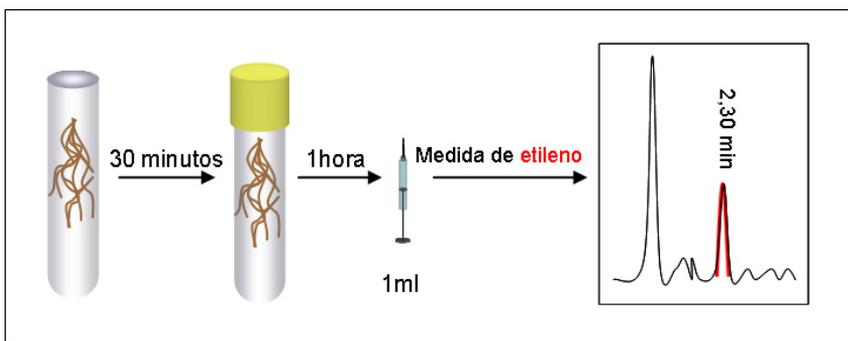


Figura III.5: Extracción y medida del etileno producido en raíces

La cantidad de etileno por mililitro de aire analizado se determinó por interpolación de una curva patrón preparada con cantidades conocidas de etileno (de 0 a 777,65 μ moles) y el área de sus picos. De este modo se obtuvieron los nmoles de etileno por ml, con la media de las tres réplicas por muestra analizadas. Esta concentración de etileno se multiplicó por el volumen del contenedor que encerraba a la raíz, y se dividió entre el peso de la raíz y entre el tiempo (1 hora) que la misma estuvo dentro del contenedor. La cantidad de etileno final por muestra, correspondiente a su producción, se dio en $\text{nmoles} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$.

4. DETERMINACIONES DE EXPRESIÓN GÉNICA

4.1. Estudio de la expresión génica por RT-PCR semicuantitativa

4.1.1. Extracción de ARN de raíces

La extracción de ARN se realizó con dos protocolos diferentes a partir de la raíz previamente lavada, cortada e inmediatamente congelada en N_2 líquido, y conservada a -80°C hasta la extracción.

- * En los ensayos del primer capítulo de resultados (IV.1) se siguió el método de Kay y col. (Kay y col, 1987), según el cual 0,5g de raíz se maceraron con mortero y pistilo de porcelana en N_2 líquido hasta obtener una textura de polvo fino. Posteriormente el polvo se homogeneizó con 900 μ l de tampón REB (Tabla III.6). Este homogeneizado se mezcló suavemente con 900 μ l de fenol: cloroformo: isoamílico (50:24:1/v:v:v). Tras separar la fase acuosa de la orgánica por centrifugación, 10 minutos a 4°C y 12000rpm, se recogió la fase acuosa que volvió a extraerse dos veces más con el mismo volumen de fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1/v:v:v), y otra vez más con 900 μ l cloroformo: isoamílico (24:1/v:v), centrifugando cada vez durante 10 minutos a 12000rpm y 4°C . Después de las extracciones se realizó una primera precipitación del ARN añadiendo poco a poco 0,25 volúmenes de LiCl 10M mientras se agitó la muestra. Trascorridas al menos 12 horas de precipitación a 4°C , se centrifugó la muestra 15 minutos a 12000rpm y 4°C , se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500 μ l de LiCl 2M. Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y se resuspendió el precipitado en 200 μ l de tampón TE (Tris-HCl 10mM a pH 8 y EDTA 1mM). Seguidamente se realizó una segunda precipitación con 2 volúmenes de etanol al 95% y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M a pH 5,2, dejando precipitar al menos durante 12 horas a -20°C . Después de la precipitación se centrifugó la muestra 15 minutos a 4°C y

12000rpm, se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 300µl de etanol al 80%. Finalmente se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, se dejó secar el precipitado durante 5 minutos y se resuspendió en H₂O milliQ tratada con DEPC.

- * En los ensayos de los capítulos IV.3 y IV.4 de los resultados, la extracción de ARN se realizó con el 'RNeasy Plant Mini Kit' de Qiagen (Valencia, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

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

Tabla III.6: Composición y preparación del tampón REB

	Concentración (mM)	Solución madre (M)	Para 100ml (ml)
Tris-HCl pH 8	25	1	2,5
EDTA	25	0,5	5
NaCl	75	5	1,5
SDS	50	0,5	10
En este punto se añadió el H ₂ O-DEPC (81ml) y autoclavó 20min. a 120°C			
B-mercaptoetanol	1	14,3	7µl

4.1.2. Cuantificación de ARN, ADN y oligonucleótidos

El principal método de cuantificación de ARN, ADN y oligonucleótidos utilizado fue el descrito por Sambrook y col. (Sambrook y col, 1989) mediante espectrofotometría. Se determinó la absorbancia de la solución de estos compuestos a 260nm y a 280nm en cubetas de cuarzo frente a un blanco de H₂O-DEPC para el ARN, y H₂O- milliQ estéril para el ADN y oligonucleótidos. La concentración de

ADN de la muestra se calculó respecto a los valores estándar de $A_{260}=1$ para soluciones con 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ARN y ADN de cadena sencilla, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ADN de cadena doble, y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de oligonucleótidos. La relación A_{260}/A_{280} se utilizó para estimar el grado de pureza de la preparación, considerándose los valores por debajo de 1,8 como indicadores de contaminación con proteínas o fenoles.

Otro método de cuantificación de ADN, también descrito por Sambrook y col. (1989), necesitó de la separación por electroforesis del ADN problema junto a moléculas de ADN y de distinto tamaño y concentración conocida, pertenecientes a marcadores de peso molecular estándar, mediante electroforesis en geles de agarosa (ver apartado III.4.1.7). Posteriormente se tiñó el ADN del gel en un baño con bromuro de etidio, que al someterlo a la luz UV (260nm) fluoresce. La comparación de la intensidad en la fluorescencia de las bandas de ADN problema con las del marcador de peso molecular dio una estimación aproximada de la cantidad de ADN en la muestra.

4.1.3. Tratamiento con desoxiribonucleasas (DNAsa I)

Entre el ARN extraído se encuentran contaminaciones de ADN que pueden interferir en los análisis de expresión por amplificación del ADNc. Para evitarlo, la solución de ARN se sometió al tratamiento de DNAsa (DNAsa I libre de RNAsa de Roche). En la tabla III.7 se expone la mezcla de reacción preparada a fin de realizar el tratamiento del ARN. Dicha solución se agitó suavemente y se incubó a 37°C durante 45 minutos. Posteriormente a la inoculación se le añadieron 70 μl de H₂O-DEPC y 100 μl de fenol:cloroformo:isomílico (75:24:1/v:v:v), se agitó suavemente y se centrifugó 10 minutos a 12000rpm. Se desechó la fase orgánica inferior, y con ella las proteínas como la DNAsa I, y se precipitó el ARN de la fase acuosa añadiendo 2 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 de acetato sódico 3M a pH 5,2, e incubándolo a -20°C 12 horas. Transcurrido ese tiempo se centrifugó la muestra a 4°C durante 15 minutos a 12000rpm y se desechó el sobrenadante. Después se lavó el precipitado con etanol al 80% y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones durante 10 minutos. Finalmente se dejó evaporar el etanol y el ARN se resuspendió en H₂O-DEPC.

La concentración de ARN se determinó por espectrofotometría (ver apartado III.4.1.2) y se diluyó en H₂O-DEPC hasta una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. El ARN se conservó a -80°C.

Tabla III.7: Tratamiento con DNAsa I (Roche)

ARN(20 μ g)	X μ l
Tampón 10X de DNAsa (Roche)	2 μ l
Inhibidor de RNAsa (50u/ μ l) (Roche)	1 μ l
DNAsa I (10u/ μ l)(Roche)	1 μ l
H ₂ O- DEPC	(16-X) μ l

4.1.4. Transcripción inversa de ARNm (RT)

Mediante transcripción inversa el ARNm fue transcrito a ADN copia (ADNc) para el posterior análisis de la expresión genética mediante PCR (punto 4.1.6). Para ello se utilizó el kit de dos pasos de RT-PCR de Roche. Se tomaron 2 μ g de ARN a los que se añadió el cebador, que en algunos ensayos fueron 2 μ l del oligonucleótido dT₁₅ (0,8 μ g/ μ l), el cual se une a la cola poli A del ARNm, y en otros ensayos 2 μ l de una mezcla de hexanucleótidos facilitados por el kit (2 μ g/ μ l)), complementado la reacción con H₂O-DEPC hasta un volumen final de 10,2 μ l. Esta mezcla de reacción se incubó 10 minutos a 70°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente, eliminando así los posibles bucles formados en la cadena de ARNm y facilitando la unión de los oligonucleótidos cebadores. Después se preparó la mezcla se reacción indicada en la tabla III.8, y se incubó 10 minutos a 25°C, o 60 minutos a 42°C. A continuación se procedió a la amplificación del ADNc mediante la incubación de la mezcla durante una hora a 42°C.

Tabla III.8: Reacción RT

ARN(2 μ g)	2 μ l
Oligonucleótido dT ₁₅ (0,8 μ g/ μ l) (Roche), o bien mezcla de cebadores dN ₆ (1,6 μ g/ μ l) (Roche)	2 μ l
H ₂ O- DEPC	6,2 μ l
10 minutos a 70°C	
dNTPs (10mM)	2 μ l
Tampón 10X (100mM tris HCl, 500mM kCl) (Roche)	2 μ l
Cl ₂ Mg (25mM)	4 μ l
Inhibidor de RNAsa (50u/ μ l) (Roche)	1 μ l
AMV Reverso transcriptasa (20u)	0,8 μ l
Volumen final	20 μ l

Transcurrido este tiempo se añadieron 80µl de H₂O-DEPC y se calentó la mezcla durante 5 minutos a 95°C para desnaturalizar la enzima. Seguidamente se pasó la solución a 4°C, y a partir de ella se prepararon tres diluciones con H₂O-DEPC que se usaron para el análisis de la expresión genética de tal forma que obtuvieron las diluciones $\frac{1}{1}$, $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{50}$ y $\frac{1}{100}$ del ADNc. El ADNc se conservaron a -20°C.

4.1.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación PCR de fragmentos de ADN se realizó empleando el termociclador Eppendorf MasterCycler™ Personal y la enzima Taq-ADN Polimerasa (Roche). La mezcla de reacción se preparó en tubos de 0,2ml atendiendo a la composición descrita en la tabla III.9:

Las condiciones de reacción incluyeron una desnaturalización a 95° C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación, consistiendo cada uno de ellos en tres fases: una de desnaturalización de 0,5 minutos a 95° C, otra de hibridación de 1 minuto (a la temperatura de alineamiento adecuada para cada pareja de cebadores según las tablas III.10, III.11, III.12 y III.13), y otra última de polimerización a 72°C de 1,5 minutos. Tras los 30 ciclos se realizó una extensión final a 72° C durante 5 min.

Los productos de la reacción se conservaron a 4°C hasta su análisis por observación directa de bandas de ADN en electroforesis en gel de agarosa (apartado III.4.1.7), o por detección de dichas bandas mediante hibridación por la técnica de Southern (apartado III.4.1.8).

Tabla III.9: Mezcla para la reacción PCR

	Concentración final Para 25µl (µl)	
ADNc (diluciones $\frac{1}{1}$, $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{50}$, $\frac{1}{100}$)		5
Tampón 10X de Taq-Polimerasa (Roche)	1X	2,5
MgCl ₂ (25mM)	1,5mM	1,5
Tritón x-100 1%	0,1%	2,5
dNTPs (1mM)	0,1mM	2,5
Cebador 5' (10µM)	1µM	2,5
Cebador 3' (10µM)	1µM	2,5
Taq-ADN polimerasa (Roche)(5u/µl)	1,25u	0,25
H ₂ O-mQ estéril		5,75

4.1.6. Cebadores utilizados y diseño de los mismos

En las tablas siguientes se muestra una relación de los oligonucleótidos utilizados como cebadores en la reacción PCR. Los cebadores de genes de tomate en tabla III.10, de tabaco en tabla III.11, de guisante en tabla III.12, y cebadores de *Glomus intraradices* en la tabla III.13. Los marcados en letra negrita han sido diseñados durante el desarrollo de esta tesis con ayuda del programa NetPrimer, a partir de las secuencias más conservadas de los genes en cuestión.

Tabla III.10: Cebadores de plantas de tomate

Nombre	Secuencia (5'-3')	T ^a alineamiento (°C)	Tamaño del amplificado	Nombre y referencia
UBI1	atgcagat(c/t)tttgtgaagac	55	228pb y múltiples	<i>PoliUBI</i> (Rollfinke y Pfitzner, 1994)
UBI2	acgcagaccgaggtggag			
LE4F	actcaaggcatgggtactgg	55	112pb	<i>LE4</i> (Cohen y col, 1991)
LE4R	ccttcttctcctcccact			
LePT4-f	gaaggggagccatttaatgtgg	55	811pb	<i>LePT4</i> (Nagy y col, 2005)
LePT4-r	ccatcttgtgtgtattgtgtatc			

Tabla III.11: Cebadores de plantas de tabaco

Nombre	Secuencia(5'-3')	T ^a alineamiento (°C)	Tamaño del amplificado	Nombre y referencia
UBI1-General	atgcagatctttgtgaagac	58	228pb y múltiples	<i>PoliUBI</i> (Huq y col, 1997)
UBI2-General	accaccagc(g/a)agacggag			
PAL₁-T	tgaacaacacaaccaag	50	532pb	<i>PAL</i>
PAL₂-T	caatggataagacctgc			
PAL₁-T	tgaacaacacaaccaag	50	481pb	<i>PAL18</i>
PAL18-r	acatttcgatgcagc			
LTP-Tf	tgttgcggtggcgttcag	44	198pb	<i>LTP</i>
LTP-Tr	gaatattgacaccac			
PR _{1b} T-F	gatgcccataaacagctcg	55	540pb	<i>PR-1b</i>
PR _{1b} T-R	tttacagatccagttcttcagagg			
PR ₂ T-F	ctgcccttgacttgttggg	55	871pb	<i>PR-2</i>
PR ₂ T-R	tccaggttctttggagtcc			
PR ₃ T-F	ggttctattgtaacgagtgac	55	696pb	<i>PR-3</i>
PR ₃ T-R	ttctatgtaacgaagcctagc			

Tabla III.12: Cebadores de plantas de guisante

Nombre	Secuencia (5'-3')	T ^a alineamiento (°C)	Tamaño del amplificado	Nombre y referencia
UBI1-General	atgcagatctttgtgaagac	58	228pb y múltiples	<i>PoliUBI</i> (Huq y col, 1997)
UBI2-General	accaccacg(g/a)agacggag			
PsENOD12A-f	tcactagtgttctccttgc	58	274pb	<i>PSENOD-12A</i> (Albrecht y col, 1998)
PsENOD12A-r	ccataagatggtttgcacg			
PI ₂₀₆ -f	agccatataaacatgc	58	478pb	<i>PI-206</i> (Ruiz-Lozano y col, 1999)
PI ₂₀₆ -r	ccaacactcaaagaacttg			
PI ₄₉ -f	ggcaagcaatttcttagtt	58	604pb	<i>PI-49</i> (Ruiz-Lozano y col, 1999)
PI ₄₉ -r	gcagccaattaagcacac			

Tabla III.13: Cebadores de *Glomus intraradices*

Nombre	Secuencia (5'-3')	T ^a alineamiento (°C)	Tamaño del amplificado	Nombre y referencia
RMF	actcaaggcatgggtactgg	55	500pb	<i>Gi18S</i> (González-Guerrero y col, 2005)
RMR	ccttctttctcctccacct			
ALP1	atcgtagccgcagtaatagt	55	351pb	<i>ALP</i> (Aono y col, 2004)
ALP2	ctaagtgtttggcagattcc			

4.1.7. Electroforesis en gel de agarosa

La integridad del ARN total extraído se comprobó mediante electroforesis horizontal en gel sumergido de agarosa al 1% (p:v), preparado en tampón TBE 1X con H₂O-DEPC (ver tabla III.14). La electroforesis se realizó a 50V durante 45-60 minutos. Las muestras se prepararon mezclándolas con tampón de carga Orange G 10X a razón de 10:1 (v:v) (ver tabla III.14).

El análisis de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis horizontal en gel sumergido de agarosa preparado en tampón TBE 1X, y en su concentración apropiada según el tamaño de los fragmentos a separar como se indica en la tabla III.15. Las muestras se prepararon mezclando 20 µL de la reacción de PCR con 2 µL de tampón de carga Orange G 10X (Tabla III.14). De forma paralela se cargó un

marcador de peso molecular adecuado con la misma proporción de tampón de carga. Como marcadores de peso molecular se utilizaron el marcador de 100pb (Amersham biosciences) para determinar el tamaño de los amplificados de menor peso molecular (Con un rango de 0,1 a mas de 2kpb), y el marcador de peso molecular III (Roche) para determinar el tamaño, aunque con menor precisión, de los amplificados de mayor peso molecular (Con un rango de 0,564 a 2.226kpb) (Sambrook y col, 1989).

Tabla III.14

Tampón TBE 5X			Tampón de carga Orange G 10X		
Concentración (g/l)			Concentración Para 20ml		
Tris	450mM	54	Glicerol	50%	10ml
Na ₂ EDTA	12,5mM	4,7	EDTA	10mM	74mg
BO ₃ H ₂	450mM	27	Orange G	0,5%	0,1mg
El pH se llevó a 8,2			Se conservó a 4°C		

La visualización y fotografiado del ARN y ADN en los geles se realizó bajo luz UV (260nm) utilizando un sistema de captación de imágenes y fotografía (Tdi), después de la tinción del ADN durante 10 minutos con bromuro de etidio (25µl de una solución de bromuro de etidio 10mg/ml añadidos a 300ml de H₂O) y del aclarado del gel en H₂O.

Tabla III.15: Rangos de separación de fragmentos de ADN en función de la concentración de agarosa utilizada

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

4.1.8. Southern blot

Para la identificación y cuantificación de un determinado fragmento de ADN se utilizó la técnica descrita por Southern (Southern, 1975), consistente en la fijación del ADN problema, separado mediante electroforesis en gel de azarosa, a una membrana

de nylon, y sobre esta membrana se realiza la detección del ADN mediante hibridación con una sonda marcada. Las sondas utilizadas en esta tesis fueron marcadas de forma no radioactiva con el nucleótido dUTP-digoxigenina, utilizando la metodología PCR para dicho marcaje. La detección del complejo fragmento ADN problema-ADN sonda-digoxigenina se realiza de manera indirecta, mediante el análisis de la liberación de luz en la reacción del enzima con actividad fosfatasa alcalina (AP) unido a un anticuerpo anti-digoxigenina. El complejo anti-digoxigenina-AP se une a la sonda ADN-digoxigenina, a su vez unida al fragmento ADN problema, de tal forma que la cantidad de enzima AP es proporcional a la cantidad de dicho ADN problema. Esta actividad AP provoca la ruptura del sustrato CSPD (Sigma) mediante una reacción que libera luz de forma proporcional a la cantidad de enzima. La luz impresiona una película fotosensible, quedándose marcadas las zonas donde se unió la sonda de forma que la marca es mayor cuanto mas ADN problema hay en la membrana, de tal modo que se pudo determinar la marca impresa mediante densitometría.

4.1.8.1. Transferencia de ADN a membrana de nylon

Tras la separación de los productos de la PCR en un gel de agarosa en función de su tamaño (Ver apartado III.4.1.7), el gel se trató en agitación con varias soluciones para conseguir una correcta transferencia y posterior hibridación. En primer lugar se incubó el gel en la solución de desnaturalización de ADN (Tabla III.16) durante 30 minutos, y después se lavó durante 5 minutos en H₂O- milliQ. A continuación se dejó agitar en una solución de neutralización (Tabla III.16) durante 30 minutos. Finalmente se enjuagó con el tampón SSC 2X (Tabla III.16). En los geles de agarosa donde se separaron fragmentos de alto peso molecular se realizó un tratamiento inicial (previo a la desnaturalización) con HCl 0,125M durante 10 minutos.

Seguidamente, el gel se colocó sobre una superficie lisa y horizontal cubierta con papel Whatman 3 MM, con cuidado de que no quedasen burbujas de aire atrapadas bajo el gel. El papel Whatman 3 MM hizo de difusor del tampón SSC 20X hasta el gel, al estar sus extremos sumergidos en el tampón (Figura III.6). Sobre el gel se colocó un trozo de membrana de nylon (Hybond-N de Amersham Biosciences) del mismo tamaño que el gel y previamente equilibrada en SSC 2X, con cuidado de no dejar burbujas de aire entre ambos. Sobre la membrana de nylon se colocaron tres trozos de Whatman 3MM, sin dejar burbujas entre ellos, siendo todos del mismo tamaño que el gel y humedecidos previamente con el tampón SSC 2X. Finalmente, se colocaron numerosas capas de papel de celulosa absorbente sobre el papel Whatman

3MM, hasta ocupar una altura de 15cm, cuya función fue la de absorber el tampón SSC 20X procedente del papel Whatman que estaba colocado bajo el gel y que pasó a través del gel, la membrana y el papel absorbente. De este modo se consiguió un flujo unidireccional del tampón SSC 20X desde el gel hacia la membrana de nylon que arrastró el ADN hacia la membrana. Para comprimir el sistema y acelerar el proceso de absorción, por encima de la torre de papel se colocó un peso de 1kg, sobre un cristal que repartió la presión de forma homogénea por todos los puntos de la torre (Figura III.6).

Trascurridas de 12-24 horas se retiraron las capas de papel, y se enjuagó la membrana de nylon en SSC 2X para retirar los restos de agarosa que se hubieran podido quedar adheridos. Finalmente se fijó el ADN a la membrana incubándola a 80°C al vacío y durante 2 horas.

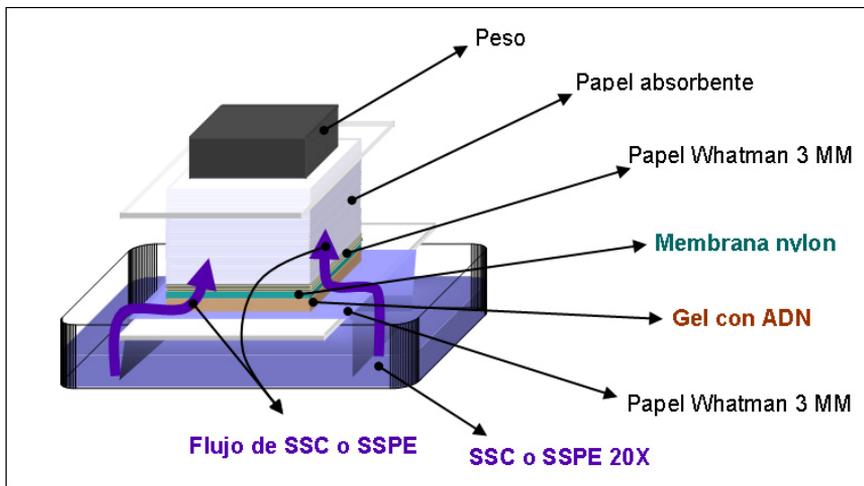


Figura III.6: Transferencia de ADN o ARN desde un gel de agarosa hasta una membrana de nylon.

Tabla III.16

<u>Solución de desnaturalización</u>	<u>Tampón de neutralización</u>	<u>SSC 20X</u>
<u>Concentración</u>	<u>Concentración</u>	<u>Concentración</u>
NaOH 0,5M	Tris-HCl 0,5M	NaCl 3M
NaCl 1,5M	NaCl 1,5M	Na-citrato 0,3M
	El pH se llevó a 7,2	El pH se llevó a 7

4.1.8.2. Marcaje de sondas de ADN con dUTP-Digoxigenina

Para el marcaje de las sondas de los genes a estudiar se llevó a cabo una reacciones PCR a partir de ADN plasmídico que contenía insertados fragmentos de ADN del gen objeto de estudio. Para la reacción PCR se utilizaron los mismos ciclos descritos en el apartado III.4.1.6, con la mezcla de reacción de la tabla III.17.

Con el fin de eliminar restos de dUTP-digoxigenina, así como de los demás componentes de la reacción PCR, tras el proceso de síntesis, la mezcla de reacción se limpió pasándola por una columna S-300 (Amersham).

Tabla III.17: Mezcla para la reacción PCR del marcaje de ADN con dUTP-digoxigenina

	Concentración final	Para 100µl (µl)
ADN plasmídico (10ng/µl)	0,4ng/µl	4
Tampón 10X de Taq-Polimerasa (Roche)	1X	10
MgCl ₂ (25mM)	5mM	10
Tritón x-100 1%	1%	10
dNTPs (dATP + dGTP + dCTP) (2mM)	0,2mM	10
dTTP (1,8mM)	0,18mM	10
dUTP-digoxigenina (0,2mM)	0,02mM	10
Cebador 5' (10µM)	1µM	10
Cebador 3' (10µM)	1µM	10
Taq-ADN polimerasa (Roche)(5u/µl)	5u	1
H ₂ O- milliQ estéril		15

4.1.8.3. Hibridación con la sonda y lavados

Para la hibridación de la sonda de ADN marcado con digoxigenina al ADN fijado a la membrana de nylon, la membrana se incubó en tubos de hibridación dejando la cara en la que se fijó el ADN hacia la parte interior del tubo. La primera incubación de la membrana se realizó en condiciones de agitación suave en la solución de hibridación (Tabla III.18) durante 1hora y 30 minutos a 42°C, con el objetivo de equilibrar la membrana. Posteriormente se incubó durante al menos 12 horas, a 42°C y en agitación suave, con 25ml de solución de hibridación a la que se le añadieron 100µl de la sonda marcada y purificada por columna S-300, desnaturaliza previamente por calor (5 minutos a 95°C).

Trascurridas las 12 horas, se eliminó la solución de hibridación y la membrana se lavó dos veces durante 5 minutos a 25°C con el tampón SSC 2X (Tabla III.16) conteniendo SDS al 0,1%, para eliminar los restos de la sonda. Finalmente se lavó otras dos veces durante 15 minutos a 68°C con el tampón SSC 0,1X, SDS 0,1%.

Tabla III.18: Solución de hibridación

	Concentración
SSC	5X
Reactivo Blocking (Roche)	2%(p:v)
N-Laurilsarcosina	0,1%(p:v)
SDS	0,02%(p:v)
Formamida	50%(v:v)

4.1.8.4. Detección de la sonda sobre la membrana de nylon

Este proceso se realizó a temperatura ambiente tras los lavados con SSC 0,1X, SDS 0,1%. Primero se lavó la membrana con el tampón de lavado (Tabla III.19) durante 5 minutos, seguido de otro lavado de 30 minutos en el tampón 2 (Tabla III.19), para después incubarla durante 30 minutos con el anticuerpo (Antidigoxigenina- AP de Roche) diluido a razón de 75mU/ml en tampón 2. Posteriormente se realizaron dos lavados de 15 minutos con el tampón de lavado, y se equilibró la membrana incubándola 5 minutos en el tampón 3 (Tabla III.19). Después se incubó la membrana durante 5 minutos con el sustrato CSPD (Roche) diluido en el tampón 3 (1:1000; v:v).

Tras estos lavados e incubaciones, se eliminó el exceso de líquido de la membrana con papel Whatman, y se dejó secar durante 15 minutos a 37°C para favorecer la reacción de la AP unida al anticuerpo anti-digoxigenina. Finalmente, se expuso la membrana a una película fotosensible (Cuprix RP-2, AGFA), durante al menos 20 minutos, en un cassette que la protegió de la luz, colocando la cara de la membrana de nylon en la que se fijó el ADN en contacto con la película.

El revelado de la película se realizó en oscuridad, sumergiéndola en una solución reveladora (Eukobrom, Tetenal) durante 2 o 3 minutos. Después se enjuagó con agua, y se sumergió en una solución fijadora (Superfix, Tetenal) durante otros 2 o 3 minutos. Finalmente se enjuagó con agua y se dejó secar a temperatura ambiente. Este revelado mostró las zonas en las que se unió la sonda y la intensidad de la

mancha impresionada fue proporcional a la cantidad del ADNc problema presente, y por tanto a la expresión del gen a estudiar.

Para volver a hibridar la membrana de nylon con una nueva sonda, la membrana se enjuagó con H₂O- milliQ estéril, y se lavó dos veces durante 15 minutos a 37°C con una solución de NaOH 0,2M y SDS al 0,1%. Posteriormente se lavó 5 minutos con SSC 2X.

Tabla III.19

Tampón de lavado		Tampón 2		Tampón 3	
Concentración		Concentración		Concentración	
Ácido maleico	0,1M	Ácido maleico	0,1M	Tris	0,1M
NaCl	0,15M	NaCl	0,15M	NaCl	0,1M
Tween 20	0,3%(p:v)	Reactivo blocking	1%(p:v)	MgCl ₂	50mM
El pH se llevó a 7,5		El pH se llevó a 7,5		El pH se llevó a 9,5	

4.2. Estudio de la expresión génica por Northern blot

La técnica de Northern consiste en la transferencia de ARN a una membrana de nylon. El ARN se separa previamente en función de su tamaño mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes, en gel de agarosa. Posteriormente se utilizan sondas marcadas (generalmente de ADN), específicas de un gen determinado, que hibridan con las moléculas de ARN homologas de la membrana, determinando así el tamaño y la cantidad del ARN correspondiente (Alwine y col, 1977).

4.2.1. Electroforesis de ARN en condiciones desnaturizantes

Para que las estructuras secundarias del ARN no varíen su velocidad de migración en el gel de agarosa, la electroforesis se llevó a cabo en condiciones desnaturizantes. La electroforesis se realizó con un voltaje de unos 5 o 10 voltios/cm de superficie del gel. El tampón de electroforesis (tampón MOPS 1X, tabla III.20) se cambió cada 30 minutos, procurando que el nivel del tampón quedase justo a la altura de la superficie del gel. La electroforesis se detuvo cuando el colorante del tampón de carga (Tabla III.20), el azul de bromofenol, recorrió $\frac{3}{4}$ de la longitud del gel.

Tabla III.20

Tampón de carga			Tampón MOPS 10X		
Concentración final Para 25ml			Concentración final Para 500ml		
Ficoll	30%	7,5ml	MOPS	0,2M	20,9g
EDTA 0,5M pH 8	40mM	2ml	Acetato sódico	50mM	2,05g
SDS 10%	0,1%	25µl	EDTA 0,5M pH 8	10mM	10ml
Azul de bromofenol	0,25%	0,06g	H ₂ O-DEPC	hasta 50ml	
Xilen cianol	0,25%	0,06g	El pH se llevó a 7 con NaOH		
H ₂ O- DEPC	hasta 25ml				
Se autoclavó 20min. a 120°C y guardó a 4°C					

Para evitar la contaminación de RNAsas todo el material necesario para la electroforesis (peine, molde y cubeta) se trató previamente con NaOH 5mM durante 2 horas, pasadas las cuales el material se enjuagó con abundante H₂O-DEPC.

- **Preparación del gel:** Para la preparación del gel se fundieron 1,5g de agarosa (concentración final del 1,5%) en 73,6ml de H₂O-DEPC estéril, y se dejó enfriar hasta alcanzar los 50°C, para añadirle 10ml de tampón MOPS 10X (Tabla III.20) y 16,4ml de formaldehído al 37%. La mezcla se dejó enfriar y solidificar en el molde para el gel. Una vez solidificado, el gel se colocó sobre la cubeta de electroforesis que se llenó con tampón MOPS 1X hasta el nivel del gel, sin llegar a cubrirlo totalmente para minimizar la difusión del formaldehído que es el responsable de mantener la desnaturalización del ARN.

- **Preparación de las muestras:** Se prepararon las muestras de ARN según se la tabla III.21. Esta mezcla se calentó durante 5 minutos a 65°C para desnaturalizar el ARN, se recogió mediante un pulso de centrifuga, y se enfrió en hielo. Justo antes de cargar las muestras en el gel se añadieron 5µl por muestra de ARN de tampón de carga (Tabla III.20).

Tabla III.21: Mezcla para la electroforesis del ARN

ARN(3µg/µl)	5µl
Formamida desionizada (50%)	12,5µl
Formaldehído (2,3M)	4,25µl
MOPS 10X	2,5µl

- **Tinción del gel:** Tras la electroforesis, el gel se incubó en acetato de amonio 0,1M durante 1 hora en agitación suave. Después se incubó 20 minutos en un baño

de 300ml de H₂O-DEPC al que se le añadieron 25µl de una solución bromuro de etidio de 10mg/ml. Transcurridos los 30 minutos, el gel se lavó en un baño de H₂O-DEPC estéril en agitación suave durante 30 minutos. La visualización y fotografiado del gel se realizó según lo observado en el apartado 4.1.7.

4.2.2. Transferencia a la membrana de nylon

La transferencia del ARN a la membrana de nylon Hybond-N (Amersham Biosciences) se realizó de la misma forma que se hizo con el ADN en el apartado III.4.1.8.1, pero en lugar de utilizar el tampón SSC se usó el tampón SSPE (Tabla III.23).

4.2.3. Marcaje radioactivo de sondas de ADN

Para el marcaje de las sondas de ADN de forma radioactiva, se llevó a cabo una reacción PCR con la mezcla de reacción de la tabla III.22. Dicha reacción se realizó a partir de ADN plasmídico con el fragmento de la secuencia del gen a estudiar insertado. Las condiciones de reacción incluyeron una desnaturalización a 95° C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos, consistiendo cada uno de ellos en: una fase desnaturalización de 1 minuto a 95° C, otra de hibridación a 56°C durante 1 minuto, y otra última de polimerización a 72°C durante 1 minuto. Al final se realizó una extensión final a 72° C durante 5 minutos y los productos de la reacción se conservaron a 4°C.

Tabla III.22: Mezcla para la reacción PCR para el marcaje radioactivo de ADN

	Concentración final	Para 20µl (µl)
ADN plasmídico (10ng/µl)	1ng/µl	2
Tampón 10X de Taq-Polimerasa (Roche)	1X	2
MgCl ₂ (25mM)	2,5mM	1
dATP (100µM)	5µM	1
dGTP (100µM)	5µM	1
dTTP (100µM)	5µM	1
³² P-dCTP (10µcurios/µl)	2,5µc/µl	5
Cebador M-13 (10µM)	0,5µM	1
Cebador Reverso (10µM)	0,5µM	1
Taq-ADN polimerasa (Roche)(5u/µl)	1u	0,2
H ₂ O- milliQ estéril		4,8

Una vez sintetizada la sonda y marcada, se purificó con la columna MicroSpin™ (Amersham pharmacia biotech), y se comprobó el porcentaje de incorporación radioactiva, analizando la cantidad de radioactividad incorporada en el ADN sintetizado (^{32}P -dCTP) respecto a la cantidad inicial de radioactividad añadida en la reacción PCR. Las medidas de emisión radiactiva se realizaron en el contador de centelleo. Todo el proceso se realizó en el laboratorio de radioquímica.

4.2.4. Hibridación de la sonda radioactiva y lavados

Para la hibridación de la sonda radioactiva de ADN al ARN fijado a la membrana de nylon, la membrana se incubó en tubos de hibridación dejando la cara en la que se fijó el ARN hacia la parte interior del tubo. La incubación se realizó en condiciones de agitación suave en la solución de pre-hibridación (Tabla III.23) durante al menos 2 horas a 42°C. Posteriormente se incubó de nuevo la membrana con 25ml de la solución de pre-hibridación a la que se le añadió 100µl de la sonda marcada, sonda que previamente había sido desnaturalizada por calor (5 minutos a 95°C). La membrana se dejó incubar con la sonda durante 12 horas a 42°C en agitación suave.

Trascurrido ese tiempo la membrana se lavó dos veces durante 15 minutos a 65°C con el tampón SSPE 2X con SDS al 0,1%. Después se volvió a lavar otras dos veces con el tampón SSPE 1X con SDS al 0,1% durante 15 minutos a 65°C. Finalmente se volvió a lavar dos veces durante 15 minutos a 65°C con el tampón SSPE 0,5X con SDS 0,1%. Todo el proceso se realizó en el laboratorio de radioquímica.

Tabla III.23

Tampón SSPE 20X		Solución de pre-hibridación		
Concentración		Concentración	Para 100ml	
NaCl	3M	SSPE 20X	5X	25ml
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	200mM	Reactivo de Blocking*	2%(p:v)	2g
EDTA	20mM	SDS 20%	0,5%	2,5ml
		N-Laurilsarcosina	0,1%(p:v)	0,1g
		Formamida	50%	50ml
		H ₂ O-DPEC		25ml

*Se disuelve calentando el H₂O-DPEC y se dejó enfriar a 42°C antes de añadir el resto de reactivos

4.2.5. Detección de la sonda

Tras los lavados se dejó secar la membrana de nylon a temperatura ambiente y se expuso a una película fotográfica (Kodak X-OMATTH AR), protegidas en casetes de exposición con doble pantalla amplificadora, durante al menos 6 horas a -80°C (dependiendo de la intensidad de la señal), colocando la cara de la membrana de nylon en la que se fijó el ARN en contacto con la película.

El revelado de la película se realizó en oscuridad sumergiéndola en una solución reveladora (Eukobrom, Tetenal) durante 2 o 3 minutos, luego se enjuagó con agua y se sumergió en una solución fijadora (Superfix, Tetenal) durante otros 2 o 3 minutos. Finalmente se enjuagó con agua y se dejó secar a temperatura ambiente. Este revelado mostró las zonas en las que se unió la sonda y la intensidad de la mancha impresionada fue proporcional a la cantidad del ARNm problema presente, y por tanto a la expresión del gen a estudiar.

Para la reutilización de la membrana en otras hibridaciones, esta se incubó con una solución de SDS al 0,1% a 90°C durante 10 o 15 minutos, y después se dejó secar a temperatura ambiente.

5. CLONACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

En el transcurso de esta tesis se ha abordado la clonación de distintos ADNc copia (ADNc) específicos de tabaco, entre los que se incluyen UBI-T, LTP-T, PAL18, PAL27, PR1b, PR2, PR3. Los clones UBI-T, LTP-T, PR1b, PR2 y PR3 se obtuvieron a partir de ARN de hojas de tabaco variedad NN Samsun, mediante reacciones PCR según las condiciones del apartado III.4.1.6, y con los cebadores que se indican en la tabla III.9. Por otro lado, la clonación de PAL18, y PAL27 se realizó a partir de ARN de raíces de tabaco variedad NN Samsun cultivadas en un cultivo hidropónico y expuestas a SA (Apartado III.1.2.5), mediante reacciones PCR según las condiciones del apartado III.4.1.6, y con los cebadores PAL₁-T y PAL₂-T que se indican en la tabla III.9.

Los amplificadores por PCR se separaron mediante electroforesis en un gel de azarosa, según las condiciones descritas en el apartado III.4.1.7, y seleccionando las bandas correspondientes a cada fragmento de ADNc, identificadas según su tamaño, para su posterior purificación y clonación. Estos clones se utilizaron como molde de ADN para la obtención de sondas para los análisis de expresión génica por RT-PCR, Southern blot y Northern blot (apartados III.4.1.8 y III.4.2).

5.1. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

La purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se realizó mediante el uso del kit comercial Quiaex II (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.2. Ligación de fragmentos amplificados por PCR en vectores de clonación

Después de la purificación de los fragmentos de ADN, estos se clonaron en el vector pGEM[®]-T (Promega) mediante la preparación de la mezcla de la tabla III.24. La cantidad de inserto se resolvió según la siguiente ecuación, donde la relación inserto:vector fue 3:1. Esta mezcla se incubó durante 1h a temperatura ambiente. Cuando se precisó una ligación más eficiente, la incubación se realizó durante unas 12 h a 4°C.

$$\frac{ng \text{ vector} \times kb \text{ inserto}}{kb \text{ vector}} \times (\text{inserto} : \text{vector}) = ng \text{ inserto}$$

Tabla III.24: Mezcla de reacción para la ligación en pGEM[®]-T

	Para 10μl
Inserto de ADN	Xμl
2X Rapid Ligation Buffer	5μl
pGEM-T [®] (50ng/μl)	1μl
ADN Ligasa T ₄ (3u/μl)	1μl
H ₂ O milliQ	(3-X) μl

5.3. Preparación de células competentes de *Escherichia coli*

El método utilizado fue el descrito por Hanahan (Hanahan, 1983). Se cultivaron bacterias de *Escherichia coli* DH5α en 3ml de medio LB líquido (Luria- Bernati, tabla III.25) a 37°C durante 12 horas y en agitación. De estos 3ml se tomó 1ml con el que se inocularon otros 100ml de LB líquido. Los 100ml se incubaron durante más de 2 horas a 37°C en agitación hasta alcanzar el cultivo una densidad óptica a 600nm de 0,4 a 0,6 unidades de absorbancia. Entonces se detuvo el crecimiento del cultivo colocándolo en hielo durante 10 minutos. Las células del cultivo se recogieron

centrifugándolas 5 minutos a 4°C y 10.000rpm, se desechó el sobrenadante y se resuspendió con cuidado el precipitado en 100ml de MgCl₂ 0,1M a 4°C. Las células se volvieron a recoger centrifugándolas 5 minutos a 4°C y 5.000rpm, y a resuspender con cuidado en 50ml de CaCl₂ 0,1M a 4°C. Se dejaron enfriar en hielo durante 30 minutos, para recogerlas después por centrifugación durante 5 minutos a 4°C y 5.000rpm. Finalmente, tras desechar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 5ml de CaCl₂ 0,1M con el 20% de glicerol. La suspensión celular se repartió en alícuotas de 100µl, que se congelaron en N₂ líquido y se conservaron a -80°C hasta su utilización.

5.4. Transformación de células competentes de *Escherichia coli*

Se usó el método descrito por Rodríguez y Tait (Rodríguez y Tait, 1983). Según este método las células competentes, previamente preparadas y mantenidas a -80°C (Ver apartado III.5.3), se descongelaron en hielo, y se le añadieron de 50 a 100ng del plásmido de interés (pGEM[®]-T), el cual contiene un gen determinante de resistencia a ampicilina y otro codificante de la enzima β-galactosidasa. La secuencia del gen de la β-galactosidasa se interrumpió en aquellos plásmidos a los que se incorporó el inserto de ADN mediante la reacción de ligación. Las células se mantuvieron en hielo durante 30 minutos, y posteriormente se sometieron a un choque térmico, incubándolas a 42°C durante 90 segundos, tras el cual se mantuvieron en hielo 5 minutos. Después se les añadieron 900µl de LB líquido y se incubaron en agitación a 37°C durante al menos 90 minutos.

Tabla III.25: Medio LB

	Concentración % (p:v)
Triptona	1% (p:v)
Extracto de levadura	0,5% (p:v)
NaCl	0,5% (p:v)
El pH se llevó a 7	
Agar	1,5% (p:v)
Se autoclavó 20 minutos a 120°C	

Para medios selectivos: Cuando se enfrió a 50°C se les añadió:

	Dilución
Ampicilina (200mg/ml)	1:1000(v:v)
X-gal (20mg/ml)	1:500(v:v)

Pasado ese tiempo se inocularon 50, 100 y 200 μ l de este cultivo en medio selectivo (Tabla III.25), donde la ampicilina solo permitió el crecimiento de las bacterias transformadas con pGEM[®]-T; y el X-gal sirvió de sustrato para la β -galactosidasa de las bacterias transformadas con pGEM[®]-T y sin el inserto de ADN, dándole un color azul a estas colonias. Por lo tanto las colonias blancas que crecieron en el medio selectivo contenían el vector pGEM[®]-T con el inserto de ADN.

Para la conservación de las células de *E. coli* portadoras de los distintos plásmidos de interés, se sembraron 5ml de medio LB líquido y se incubaron a 37°C en agitación unas 12 horas. Tras este tiempo se tomaron alícuotas de 800 μ l, se les añadieron 200 μ l de glicerol, autoclavado previamente a 120°C 20 minutos, y se conservaron a -80°C.

5.5. Purificación de ADN plasmídico

La purificación de ADN plasmídico a partir de un cultivo de células de *E. coli* se realizó mediante el uso del kit comercial QIAprep Plasmid (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se tomaron de 1 a 3ml del cultivo de dichas células en LB líquido (Tabla III.25), incubado anteriormente a 37°C durante unas 12 horas, para la obtención de unos 15 μ g de ADN plasmídico.

5.6. Digestión dirigida de ADN

Tanto para la liberación de fragmentos clonados en distintos plásmidos, como para la distinción de genes con secuencias ligeramente diferentes (como fue el caso de los Pal-18 y Pal-27), se utilizaron las enzimas de restricción EcoR 1, EcoRV y Pst I (Roche). La reacción de lisis de ADN se realizó preparando la mezcla que se indica en la tabla III.26, utilizando el tampón recomendado por el fabricante para cada enzima (tampón H para EcoR 1 y Pst I, y tampón D para EcoRV), y se dejó incubar a 37°C (temperatura recomendada por el fabricante) durante un mínimo de 2 horas.

Tabla III.26: Mezcla de reacción para enzimas de restricción

ADN (1 μ g/ μ l)	1 μ l
Tampón recomendado 10X	2 μ l
Enzima de restricción (10u/ μ l)	0,5 μ l
H ₂ O mili-Q	16,5 μ l

5.7. Secuenciación

Las reacciones de secuenciación de fragmentos de ADNc fueron realizadas por el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (CSIC, Granada). La determinación de secuencias se realizó por secuenciación de cadena única, usando un secuenciador automático Perkin-Elmer ABI Prism 373. Para cada reacción se utilizaron de 100-200ng de ADN molde y 6,4pmol de cebador.

5.8. Identificación de secuencias

El análisis, identificación, y comprobación de secuencias se realizó mediante el uso de los programas Chromas Lite, Vector NI, y el programa en línea BLAST (de sus siglas en inglés 'Basic Local Alignment Search Tool', localizado en la página web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cada ensayo se repitió al menos dos veces obteniendo resultados similares. Se utilizaron para el análisis estadístico 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 $p \leq 0,05$. Las diferencias significativas encontradas se indican con letras diferentes en los distintos tratamientos.



IV. Resultados

IV. RESULTADOS

1. PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO SALICÍLICO (SA) EN EL PROCESO DE MICORRIZACIÓN, E IMPLICACIÓN EN LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA DE DEFENSA DURANTE LA MISMA

Con objeto de determinar la participación del SA en la simbiosis MA , y de esclarecer su modo de acción, se estudiaron tanto el efecto que tiene sobre la micorrización la alteración del nivel de SA endógeno en raíces, como la posible relación de estos cambios con la expresión de genes de la planta relacionados con la defensa durante el proceso de micorrización.

1.1. Participación del SA en el proceso de micorrización

1.1.1. Micorrización en plantas transgénicas con altos niveles de SA

Para determinar la posible participación que tiene el ácido salicílico (SA) en la regulación de la micorrización, se estudió la evolución de la micorrización en plantas transgénicas de tabaco afectadas en su capacidad de acumulación de SA, con lo que se pudo relacionar la alteración en los niveles endógenos de SA en las raíces con su capacidad de micorrización. En este sentido se plantearon dos ensayos en los que se utilizaron inóculos de *G. intraradices* y *G. mosseae*, y plantas de tabaco de la variedad silvestre Samsun NN y transgénicas CSA (Constitutive SA biosynthesis). En las plantas CSA la producción de SA está aumentada por la inserción de dos genes bacterianos que transforman el corismato de los cloroplastos vegetales en SA (Verberne y col, 2000). Así, se analizó la evolución de la micorrización para cada especie de hongo micorrízico en ambas líneas, determinando el porcentaje de raíz micorrizada en al menos cuatro tiempos consecutivos de cosecha durante los ensayos en maceta (Figura IV.1).

La evolución en la micorrización observada siguió el patrón de desarrollo normal con ambos hongos, tanto en la línea silvestre Samsun NN como en la transgénica CSA, con una fase inicial de latencia hasta cerca de los 15 días después de la inoculación (dpi), seguida de una fase de desarrollo exponencial. Sin embargo, en la línea CSA el desarrollo de la colonización sufrió un descenso respecto de su silvestre Samsun NN, de manera que en la mayoría de los puntos de cosecha el porcentaje de micorrización fue significativamente inferior en la línea CSA. Solo en la fase inicial (15 y 26 dpi con *G. intraradices*, y 13dpi con *G. mosseae*) y al final del experimento (a los 62dpi con *G. intraradices*, y 39dpi con *G. mosseae*), cuando ambas líneas presentaban un máximo de micorrización, el porcentaje de raíz colonizada fue el mismo para las dos

líneas de tabaco. Aunque en ambas líneas se alcanzó el mismo valor máximo de micorrización con ambos hongos micorrícicos, las raíces de plantas Samsun NN inoculadas con *G. intraradices* lo alcanzaron a los 47dpi, mientras que las de CSA no lo hicieron hasta los 62dpi (Gráfica A, figura IV.1). Resultados semejantes se obtuvieron con *G. mosseae*, donde Samsun NN alcanzó su valor máximo de micorrización a los 32dpi y CSA lo hizo a los 39dpi (Gráfica A, figura IV.1).

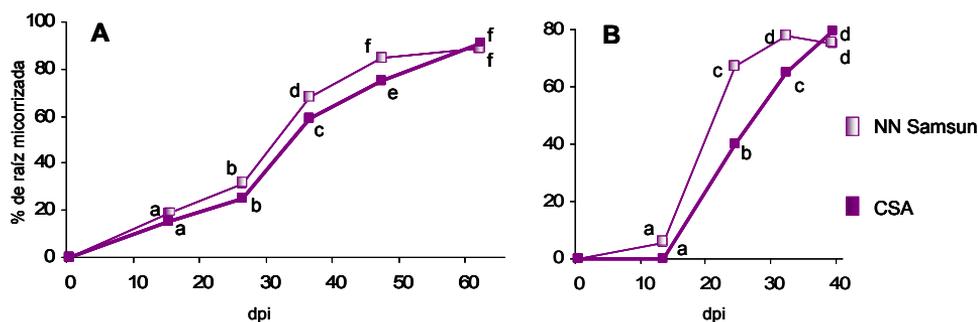


Figura IV.1: Porcentaje de raíz micorrizada en las líneas silvestre Samsun NN y transgénica CSA. **Gráfica A:** Micorrización con *G. intraradices*. **Gráfica B:** Micorrización con *G. mosseae*. Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Con el fin de confirmar que los cambios producidos en la colonización de la línea CSA se debían a cambios en la producción de SA en la misma, se realizaron medidas de los niveles de SA total (libre y β -glucosidado) en raíces de las plantas micorrizadas de ambas variedades inoculadas con *G. intraradices*. De esta forma se comprobó que la cantidad de SA en una primera cosecha (a los 17dpi), fue la misma en ambas líneas, al igual que el porcentaje de raíz colonizada. En las sucesivas cosechas, los niveles de SA total aumentaron en ambas líneas, a la vez que lo hizo también la micorrización. La cantidad de SA por gramo de raíz fue mayor en CSA que en la línea Samsun NN, tanto a los 28 como a los 38 dpi, y el aumento registrado respecto al valor inicial medido a los 17 dpi también fue superior en CSA que en Samsun NN. La cantidad de SA en plantas CSA a los 28 y 38 dpi fue superior en 1,4 y 2,7 veces respectivamente respecto al valor obtenido a los 17 dpi, mientras que en plantas Samsun NN solo aumentó 1,7 veces a los 38dpi (Figura IV.2)

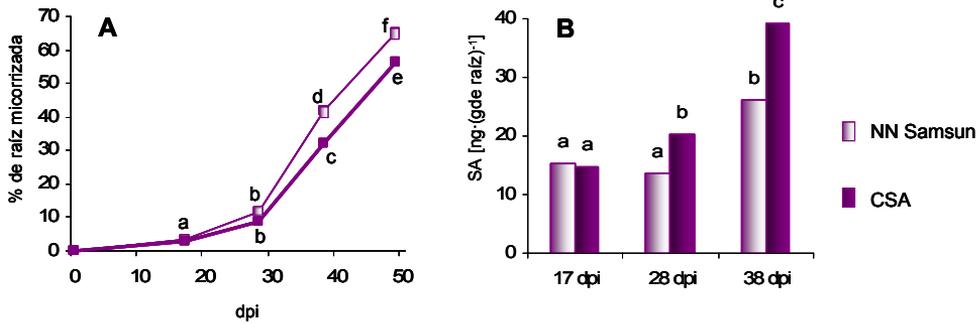


Figura IV.2: Micorrización y cantidad de SA en Samsun NN y CSA. **Gráfica A:** Porcentaje de raíz micorrizada por *G. intraradices* en las líneas silvestre Samsun NN y transgénica CSA de tabaco. **Gráfica B:** Medidas de SA total en raíces de las líneas Samsun NN y CSA de tabaco micorrizadas con *G. intraradices*.

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

1.1.2. Micorrización en plantas transgénicas con deficiencias en la acumulación de SA

Otro tipo de alteración en la capacidad de acumulación de SA lo presentan las plantas transgénicas NahG. En ellas se ha disminuido la capacidad de acumulación de SA, pues se ha insertado un gen bacteriano codificante de una enzima que degrada el SA hasta catecol, CO_2 y H_2O (Gaffney y col, 1993), y por tanto el SA disponible en la célula vegetal es rápidamente eliminado por esta acción enzimática. Con el fin de comprobar el efecto que tienen los descensos endógenos de SA en raíces sobre la micorrización, se inocularon transgénicos NahG de la variedad Xhanti de tabaco y silvestres, con los hongos micorrícicos *G. mosseae* y *G. intraradices*.

Igual que ocurrió con los ensayos con Samsun NN y CSA, al inicio de la colonización no se observaron diferencias entre Xhanti y NahG en el porcentaje de raíz colonizada con ninguno de los dos hongos. En las siguientes cosechas, conforme avanzó la colonización de la raíz, se hicieron patentes las diferencias en la proporción de raíz colonizada con ambos hongos micorrícicos dependiendo de la variedad de la planta. De este modo, el porcentaje de micorrización en la línea transgénica NahG fue casi 2 veces superior al de Xhanti a los 28dpi, y 1,2 veces superior a los 49dpi en el experimento de inoculación con *G. intraradices* (Gráfica A, figura IV.3). Igualmente, con *G. mosseae*, la micorrización en NahG fue 2,3 veces superior a la de a variedad silvestre a los 24dpi, y esta diferencia disminuyó a 1,4 veces a los 34dpi, mientras que

a los 84dpi ya no se encontraron diferencias significativas entre la línea transgénica y la silvestre (Gráfica C, figura IV.3).

Los niveles de SA total en las raíces inoculadas con *G. intraradices* fueron superiores en la línea silvestre en todas las cosechas analizadas (Gráfica B, figura IV.3). También se pudo comprobar que tanto los niveles de SA libre como los de β -glucosido fueron claramente menores en los transgénicos NahG que en los silvestres, medidos en este caso a los 38dpi en el experimento de inoculación con *G. mosseae* (Gráfica D, figura IV.3). El estudio comparado de la evolución de los niveles de SA en las líneas de tabaco Xhanti y NahG, con la evolución de la micorrización con *G. intraradices* reveló resultados interesantes. La cantidad de SA en la raíz aumentó conforme lo hizo la micorrización, tanto en Xhanti como en NahG, aunque manteniéndose siempre en niveles inferiores en NahG. Esta diferencia en la cantidad de SA entre Xhanti y NahG, fue disminuyendo a lo largo de la micorrización (tabla IV.1), y curiosamente, el punto con mayor diferencia en la micorrización (28dpi) ocurrió 10 días después del de mayor diferencia en la cantidad de SA (17dpi). Conforme fue disminuyendo la diferencia en la cantidad de SA, lo hizo la diferencia en la micorrización entre NahG y Xhanti, pero con 10 días de retraso (tabla IV.1, figura IV.3).

Tabla IV.1. Micorrización con *G. intraradices* y contenido en SA de Xhanti y NahG

	Días tras la inoculación	Xhanti	NahG	NahG/ Xhanti	Xhanti/ NahG
% de raíz colonizada	17	2,4 a	4,6 a	-	
	28	11,4 b	19,8 c	1,7	
	38	29,5 d	42,4 e	1,4	
	49	57,6 f	66,6 g	1,2	
SA (ng/g de raíz)	17	23,5 b	6,8 a		3,5
	28	42,5 c	22,6 b		1,8
	38	70,0 e	48,3 d		1,5

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

En un nuevo ensayo con ambas líneas e inoculadas con *G. mosseae*, se estudiaron el porcentaje de raíz micorrizada, el de arbuscúlos en el sistema, y el de unidades de infección (Tabla IV.2). De este modo se comprobó como los tres parámetros se duplicaron a los 14dpi en los transgénicos NahG respecto a Xhanti, mientras que no

se encontraron diferencias a la semana de la inoculación. Los valores de los tres parámetros fueron significativamente superiores en NahG a los 21dpi, aunque las diferencias fueron menores que a los 14dpi. A los 31dpi no se encontraron diferencias significativas entre ambas líneas.

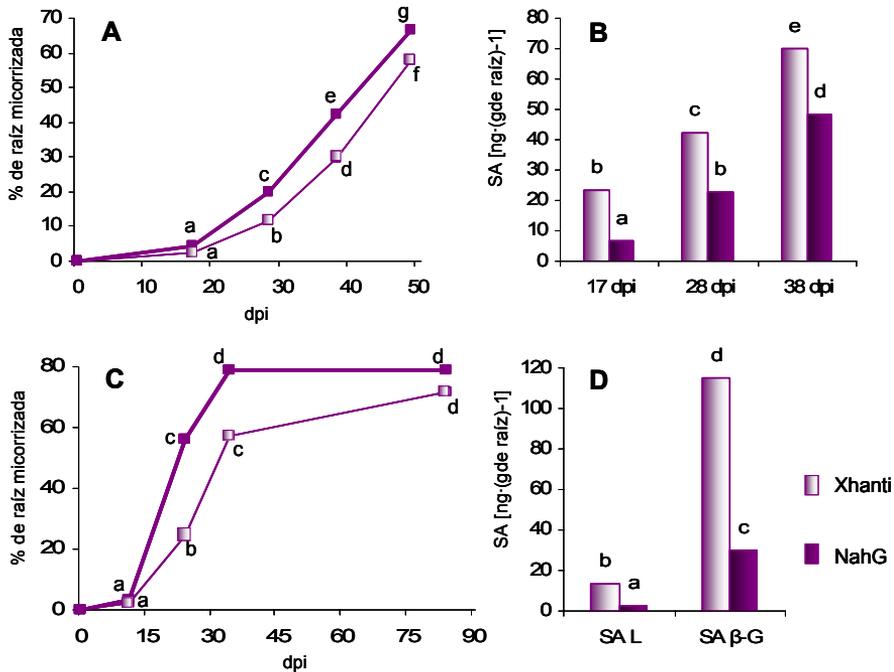


Figura IV.3: Micorrización y cantidad de SA total en plantas de tabaco de las variedades Xhanti y NahG. **Gráfica A:** Porcentaje de raíz micorrizada por *G. intraradices*. **Gráfica B:** Medidas de SA total en raíces inoculadas con *G. intraradices*. **Gráfica C:** Porcentaje de raíz micorrizada por *G. mosseae*. **Gráfica D:** Medidas de SA libre (SA L) y β-glucosidado (SA β-G) en raíces inoculadas con *G. mosseae* a los 34dpi. Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos en plantas de tabaco, se comprobó el efecto endógeno de la disminución de SA sobre la micorrización con *G. intraradices* en plantas transgénicas NahG de otras especies vegetales como el tomate, variedad Moneymarker, y *Lotus japonicus*. La línea transgénica NahG de tomate, igual que la de tabaco, tiene una copia del gen *nahG*, cuyo producto proteico provoca la degradación del SA en la planta (Brading y col, 2000). Los ensayos se realizaron en maceta, y la disminución de SA en raíces provocó un incremento en la colonización de la raíz de tomate NahG por el hongo *G. intraradices* respecto a su línea silvestre,

pero siempre una vez superadas las primeras etapas de colonización (Gráfica A, figura IV.4).

Tabla IV.2. Distintos parámetros de micorrización con *G. mosseae*

	Días tras la inoculación	Xhanti	NahG	NahG/ Xhanti
% de raíz colonizada	7	5,8 a	9,7 a	-
	14	22,3 b	44,8 c	2,0
	21	52,2 c	64,6 d	1,2
	31	76,2 e	75,3 e	-
% de arbusculos	7	-	0,8 a	-
	14	15,3 b	31,1 c	2,0
	21	31,1 c	52,8 d	1,7
	31	52,1 d	54,0 d	-
% de unidades de infección	7	2,6 a	5,9 a	-
	14	21,2 b	43,7 c	2,1
	21	48,8 b	60,7 e	1,2
	31	56,8 e	61,3 e	-

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

El mismo efecto de inducción en el desarrollo de la micorrización con *G. intraradices* se pudo observar en plantas transgénicas de *L. japonicus* en las que se han insertado un número variable de copias del gen *nabG*. Así, se utilizaron las líneas transgénicas GI3.8 y GB3.B de *L. japonicus*, con una y tres copias insertadas del gen *nabG* respectivamente (Stacey y col, 2006). Los ensayos se realizaron en maceta, y en ambos casos la disminución de SA en raíces se relacionó con un incremento en la colonización de la raíz respecto a la línea silvestre, una vez superadas las primeras etapas de colonización (Gráfica B, figura IV.4). Sin embargo, no se observaron incrementos mayores en la micorrización en la línea GB3.B, con tres copias del gen *nabG*, que en la línea GI3.8, con una sola copia. Así mismo, tal y como se observó en tabaco, la presencia del gen *nabG* no alteró la capacidad máxima de micorrización de la planta, y en este sentido se pudo observar como los porcentajes de micorrización se igualaron en las líneas silvestres y transgénicas NahG al alcanzar dicho máximo. Conforme la micorrización se acercó a los niveles máximos en la línea silvestre y transgénica, las diferencias de micorrización se hicieron menores.

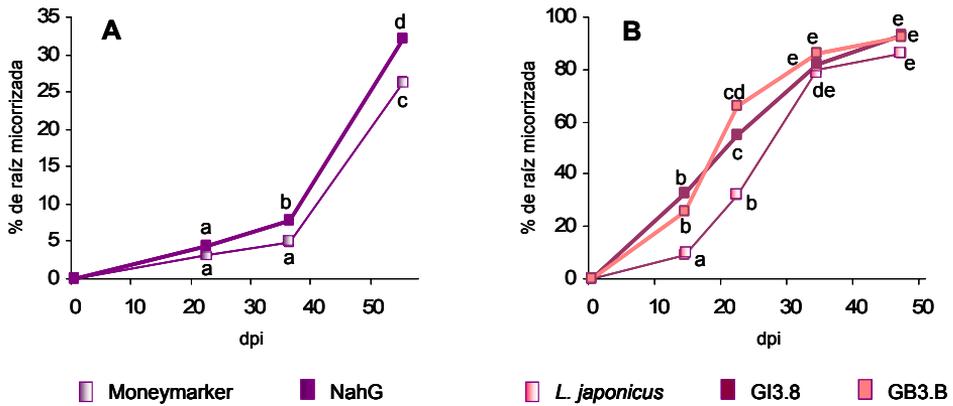


Figura IV.4: Porcentaje de raíz micorrizada en líneas silvestres y transgénicas NahG. **Gráfica A:** porcentaje de raíz micorrizada en las líneas silvestre Moneymarker y transgénica NahG de tomate. **Gráfica B:** porcentaje de raíz micorrizada en las líneas silvestres y transgénicas NahG (GI3.8 y GB3.B) de *L. japonicus*. Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

1.2. Implicación del SA en la inducción de respuestas de defensa durante la micorrización

1.2.1. Expresión de genes de defensa inducibles por SA durante la micorrización

Es conocido que el SA está estrechamente ligado con la respuesta de defensa a agentes patógenos en plantas, principalmente agentes biotróficos, (Apartado II.3.2.1). Con el fin de determinar si el efecto negativo del SA sobre el desarrollo de la micorrización está relacionado con la inducción de una respuesta de defensa, se estudió la expresión de diversos genes relacionados con la defensa y supuestamente inducibles por SA. Estos estudios de expresión se realizaron en los ensayos descritos en los apartados IV.1.1.1 e IV.1.1.2, en los que se utilizaron plantas de tabaco silvestres y transgénicas afectadas en su capacidad de acumulación de SA, inoculadas con *G. intraradices*, y como se ha mostrado anteriormente, afectadas en su capacidad de micorrización. Los experimentos de análisis de expresión génica se llevaron a cabo utilizando dos metodologías distintas: a) Para el estudio comparado de la expresión de los genes PAL, *PR1b*, *PR2*, *PR3* y *LTP* se realizaron RT-PCRs semicuantitativas, y análisis Southern blot; Y b) para el análisis de la expresión comparada de *PR1a*, *PR5*, *APX* y *CAT*, se utilizó la metodología del Northern blot.

● **Expresión de los genes *PAL*, *PR1b*, *PR2* y *PR3* en tabaco durante la micorrización**

El estudio de la expresión de distintos genes codificantes para la enzima PAL (Fenilalanina amonio-liasas), se realizó mediante la clonación de fragmentos de ADNc con cebadores degenerados diseñados para *PAL* en tabaco, y el análisis de su expresión diferencial mediante RT-PCR. La clonación se realizó a partir de raíces de plantas de tabaco variedad Samsun NN, cultivadas en un medio hidropónico en condiciones axénicas para evitar contaminantes de otros microorganismos en las raíces, y al cual se añadió SA con el fin de inducir la expresión de genes de respuesta a dicho compuesto. Gracias al uso de cebadores degenerados diseñados para *PAL* en tabaco, PAL₁-T y PAL₂-T (Tabla III.11), se clonaron dos fragmentos cDNA de genes codificantes para PAL en tabaco, los cuales se denominaron PAL18 y PAL27. La secuencia de ambos ADNcs resultó ser tan parecida que hizo difícil el diseño de cebadores específicos para cada uno (Figura IV.5). No obstante, si se diseñó un cebador específico para PAL18, PAL18-r (Tabla III.11), que se usó junto con PAL₁-T para amplificar un fragmento de 481pb, que hibridaba específicamente con las sondas del ADNc PAL18 y no con las de PAL27. Para determinar la expresión de PAL27 se aprovechó una diana para la enzima de restricción EcoRI presente en la secuencia de PAL27. Así, se amplificaron distintas isoformas de PAL con PAL₁-T y PAL₂-T, y posteriormente se trataron con EcoRI, obteniéndose tres bandas en la electroforesis: Una superior de 532pb correspondiente a la amplificación de diferentes ADNcs de PAL (incluida PAL18), seguida de otras dos de 379pb y 153pb correspondientes a los dos fragmentos de PAL27. La hibridación con sondas específicas PAL18 y PAL27 del resultado tras el tratamiento con EcoRI del amplificado con PAL₁-T y PAL₂-T, demostró que los fragmentos resultantes del tratamiento con la enzima de restricción son específicos de PAL27.

Siguiendo la metodología descrita se analizó la expresión de *PAL* en plantas de tabaco no micorrizadas y micorrizadas con *G. intraradices*, realizando el análisis en cuatro cosechas consecutivas durante el desarrollo de la micorrización y en las dos variedades diferentes de tabaco. Tras el análisis de la expresión diferencial de *PAL18* y *PAL17* entre tratamientos micorrizados y no micorrizados, se comprobó que en ninguno de los puntos de cosecha analizados se detectaron diferencias significativas en la expresión de estos genes como consecuencia de la micorrización (Figura IV.6). Tan solo se observaron leves descensos en los niveles de expresión de PAL 27 en plantas micorrizadas respecto a sus controles no micorrizadas en las dos primeras cosechas.

Del mismo modo, cuando se comparó la expresión de ambos genes PAL durante la micorrización de variedades silvestres y transgénicos afectados en la capacidad de acumulación de SA, no se observaron diferencias en la expresión de *PAL18* y *PAL27* asociadas a las variaciones de SA endógeno (Figura IV.6). Así, en plantas CSA, con niveles superiores en SA y menor micorrización que su silvestres Samsun NN, la expresión no varió respecto a la de Samsun NN. Tampoco la expresión de estos genes varió en NahG respecto a Xhanti, con menor cantidad de SA y mayor micorrización que su silvestre.

	1	10	20	30	40	50	60
Pal-18 (1)	TGAACAACACAACCAAGATGTCAACTCCTTGGGCTTAATCTCAGCAAGGAAAAACAGCTGA						
Pal-27 (1)	TGAACAACACAACCAAGATGTA AACTCTTGGGCTTAATCTCTCAAGAAAAACAGCTGA						
	61	70	80	90	100	110	120
Pal-18 (1)	AGCTGTGATATCTTAAAGTCATGTCATCAACTTATCTAGTGGCAGTTTGCCAAAGCTAT						
Pal-27 (1)	GGCGGTGATATCTTGAAGTCATGTCCTTACTTATCTAGTAGCAGCTTTGCCAAAGCCAT						
	121	130	140	150	160	170	180
Pal-18 (1)	CGACTTGAGGCATTTGGAGGAAAACTTAAAGAAATGCAGTCAAGAACACAGTTAGCCAAGT						
Pal-27 (1)	TGACTTGAGGCATTTGGAAGAAAACTCAAGGCTTCAGTGAAAAGTGAGTGGTGGT						
	181	190	200	210	220	230	240
Pal-18 (1)	AGCTAAGAGAACTCTTACAATGGGTGCTAACGGTGAACCTTCAATCCAGCAAGATTCTGTGA						
Pal-27 (1)	GGCCAAGAAAGTGCTGATAACTGGTCAAAATGGAGGGCTTCACTATTCAAGATTGAGCGA						
	241	250	260	270	280	290	300
Pal-18 (1)	AAAGGAAATTGCTACGAGTCTGGACAGGGAATACTTGTTCGCCTACGCTGATGATCCCTTG						
Pal-27 (1)	GAAAGACTTGCTCACAGCGTTGATAGAGAATATTGTTTGCATATGCTGATGACCCCTG						
	301	310	320	330	340	350	360
Pal-18 (1)	CAGTTGCAACTACCTTTAATGCAGAACTGAGACAAGTACTTGTGATCATGCAATGAA						
Pal-27 (1)	CAGTGCTAACTATCCACTAATGCAAAAGTTAAGACAAGTGTAGTGGACCATGCCCTATT						
	361	370	380	390	400	410	420
Pal-18 (1)	TAATGGTGAAGTGAAGAATGTGAACAGTCAATCTTCCAAAAGATTGGAGCTTTGGA						
Pal-27 (1)	GAATAGTAATGAGGAGAGCAATCTAGCACTCAATTTTCCATAAAATCAGTGCATTGGA						
	421	430	440	450	460	470	480
Pal-18 (1)	AGACGAATTAAAGGCTGTTTTACCAAGGAAGTTGAGAGTGCAGGCTGCAATTGGAATG						
Pal-27 (1)	GGAAGAATTGAAGATTGTTTTGCCTAAGGAAATTGAGAGTGCATGATTAACTTGGAAGAA						
	481	490	500	510	520	532	
Pal-18 (1)	TGGCAACCCCTGCTATTGCTAACAGGATTACAGAATGCAGGTCTTATCCATTG						
Pal-27 (1)	TGGGAAGCCAGCAATTCTAATAGGATTACAGAATGCAGGTCTTATCCATTG						

Figura IV.5: Secuencias de ADNc PAL18 y PAL27. Se indican los lugares de alineamiento de los cebadores PAL₁-T y PAL₂-T en azul marino, y PAL18-r en morado, además de la diana para la enzima de restricción EcoRI, en rojo.

Para asegurarnos de que la cantidad de ARNm utilizada en cada tratamiento fue la misma, se analizó como marcador interno la expresión del gen constitutivo *PolyUBI* de tabaco, amplificado con los cebadores UBI1-General y UBI2-general (tabla III.11), que amplificaron fragmentos de 228 y 456pb (Figura IV.6).

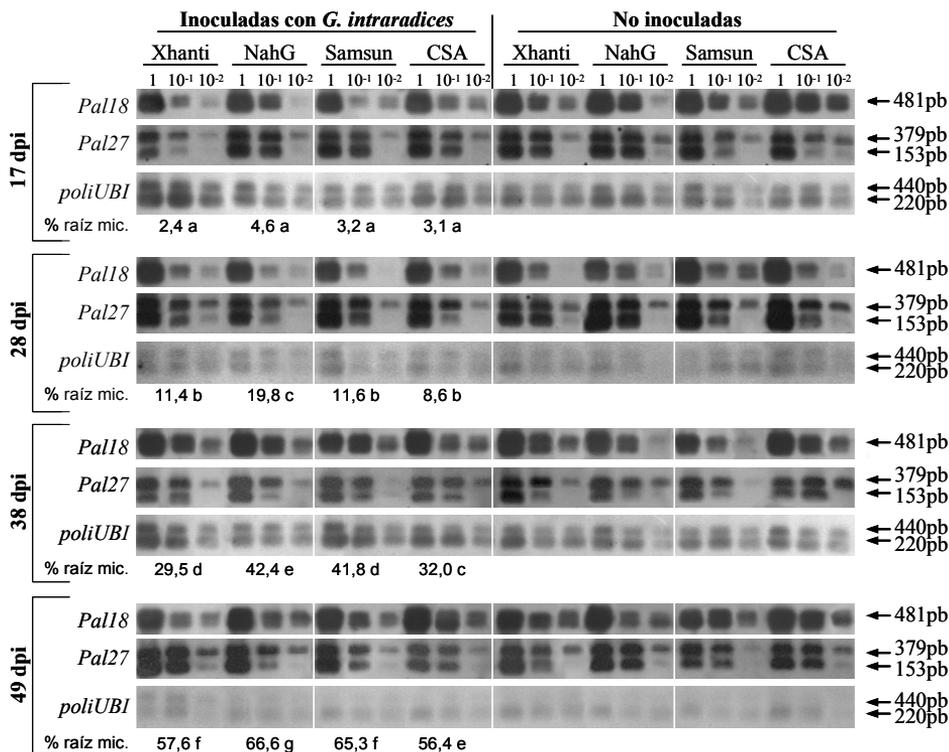


Figura IV.6: Análisis de la expresión de los genes *Pal18*, *Pal27*, y *poliUBI*. Fotografías del análisis Southern blot e hibridación con sonda específica de los productos RT-PCR tras digestión EcoRI del ADNc. La expresión de cada gen en cada tratamiento se estudió en tres diluciones distintas del ADNc total (1, 10⁻¹ y 10⁻²). El ADNc se extrajo de raíces de tabaco de las líneas Xhanti, Samsun NN, NahG y CSA. Debajo que cada bloque de fotografías se encuentran los datos del porcentaje de raíz micorrizada (% raíz mic.) en las cuatro líneas a los 17, 28, 38 y 49 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi). Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Para el estudio de la expresión de los genes *PR1b*, *PR2* y *PR3*, se utilizó la misma metodología que se explica para los genes *PAL*. De esta forma se clonaron fragmentos ADNc específicos para cada gen (apartado III.5), se analizaron mediante secuenciación, y se utilizaron como patrones para el marcado de sondas específicas usadas en los experimentos de hibridación por Southern blot de los amplificadores obtenidos RT-PCR, usando los cebadores que se indican en la tabla III.11. Como control de la cantidad de ARNm utilizada en cada tratamiento se utilizó la cantidad de ADNc del gen constitutivo de tabaco *PoliUBI*.

Se analizaron las posibles variaciones en la expresión de *PR1b*, *PR2* y *PR3* en plantas no micorrizadas y micorrizadas con *G. intraradices*, de las variedades Samsun NN y Xhanti (con el 24% y el 30% de raíz micorrizada respectivamente). En ninguno de estos casos se detectaron variaciones significativas en la expresión de estos genes debidas a la micorrización (Figura IV.7). Igualmente, se estudió el posible efecto de las variaciones en los niveles endógenos de SA sobre la expresión de estos genes, gracias al análisis de expresión en las plantas transgénicas CSA, y NahG. En el caso de CSA (con un 20% de raíz micorrizada frente al 24% de Samsun NN) no se observó ni inducción, ni represión en la expresión de los genes *PR1b*, *PR2* y *PR3*. Tampoco se observaron diferencias significativas en la expresión de los mismos en plantas NahG (con un 37% de raíz micorrizada) respecto a Xhanti (con el 30% de raíz micorrizada) (Figura IV.7).

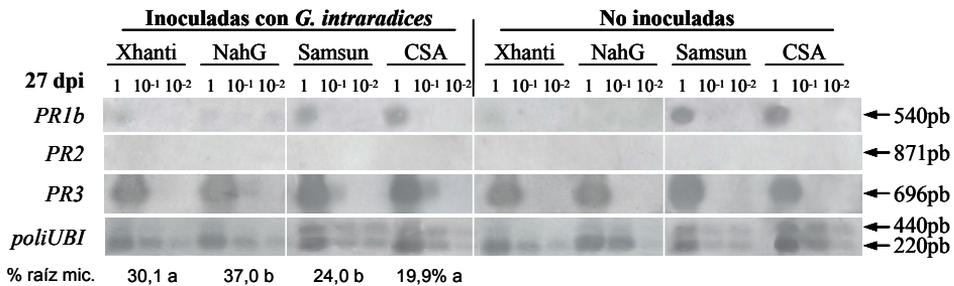


Figura IV.7: Análisis de la expresión de los genes *PR1b*, *PR2*, *PR3* y *poliUBI*. Fotografías del análisis por Southern blot e hibridación de los productos RT-PCR. La expresión de cada gen y cada tratamiento se estudió en tres diluciones distintas del ADNc total (1, 10⁻¹ y 10⁻²). El ARN se extrajo de raíces de tabaco de las variedades Xhanti y Samsun NN, y de los transgénicos NahG y CSA. El estudio se hizo en plantas inoculadas con *G. intraradices* y controles sin inocular a los 27dpi (días tras la inoculación). Debajo que cada bloque de fotografías se encuentran los datos del porcentaje de raíz micorrizada (% raíz mic.)

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

● Expresión durante la micorrización de otros genes relacionados con la defensa en plantas de tabaco

Tras clonación de ADNc de genes de tabaco *PR1a*, *PR5*, *APX* y *CAT*, y con la técnica Northern blot (apartado III.4.2) se buscaron posibles diferencias en la expresión en dichos genes durante la micorrización. No se pudo detectar expresión de estos genes ni en las raíces de plantas micorrizadas, ni en las no micorrizadas de la

variedades Samsun NN (con 3%, 12%, 42% y 65% de raíz micorrizada) y Xhanti (con 2%, 11%, 30% y 58% de raíz micorrizada) a los 17, 28, 38 y 49 días tras la inoculación. Del mismo modo, no se detectó la expresión de ninguno de ellos ni en las transgénicas CSA, con mayor cantidad de SA (con 3%, 9%, 32% y 56% de raíz micorrizada), ni en las NahG, con niveles de SA reducidos (con 5%, 20%, 42% y 67% de raíz micorrizada).

1.2.2. Relación entre la mutación de genes simbióticos y expresión de genes de defensa inducibles por SA

Estudios previos a este trabajo de Tesis, realizados en el grupo de investigación, demostraron la acumulación de SA en mutantes de guisante Nod-/Myc- en respuesta a la inoculación con *Rhizobium* y hongos de la micorriza arbuscular (Blilou y col, 1999). Profundizando en esta dirección, se plantearon una serie de experimentos destinados a buscar la posible relación entre los incrementos de SA y la inducción de la respuesta de defensa durante la micorrización en dichos mutantes. Se realizaron diversos ensayos con dos líneas mutantes de guisante de la variedad Finale, RisNod 2 y RisNod 19, afectadas en los genes *Sym19* y *Sym30* respectivamente, y para los cuales se tenían datos previos de su capacidad de acumulación de SA en respuesta a hongos arbusculares. Para el ensayo se utilizó el hongo micorrícico *G. intraradices*, y se determinó el porcentaje de raíz micorrizada en ambas líneas mutantes respecto a la silvestre. Se realizaron medidas de la expresión de dos genes marcadores de respuesta defensiva en guisante (PR-relacionados con la defensa), el *PI206* y *PI49*. El gen *PI206* es inducido durante la micorrización y su expresión está asociada a la formación de apresorios (Ruiz-Lozano y col, 1999). Como gen marcador del proceso de micorrización se eligió el gen simbiótico *ENOD12A*, codificante para una nodulina temprana y expresado tanto durante la nodulación como la micorrización (Albrecht y col, 1998).

Antes de realizar los ensayos correspondientes, se comprobó si los genes *PI206* y *PI49* están inducidos o no por el SA, para lo cual se analizó su expresión por RT-PCR en raíces de Guisante de la variedad Finale, silvestres y mutantes *Sym30*, controles y tratadas con una solución 1mM de SA aplicado sobre el sustrato. Con este ensayo se comprobó que la expresión del gen *PI206* se ve fuertemente inducida tras el tratamiento de SA, mientras que la del gen *PI49* apenas se ve afectada por esta molécula (Figura IV.8).

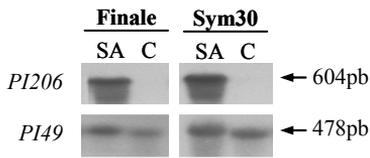


Figura IV.8: Análisis de la expresión por RT-PCR de la expresión de *PI206* y *PI49* en plantas de guisante variedad Finale, en silvestres y mutantes Sym30 controles (C) y tratadas con una solución de SA 1mM. Fotografías del gel tras la separación por electroforesis y tinción con bromuro de etidio.

Las determinaciones se realizaron en plantas cosechadas a los 16 y 29 días después de la inoculación con *G. intraradices* (dpi). Los resultados de micorrización mostraron unos porcentajes de colonización del 31% y 78% a los 16 y 29 dpi en la línea silvestre (Figura IV.9). En ambos mutantes Myc-/*Nod*-, afectados en los genes simbióticos *Sym19* y *Sym30*, no se encontraron estructuras fúngicas intraradicales, pudiendo el hongo micorrícico formar solo apresorios.

El estudio de la expresión de los genes *ENOD12A*, *PI206* y *PI49* se realizó mediante RT-PCR, con los cebadores descritos en la tabla III.12, y análisis Southern blot de los amplificadores, usando sondas específicas en los experimentos de hibridación. Como referencia interna de la cantidad de ADNc se analizó la expresión del gen *polyUBI*. Las plantas no micorrizadas, no expresaron el gen simbiótico *ENOD12A*, mientras que en las micorrizadas la expresión fue mayor en la línea silvestre durante la primera cosecha (16dpi). A los 16 dpi la expresión de *ENOD12A* fue casi inapreciable en los mutantes de *Sym19* y totalmente inapreciable en los mutantes de *Sym30*. En la cosecha siguiente, con un 78% de raíz micorrizada en plantas Finale, la expresión de *ENOD12A* disminuyó en esta línea respecto a su valor a los 16 dpi, mientras que en los mutantes de *Sym19* y *Sym30* aumentó levemente en comparación a la expresión observada en la primera cosecha (Figura IV.9). El gen *PI206* se expresó en todas las líneas inoculadas, siendo su inducción superior en los mutantes *Sym19* y *Sym30* que en los silvestres Finale, especialmente en *Sym19* a los 16dpi y en los dos mutantes a los 29 dpi (Figura IV.9). *PI49* se expresó en todas las líneas y tratamientos, tanto en plantas inoculadas como en no inoculadas, mostrando mayor inducción en las plantas con mayor tiempo de cultivo (29dpi).

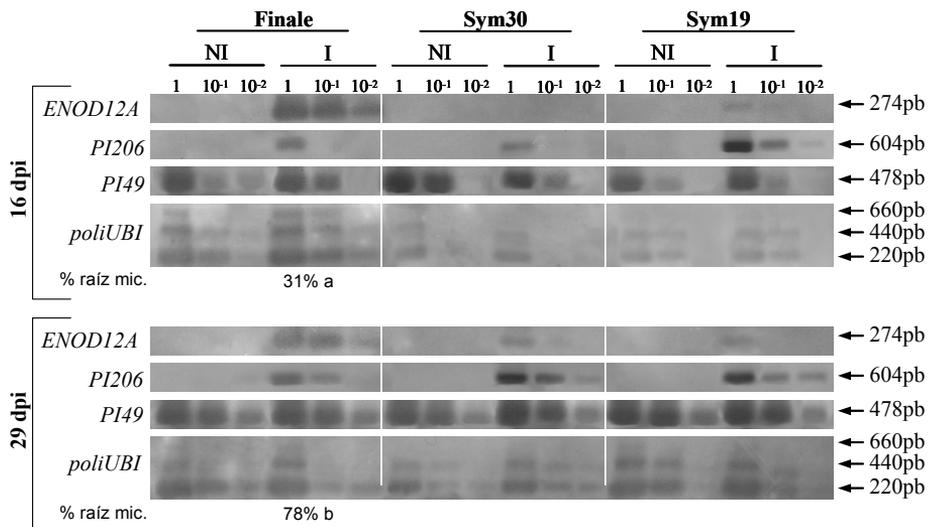


Figura IV.9: Análisis de la expresión de los genes *ENOD12A*, *PI206*, *PI49* y *poliUBI* en plantas inoculadas (I) y no inoculadas (NI) con *G. intraradices*. Fotografías del análisis por Southern blot e hibridación de los productos RT-PCR. La expresión de cada gen y cada tratamiento se realizó en tres diluciones distintas del ADNc total (1, 10⁻¹ y 10⁻²), y en raíces de plantas silvestres Finale, y mutantes en los genes *Sym30* y *Sym19*. Debajo que cada bloque de fotografías se encuentran los datos del porcentaje de raíz micorrizada (% raíz mic.) a los 16 y 19 días tras la inoculación (dpi).

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

1.2.3. Evolución de la micorrización en plantas que sobre-expresan proteínas relacionadas con la defensa

Como complemento del estudio anterior sobre el efecto que tiene la alteración en los niveles de SA de la planta en la micorrización, se realizaron una serie de experimentos dirigidos a estudiar los posibles cambios provocados en la micorrización por la inducción constitutiva en la planta de respuestas de defensa similares a las que induce el SA. Para ello se utilizaron plantas transgénicas que expresan de manera constitutiva el gen *PRms*, el cual codifica una proteína PR en maíz, inducida en respuesta a infección fúngica (Casacuberta y col, 1991), y cuya expresión constitutiva en plantas de tabaco (plantas *PRms*) origina la activación constitutiva de la expresión de genes considerados como marcadores de la expresión de la respuesta SAR (Murillo y col, 2003). Además, estas plantas presentan una alteración en las condiciones normales de asimilación y distribución de fotoasimilados, siendo plantas con mayor capacidad de acumulación de sacarosa en detrimento de

almidón, y con un contenido muy alto de sacarosa en el floema, lo que indica una mayor capacidad de volcado de dicho asimilado y de redistribución a las zonas no asimiladoras (Murillo y col, 2003).

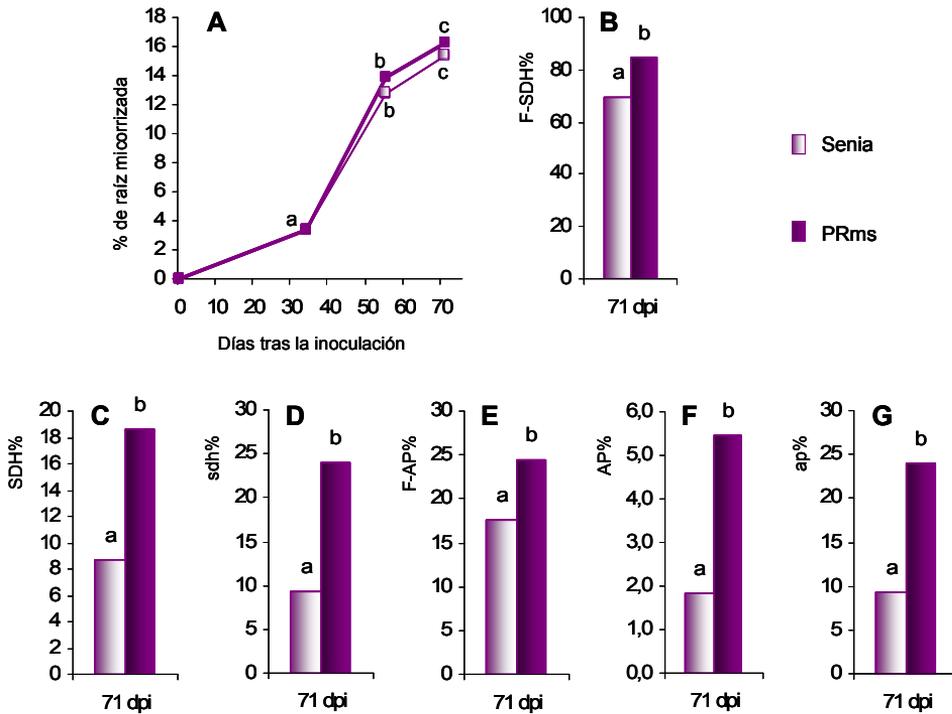


Figura IV.10: Parámetros de micorrización en líneas de arroz Senia y PRms. **Gráfica A:** porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica B:** Frecuencia de la actividad succinato deshidrogenasa fúngica (F-SDH%). **Gráfica C:** Intensidad de actividad succinato deshidrogenasa fúngica en el sistema radical (SDH%). **Gráfica D:** Intensidad de actividad SDH fúngica por fragmento contabilizado (sdh%). **Gráfica E:** Frecuencia de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (F-AP%). **Gráfica F:** Intensidad de actividad fosfatasa alcalina fúngica en el sistema radical (AP%). **Gráfica G:** Intensidad de actividad fosfatasa alcalina fúngica por fragmento contabilizado (ap%)

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

En los experimentos de micorrización se usaron plantas transgénicas PRms tanto de arroz, variedad Senia, como de tabaco, variedad Petit Havana SR1 (Murillo y col, 2003). Al inocular plantas de arroz silvestres Senia y transgénicas PRms con *G. intraradices* no se observaron diferencias en el porcentaje total de raíz micorrizada (Gráfica A, figura IV.10). Sin embargo, un análisis más exhaustivo de la micorrización

mostró diferencias significativas entre las dos líneas. Dicho análisis se realizó en plantas de 71 días tras la inoculación (dpi). Por un lado se cuantificó la cantidad de hongo vivo, medido la actividad succinato deshidrogenasa fúngica (SDH), comprobando su frecuencia en el sistema radical (F-SDH%), la intensidad en el sistema radical (SDH%), y la intensidad de SDH por fragmento cuantificado (sdh%). Estas mediciones mostraron un aumento significativo tanto en F-SDH%, como en SDH% y sdh% en los transgénicos PRms respecto de los silvestres de arroz Senia, demostrando un aumento en la frecuencia e intensidad de *G. intraradices* en la raíz (Gráficas B, C y D, figura IV.10). Por otro lado se realizó la cuantificación de la eficiencia de la micorrización por medio de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP), localizada principalmente en los arbusculos. Se determinó la frecuencia de AP fúngica en el sistema radical (F-AP%), la intensidad de AP fúngica en el sistema radical (AP%), y la intensidad de AP fúngica por fragmento cuantificado (ap%). Los resultados también mostraron un incremento significativo en los transgénicos PRms, tanto en la frecuencia de actividad del hongo como también en la intensidad de esta actividad (Gráficas E, F y G, figura IV.10).

Los efectos de la sobre-expresión de *PRms* sobre la micorrización se pudieron observar con mayor claridad en plantas de tabaco. En estos experimentos, el porcentaje total de raíz micorrizada fue claramente superior en la línea transgénica PRms que en la silvestre SR1. Las diferencias en micorrización entre PRms y SR1 se observaron a lo largo de todo el periodo de crecimiento y micorrización de las plantas, aunque fueron disminuyendo conforme la micorrización se acercó al máximo (Gráfica A, Figura IV.11).

De los cuatro puntos en los que se midió el porcentaje de raíz micorrizada, se seleccionó el punto de cosecha de 51 dpi para analizar en profundidad el estado de la micorrización en ambas líneas. A los 51dpi, se obtuvo un 30% de micorrización en plantas silvestres SR1 y un 59% en transgénicas PRms. Sobre estas plantas se realizó un análisis de: frecuencia de micorrización (F%), intensidad de la micorrización en el sistema radical (M%), intensidad de la micorrización por fragmento contabilizado (m%), intensidad de arbusculos en el sistema radical (A%), e intensidad de arbusculos por fragmento contabilizado (a%) (Figura IV.11 y tabla IV.3). No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de micorrización entre ambas líneas, pero sí en M% y m%, observándose incrementos de estos parámetros de 2,2 veces en plantas PRms (Gráficas B, C y D, figura IV.11). La mayor diferencia entre ambas líneas se pudo observar en la intensidad de arbusculos del sistema radical, siendo 2,7 veces superior en PRms (Gráfica E, figura IV.11). La cuantificación de la viabilidad del hongo en la raíz, medida como actividad SDH fúngica, mostró de nuevo la misma

tendencia, no se encontraron diferencias en F-SDH%, aunque sí en la intensidad en el sistema radical e intensidad de SDH fúngica por fragmento, que fue 1,5 veces superior en PRms (Gráficas G y H, figura IV.11). Finalmente se cuantificó la eficiencia de la micorrización mediante medidas de AP fúngica, con lo cual se pudo comprobar que, de forma parecida a como ocurrió en plantas de arroz transgénicas PRms, la línea PRms presentó mayor F-AP% que la silvestre SR1 (Gráficas I y J, figura IV.11).

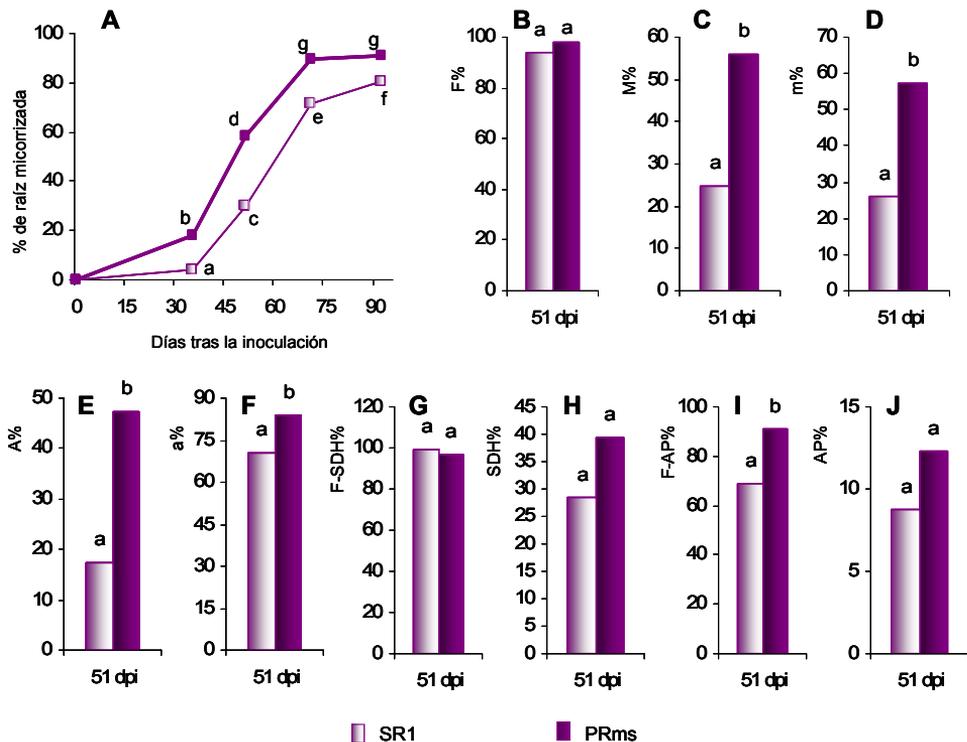


Figura IV.11: Parámetros de micorrización de plantas de tabaco SR1 y PRms. **Gráfica A:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica B:** Frecuencia de micorrización (F%). **Gráfica C:** Intensidad de micorrización en el sistema radical (M%). **Gráfica D:** Intensidad de micorrización por fragmento (m%). **Gráfica E:** Intensidad de arbusculos en el sistema radical (A%). **Gráfica F:** Intensidad de arbusculos por fragmento (a%). **Gráfica G:** frecuencia de actividad succinato deshidrogenasa fúngica (F-SDH%). **Gráfica H:** Intensidad de actividad succinato deshidrogenasa fúngica en el sistema radical (SDH%). **Gráfica H:** Frecuencia de actividad fosfatasa alcalina fúngica (F-AP%). **Gráfica I:** Intensidad de actividad fosfatasa alcalina fúngica en el sistema radical (AP%)

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Con el fin de establecer una relación entre las alteraciones en la micorrización de las líneas transgénicas PRms y las posibles alteraciones en los niveles de SA en estas líneas, se cuantificaron los niveles de SA total en raíces de SR1 y en PRms. En la gráfica C de la figura IV.12 se representa el porcentaje de raíz micorrizada en tres cosechas distintas de un experimento de micorrización, donde se seleccionaron dos tiempos de cosecha para determinar niveles de SA en los cuales las diferencias en micorrización fueron significativas. A los 30 dpi no se observaron diferencias significativas en los niveles de SA en raíz en ninguno de los tratamientos. La medida de SA total a los 50 dpi mostró que tanto en la línea silvestre como en la transgénica se incrementaron los niveles de SA respecto al valor observado a los 30 dpi como consecuencia de la micorrización (Gráfica A, Figura IV.12). Aunque la tendencia fue la misma, el incremento en la producción de SA observado en SR1 micorrizadas fue superior en SR1 que en PRms, de modo que los niveles de SA en las raíces de 50 dpi de plantas silvestres SR1 micorrizadas fueron significativamente mayores a los de la línea transgénica PRms micorrizada (Gráfica A, Figura IV.12).

Tabla IV.3. Relación de micorrización y actividades SDH y AP entre tabaco silvestre SR1 y transgénico PRms

	Días tras la inoculación	SR1	PRms	PRms /SR1
% de raíz colonizada	35	4,0 a	18,3 b	4,6
	51	29,5 c	58,6 d	2
	71	71,5 e	89,9 g	1,3
	92	80,8 f	90,8 g	1,1
Micorrización 51dpi	F%	94,0 a	98,0 a	-
	M%	24,7 a	56,0 b	2,2
	m%	26,0 a	57,2 b	2,2
	A%	17,3 a	47,3 b	1,7
	a%	70,1 a	83,6 b	1,2
SDH 51dpi	F-SDH%	96,7 a	99,3 a	-
	SDH%	28,4 a	39,2 b	1,4
	sdh%	28,6 a	40,5 b	1,4
AP 51dpi	F-AP%	69,0 a	90,9 b	1,3
	AP%	8,8 a	12,3 b	1,4
	Ap%	11,6 a	13,5 b	1,2

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

En las raíces de SR1 y PRms se determinó también la producción de etileno, fitohormona relacionada con la reacción de defensa en plantas (Apartado II.3.2.3), y cuya participación en la micorrización también es objeto de estudio en la presente tesis (Apartado IV.2). En este caso se realizaron determinaciones a los 15dpi, donde no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de raíz micorrizada, y a los 30dpi, cuando la diferencia de micorrización entre PRms y SR1 fue significativa. A los 15 dpi no se encontraron diferencias en los niveles de etileno entre plantas SR1 y PRms micorrizadas, aunque los niveles de etileno de ambas líneas fueron menores que los de sus controles no micorrizados (Gráfica B, Figura IV.12). En la siguiente cosecha, a los 30dpi, los niveles de etileno aumentaron con la edad de las plantas, aunque los niveles de las plantas SR1 aumentaron en mayor proporción siendo significativamente superiores a los de los controles y a los de la línea PRms. En la línea PRms no se encontraron diferencias significativas en la producción de etileno entre inoculadas y no inoculadas a los 30 dpi (Gráfica B, figura IV.12).

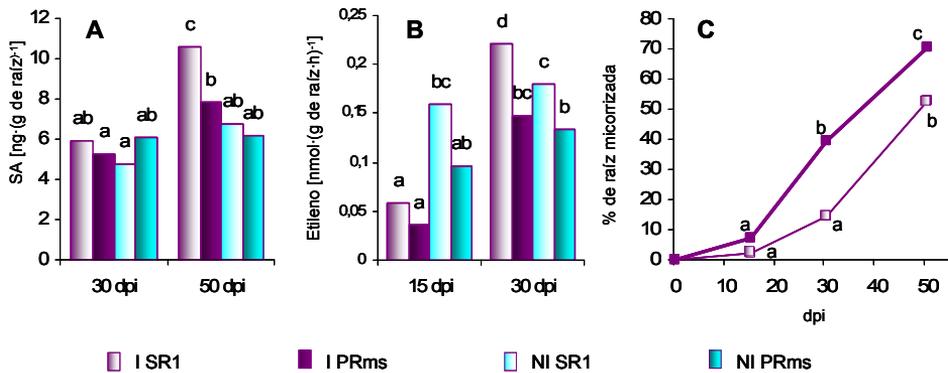


Figura IV.12: Medidas de los niveles de SA, etileno y micorrización en raíces de SR1 y PRms a los 15, 30 y 50 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi). **Gráfica A:** Cantidad de SA total en tratamientos sin inocular (NI), e inoculados (I). **Gráfica B:** Etileno producido en tratamientos NI, e I. **Gráfica C:** Porcentaje de raíz micorrizada.

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

2. PARTICIPACIÓN DEL ETILENO EN EL PROCESO DE MICORRIZACIÓN

El etileno es una hormona vegetal con un amplio espectro de funciones fisiológicas, y al igual que ocurre con el SA, su función como señal inductora de la respuesta defensiva de la planta ha sido ampliamente estudiada. También se le han propuesto distintas funciones durante el establecimiento de relaciones de tipo simbiótico mutualistas entre plantas y microorganismos, aunque su papel no está claro. En este sentido, se han determinado efectos mayoritariamente negativos sobre la formación de nódulos y sobre la micorrización, aunque en este último caso algunos de los resultados obtenidos son contradictorios. Esta contradicción puede ser debida a las diferencias en la reacción de cada planta hospedara ante la presencia de distintos hongos micorrícicos. En este capítulo se presenta la investigación que se ha realizado durante la presente tesis sobre la participación del etileno como modulador de la micorrización, utilizando como modelo plantas de tomate y el hongo micorrícico *G. intraradices*. Para ello se estudió el efecto que tienen sobre la micorrización los cambios en la cantidad de etileno en plantas, debidos a la aplicación exógena o a cambios endógenos, así como los cambios en la sensibilidad de la planta al etileno.

2.1. Efectos sobre la micorrización de la alteración cuantitativa de los niveles de etileno en la planta

2.1.1. Efectos sobre la micorrización debidos a la aplicación exógena de etileno

El etileno se aplicó a las raíces de plantas micorrizadas como ethephon (ácido 2-cloroetilfosfónico o CEPA) a pH 7, que liberó etileno y una pequeña cantidad de ácido fosfórico. En un primer experimento se determinó la dosis de ethephon necesaria para inducir efectos en las plantas, pero sin afectar de manera drástica los parámetros de crecimiento de las mismas. En este sentido se ensayaron tres concentraciones distintas de ethephon y se comprobó cual fue su efecto en el crecimiento de plantas de tomate de la variedad Pearson. Las dosis utilizadas fueron 0,01mM, 0,1mM y 1mM, realizando dos aplicaciones semanales de 20 ml/maceta. Las concentraciones de 0,1mM y 1mM disminuyeron de forma significativa el crecimiento de la planta mientras que la dosis 0,01mM no afectó al crecimiento de tomate (Figura IV.13). Por esta razón la dosis de ethephon utilizada en experimentos posteriores fue superior a 0,01mM e inferior a 0,1mM, en concreto 0,07 mM (70 μ M).

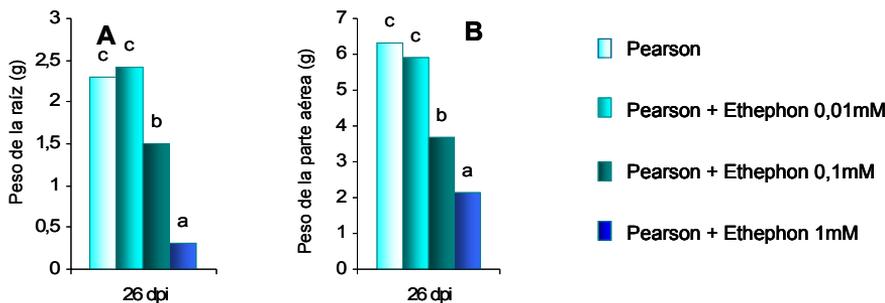


Figura IV.13: Valores de crecimiento de plantas de tomate variedad Pearson, controles y tratadas con soluciones de ethephon 0,01mM, 0,1mM y 1mM. **Gráfica A:** Peso fresco de la raíz. **Gráfica B:** Peso fresco de la parte aérea. Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Una vez establecidas las dosis de ethephon, se estudió su efecto sobre la micorrización. El posible efecto negativo sobre la micorrización del ácido fosfórico liberado por la molécula de ethephon se igualó en las plantas no tratadas, aplicando una solución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 1mM y pH 7. Se utilizaron para estos ensayos plantas de tomate de la variedad Floradade y se inocularon con *G. intraradices*. La aplicación del compuesto no afectó al crecimiento de las plantas, no observándose variaciones en el peso fresco ni de la raíz ni de la parte aérea de las plantas tratadas con ethephon respecto a las no tratadas (Gráficas F y G, figura IV.14). Se realizó un seguimiento de la evolución de la micorrización en ambos tratamientos durante tres cosechas consecutivas, hasta los 60 días después de la inoculación (dpi). La aplicación de etileno en forma de ethephon en suelo disminuyó el porcentaje de raíz micorrizada en plantas de 30 y 44 días pero no afectó al nivel de micorrización de la raíz a los 60 dpi (Gráfica A, figura IV.14). Un análisis más exhaustivo de la micorrización confirmó el efecto inhibitor del etileno sobre la capacidad invasora del hongo micorrízico. El etileno disminuyó en mayor grado a la frecuencia de micorrización (F%) en las primeras etapas de desarrollo de la micorrización, encontrándose mayores diferencias a los 30 que a los 44 dpi entre plantas tratadas y no tratadas, y no encontrándose diferencias en plantas de 60 dpi (Gráfica B, figura IV.14). La intensidad de micorrización (M%) solo disminuyó a los 44 dpi, posiblemente como consecuencia de la diferencia existente en la frecuencia de micorrización los 30dpi.

El etileno también disminuyó la intensidad de arbusculos (A%), indicando un efecto negativo en su formación, y la proporción de actividad fosfatasa alcalina del hongo (%AP) en las raíces, localizada mayoritariamente en los arbusculos. La intensidad de los arbusculos fue superior en todo momento en la raíz de plantas

controles no tratadas con ethephon (Gráficas D y E, figura IV.15). El porcentaje de actividad de AP disminuyó más de 2 veces en las plantas tratadas con ethephon a los 30 dpi, pero esta diferencia se hizo menor con el progreso de la micorrización. A los 44dpi el %AP fue 1,3 veces mayor en los tratamientos control, y después la diferencia decreció, alcanzando valores similares en las plantas tratadas y no tratadas con ethephon a los 60 dpi (Gráfica E, figura IV.14).

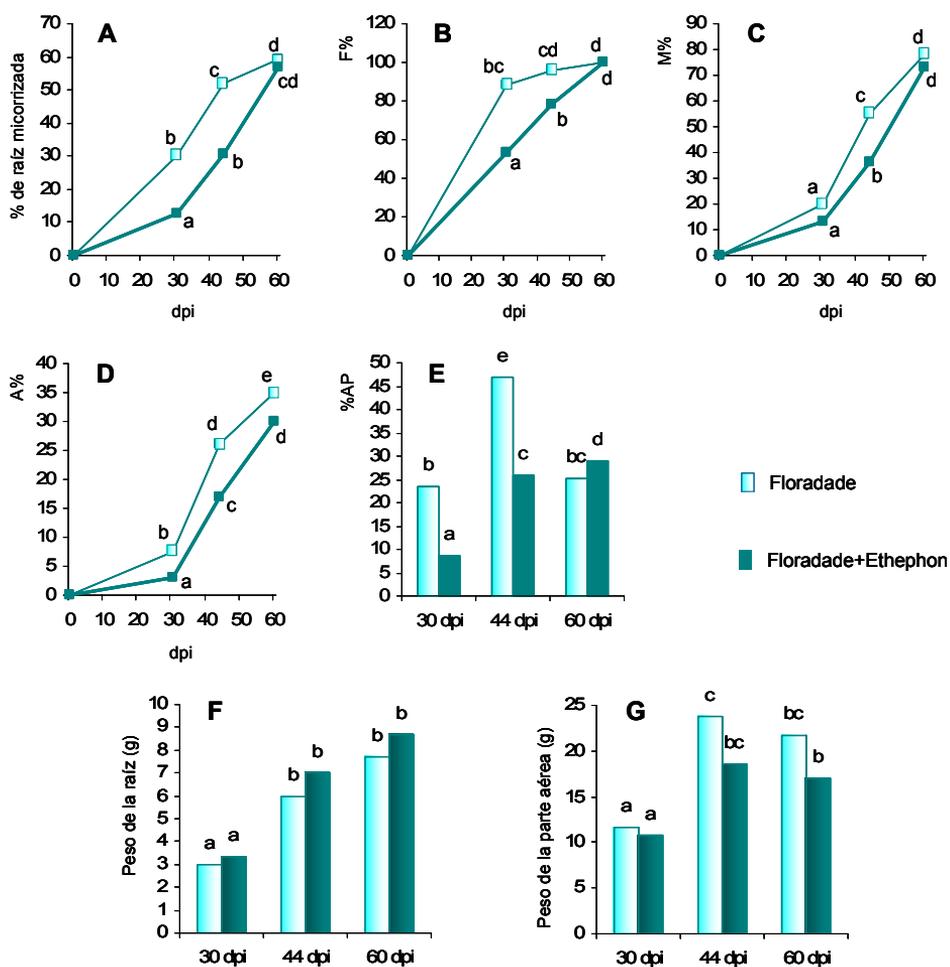


Figura IV.14: Valores de los parámetros de micorrización y crecimiento de plantas de tomate variedad Floradade. Las plantas fueron tratadas dos veces por semana con una solución de ethephon $70\mu\text{M}$ y cosechadas a los 30, 44 y 60 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi). **Gráfica A:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica B:** Frecuencia de micorrización (F%). **Gráfica C:** Intensidad de micorrización en el sistema radical (M%). **Gráfica D:** Intensidad de arbusculos en el sistema radical (A%). **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 los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

2.1.2. Micorrización en plantas transgénicas alteradas en la síntesis de etileno

Con el fin de corroborar el efecto negativo del etileno sobre la micorrización, se realizaron experimentos de micorrización en plantas transgénicas de tomate alteradas en la síntesis de etileno. En concreto se utilizaron plantas ACD, donde la capacidad de síntesis de etileno está disminuida por la degradación del precursor del etileno, el ácido 1-amino ciclopropano-1-carboxilo, debido a la acción de la enzima ACC desaminasa, producto del gen de expresión constitutiva ACD bacteriano dirigido por el promotor CaMV 35S (Klee y col, 1991). Estas plantas son transgénicas de la variedad silvestre UC82B, y en ellas la capacidad de producción de etileno es menor, aunque no aparentan anomalías fenotípicas características, excepto un retraso en la maduración de frutos (Klee y col, 1991). En los experimentos realizados en el presente estudio, y como muestra la gráfica E de la figura IV.15, se pudo comprobar que la producción de etileno es menor en dicha línea transgénica.

En los ensayos de micorrización, las plantas se inocularon con el hongo micorrízico *G. intraradices*, y se analizaron tres cosechas consecutivas durante el establecimiento de la simbiosis, a los 30, 53 y 67 días tras la inoculación (dpi). El porcentaje de raíz micorrizada en plantas ACD fue inferior a los 30 y 53dpi (Gráficas A, figura IV.15). La frecuencia de micorrización (F%) en plantas ACD tuvo un comportamiento fluctuante en comparación con las plantas silvestres UC82B (Gráficas B, figura IV.15). A los 30 dpi F% fue mayor en raíces ACD que en raíces UC82B, para después, a los 53 dpi, invertirse la tendencia, siendo ligeramente menor en plantas ACD (Gráficas B, figura IV.15). La intensidad de micorrización (M%) en plantas ACD fue menor que en las plantas silvestres a los 53dpi, no mostrando diferencias con los silvestres UC82B ni a los 30, ni a los 67dpi (Gráfica C, figura IV.15). También, en las dos primeras cosechas, se pudo apreciar una ligera disminución en el porcentaje de actividad fosfatasa alcalina del hongo (%AP) en plantas ACD respecto a plantas UC82B, sugiriendo un descenso de la eficiencia de micorrización durante las primeras etapas de colonización de la raíz en plantas ACD (Gráfica D, figura IV.15). Más tarde, a los 67dpi, cuando no hubo diferencias ni en el porcentaje de raíz micorrizada, ni en F%, ni en M% entre ambas líneas, la menor cantidad de etileno en ACD supuso un aumento en AP%, que superó significativamente a la de la línea silvestre.

Los resultados de los experimentos de micorrización de la línea ACD ponen de manifiesto que la disminución constitutiva de los niveles de etileno no afecta drásticamente la capacidad de micorrización de las plantas, observándose como

hechos más destacables un ligero incremento inicial de la frecuencia de micorrización y una disminución transitoria de la intensidad de micorrización.

A efectos de establecer si la alteración de la micorrización en respuesta a la aplicación de etileno es diferente entre plantas silvestres UC82B, con contenido normal de etileno, y transgénicas ACD, con niveles reducidos de etileno, se realizaron experimentos de aplicación de etileno y determinación secuencial de parámetros de micorrización. El etileno se aplicó en forma de ethephon dos veces por semana a la concentración $70\mu\text{M}$ y pH 7, y en las plantas controles no tratadas se aplicó una solución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 1mM y pH 7. La aplicación de ethephon no afectó al crecimiento de las plantas de ninguna de las dos líneas, ni de la raíz, ni de la parte aérea (Gráficas I y J de la figura IV.16).

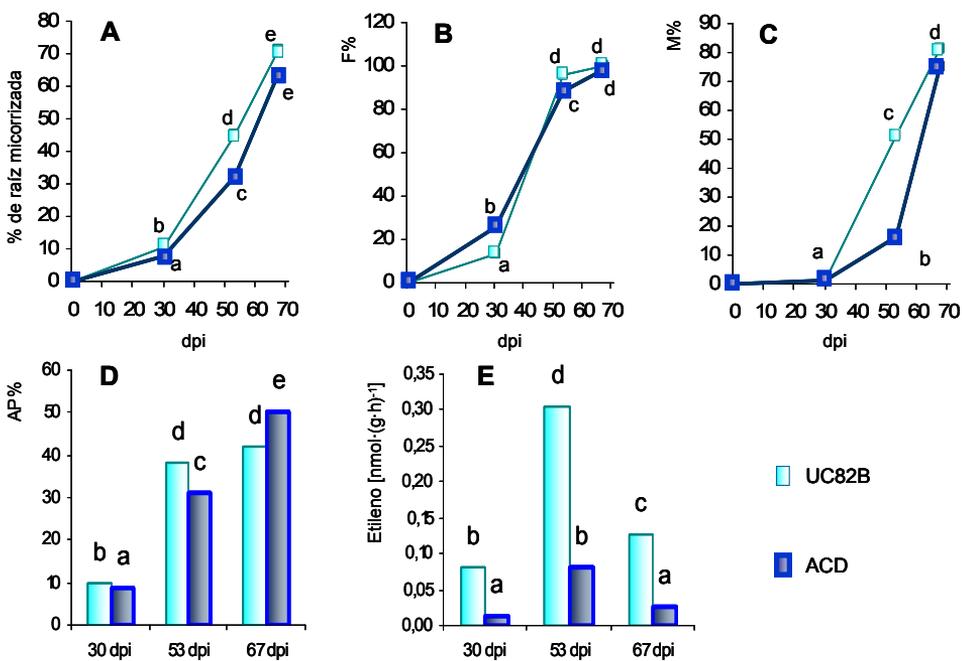


Figura IV.15: Parámetros de micorrización de las líneas de tomate ACD y silvestre, variedad UC82B, a los 30, 53 y 67 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi). **Gráfica A:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica B:** Frecuencia de micorrización (F%). **Gráfica C:** Intensidad de micorrización (M%). **Gráfica D:** Porcentaje de actividad fosfatasa alcalina fúngica (%AP). **Gráfica E:** Producción de etileno en raíz.

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

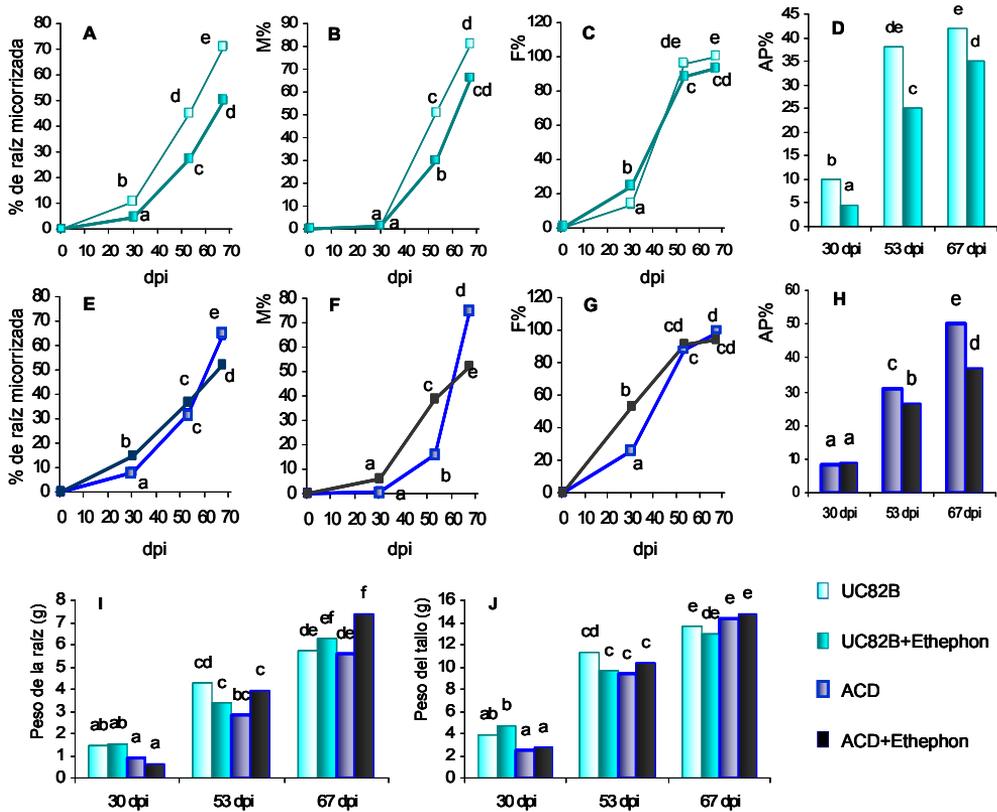


Figura IV.16: Parámetros de micorrización y crecimiento de tomate, línea silvestre variedad UC82B (gráficas A,B,C,D) y transgénica ACD (gráficas E,F,G,H), en plantas controles y tratadas dos veces por semana con una solución de ethephon $70\mu\text{M}$, y cosechadas a los 30, 53 y 67 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi). **Gráficas A,E:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráficas B,F:** Intensidad de micorrización (M%). **Gráficas C,G:** Frecuencia de micorrización (F%). **Gráficas D,H:** Porcentaje de actividad fosfatasa alcalina fúngica (%AP). **Gráfica I:** Peso fresco de la raíz. **Gráfica J:** Peso fresco de la parte aérea.

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

En la línea silvestre UC82B, la aplicación de ethephon supuso un descenso en todos los puntos de cosecha tanto del porcentaje de raíz micorrizada como de la intensidad de micorrización (M%) (Gráficas A y B, figura IV.16), tal y como se había demostrado en experimentos anteriores con la variedad silvestre Floradade (Figura IV.14). La frecuencia de micorrización (F%) en UC82B sufrió un incremento a los 30 dpi como consecuencia de la aplicación de ethephon, para luego disminuir ligeramente a los 53 y 67 dpi en las plantas tratadas (Gráfica C, figura IV.16). Al igual que en plantas UC82B, en plantas ACD, la frecuencia de micorrización se incrementó también en la cosecha inicial debido al tratamiento con ethephon (Gráfica G, figura

IV.16). Respecto a los parámetros de porcentaje de raíz colonizada e intensidad de micorrización (M%), las plantas ACD mostraron un comportamiento ligeramente diferente al de las plantas UC82B tras la aplicación de ethephon. Concretamente, en plantas ACD solo se detectó un descenso efectivo del porcentaje de colonización y de %M, mediado por la aplicación de ethephon, a tiempos largos (67 dpi), igual que ocurrió en plantas UC82B (Gráficas A, B, E, F, figura IV.16). En tiempos cortos e intermedios de cosecha (30 y 53 dpi) la aplicación de ethephon resultó en un incremento de los parámetros de porcentaje de colonización y M% en raíces de las plantas transgénicas ACD (Gráficas E y F, figura IV.16). La intensidad de actividad fosfatasa alcalina fúngica (%AP) se vio afectada de forma negativa por la aplicación de etileno en ambas líneas, aunque en ACD este efecto no se hizo patente hasta los 53dpi (Gráficas D y H, figura IV.16).

2.2. Efectos sobre la micorrización de la alteración en la percepción del etileno

El complejo sistema de señalización del etileno demuestra la importancia que tienen los receptores de etileno en la respuesta a esta fitohormona. La acción de los receptores es inhibir la respuesta a etileno, y la unión del etileno a estos receptores bloquea la acción inhibidora. Por tanto, el control de la respuesta al etileno no solo depende de la cantidad de etileno, sino también de la funcionalidad de sus receptores. En este sentido, durante el presente trabajo de investigación se estudió la participación de los receptores de etileno en la modulación de la micorrización. Para ello se realizaron dos tipos de ensayos: unos de bloqueo de la unión del etileno a los receptores mediante la aplicación de tiosulfato de plata (STS); y otros en los que se utilizaron plantas transgénicas alteradas en el funcionamiento o expresión de alguno de sus receptores para etileno.

2.2.1. Efectos sobre la micorrización debidos a la aplicación exógena de STS

El tiosulfato de plata (STS) en solución libera plata que se une a los receptores de etileno, inactivándolos para la unión del propio etileno y bloqueando con ello la respuesta a etileno. En condiciones normales, el receptor de etileno en su forma libre (sin etileno) es un efector positivo de una ruta de señalización que desemboca en una inhibición de la respuesta a etileno. La unión de etileno a dicho receptor provoca un cambio conformacional en el mismo, bloqueando su actividad y por tanto

desactivando la inhibición de la respuesta a etileno. Por tanto, la ruta de señalización de etileno se activa bloqueando la actividad del receptor. Los iones de plata dificultan la unión física de etileno al receptor, activando constitutivamente la actividad positiva del receptor en forma libre y bloqueando con ello la respuesta a etileno (Sisler y Serek, 2003).

En un primer experimento se determinó la dosis adecuada de STS necesaria para bloquear la acción del etileno endógeno de la raíz, sin causar graves perjuicios en el desarrollo de la planta. Para el tratamiento se ensayaron tres concentraciones distintas de STS y se comprobó cual fue su efecto en el crecimiento de plantas de tomate de la variedad Rheinlands Ruhm. Las dosis utilizadas fueron 0,01mM, 0,1mM y 1mM de STS, añadidas en suelo dos veces por semana a razón de 20ml/maceta. Tan solo la concentración 1mM de STS afectó negativamente al crecimiento de las plantas, mientras que las concentraciones 0,1mM y 0,01mM no provocaron cambios significativos en su crecimiento (Figura IV.17). Por esta razón en experimentos posteriores se utilizaron concentraciones de STS inferiores a 0,1mM y superiores a 0,01mM.

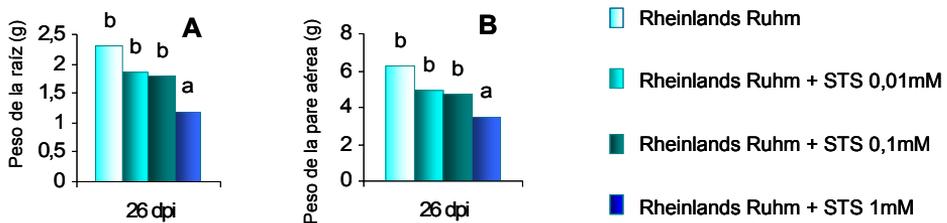


Figura IV.17: Valores de crecimiento de plantas de tomate variedad Rheinlands Ruhm, controles y tratadas con soluciones de STS 0,01mM, 0,1mM y 1mM. **Gráfica A:** Peso fresco de la raíz. **Gráfica B:** Peso fresco de la parte aérea.

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

En los experimentos diseñados para determinar el posible efecto sobre la micorrización causado por el STS, se utilizaron plantas de tomate de la variedad Rheinlands Ruhm. La inoculación se realizó con el hongo micorrícico *G. intraradices*, y se aplicaron al sustrato 20ml por maceta de una solución de STS 50 μ M a pH 7 a razón de dos veces por semana. El crecimiento de las plantas no se afectó por los tratamientos con STS, puesto que no se encontraron diferencias significativas en los pesos ni de la raíz ni de la parte aérea, entre las plantas tratadas y las no tratadas con STS (Gráficas G y H, figura IV.18). Las medidas de micorrización se tomaron a un solo tiempo de cosecha, a los 37 días tras la inoculación (dpi). La aplicación de STS

en suelo, y con ello la inhibición de la respuesta a etileno desde la raíz, provocó el aumento del porcentaje de raíz micorrizada (Gráfica A, figura IV.18). Un estudio más profundo de la micorrización demostró que el STS prácticamente no afectó a la frecuencia de la micorrización (F%), y por tanto a la capacidad del hongo de penetrar e instalarse en la raíz, pero sí aumentó la intensidad de la micorrización (M%) y la de los arbusculos (A%) (Gráficas B, C y D, figura IV.19), lo que sugiere una mayor capacidad de dispersión y desarrollo en el interior de la raíz. Además, al medir la actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%), se comprobó que el bloqueo de los receptores de etileno incrementó tanto la frecuencia (F-AP%), como la intensidad de AP (AP%) (Gráficas E y F, figura IV.18)

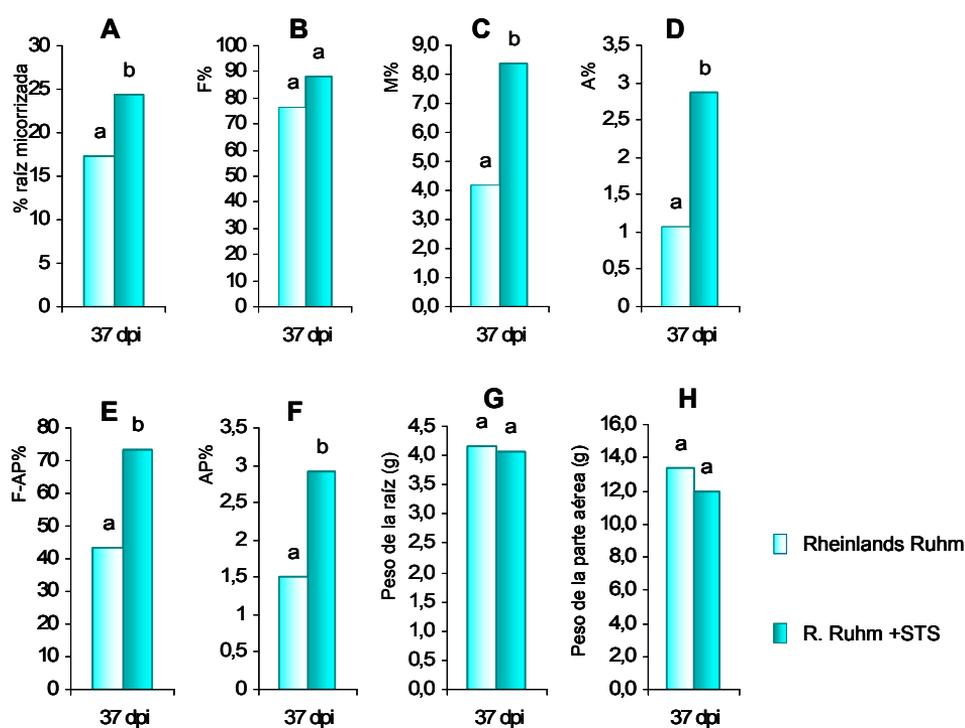


Figura IV.18: Parámetros de micorrización y crecimiento en plantas de tomate, variedad Rheinlands Ruhm, controles y tratadas en suelo con una solución de STS 50µM dos veces por semana, e inoculadas con *G. intraradices*. **Gráfica A:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica B:** Frecuencia de micorrización (F%). **Gráfica C:** Intensidad de micorrización en el sistema radical (M%). **Gráfica D:** Intensidad de arbusculos en el sistema radical (A%). **Gráfica E:** Frecuencia de actividad fosfatasa alcalina fúngica (F-AP%). **Gráfica F:** Intensidad de actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%). **Gráfica G:** Peso fresco de la raíz. **Gráfica H:** Peso fresco de la parte aérea.

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

2.2.2. Micorrización en plantas transgénicas alteradas en la percepción de etileno

Tras comprobar como el bloqueo en la unión de etileno a sus receptores, mediante la aplicación de STS, provoca alteraciones en la evolución de la micorrización, se estudió en mayor profundidad el efecto que sobre la micorrización tiene la alteración de la percepción de etileno. Para ello se diseñaron experimentos de micorrización de plantas de tomate mutantes y transgénicas alteradas en la funcionalidad de sus receptores. En este sentido, se disponía de mutantes de tomate “Never Ripe” (NR), insensibles a etileno y alterados por mutación natural en el receptor de etileno LeETR3 (Lanahan y col, 1994), así como de líneas más sensibles a etileno y transgénicas ETR4AS y ETR6AS, en las que se ha disminuido por expresión constitutiva de construcciones mRNA antisentido la cantidad de receptores LeETR4 y LeETR6 respectivamente (Tieman y col, 2000).

2.2.2.1. Micorrización en plantas insensibles al etileno

La existencia de un mutante natural de la variedad Pearson de tomate en el que una parte importante de sus receptores de etileno son incapaces de unirse a la hormona, permitió comprobar como la insensibilidad al etileno afectaba a la micorrización. Estos mutantes han sido denominados Never Ripe (NR), ya que su insensibilidad al etileno impide la normal maduración de sus frutos, y están afectados en el receptor LeETR3 de etileno (Klee, 2002). Al no poder los receptores LeETR3 unirse al etileno, y por tanto no poder inactivarse la represión de la respuesta a etileno, los receptores LeETR3 mutados están constitutivamente inhibiendo la respuesta a etileno y hacen a la planta más insensible a la hormona.

Aprovechando la deficiencia en la percepción de etileno, se estudió la evolución de la micorrización en los mutantes NR, comparándola con la de la línea silvestre Pearson. Se determinó la curva de micorrización para cada tipo de planta, para lo cual se contabilizó el porcentaje de raíz micorrizada por el hongo *G. intraradices* en cuatro cosechas consecutivas. La evolución de la micorrización siguió un patrón de crecimiento normal en ambas líneas, con una fase inicial de latencia, y otra exponencial, hasta alcanzar un máximo. Las diferencias en micorrización se observaron en la fase exponencial de colonización, y así a los 32 y 41 dpi la ocupación de la raíz por el hongo micorrízico fue significativamente mayor en los mutantes NR que en la variedad silvestre (Figura IV.19). Al final de la fase exponencial de micorrización se alcanzaron niveles similares de colonización en plantas NR y

Pearson (Figura IV.19). La colonización de la raíz de NR fue más rápida que la de la raíz de las plantas silvestres, si bien los valores finales de ocupación no variaron.

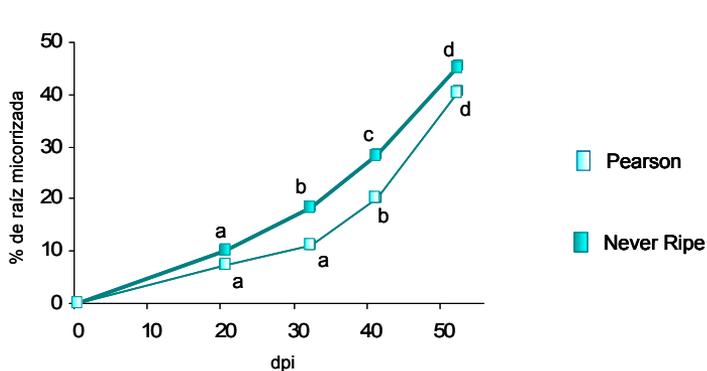


Figura IV.19: Porcentaje de raíz micorrizada en la línea silvestre Pearson y el mutante NR. a los 20, 32, 41 y 52 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi). Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

2.2.2.2. Micorrización en plantas más sensibles al etileno

El estudio del efecto sobre la micorrización debido a un aumento en la sensibilidad a etileno se estudió en experimentos de micorrización con las líneas transgénicas de la variedad Floradade de tomate ETR4AS y ETR6AS (Tieman y col, 2000). A ambos transgénicos se les ha insertado la secuencia anti-sentido de los genes codificantes para los receptores de etileno LeETR4 y LeETR6 respectivamente, con lo cual se produce un silenciamiento génico. El resultado final son plantas transgénicas deficientes en uno de los receptores. El menor número de receptores supone, por un lado, que hay menos receptores que en forma libre inhiban la respuesta al etileno, y por otro, que es necesaria menor cantidad de etileno para bloquear ese menor número de receptores, y ambos efectos dan lugar a plantas más sensibles a la acción de la hormona.

Se realizó un seguimiento en la evolución de la micorrización con el hongo *G. intraradices* en las tres líneas, la silvestre y las transgénicas ETR4AS y ETR6AS, realizando tres cosechas consecutivas en el tiempo hasta los 60 días después de la inoculación (dpi). En la figura IV.20 se recogen los resultados de este ensayo, observándose que en las líneas transgénicas ETR4AS y ETR6AS los parámetros de micorrización descendieron respecto a la línea silvestre Floradade, principalmente

durante las primeras etapas de desarrollo de la micorrización. En ETR4AS el porcentaje de raíz micorrizada fue significativamente menor al de Floradade tanto a los 30 como a los 44dpi, aunque se igualó a los 60dpi (Gráfica A, Figura IV.20). Las plantas ETR6AS no alcanzaron los niveles de micorrización de Floradade en ninguna de las cosechas, y a los 44 y 60dpi el porcentaje de micorrización fue menor en ETR6AS que en ETR4AS (Gráfica A, Figura IV.20). Algo parecido ocurrió con la intensidad de la micorrización en el sistema radical ($M\%$), pero en este caso tanto ETR4AS como ETR6AS alcanzaron los niveles de Floradade, si bien ETR4AS lo hizo a los 44dpi, ETR6AS lo hizo al los 60dpi (Gráfica C, Figura IV.20). La frecuencia de micorrización ($F\%$) solo se vio afectada en los transgénicos a los 30dpi, donde fue casi 3 veces menor (Gráfica B, Figura IV.20). La mayor sensibilidad al etileno también provocó un descenso en la intensidad de arbusculos en el sistema ($A\%$), sobre todo al principio de la micorrización, 30dpi, y en ETR6AS también a los 44dpi (Gráfica D, Figura IV.20). En ETR4AS, aunque $A\%$ descendió a los 30dpi respecto a la línea silvestre, luego aumentó rápidamente superando incluso a Floradade a los 60dpi (Gráfica D, Figura IV.20). La eficiencia de la micorrización, determinada por el porcentaje de actividad fosfatasa alcalina fúngica ($\%AP$), también se vio afectada por la mayor sensibilidad a etileno en plantas ETR4AS y ETR6AS (Gráfica E, Figura IV.20). Se observó un gran descenso de $\%AP$ a los 30 y 44dpi, de 3,2 y 1,8 veces respectivamente, y similar en ambas líneas transgénicas. A los 60dpi, la actividad AP se igualó en todas las líneas, e incluso aumento en ETR4AS respecto al nivel observado en Floradade y ETR6AS. (Gráfica E, Figura IV.20).

Con el fin de comprobar que estos cambios en la micorrización no se debieron a diferencias en la producción de etileno entre la línea silvestre Floradade y los transgénicos ETR4AS y ETR6AS, se tomaron medidas de la acumulación de etileno, no encontrándose diferencias significativas entre ellas (Gráfica F, figura IV.20).

Dada la mayor sensibilidad a etileno de plantas ETR4AS y ETR6AS, se realizaron experimentos de aplicación exógena de etileno y comparación de los efectos causados sobre la micorrización de plantas de fenotipo silvestre y transgénicas más sensibles. El objeto de estos experimentos era identificar más claramente las alteraciones sobre la micorrización debidas a una mayor respuesta al etileno, además de la influencia que tienen sobre la micorrización uno u otro receptor (LeETR4 o LeETR6). Se realizaron así aplicaciones de ethephon $70\mu\text{M}$ a pH7 en suelo (20ml/maceta) dos veces por semana, y una solución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 1 mM y pH 7 con la misma frecuencia a las plantas no tratadas con ethephon. La solución de ethephon no causó cambios significativos en el crecimiento de las plantas (Figura IV. 21), pero sí en la colonización por el hongo micorrícico *G. intraradices*.

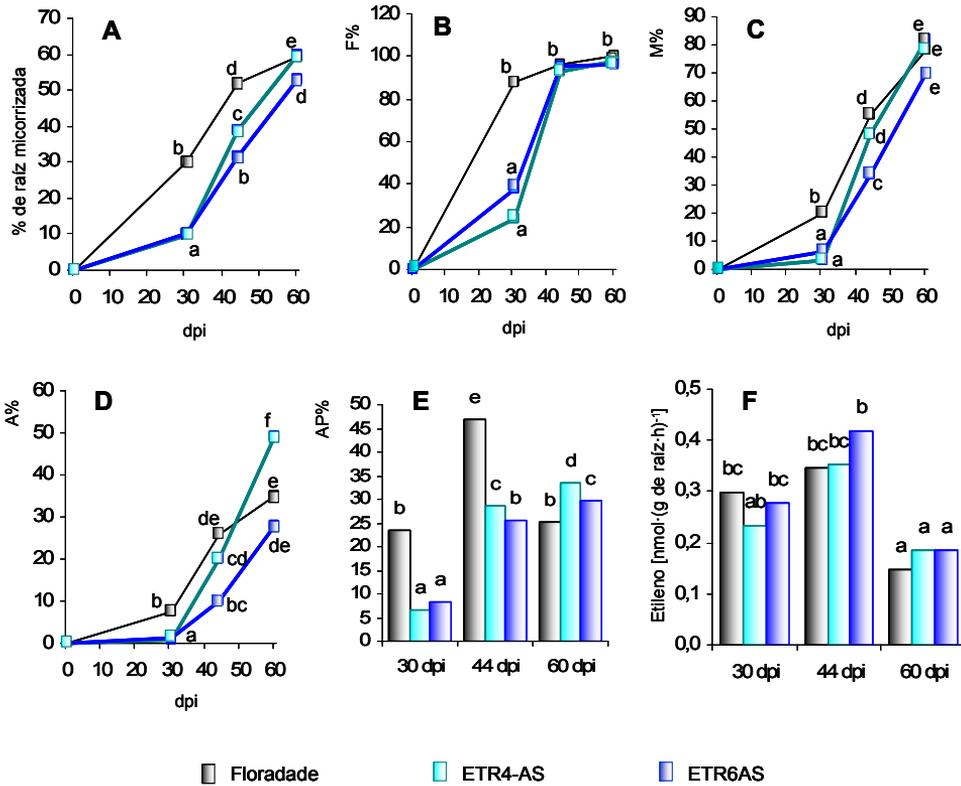


Figura IV.20: Parámetros de micorrización en tomate, variedad silvestre Floradade y líneas transgénicas ETR4AS y ETR6AS a los 30, 44 y 60 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi). **Gráfica A:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica B:** Frecuencia de micorrización (F%). **Gráfica C:** Intensidad de micorrización en el sistema radical (M%). **Gráfica D:** Intensidad de arbusculos en el sistema radical (A%). **Gráfica E:** Porcentaje de actividad fosfatasa alcalina fúngica (%AP). **Gráfica F:** Concentración de etileno en raíz. Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

En la figura IV.22 se representan los resultados de los parámetros de micorrización determinados en plantas transgénicas ETR4AS y ETR6AS tratadas y no tratadas con ethephon. El ethephon no afectó al porcentaje de raíz micorrizada, ni a la intensidad de micorrización (M%) de ETR4AS y ETR6AS en la primera cosecha, a los 30dpi dpi (Gráficas A, C, E y G, figura IV.22). A partir de los 44 dpi, y más claramente a los 60dpi, el etileno provocó un descenso de ambos parámetros en ETR4AS (Gráficas A y C, figura IV.22), mientras que en ETR6AS solo se produce dicho descenso acusado a los 60 dpi, pues a los 44 dpi tanto el porcentaje de colonización como la intensidad de colonización son igual o superiores en ETR6AS tratadas con ethephon respecto a las no tratadas (Gráficas E y G, figura IV.22). La

frecuencia de micorrización, por el contrario, se incremento al inicio de la colonización en las plantas ETR4AS y ETR6AS tratadas con ethephon, aunque a partir de la segunda cosecha (44 dpi) se igualó entre tratamientos control y tratados con ethephon (Gráficas B y F, figura IV.22).

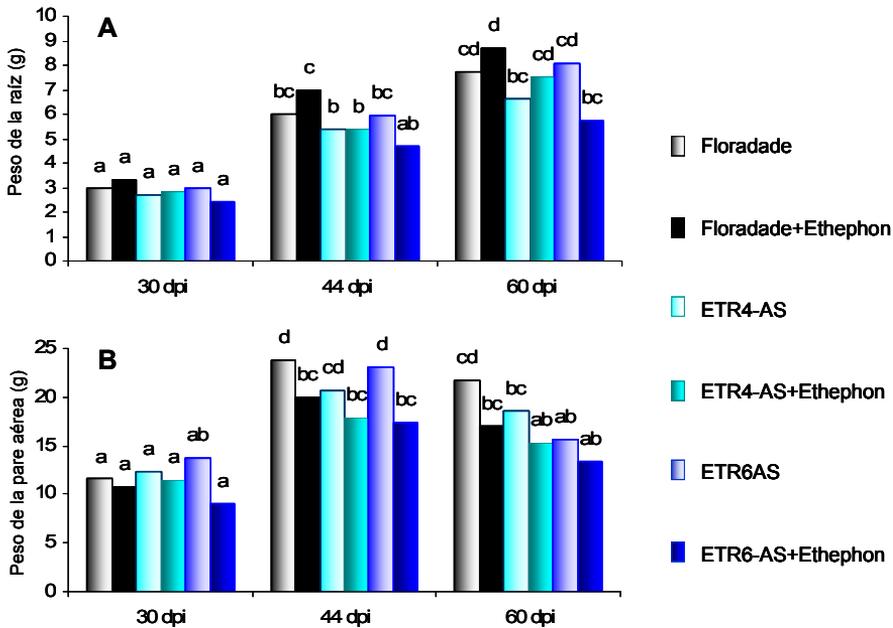


Figura IV.21: Peso fresco de plantas de tomate de la variedad Floradade y de las líneas transgénicas ETR4AS y ETR6AS, controles y tratadas dos veces por semana con una solución de ethephon 70 μ M. **Gráfica A:** Peso fresco de la raíz. **Gráfica B:** Peso fresco de la parte aérea. Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

La aplicación de ethephon provocó un efecto diferencial en las líneas ETR4AS y ETR6AS respecto a la intensidad de arbusculos en el sistema radical (A%), pues mientras que supuso un descenso en ETR4AS a los 44 y 60dpi, por el contrario resultó en un aumento en ETR6AS a los 44dpi (Gráficas D y H, figura IV.22). De forma paralela, el porcentaje de actividad fosfatasa alcalina fúngica (%AP), aumento ligeramente a los 30 dpi y descendió a los 44 y 60 dpi en plantas ETR4AS debido al tratamiento con ethephon, y aumentó considerablemente a los 30 y 44 dpi en plantas ETR6AS tratadas con ethephon. (Gráficas I y J, figura IV. 22).

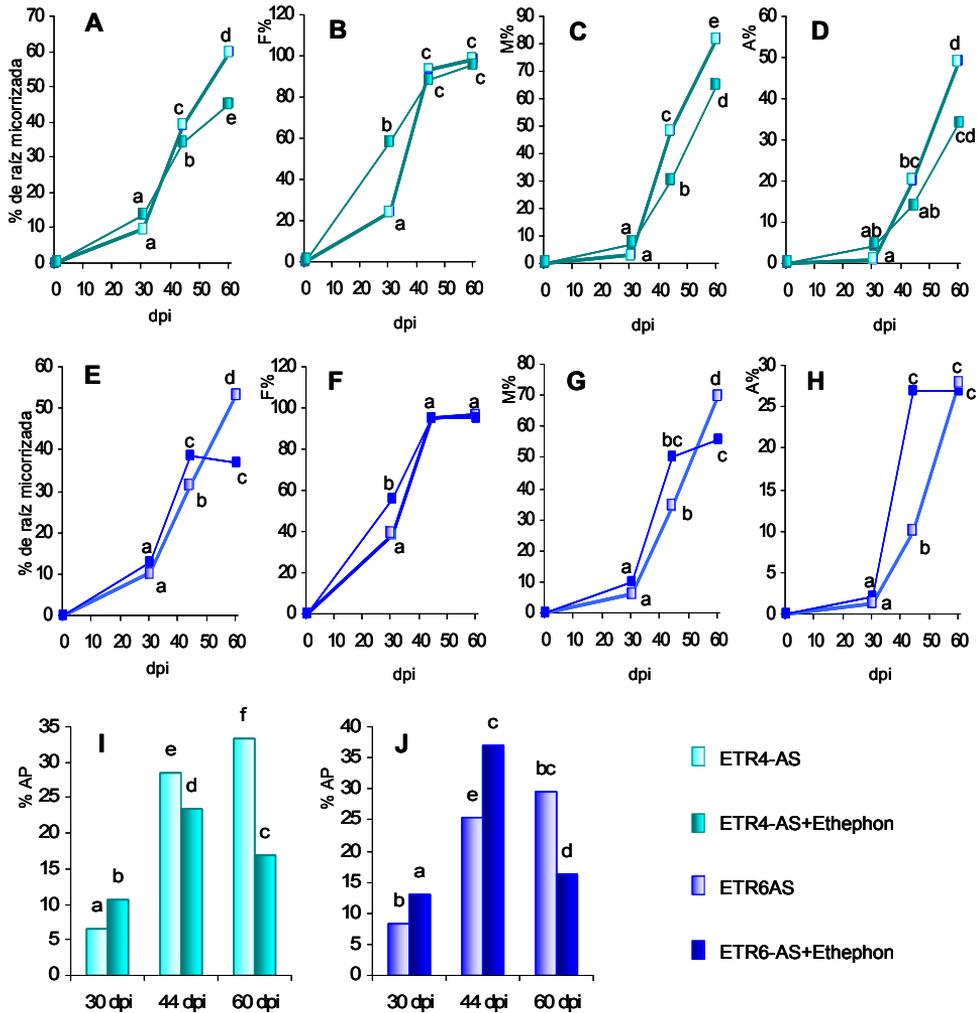


Figura IV.22: Parámetros de micorrización de plantas transgénicas ETR4AS (Gráficas A,B,C,D,I) y ETR6AS (Gráficas E,F,G,H,J), controles y tratadas dos veces por semana con una solución de ethephon 70µM. **Gráfica A,E:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica B,F:** Frecuencia de micorrización (F%). **Gráfica C,G:** Intensidad de micorrización en el sistema radical (M%). **Gráfica D,H:** Intensidad de arbusculos en el sistema radical (A%) en ETR6AS. **Gráfica I,J:** Frecuencia de actividad fosfatasa alcalina fúngica (%AP).

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Con objeto de comparar si el efecto de la adición de ethephon a la línea silvestre es similar al efecto de mayor sensibilidad endógena al etileno en las líneas transgénicas, en la figura IV.23 se representan en conjunto los parámetros de micorrización de la línea silvestre tratada con 70µM de ethephon dos veces por semana, de los controles

no tratados, y de las líneas transgénicas más sensibles al etileno sin tratar. Con este estudio apenas se encontraron diferencias entre el tratamiento de las plantas silvestres con etileno y las plantas transgénicas más sensibles a la hormona, ni en el porcentaje de raíz micorrizada, ni en M%, ni en %AP, a los 30, 44 y 60dpi (Gráficas A, C y E, figura IV.23). Tan solo se detectó un ligero incremento en ETR4AS en el porcentaje de raíz micorrizada a los 44dpi (1,2 veces) y en %AP a los 44 y 60dpi (1,1 veces) (Gráficas C y E, figura IV.23). Tampoco se encontraron diferencias significativas en A% entre Floradade con ethephon y ETR6AS en las tres cosechas, ni con ETR4AS a los 30 y 44dpi, pero sí a los 60dpi donde A% en ETR4AS fue mayor que en Floradade con ethephon y ETR6AS (1,6 veces) (Gráfica D, figura IV.23). En el parámetro donde se encontraron las mayores diferencias fue en F%, mientras que a los 30dpi Floradade con ethephon superó en 1,7 veces a ETR4AS y ETR6AS, a los 44dpi fue 1,2 veces inferior. Además, ETR4AS y ETR6AS alcanzaron el 100% de F a los 44dpi, Floradade con ethephon a los 60dpi (Gráfica B, figura IV.23).

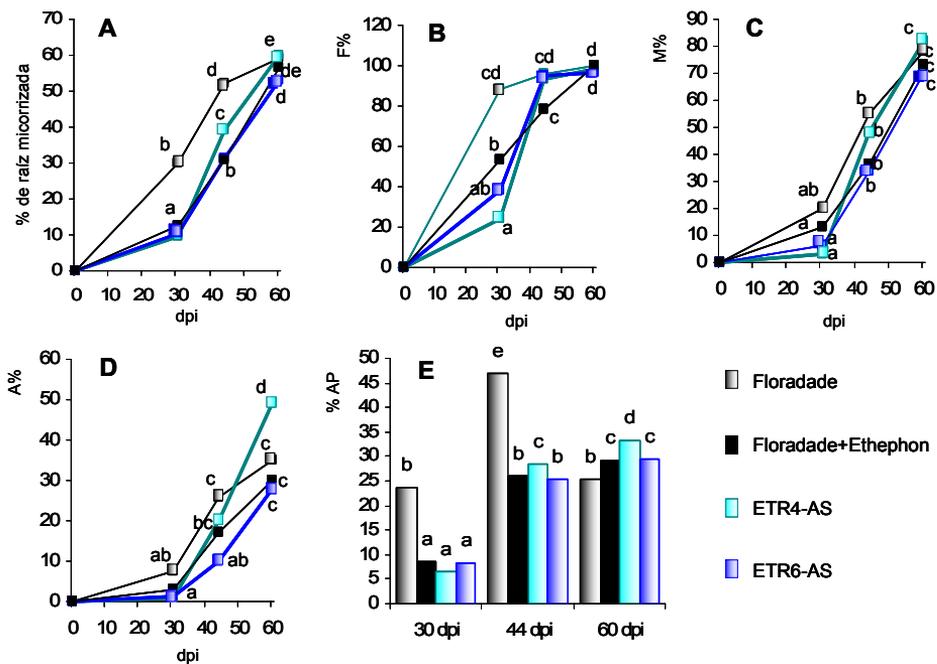


Figura IV.23: Parámetros de micorrización de plantas de la línea silvestre Floradade, controles y tratadas con ethephon 70 μ M dos veces por semana, y transgénicas ETR4AS y ETR6AS. **Gráfica A:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica B:** Frecuencia de la micorrización (F%). **Gráfica C:** Intensidad de micorrización en el sistema radical (M%). **Gráfica D:** Intensidad de arbusculos en el sistema radical (A%). **Gráfica E:** Porcentaje de actividad fosfatasa alcalina fúngica (%AP).

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

3. PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO JASMÓNICO (JA) EN EL PROCESO DE MICORRIZACIÓN

El ácido jasmónico (JA) es una hormona vegetal que, entre otras muchas funciones, participa en la mediación de procesos de respuesta de la planta frente al ataque de organismos herbívoros y procesos de defensa frente a microorganismos patógenos. Esta molécula es también mediadora, junto con el etileno, en la inducción de la respuesta ISR (Respuesta Sistémica Inducida) en plantas y generada por determinadas rizobacterias. Sin embargo, la función de esta hormona en las interacciones de las plantas con microorganismos simbioses mutualistas no está clara, aunque existen numerosas evidencias de su participación. En el caso concreto de la asociación micorriza arbuscular existen suficientes pruebas experimentales que apoyan la hipótesis de la participación del JA durante el proceso de micorrización (ver apartado II.3.1.2), sin embargo no existen datos concluyentes sobre su verdadera función.

Uno de los objetivos de esta tesis ha sido aportar nuevos conocimientos sobre la participación del JA en el proceso de micorrización, con el fin de aclarar cual es su verdadero papel durante la micorrización. Para ello se utilizaron dos tipos de aproximaciones experimentales. Por un lado se realizaron experimentos de inducción de la respuesta al JA en planta mediante la aplicación de metil-jasmonato (MeJA), y en estas condiciones se analizó el desarrollo de la micorrización. Por otro lado, se estudió la evolución de la micorrización en plantas mutantes insensibles al JA.

3.1. Efectos sobre la micorrización debidos a la aplicación de MeJA

3.1.1. Efectos sistémicos sobre la micorrización de la raíz debidos a la aplicación de MeJA en la parte aérea de las plantas

El metil-jasmonato (MeJA) es un compuesto gaseoso, derivado de la metilación del JA, clave en la señalización del JA e inductor de su síntesis por retroalimentación (Sasaki y col, 2001; Cheong y Choi, 2003). En el presente estudio, se aprovecharon las propiedades del MeJA como inductor de la respuesta al JA para comprobar el efecto de esta respuesta sobre la micorrización de plantas de tomate de la variedad Moneymarker.

En un primer estudio, se planteó investigar el efecto sistémico sobre la micorrización de la raíz debido a la aplicación de MeJA en la parte aérea de la planta, ya que existían datos contradictorios al respecto en la literatura científica. Se aplicó el MeJA sobre las plantas, pulverizando la parte aérea 2 veces por semana con distintas

diluciones de MeJA: 5 μ M, 50 μ M y 500 μ M. Se realizó un análisis secuencial del porcentaje de raíz micorrizada en tres cosechas, a los 24, 45 y 71 días tras la inoculación con el hongo *G. intraradices* (dpi), tanto en plantas controles como en las tratadas con las diluciones de MeJA. La aplicación de MeJA no provocó cambios en el crecimiento de las plantas tratadas, excepto para la concentración 500 μ M, que resultó ser demasiado elevada y tóxica e impidió un crecimiento normal de las plantas, siendo estas significativamente más pequeñas que el resto (Gráficas B y C, figura IV.24).

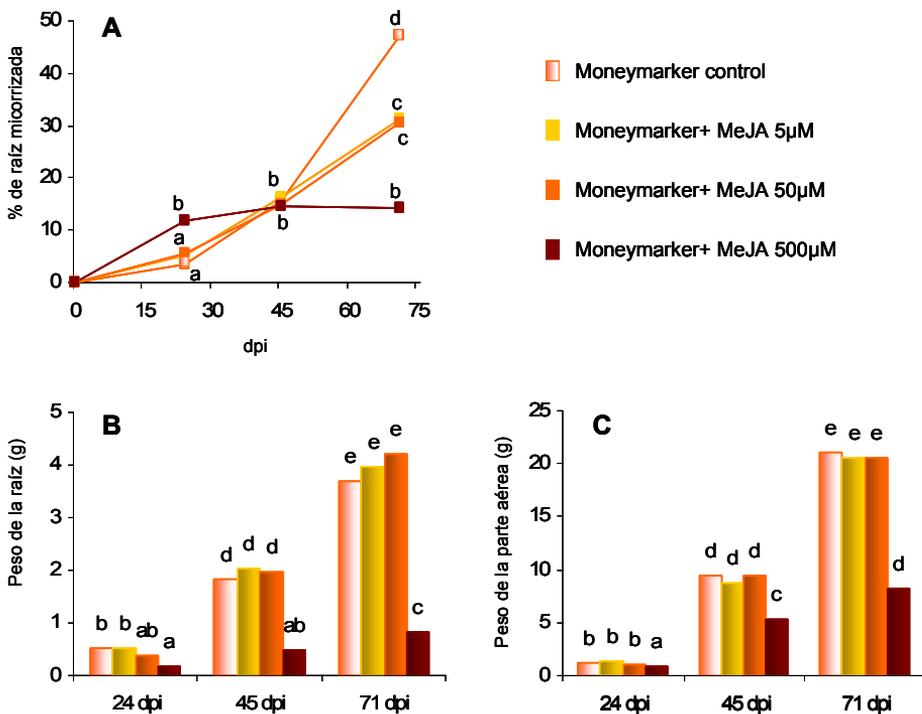


Figura IV.24: Parámetros de micorrización y crecimiento de plantas de tomate, variedad Moneymarker, controles y tratadas con soluciones de MeJA 5 μ M, 50 μ M y 500 μ M y cosechadas a los 24, 45 y 71 días tras la inoculación con *G. intraradices*. **Gráfica A:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica B:** Peso fresco de la raíz **Gráfica C:** Peso fresco de la parte aérea. Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Durante las primeras etapas de la micorrización, a los 22 y 45dpi, la aplicación de MeJA no afectó al porcentaje de raíz micorrizada, con excepción de la concentración 500 μ M que produjo un aumento inicial de 3,5 veces en el porcentaje de raíz micorrizada a los 24dpi, pero no permitió que el hongo continuase dispersándose en

la raíz, ya que el porcentaje de micorrización fue el mismo a los 24, 45 y 71 dpi. Sin embargo, en los tratamientos con 5 μ M y 50 μ M de MeJA, se observó una disminución del porcentaje de raíz colonizada de 1,6 veces al final del experimento, a los 71dpi (Gráfica A, figura IV.24).

Los resultados obtenidos mostraron claramente que las plantas de tomate tratadas con 500 μ M de MeJA sufrieron graves daños fisiológicos por el exceso de MeJA, y que posiblemente afectase de manera indirecta al desarrollo de la micorrización. Sin embargo, concentraciones menores de MeJA (5 μ M y 50 μ M) aplicadas en hojas no afectaron el desarrollo normal de la planta y si tuvieron un efecto evidente y significativo de reducción del porcentaje de micorrización, manifestado en etapas tardías de desarrollo de la interacción.

3.1.2. Efectos sobre la micorrización debidos a la aplicación de MeJA en la rizosfera

Se estudió el efecto que tiene sobre la micorrización la aplicación de MeJA en la zona de la rizosfera, para lo cual se aplicaron soluciones de MeJA a las concentraciones 5 μ M y 50 μ M en el sustrato de crecimiento de las plantas, a razón de dos veces por semana, y con un volumen de 20ml por maceta en cada aplicación. La aplicación de MeJA sobre el sustrato prácticamente no afectó al crecimiento de las plantas (Gráficas G y H de la figura IV.25). En este ensayo se estudiaron los parámetros de frecuencia de micorrización (F%), intensidad de micorrización (M%), intensidad de arbusculos en el sistema radical (A%), intensidad de arbusculos en la zona colonizada (a%), frecuencia de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (F-AP%), e intensidad de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%).

La aplicación de la solución 5 μ M de MeJA sobre el sustrato no afectó la F%, mientras que la solución 50 μ M si provocó un descenso del 50% del valor de F% en las plantas a los 68 dpi. A los 85dpi, los valores de F% alcanzaron su máximo en todos los tratamientos (Gráfica A, figura IV.25). El efecto de MeJA sobre M%, fue el mismo que sobre A% y a%. A los 68dpi no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros de micorrización, mientras que a los 85dpi, las dos concentraciones aplicadas produjeron bajadas en los tres parámetros de micorrización, siendo el descenso significativamente mayor con MeJA 50 μ M que con 5 μ M (Gráficas B, C y D, figura IV.25). Las determinaciones de actividad fosfata alcalina fúngica demostraron que el tratamiento con MeJA 50 μ M provocó un descenso tanto en F-AP% como en AP% a los 68dpi, que no se produjo con la concentración 5 μ M. A los 85dpi las plantas tratadas con ambas concentraciones de MeJA presentaron valores

significativamente inferiores de AP% respecto a las plantas control no tratadas (Gráficas E y F, figura IV.25).

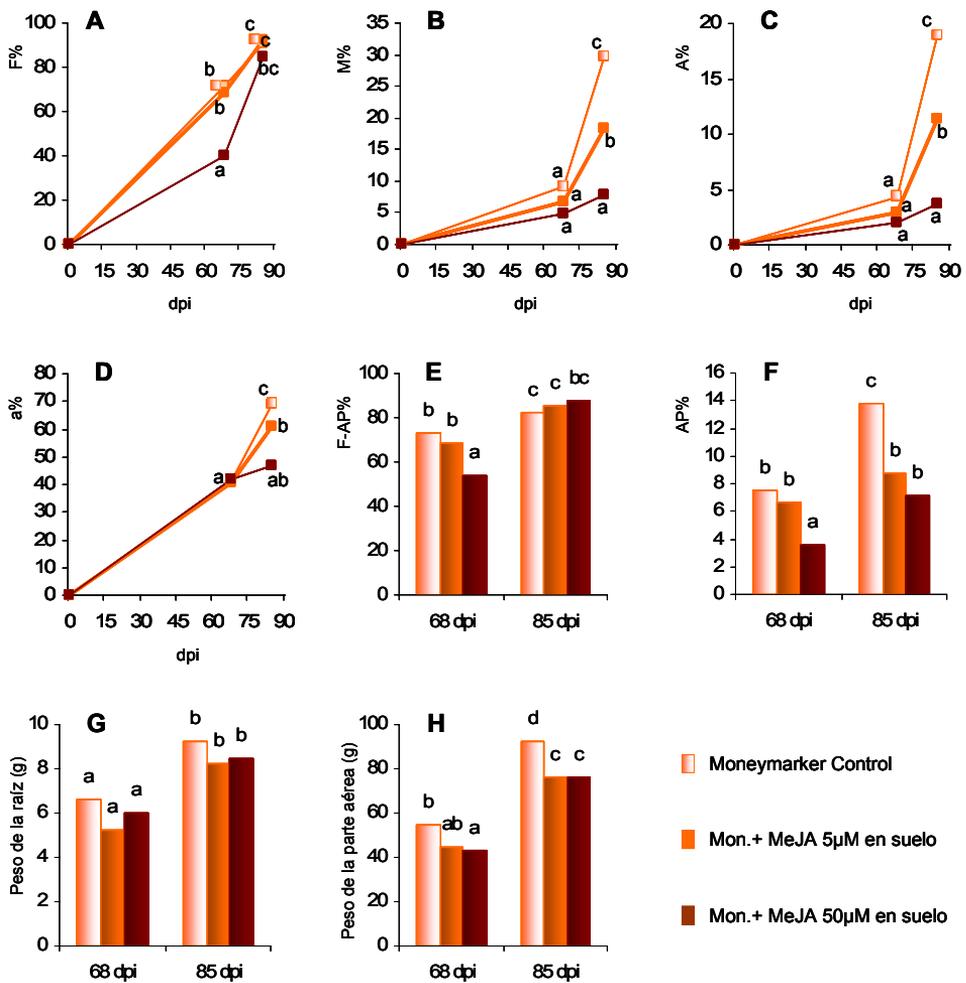


Figura IV.25: Parámetros de micorrización y crecimiento en plantas de tomate, variedad Moneymarker, controles no tratadas y tratadas con soluciones de MeJA 5µM y 50µM aplicadas en suelo, y cosechadas a los 68 y 85 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi). **Gráfica A:** Frecuencia de la micorrización (F%). **Gráfica B:** Intensidad de micorrización (M%). **Gráfica C:** Intensidad de arbusculos en el sistema radical (A%). **Gráfica D:** Intensidad de arbusculos en la zona colonizada (a%). **Gráfica E:** Frecuencia de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (F-AP%). **Gráfica F:** Intensidad de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%). **Gráfica G:** Peso fresco de la raíz. **Gráfica H:** Peso fresco de la parte aérea. Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

3.1.3. Comparación de los efectos sobre la micorrización tras la aplicación de MeJA sobre la parte aérea o la rizosfera

Con el fin de comparar posibles diferencias en los efectos sobre la micorrización entre la aplicación de MeJA sobre la raíz o sobre la parte aérea de la planta, se realizó un experimento de inoculación con *G. intraradices* y aplicación de MeJA tanto en raíz como en parte aérea, con una única cosecha de 68 días tras la inoculación (dpi). La dosis aplicada en la parte aérea fue de 5 μ M, ya que en experimentos anteriores se había comprobado que esta dosis tiene efectos negativos sobre la micorrización. El MeJA sobre la rizosfera se aplicó a una concentración de 50 μ M, puesto que fue la que mostró mayores diferencias en cuanto a su efecto sobre la micorrización en ensayos previos. Las dosis aplicadas de MeJA tanto en suelo como sobre la superficie foliar de las plantas no afectó al desarrollo de la raíz de las plantas y tan solo la aplicación de 50 μ M de MeJA en suelo provocó un leve descenso en el peso fresco de la parte aérea (Gráficas E y F de la figura IV.26).

La solución 5 μ M aplicada sobre la parte aérea de las plantas produjo un descenso en la frecuencia de la micorrización (F%) equivalente al producido por la solución 50 μ M aplicada sobre el sustrato, reduciendo el valor de frecuencia a la mitad (Gráfica A, figura IV.26). La solución 5 μ M de MeJA aplicada sobre las hojas produjo un descenso mayor en la intensidad de micorrización (M%) que el tratamiento sobre la rizosfera (Gráfica B, figura IV.26), y tan solo la solución 5 μ M de MeJA aplicada sobre las hojas produjo un descenso en la intensidad de arbusculos en el sistema radical (A%), mientras que el tratamiento de MeJA 50 μ M sobre la rizosfera no produjo diferencias significativas (Gráfica C, figura IV.26). Las determinaciones de intensidad de actividad fosfatasa alcalina (AP%) demostraron que los tratamientos con MeJA 5 μ M sobre las hojas, y 50 μ M en la raíz, provocaron un descenso similar en dicho parámetro con ambos tratamientos (Gráfica D, figura IV.26).

Se realizó un análisis a nivel molecular para cuantificar tanto la cantidad del hongo micorrícico *G. intraradices* presente en dichas raíces, como la actividad metabólica y simbiótica de dicho hongo. Mediante RT-PCR semicuantitativa, se realizó una cuantificación relativa de la cantidad de ARN ribosómico del hongo presente en las raíces, amplificando parte del ADNc del ARN18S de *G. intraradices* (denominado *Gi18S*), y se comparó con la expresión del gen constitutivo de poli-ubiquitina de tomate (*PolyUBI*). Los resultados mostraron mayores cantidades de amplificado correspondiente a ARN 18S en las plantas controles que en las tratadas con MeJA (Figura IV.27), aunque la diferencia no fue tan obvia como la obtenida con

la tinción histoquímica y la cuantificación del hongo micorrícico por métodos microscópicos (gráfica A de la figura IV.26).

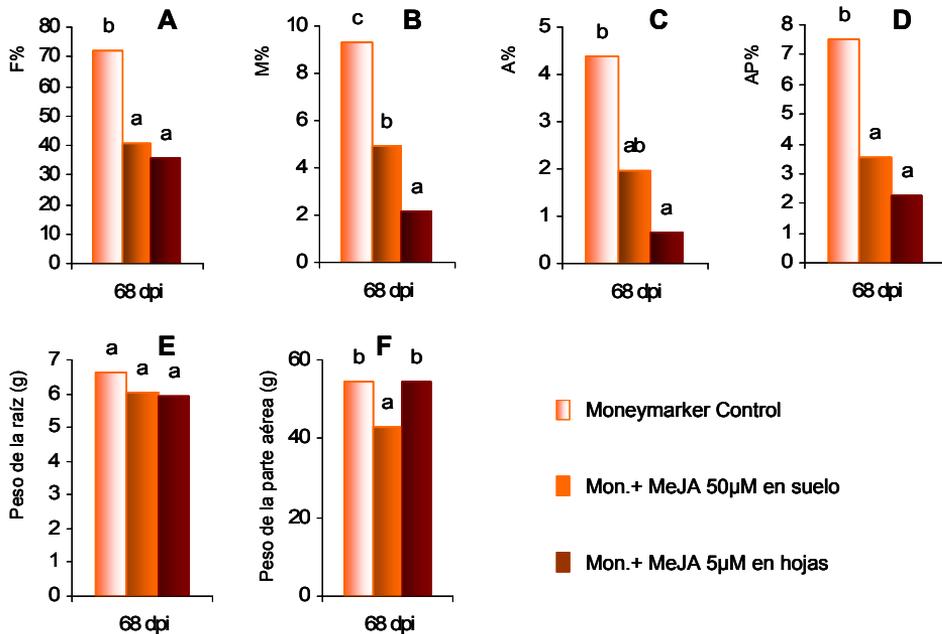


Figura IV.26: Parámetros de micorrización y crecimiento en plantas de tomate de la variedad Moneymarker, controles no tratadas y tratadas con soluciones de MeJA 5µM sobre la superficie foliar y 50µM sobre la rizosfera, y cosechadas 68 días tras la inoculación con *G. intraradices*. **Gráfica A:** Frecuencia de la micorrización (F%). **Gráfica B:** Intensidad de micorrización (M%). **Gráfica C:** Intensidad de arbusculos en el sistema radical (A%). **Gráfica D:** Intensidad de actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%). **Gráfica E:** Peso fresco de la raíz. **Gráfica F:** Peso fresco de la parte aérea.

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

La actividad metabólica del hongo en la raíz y la actividad metabólica de los arbusculos se cuantificó mediante RT-PCR semicuantitativa a partir del ARN extraído de las raíces micorrizadas usando como marcadores los genes *ALP*, codificante de la proteína con actividad fosfatasa alcalina del hongo (Aono y col, 2004), y *LePT4* de tomate, codificante de una proteína transportadora de fosfato y relacionada con la actividad de intercambio de fosfato en los arbusculos de las plantas micorrizadas (Nagy y col, 2005). Como referencia de la cantidad de ARN extraído se tomó la expresión de *PolyUBI* de tomate. Tanto *ALP* como *LePT4* presentaron mayores niveles de expresión en las plantas micorrizadas controles no tratadas que en

las tratadas con MeJA. La menor expresión en ambos genes se detectó en las plantas tratadas con MeJA 5 μ M sobre la parte aérea, especialmente con el gen *LePT4* de tomate (Figura IV.27)

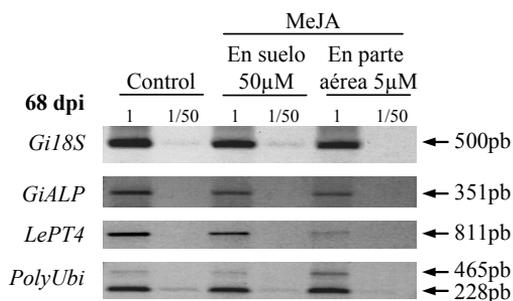


Figura IV.27: Análisis de la expresión por RT-PCR semicuantitativa de los genes *Gi18S* y *GiALP* de *G. intraradices*, y *LePT4* y *PoliUbi* de tomate, en raíces de tomate de la variedad Moneymarker micorrizadas tras 68 días de crecimiento, controles y tratados con una solución 50 μ M de MeJA aplicada en suelo o 5 μ M de MeJA aplicada sobre la parte aérea. Para las reacciones PCR se utilizaron las diluciones 1/1 y 1/50 del ADNc obtenido.

Dado que la aplicación de una dosis 5 μ M de MeJA en la superficie foliar fue suficiente para inducir una disminución de la micorrización, se planteó un experimento donde se aplicaron dosis menores con el fin de comprobar la dosis mínima necesaria para inducir el efecto. Así, se utilizaron las dosis 0,5 μ M aplicada en suelo y 0,5 μ M y 0,05 μ M de MeJA aplicado en la parte aérea, añadiendo las soluciones dos veces por semana, una vez realizada la inoculación de las plantas con *G. intraradices*. La aplicación de estas soluciones prácticamente no afectó el crecimiento de las plantas (Gráficas F y G, figura IV.28). Las concentraciones de 0,5 μ M y 0,05 μ M aplicadas sobre las hojas no ocasionaron descensos en los distintos parámetros de micorrización en la línea silvestre Moneymarker, excepto un descenso en la intensidad de los arbusculos con la dosis 0,5 μ M (Gráfica C, figura IV.28), y un descenso en la intensidad de los arbusculos de la zona colonizada proporcional a la cantidad de MeJA aplicado (Gráfica D, figura IV.28). Contrariamente a los resultados obtenidos previamente con la aplicación de 5 μ M y 50 μ M de MeJA sobre la rizosfera (Figura IV.25), la aplicación de MeJA en suelo a dosis de 0,5 μ M incrementó la micorrización, cuantificada como F%, M%, A%, a%, y en número de unidades de infección por centímetro de raíz (Figura IV.28). Por tanto, el efecto generado por la aplicación en suelo de MeJA depende de la dosis aplicada.

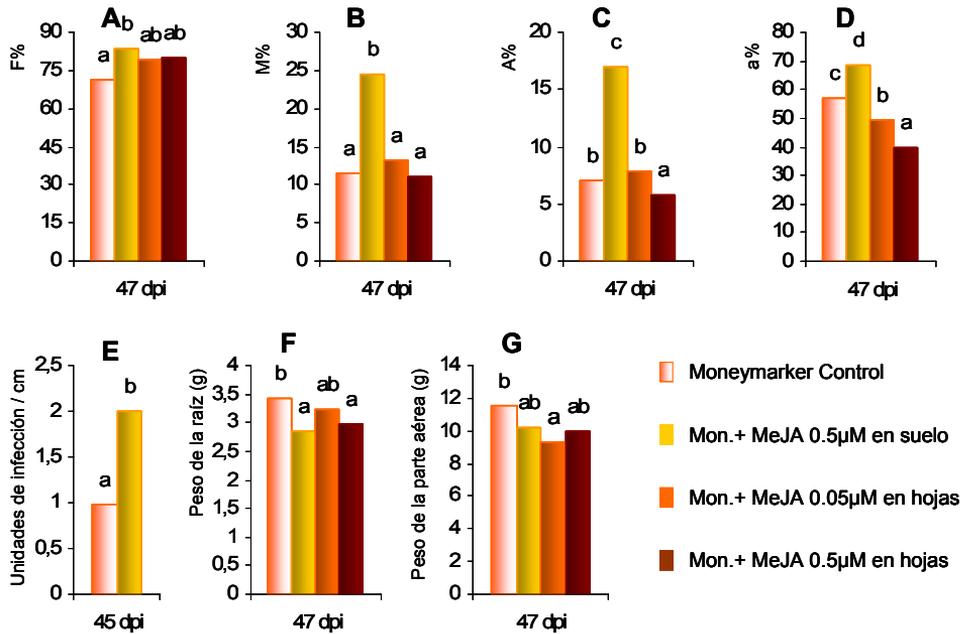


Figura IV.28: Parámetros de micorrización y crecimiento en plantas de tomate de la variedad Moneymarker, controles no tratadas y tratadas con las soluciones 0,05µM y 0,5µM de MeJA aplicado en suelo, cosechadas tras 45 días tras la inoculación con *G. intraradices*. **Gráfica A:** Frecuencia de la micorrización (F%). **Gráfica B:** Intensidad de micorrización (M%). **Gráfica C:** Intensidad de arbusculos en el sistema radical (A%). **Gráfica D:** Intensidad de arbusculos en la zona colonizada (a%). **Gráfica E:** Número de unidades de infección por centímetro de raíz. **Gráfica F:** Peso fresco de la raíz. **Gráfica G:** Peso fresco de la parte aérea. Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

3.2. Micorrización en plantas transgénicas alteradas en la percepción de JA

Al igual que en capítulos anteriores, la posibilidad de usar mutantes alterados en la ruta de señalización de una fitohormona determinada permite un abordaje complementario sobre el estudio de la participación de dicha fitohormona en la regulación de la micorrización. En el caso concreto del JA, se utilizaron los mutantes de tomate *jai1*, afectados en la sensibilidad al JA y al MeJA. La mutación *jai1* es recesiva, por lo que solo 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, utilizando los criterios de sensibilidad al MeJA descritos en el apartado III.1.2.1.1.

El estudio de la micorrización de plantas sensibles e insensibles a MeJA mostró como la insensibilidad al JA de *jai1* afectó de forma positiva a todos los parámetros de micorrización (Figura IV.29), aunque en el caso de la frecuencia de la micorrización (F%) las diferencias no fueron significativas por haber alcanzado ya los niveles máximos en la primera cosecha (47 dpi), tanto en plantas de fenotipo silvestre como en insensibles. La insensibilidad al JA provocó un notable incremento en la intensidad de la micorrización y de arbusculos en el sistema radical (M% y A%), que fue de 3,5 y del 6,8 veces respectivamente a los 47dpi, y de 2,2 y 3 veces respectivamente a los 57 dpi. Los mutantes *jai1* también presentaron un incremento en la intensidad de arbusculos en la zona colonizada (a%) de 1,6 y 1,4 veces a los 47dpi y 57dpi respectivamente. De forma paralela a la evolución de los arbusculos, los mutantes insensibles al JA presentaron un incremento en la intensidad de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%), la cual alcanzó niveles mayores en los mutantes *jai1* respecto a los silvestres, de 4,3 y 1,7 veces a los 47 dpi y 57dpi respectivamente. La frecuencia de AP (F-AP%) solo fue superior en *jai1* a los 47dpi (1,5 veces), ya que a los 57dpi ambos fenotipos alcanzaron el máximo de F-AP% (Figura IV.29). Por otro lado, la alteración en la sensibilidad del JA no afectó al desarrollo de las plantas, no observándose diferencias significativas entre los pesos de las plantas de ambos fenotipos (Gráficas G y H, figura IV.29).

Igual que se hizo en el apartado anterior, se verificaron estas medidas histoquímicas con el análisis a nivel molecular de la cantidad del hongo micorrícico *G. intraradices* presente en dichas raíces, y de la actividad metabólica del hongo micorrícico y la actividad metabólica de las células con arbusculos, usando la metodología RT-PCR para dicho análisis. Los resultados mostraron mayores cantidades de ARN 18S en las plantas mutantes *jai1* a los 47dpi respecto a las plantas de fenotipo silvestre, pero no se encontraron diferencias en la cantidad de ARN fúngico a los 57dpi (Figura IV.30). La actividad del hongo en la raíz y la funcionalidad de la simbiosis se determinaron mediante la cuantificación de la expresión por RT-PCR semicuantitativa de los genes *ALP* y *LePT4*. Como referencia de la cantidad de ARN extraído se utilizó la expresión del gen constitutivo *PolyUBI* de tomate. Del mismo modo que ocurrió con *Gt18S*, la acumulación de *ALP* y *LePT4*, fue mayor en las plantas *jai1* a los 47dpi, pero apenas se encontraron diferencias en la cantidad de *ALP* y *LePT4* a los 57dpi entre plantas mutantes insensibles a MeJA y plantas de fenotipo silvestre (Figura IV.28), aunque que si se habían determinado diferencias en las medidas histoquímicas de AP (Gráfica F, figura IV.27).

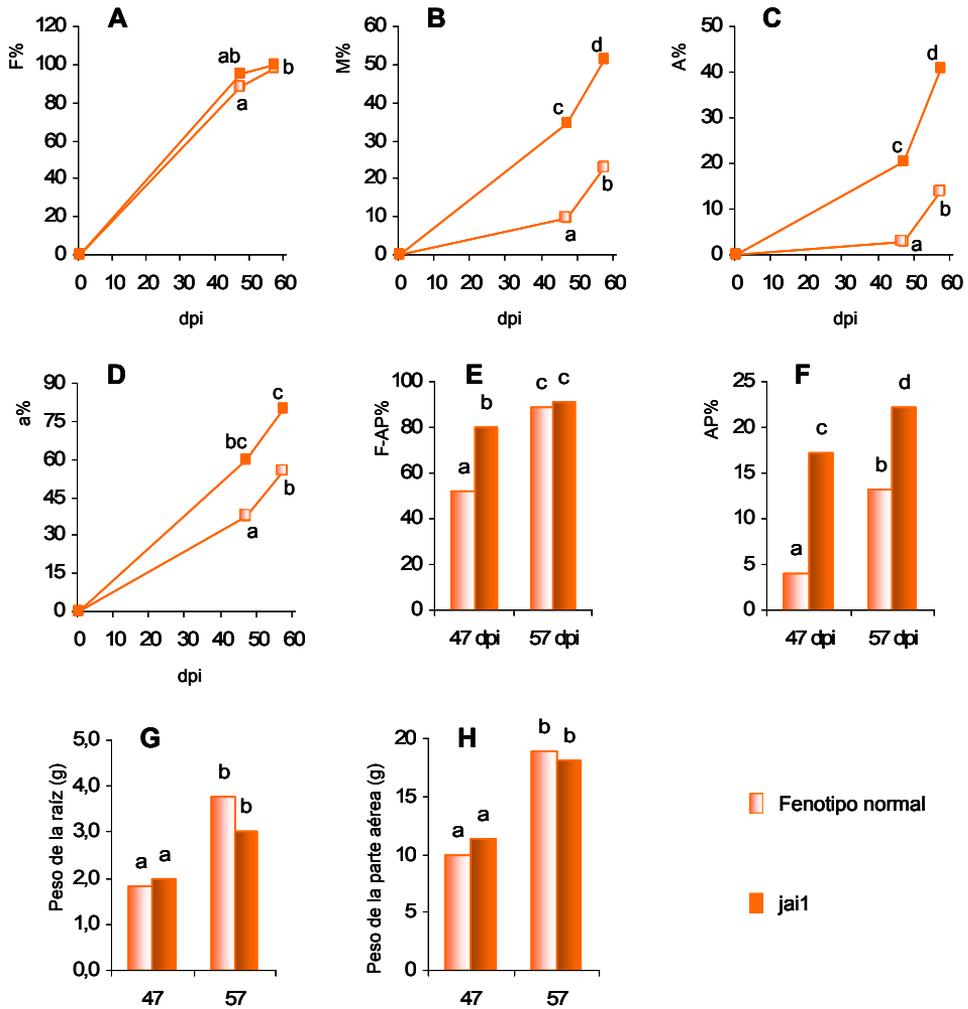


Figura IV.29: Parámetros de micorrización y crecimiento en plantas de tomate con fenotipo silvestre, y mutantes de fenotipo insensible al JA (*jai1*), determinados a los 47 y 57 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi). **Gráfica A:** Frecuencia de la micorrización (F%). **Gráfica B:** Intensidad de micorrización (M%). **Gráfica C:** Intensidad de arbusculos en el sistema radical (A%). **Gráfica D:** Intensidad de arbusculos en la zona colonizada (a%). **Gráfica E:** Frecuencia de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (F-AP%). **Gráfica F:** Intensidad de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%). **Gráfica G:** Peso fresco de la raíz. **Gráfica H:** Peso fresco de la parte aérea.

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

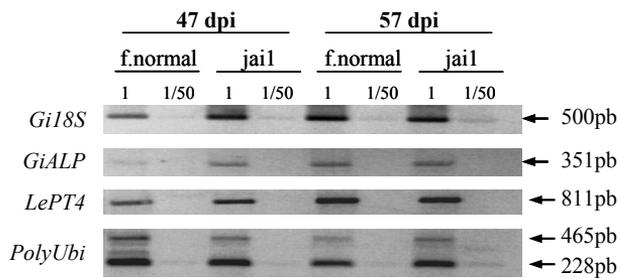


Figura IV.30: Análisis de la expresión por RT-PCR semicuantitativa de los genes *Gi18S* y *GiALP* de *Glomus intraradices*, y *LePT4* y *PoliUbi* de tomate, en raíces de tomate de fenotipo silvestre y fenotipo insensible al JA (*jai1*) a los 47 y 57 días tras la inoculación con *G. intraradices*. Para las reacciones PCR se utilizaron las diluciones 1/1 y 1/50 del ADNc obtenido.

4. PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO ABCSÍCSO (ABA) EN EL PROCESO DE MICORRIZACIÓN

Como se ha explicado en el apartado II.2.5.2.1 de la introducción, estudios previos realizados por distintos investigadores habían puesto de manifiesto variaciones en la síntesis de ABA tanto en la raíz micorrizada, como en las hifas del hongo micorrícico, aunque, poco se conocía sobre el papel concreto del ABA en la simbiosis MA, ni sobre su posible función como regulador de la micorrización. Parte del trabajo realizado en esta tesis doctoral se dirigió a estudiar la participación del ABA en el proceso de micorrización, y establecer una posible relación entre el papel del ABA y otras moléculas señal, como el SA y etileno (Apartados IV.5.1.3 y IV.5.2.2) durante la micorrización.

Igual que en apartados anteriores, los experimentos realizados fueron de dos tipos: el análisis de la micorrización en plantas alteradas en la fisiología del ABA, y experimentos de aplicación exógena de ABA y análisis de micorrización. Se utilizaron las plantas transgénicas denominadas *Sitiens*, mutantes afectados en el gen codificante de la última enzima de la ruta de síntesis del ABA, la aldehído-oxidasa específica de ABA, y que en consecuencia poseen una capacidad reducida de sintetizar dicha molécula. En los mutantes *Sitiens*, la síntesis de ABA no supera el 8% de los silvestres, variedad Rheinlands Ruhm (Herde y col, 1999), y esta deficiencia afecta al crecimiento general de la planta y a su capacidad de adaptación a diversos estreses. Los mutantes *Sitiens* por lo tanto son más pequeños y especialmente sensibles al estrés hídrico.

4.1. Micorrización en plantas transgénicas alteradas en la síntesis de ABA

Como primer objetivo se planteó establecer las posibles diferencias en micorrización entre líneas silvestres y mutantes *Sitiens*. Para ello se realizó un experimento de inoculación de plantas Rheinlands Ruhm y *Sitiens* con *G. intraradices* y se realizó una cosecha a los 40 días tras la inoculación (dpi), estudiando los distintos parámetros relacionados con la micorrización en ambas líneas. En este ensayo, así como en el resto de los ensayos, el crecimiento en los mutantes *Sitiens* estuvo limitado como parte de su fenotipo (Gráficas H e I, figura IV.31). Se comprobó que la micorrización en *Sitiens* se afectó drásticamente en comparación con la micorrización en plantas silvestres. Así, la intensidad de micorrización (M%) descendió casi 6 veces en *Sitiens* respecto al silvestre, mientras que la frecuencia de micorrización (F%) lo

hizo 3 veces (Gráficas A y B, figura IV.31). El cambio más significativo se observó en la intensidad de arbusculos en el sistema (A%), que descendió 23 veces en los mutantes *Sitiens* respecto al cultivar silvestre. La intensidad de arbusculos en la zona colonizada (a%) decayó 4 veces (Gráficas C y D, figura IV.31). En concordancia con estos resultados, por estar estrechamente ligada a los arbusculos, la frecuencia de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (F-AP%) fue 19 veces menor en *Sitiens*, y la intensidad de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%) fue 4,8 veces menor (Gráficas E y F, figura IV.31). Además, se tomaron medidas de la frecuencia de vesículas en el sistema radical, encontrándose de nuevo un descenso de 4,5 veces en los mutantes respecto a las plantas silvestre (Gráfica G, figura IV.31).

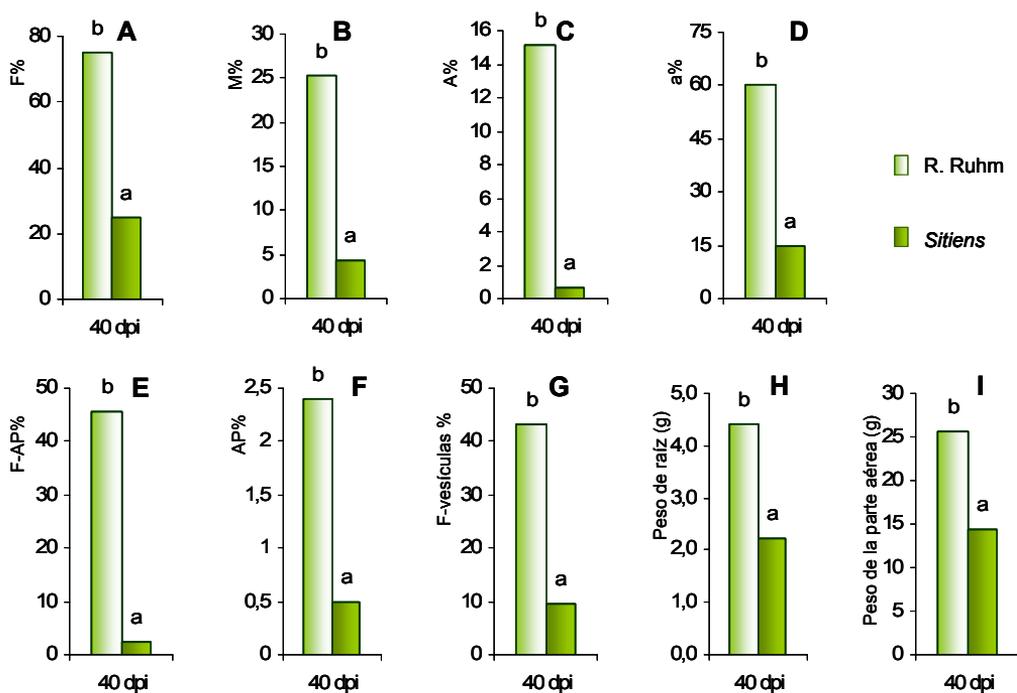


Figura IV.31: Parámetros de micorrización y crecimiento en plantas de la variedad silvestre de tomate Rheinlands Rhum y del mutante *Sitiens* cosechadas a los 40 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi). **Gráfica A:** Frecuencia de micorrización (F%). **Gráfica B:** Intensidad de micorrización (M%). **Gráfica C:** Intensidad de arbusculos en el sistema radical (A%). **Gráfica D:** Intensidad de arbusculos en la zona colonizada (a%). **Gráfica E:** Frecuencia de actividad fosfatasa alcalina fúngica (F-AP%). **Gráfica F:** Intensidad de actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%). **Gráfica G:** Frecuencia de vesículas (F-vesículas %). **Gráfica H:** Peso fresco de la raíz. **Gráfica I:** Peso fresco de la parte aérea.

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Además de la baja intensidad y frecuencia de estructuras fúngicas en la raíz de plantas *Sitiens* (Gráficas C y D, figura IV.31), se pudieron identificar ciertas diferencias a nivel de desarrollo morfológico de dichas estructuras. En concreto, se pudo observar que los arbuscúlos formados en la raíz de plantas *Sitiens* presentaban menos ramificaciones, y las pocas que había eran más gruesas y cortas en comparación con las de los arbuscúlos de Rheinlands Ruhm (Figura IV.32). Paralelamente a la menor densidad de arbuscúlos observados con la tinción azul-tripán en *Sitiens*, se observó también una menor densidad e intensidad de tinción de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (Figura IV.32).

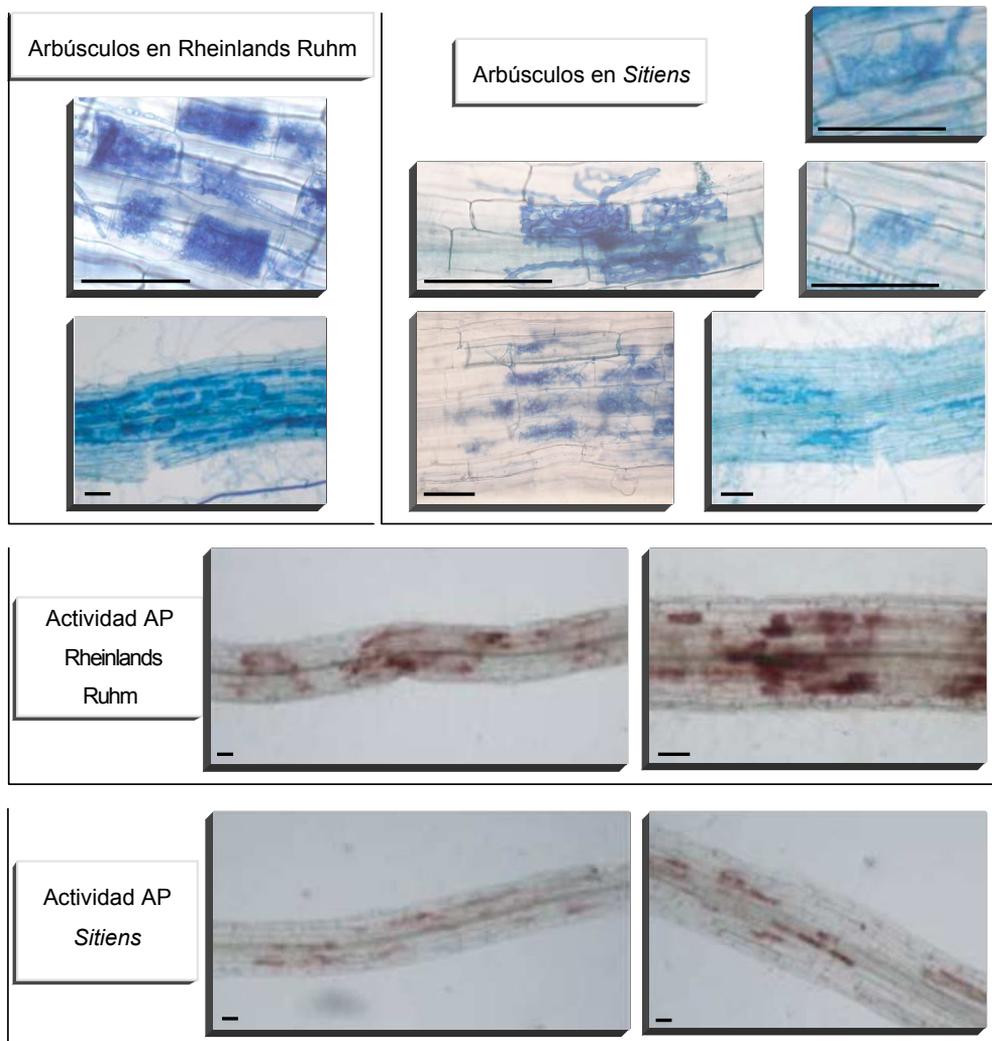


Figura IV.32: Fotografías en microscopio óptico representativas de arbuscúlos teñidos con azul-tripán, y con la tinción para la actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP) en raíces de tomate, variedad silvestre Rheinlands Rhum y mutantes *Sitiens*. La barra negra de las fotografías representa un tamaño de 50µm.

Con objeto de cuantificar las diferencias observadas en la estructura de los arbusculos formados en la línea silvestre y en los mutantes *Sitiens*, se realizó una cuantificación del nº de arbusculos en la raíz, definiendo tres categorías según se describe en el apartado IV.2.2.4. Con esta metodología se determinó el porcentaje de arbusculos pertenecientes a la clase a, b, ó c en cada tipo de raíz (silvestre o mutante *Sitiens*): En la clase **a** se incluían arbusculos en formación o degradación, poco desarrollados y ramificados y con una ocupación parcial de la célula vegetal; La clase **b** la ocupaban arbusculos medianamente desarrollados, con una ocupación total de la célula vegetal; Y la clase **c** correspondía con arbusculos totalmente desarrollados, con una ocupación completa de la célula vegetal y gran intensidad de tinción (signo de máxima ramificación). En *Sitiens* la distribución de arbusculos fue del 60%, 30% y 10% del tipo **a**, **b** y **c** respectivamente, frente al 25%, 35% y 40% cuantificada en Rheinlands Ruhm (Figura IV.33).

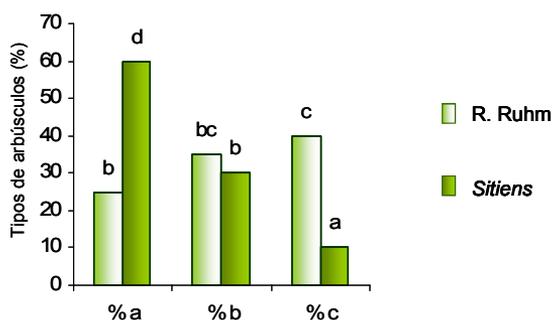


Figura IV.33: Distribución de arbusculos según los tipos de **a**, **b** o **c** en raíces plantas de la variedad silvestre de tomate Rheinlands Rhum y en el mutante *Sitiens* a los 40 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi). Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

4.2. Efectos sobre la micorrización debidos a la aplicación exógena de ABA

4.2.1. Efectos comparados de la aplicación de ABA sobre plantas silvestres y *Sitiens*

Tras comprobar la fuerte inhibición congénita de la micorrización en los mutantes *Sitiens*, especialmente en la frecuencia de los arbusculos y de la actividad AP (apartado IV.4.1), se realizaron una serie de experimentos para comprobar el efecto de la aplicación exógena del ABA en la micorrización de los silvestres Rheinlands Ruhm y de los mutantes *Sitiens*. En este sentido se cultivaron plantas de ambas líneas, y se aplicó una solución de ABA 40 μ M dos veces por semana sobre el sustrato de cultivo, realizando un seguimiento de la evolución de la micorrización en tres cosechas consecutivas, a los 22, 36 y 57 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi).

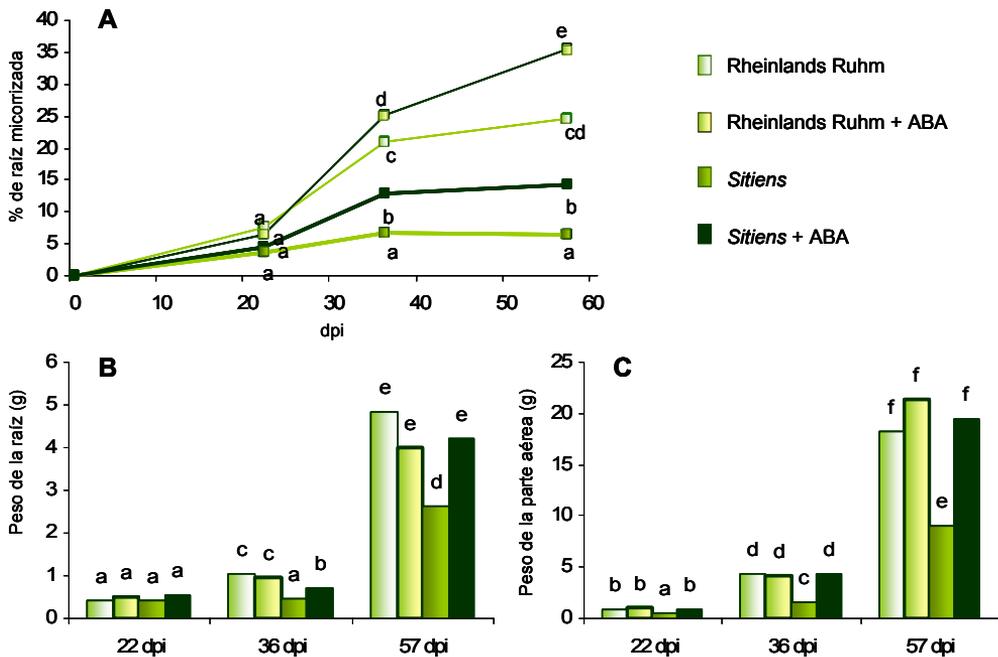


Figura IV.34: Micorrización y peso fresco de plantas Rheinlands Ruhm y *Sitiens* micorrizadas, sin tratar o tratadas con una solución 40 μ M de ABA y cosechadas a los 22, 36 y 57 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi). **Gráfica A:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica B:** Peso fresco de la raíz. **Gráfica C:** Peso fresco de la parte aérea. Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

La aplicación de ABA provocó un incremento en el porcentaje de raíz micorrizada tanto en los silvestres Rheinlands Ruhm como en las plantas mutantes *Sitiens*. Dicho incremento fue evidente a partir de los 36 dpi (Gráfica A, figura IV.34). El efecto del ABA fue más pronunciado a los 57 dpi, en plantas de fenotipo silvestre (Gráfica A, figura IV.34). Aunque la aplicación de ABA supuso un aumento en el porcentaje de raíz micorrizada en *Sitiens* a los 36 y 57dpi, este incremento no alcanzó los niveles de la línea silvestre Rheinlands Ruhm (Gráfica A, figura IV.34). Sin embargo, la aplicación de esta concentración de ABA fue suficiente para recuperar la deficiencia en el crecimiento inherente a los mutantes *Sitiens*, y así los valores de peso fresco en plantas *Sitiens* tratadas con ABA fueron similares a los obtenidos en la línea silvestre sin tratar. El ABA aplicado no afectó al crecimiento de la variedad silvestre Rheinlands Ruhm (Gráficas B y C, figura IV.34).

En la última cosecha, a los 57dpi, se efectuó un examen más exhaustivo de los niveles de micorrización y se comprobó que la aplicación de ABA sobre la línea silvestre Rheinlands Ruhm incrementó todos los parámetros de micorrización,

principalmente la intensidad de arbusculos en el sistema radical y la actividad AP fúngica (Figura IV.35). Aunque no se encontraron diferencias significativas en F% debido a que a este tiempo de cultivo en ambos tratamientos se alcanzó el máximo, la aplicación de ABA en *Sitiens* incrementó los niveles de M%, F-AP% y AP%, aunque sin llegar a alcanzar los valores de la línea silvestre (Figura IV.35).

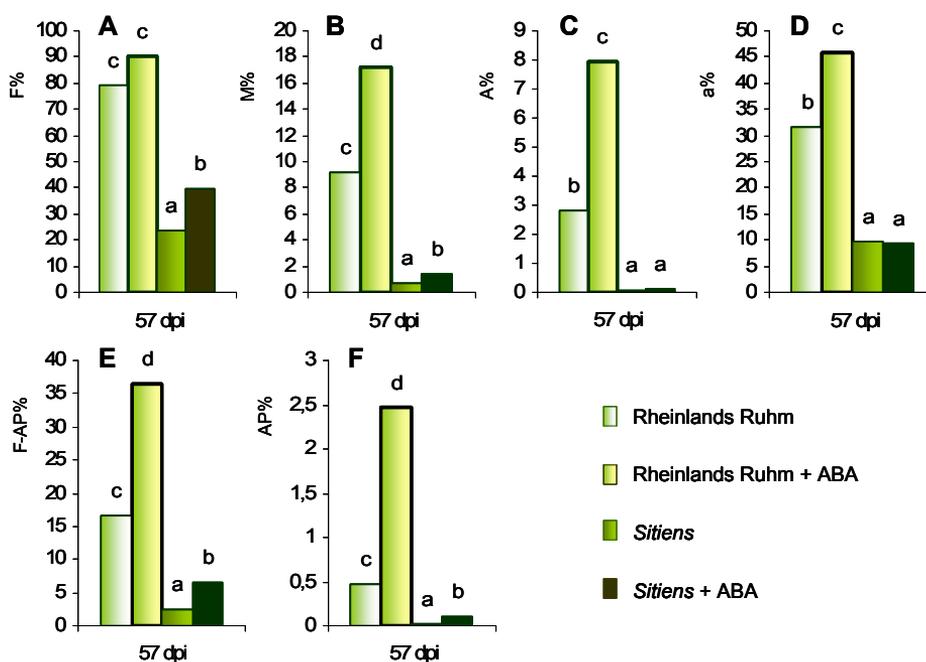


Figura IV.35: Parámetros de micorrización plantas de tomate Rheinlands Ruhm y *Sitiens*, sin tratar y tratadas con una solución 40 μ M de ABA y cosechadas a los 57 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi). **Gráfica A:** Frecuencia de micorrización (F%). **Gráfica B:** Intensidad de micorrización (M%). **Gráfica C:** Intensidad de arbusculos en el sistema radical (A%). **Gráfica D:** Intensidad de arbusculos en la zona colonizada (a%). **Gráfica E:** Frecuencia de actividad fosfatasa alcalina fúngica (F-AP%). **Gráfica F:** Intensidad de AP fúngica (AP%). Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Los experimentos de cuantificación histoquímica se complementaron con experimentos de cuantificación mediante RT-PCR semicuantitativa de la cantidad relativa del ADNc amplificado a partir del ARN ribosómico 18S de *G. intraradices* presente en raíces de plantas silvestres y mutantes *Sitiens* tratadas o no con ABA. Como marcador interno de la cantidad de ARN de la raíz se cuantificó el ADNc amplificado a partir de ARN del gen constitutivo *PolyUBI* de tomate (Cebadores en

tabla III.10). De este modo se comprobó que efectivamente la cantidad de ARN fúngico fue superior en las plantas Rheinlands Ruhm respecto a la de los mutantes *Sitiens*, y además se observó el incremento en la acumulación de ARN fúngico como consecuencia del tratamiento con ABA (Figura IV.36)

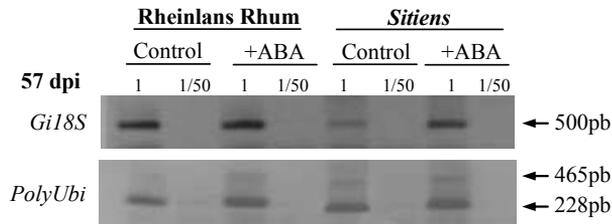


Figura IV.36: Análisis de la expresión mediante RT-PCR semicuantitativa del ARN 18S de *G. intraradices* (*Gi18S*), y del gen *PoliUbi* de tomate, en la variedad silvestre de tomate Rheinlands Ruhm y en los mutantes *Sitiens*, controles no tratados y tratados con una solución 40 μ M de ABA, y cosechadas a los 57 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi). Para las reacciones PCR se utilizaron las diluciones 1/1 y 1/50 del ADNc obtenido.

4.2.2. Efectos sobre la micorrización de plantas *Sitiens* debidos a la aplicación de concentraciones crecientes de ABA

Dado que la aplicación de la dosis 40 μ M de ABA en experimentos anteriores supuso un aumento en el porcentaje de raíz micorrizada pero no fue suficiente para reestablecer los niveles de micorrización de la línea silvestre Rheinlands Ruhm, se realizó un experimento de aplicación de dosis mayores de ABA (50 μ M y 100 μ M), y un análisis secuencial de frecuencia de micorrización (F%), intensidad de micorrización (M%), frecuencia de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (F-AP%), e intensidad de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%), a los 30, 44 y 72 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi). El ABA aplicado a la concentración 50 μ M recuperó en gran parte el crecimiento de los mutantes *Sitiens*, sin embargo la dosis de 100 μ M resultó ser inefectiva (Gráficas E y F, figura IV.37).

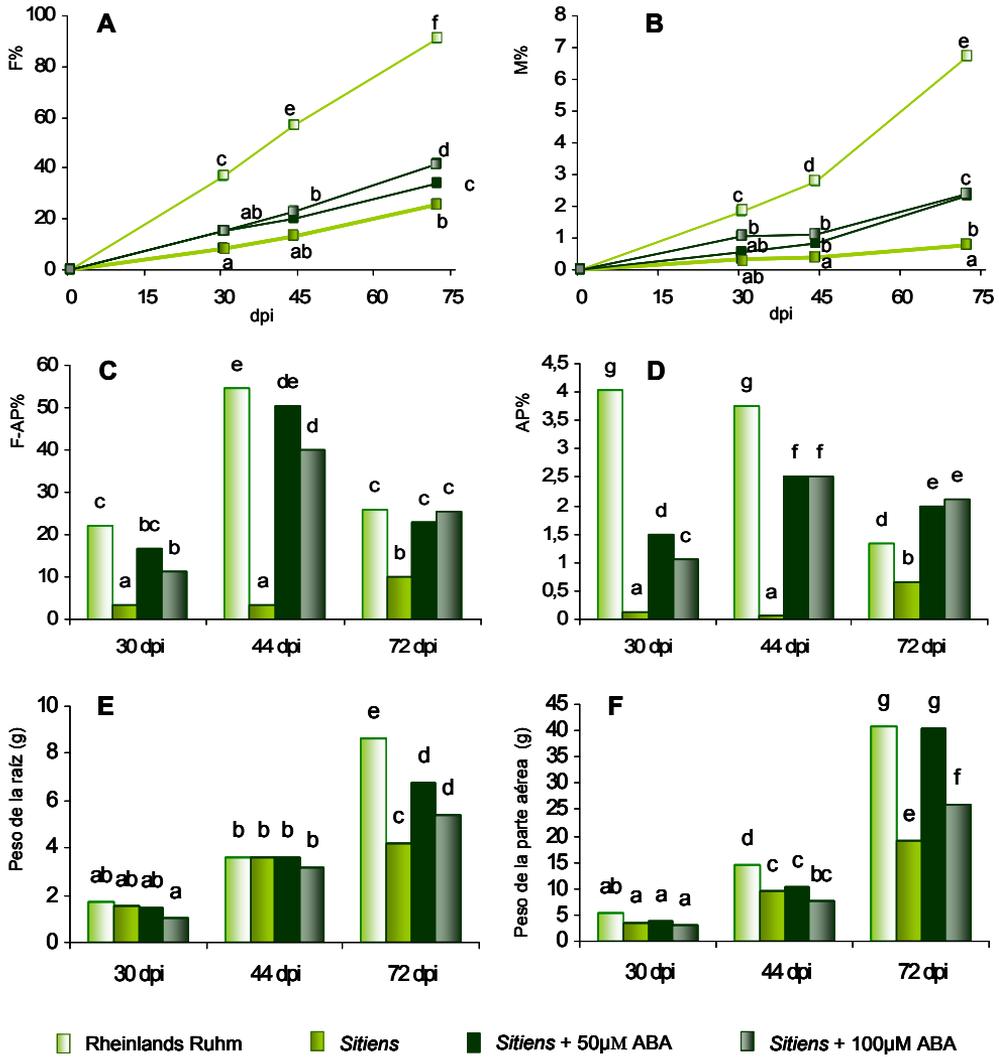


Figura IV.37: Parámetros de micorrización y crecimiento en plantas de tomate Rheinlands Ruhm no tratadas y en plantas *Sitiens*, controles no tratadas y tratadas con ABA 50µM y 100µM, y cosechadas 30, 44 y 72 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi). **Gráfica A:** Frecuencia de micorrización (F). **Gráfica B:** Intensidad de micorrización (M). **Gráfica C:** Frecuencia de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (F-AP). **Gráfica D:** Intensidad de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP). **Gráfica E:** Peso fresco de la raíz **Gráfica F:** Peso fresco de la parte aérea.

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

El ABA aplicado a ambas concentraciones provocó un considerable incremento en la actividad fosfatasa alcalina fúngica de plantas *Sitiens*, igualando en algunos casos

los valores de F-AP% de plantas Rheinlands Ruhm no tratadas (Gráficas C y D, figura IV.37). La intensidad AP% también se incrementó en *Sitiens* de igual forma con ambas dosis de ABA, alcanzando el 29% y el 70% de los niveles de Rheinlands Ruhm a los 30 y 44dpi respectivamente. El tratamiento de ABA en *Sitiens* incluso superó a la actividad AP% de los silvestres a los 72dpi, alcanzando un 150% de la actividad de Rheinlands Ruhm (Gráficas C y D, figura IV.37). Aunque también con ambas concentraciones se incrementaron la frecuencia e intensidad de la micorrización en *Sitiens*, en este caso y al contrario de lo observado con la actividad AP fúngica, no se alcanzaron los niveles de la línea silvestre (Gráficas A y B, figura IV.37), pero sí se recuperó la morfología normal de los arbusculos en *Sitiens* y la intensidad de la tinción con azul-tripán (Figura IV.48).

Para comprobar la sensibilidad y capacidad de respuesta de mutantes *Sitiens* al ABA aplicado de forma exógena, se analizó la expresión del gen *Le4*, inducible por ABA (Cohen y col, 1991), tanto en raíces de plantas Rheinlands Ruhm y *Sitiens* controles no tratadas y tratadas con soluciones 50 μ M y 100 μ M de ABA. El análisis de expresión de *Le4* se realizó mediante RT-PCR semicuantitativa utilizando como marcador interno de la cantidad de ARN de tomate extraído la amplificación del gen *PolyUBI* (Cebadores en tabla III.10). Estos experimentos demostraron que en la línea silvestre Rheinlands Ruhm *Le4* se induce con la aplicación de ABA, siendo la inducción dependiente de la concentración de ABA aplicada. Sin embargo, los mutantes *Sitiens* muestran una sensibilidad al ABA alterada. En plantas *Sitiens* sin tratar, la expresión del gen *Le4* fue superior a la de los controles de Rheinlands Ruhm, y en las raíces de las plantas tratadas no se detectó inducción de *Le4* con el tratamiento 50 μ M, mientras que con el tratamiento 100 μ M se observó un descenso en la acumulación de su amplificado (Figura IV.38). Estos resultados demostraron que Rheinlands Ruhm y *Sitiens* presentan distinta sensibilidad al ABA.

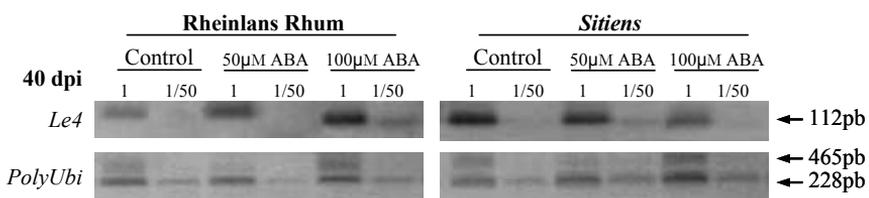


Figura IV.38: Análisis de la expresión por RT-PCR semicuantitativa de los genes *Le4* y *PoliUbi* de tomate, en la variedad silvestre Rheinlands Ruhm y en los mutantes *Sitiens*, controles no tratados y tratados con una solución 50 μ M y 100 μ M de ABA, a los 40 días tras la inoculación con *G.intraradices* (dpi). Para las reacciones PCR se utilizaron las diluciones 1/1 y 1/50 del ADNc obtenido.

5. INTERACCIÓN ENTRE LAS DISTINTAS MOLÉCULAS SEÑAL DURANTE EL PROCESO DE REGULACIÓN DE LA MICORRIZACIÓN

Una vez estudiados los efectos individuales del SA y las hormonas etileno, JA y ABA sobre la micorrización, se investigó sobre la posible relación entre ellas en la regulación de esta simbiosis. Este estudio se realizó combinando la aplicación de algunas hormonas e inhibidores de la acción hormonal, con el uso de mutantes y transgénicos de tomate afectados en la capacidad de acumulación o percepción de otras moléculas señal. Además se realizaron medidas de la producción del etileno, y acumulación de SA total en raíces en estos transgénicos y mutantes.

5.1. Interacción entre el SA y fitohormonas

5.1.1. Interacción entre el SA y el etileno en el proceso de regulación de la micorrización

Al estudiar por separado la participación de estos dos compuestos, el ácido salicílico (SA) y el etileno, sobre la micorrización, y comprobar que ambas tienen un efecto negativo sobre la misma (apartados IV.1 y IV.2.1), se decidió comprobar si existen pasos comunes en la cadena de señales del SA y el etileno que causa retrasos en el proceso de micorrización. En este sentido se utilizaron plantas transgénicas de tomate NahG de la variedad Moneymarker, cuya capacidad de acumulación de SA está reducida, comprobando la evolución en la producción de etileno en estas plantas durante el proceso de micorrización. En el apartado IV.1.1.2, se describe como en estas plantas la micorrización se acelera respecto de las silvestres Moneymarker. En un experimento de micorrización en un sistema compartimentado, que permite una micorrización rápida y homogénea en todas las plantas (ver apartado III.2.1), se comprobó que a los 38 días después de la inoculación, con un porcentaje de raíz micorrizada del 28,3% en la línea silvestre y de 43,3% en NahG, la producción de etileno no mostró diferencias entre la línea silvestre y los transgénicos NahG (Gráfica D, figura IV.39).

La aplicación de ethephon (30 μ M a pH 7) no afectó al crecimiento de la parte aérea ni de la raíz de las plantas silvestres o NahG (Gráficas B y C, figura IV.39), así como tampoco afectó a la micorrización de los silvestres Moneymarker. En cambio, en NahG provocó un descenso de 1,9 veces en el porcentaje de raíz micorrizada, de modo que las plantas NahG tratadas con ethephon alcanzaron los mismos valores de micorrización que el silvestre Moneymarker (Gráfica A, figura IV.39).

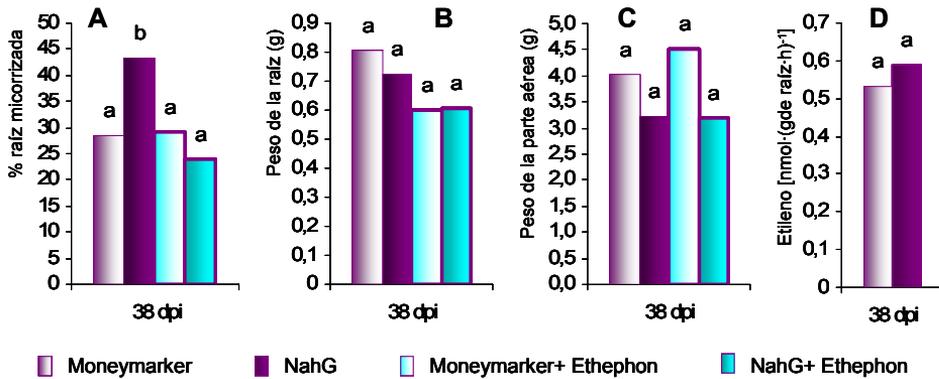


Figura IV.39: Parámetros de micorrización, crecimiento y producción de etileno en plantas de tomate Moneymarker y NahG cosechadas a los 38 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi), controles no tratadas y tratadas con ethephon 30 μ M. **Gráfica A:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica B:** Peso fresco de la raíz. **Gráfica C:** Peso fresco de la parte aérea. **Gráfica D:** Medidas de la producción de etileno en raíces.

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

5.1.2. Interacción entre el SA y el JA en el proceso de regulación de la micorrización

Los resultados obtenidos en los apartados IV.1.1 y IV.4.1, indican un efecto negativo de las hormonas ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA) sobre la micorrización. Al tener ambas hormonas un efecto parecido sobre la micorrización, se planteó estudiar si comparten algún paso en su señalización durante el proceso de micorrización, y establecer así una relación de dependencia o independencia en la actuación. Normalmente el SA o JA actúan de forma independiente durante la activación de la respuesta de defensa frente a bacterias como *Pseudomonas* (Press y col, 1997; Zhang y col, 2002; Iavicoli y col, 2003; Ryu y col, 2003). Con este fin, se utilizaron las plantas transgénicas de tomate NahG, cuya capacidad de acumular ácido salicílico es reducida (Gaffney y col, 1993), y se sometieron al tratamiento de distintas soluciones con baja concentración de MeJA (inductor de la respuesta a JA), dos veces por semana hasta alcanzar los 47 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi). Las concentraciones de MeJA utilizadas fueron 0,5 μ M aplicada en suelo, y 0,5 μ M y 0,05 μ M aplicada sobre la parte aérea.

La aplicación de estas concentraciones de MeJA no provocó grandes alteraciones en el crecimiento de la raíz o de la parte aérea de las plantas silvestres Moneymarker o mutantes NahG (Gráficas E y F, figura IV.40). La micorrización de la línea silvestre Moneymaker no se afectó por la aplicación foliar de MeJA, y la aplicación de 0,5 μ M

MeJA en suelo resultó en un incremento en la micorrización de esta línea silvestre (Gráficas B, C y F, figura IV.40). Sin embargo, la micorrización de NahG se vio afectada de forma negativa en todos los casos de aplicación de MeJA. Con la concentración $0,5\mu\text{M}$ aplicado sobre el suelo, se observó un descenso en NahG de la frecuencia de micorrización ($F\%$) de 1,2 veces, mientras que en Moneymarker no se observaron diferencias. Además, dicha aplicación provocó un descenso de 2,3 y 3,3 veces en la intensidad de micorrización ($M\%$) y de arbuscúlos en el sistema radical ($A\%$) respectivamente en la línea mutante, mientras que en los silvestres provocó un aumento de $M\%$ de 2,1 veces y de $A\%$ de 2,4. En la intensidad de arbuscúlos en el sistema radical ($a\%$), la dosis de $0,5\mu\text{M}$ sobre el sustrato provocó un aumento en Moneymarker de 1,2 veces, y en NahG un descenso de 1,7 (Gráficas A, B, C y D, figura IV.40).

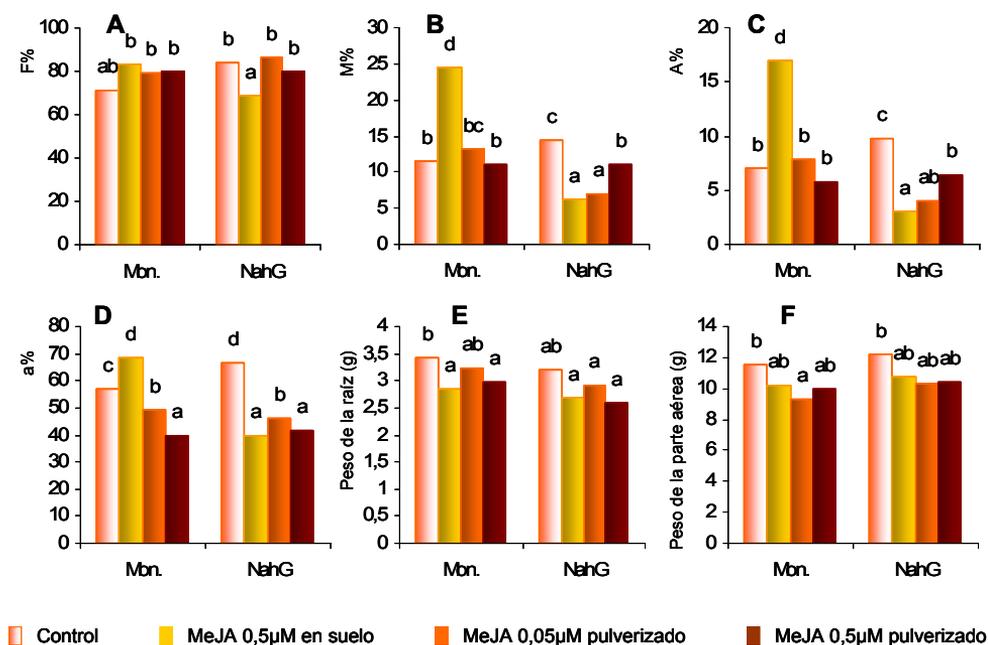


Figura IV.40: Parámetros de micorrización y crecimiento en plantas de tomate de la variedad Moneymarker y transgénicas NahG cosechadas a los 47 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi), y tratadas o no semanalmente con las soluciones $0,5\mu\text{M}$ sobre raíz y parte aérea, y $0,05\mu\text{M}$ sobre la parte aérea. **Gráfica A:** Frecuencia de la micorrización ($F\%$). **Gráfica B:** Intensidad de micorrización ($M\%$). **Gráfica C:** Intensidad de arbuscúlos en el sistema radical ($A\%$). **Gráfica D:** Intensidad de arbuscúlos en la zona colonizada ($a\%$). **Gráfica E:** Peso fresco de la raíz. **Gráfica F:** Peso fresco de la parte aérea. Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p\leq 0,05$).

En el caso de las soluciones de MeJA aplicadas sobre la parte aérea de las plantas, no se observó cambio en la línea silvestre Moneymarker de los parámetros de micorrización, exceptuando el valor de a%, donde se observó un descenso de 1,1 y 1,4 con las dosis 0,05 μ M y 0,5 μ M respectivamente. En el caso de plantas NahG, hubo descensos en las plantas tratadas de 1,4 y 1,6 veces con 0,05 μ M y 0,5 μ M respectivamente en el valor de a%, de 2,1 y 1,3 veces en el valor de M%, y de 2,2 y 1,5 veces respectivamente en el valor de A% (Gráficas B, C, y D, figura IV.40).

5.1.3. Análisis del contenido de SA en raíces de plantas micorrizadas y alteradas o no en la síntesis de ABA

En el caso de interacciones entre plantas y hongos fitopatógenos, se ha demostrado que en algunos casos el ABA parece estar relacionado con la inhibición de la respuesta de defensa mediada por SA (Mohr y Cahill, 2007). En el caso de la micorrización, y según los resultados obtenidos en el apartado IV.1.1 el SA causa un retraso en esta, mientras que ABA tiene un efecto positivo (apartado IV.3.1). Con estos indicios parece lógico investigar si la menor micorrización de los mutantes *Sitiens*, por su reducida síntesis de ABA, está relacionada o no con una alteración en la señalización mediada por SA.

En este sentido se comprobaron los niveles de producción del SA total (el SA libre más el β -glucosido) en plantas *Sitiens* y plantas silvestres Rheinlands Ruhm durante la micorrización. El ensayo se realizó en dos cosechas consecutivas durante la micorrización, a 29 y 41 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi). Igual que en el resto de los ensayos, el porcentaje de raíz micorrizada en los mutantes *Sitiens* fue marcadamente inferior al de los tomates silvestres, y su crecimiento estuvo reducido (Gráficas A, B y C, figura IV. 41). Sin embargo no se encontraron diferencias en los niveles de SA libre o SA total en raíces micorrizadas de mutantes *Sitiens* o de la línea silvestre (Gráficas D y E, figura IV. 41).

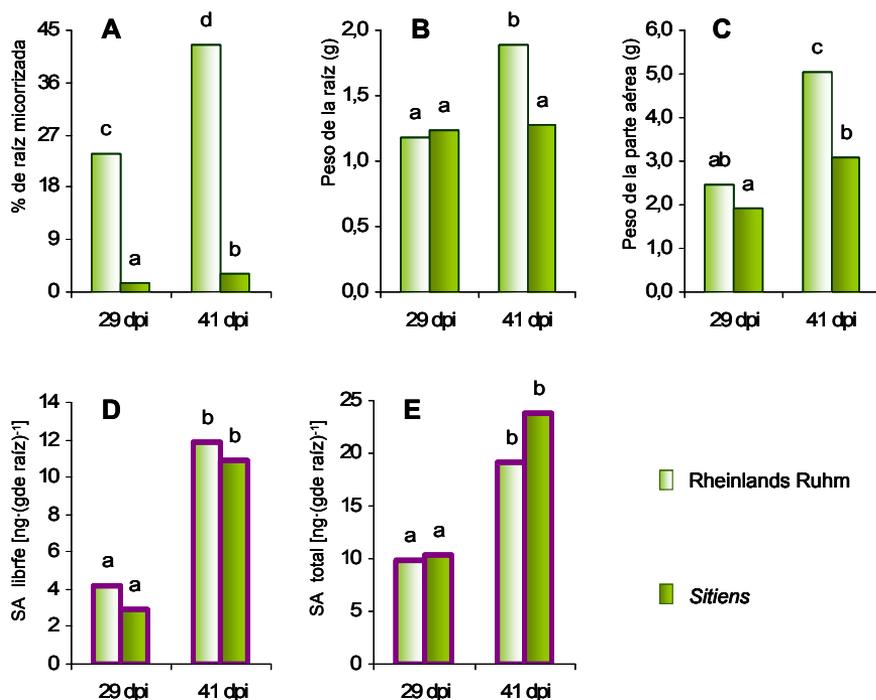


Figura IV.41: Parámetros de micorrización y crecimiento en los tomates Rheinlands Ruhm y Sitiens a los 29 y 42 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi). **Gráfica A:** Porcentaje de raíz micorrizada. **Gráfica B:** Peso fresco de la raíz. **Gráfica C:** Peso fresco de la parte aérea. **Gráfica D:** Niveles de SA libre en raíces. **Gráfica E:** Niveles de SA total en raíces. Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

5.2. Interacción entre el etileno y otras fitohormonas.

5.2.1. Interacción entre el etileno y el JA en el proceso de regulación de la micorrización

La interacción entre el JA y el etileno en la activación de la respuesta de defensa es un hecho demostrado en interacciones patogénicas, e incluso comparten componentes de la cadena de señalización. Ambas hormonas, por ejemplo, participan en la activación de la respuesta sistémica inducida por rizobacterias. Dada la estrecha y sinérgica relación entre el JA y el etileno en procesos de respuesta de la planta, y dado que las dos provocan retrasos similares en el desarrollo de la micorrización (apartados IV.2.1 y IV.4.1), se planteó la cuestión sobre su posible dependencia en la regulación de la micorrización. Con el fin de responder a esta pregunta, se realizaron experimentos de medida de producción de etileno en plantas de tomate alteradas en

la respuesta al JA (mutantes *jai1*), así como en plantas micorrizadas sometidas a la adición exógena de MeJA (inductor de la respuesta a JA). Además, se estudió el efecto que tiene sobre la micorrización de mutantes *jai1*, la aplicación de bajas dosis de etileno.

5.2.1.1. Síntesis de etileno en plantas tratadas con MeJA

El metiljasmonato (MeJA) se utilizó como inductor tanto de la síntesis del JA, como de la activación de la cadena de señalización mediada por JA. En el apartado IV.3.1.1, se muestran resultados de las consecuencias sobre la micorrización de su aplicación sobre la parte aérea de plantas de tomate de la variedad silvestre Moneymarker. De este modo, el MeJA aplicado en solución de 5 μ M, 50 μ M y 500 μ M, provocó un descenso en el porcentaje de raíz micorrizada a los 71 días después de la inoculación con *G. intraradices* (dpi) (Figura IV.24). En este experimento, se tomaron medidas de la producción de etileno de las raíces, no encontrándose diferencias significativas en su producción debidas a la aplicación de MeJA en la parte aérea de la planta (Figura IV.42), excepto en el caso de la dosis 500 μ M, que afectó drásticamente a la micorrización y al crecimiento de la planta (Gráficas B y C, figura IV.24). Estas medidas de la producción de etileno en las raíces micorrizadas se realizaron en el momento de la cosecha de las raíces, a los dos días de la última aplicación de MeJA.

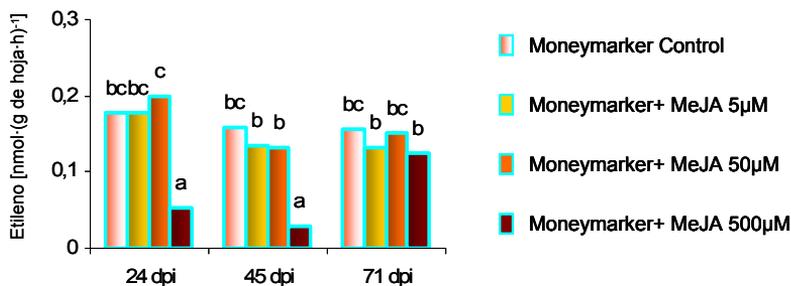


Figura IV.42: Producción de etileno en raíces micorrizadas de tomate variedad Moneymarker, controles no tratadas y tratadas con MeJA pulverizado sobre las hojas a las concentraciones de 5 μ M, 50 μ M y 500 μ M. Las medidas se tomaron a los 24, 45 y 71 días tras la inoculación con el hongo *G.intraradices* (dpi).

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Como se detectó un efecto diferencial del MeJA añadido en función de la dosis y del lugar de aplicación (Figura IV.28), se decidió hacer un seguimiento de la producción de etileno en estas plantas, aplicando las soluciones de MeJA sobre la

parte aérea y sobre la raíz. Se utilizaron las concentraciones 0,5 μ M en suelo, y 0,5 μ M y 5 μ M en la parte aérea, y se realizó una única cosecha a los 47 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi), cosecha que se realizó dos horas después de la última aplicación de MeJA. En este experimento las medidas de etileno no se realizaron en el momento de la cosecha, sino siguiendo el siguiente patrón: en hojas antes de la aplicación de MeJA, y a las cuatro horas de la aplicación; y en raíces a las tres horas de la aplicación del MeJA (Gráficas E y F, figura IV.43).

Tal y como se describió en la figura IV.28, la aplicaciones de MeJA a las concentraciones 0,5 μ M y 5 μ M sobre la parte aérea provocaron un descenso en la intensidad de arbusculos en el sistema (A%) y en la zona colonizada (a%), y la aplicación en suelo de la dosis de 0,5 μ M resulto en un incremento de los parámetros de micorrización (Figura IV.28). Las medidas de producción de etileno reflejaron que la aplicación de MeJA en hojas, a concentración de 0,5 μ M, provocó un pequeño incremento de la producción de etileno en hojas y no tuvo efecto en la producción de etileno en raíz, medido a las 4h de la aplicación (Figura IV.43). La concentración 5 μ M de MeJA aplicada en la parte aérea si aumentó considerablemente la producción de etileno, tanto en hojas como en raíz (Figura IV.43). Sin embargo, el MeJA en concentración 0,5 μ M aplicado sobre el sustrato de las plantas provocó un descenso en la producción de etileno en raíces del 24%, y en la parte aérea del 42% (Barras amarillas de la figura IV.43), acompañada de un incremento en la intensidad de la raíz micorrizada (M%) de 2,1 veces, así como en A% y a% de 2,4 y 1,2 veces respectivamente (Figura IV. 28).

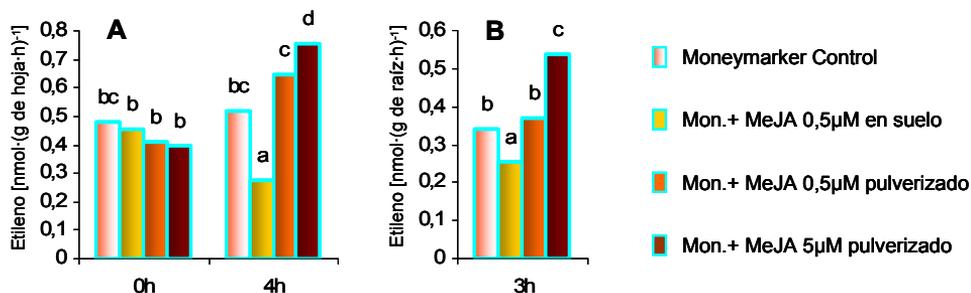


Figura IV.43: Producción de etileno en plantas de tomate de la variedad Moneymarker a los 47 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi), controles no tratadas y tratadas con las soluciones de MeJA de 0,5 μ M sobre raíz y pulverizado sobre la parte aérea, y 0,05 μ M pulverizado sobre la parte aérea. **Gráfica A:** Producción de etileno en hojas, antes (0h) y a las 4h de la aplicación de MeJA. **Gráfica B:** Producción de etileno en raíces a las 3h de la aplicación de MeJA.

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

5.2.1.2. Síntesis de etileno en plantas mutantes insensibles al JA

Se analizó la síntesis de etileno en la raíz de plantas micorrizadas de tomate con fenotipo normal, así como en mutantes con fenotipo de insensibilidad al JA y al MeJA, denominados *jai1*. Como se ha visto en el apartado IV.3.2, las plantas *jai1* insensibles al JA presentaron niveles superiores de micorrización, y un crecimiento similar al de las plantas con fenotipo normal (Figura IV.29). Respecto a la producción de etileno, no se encontraron diferencias en la producción de etileno entre raíces de plantas micorrizadas con fenotipo normal y *jai1* (Figura IV.44).

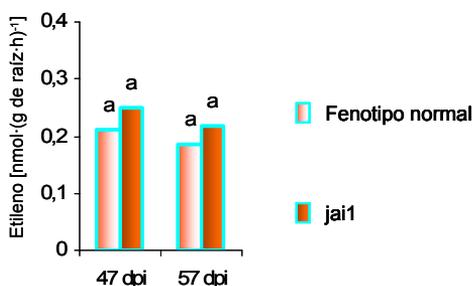


Figura IV.44: Producción de etileno en raíces de tomate con fenotipo normal e insensibles al JA (*jai1*), a los 47 y 57 días tras la inoculación con el hongo *G.intraradices* (dpi).

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

5.2.1.3. Efectos de la aplicación exógena del etileno sobre plantas mutantes de tomate alteradas en la sensibilidad al JA

Con el fin de comprobar si la alteración en la sensibilidad de JA, presente en plantas mutantes homocigotas *jai1*, también afecta a la sensibilidad al etileno en estas plantas, y si estos cambios están relacionados con la micorrización, se analizaron diversos parámetros de micorrización en plantas con fenotipo normal y en *jai1*, tras la aplicación de etileno. Para la aplicación de etileno se utilizó el compuesto ethephon (ácido 2-cloroetilfosfónico) en concentración $30\mu\text{M}$ y pH 7. El análisis de los parámetros de micorrización y crecimiento se hizo a los 57 días tras la inoculación con *Glomus intraradices* (dpi), y se comprobó que la aplicación de esta solución no afectó al crecimiento de las plantas (Gráficas G y H, figura IV.45).

A los 57dpi, los valores de la frecuencia e micorrización ($F\%$) alcanzaron el máximo en ambos fenotipos (normales e insensible a JA) y tratamientos (control y con ethephon) (Gráfica A, figura IV.45). La intensidad de micorrización ($M\%$) y la intensidad de arbusculos ($A\%$) en el sistema radical fueron inferiores tras la aplicación de ethephon en los dos fenotipos, aunque el descenso fue más acusado en plantas mutantes *jai1*. Así, la aplicación de ethephon provocó un descenso de 1,8 y 2 veces en $M\%$ y $A\%$ respectivamente en *jai1*, mientras que en plantas con fenotipo normal el

descenso fue de 1,1 veces en ambos parámetros (Gráficas B y C, figura IV.45). En el caso de la actividad fosfata alcalina fúngica, la frecuencia de la actividad (F-AP%) alcanzó valores máximos en ambos fenotipos y tratamientos a los 57dpi, no mostrando diferencias entre ellos (Gráfica E, figura IV.45). La aplicación de ethephon supuso una inhibición en la intensidad de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%) en las plantas insensibles *jai1*, inhibición que no se percibió en las plantas de fenotipo normal (Gráfica F, figura IV.45).

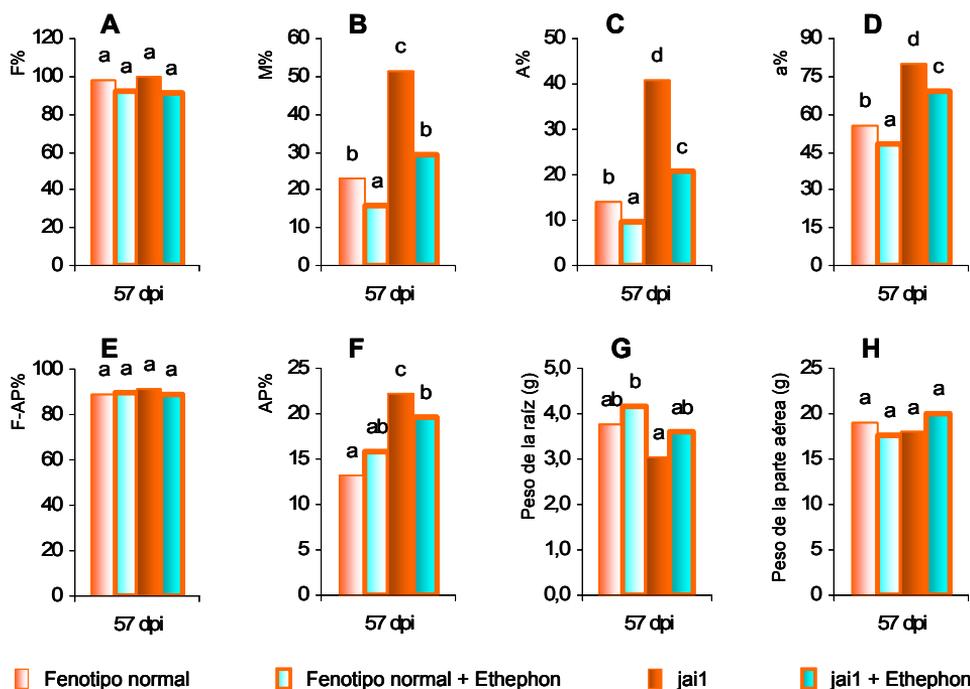


Figura IV.45: Parámetros de micorrización y crecimiento en plantas de tomate con fenotipo normal e insensible al JA (*jai1*) a los 57 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi), controles no tratadas y tratadas con ethephon 30 μ M. **Gráfica A:** Frecuencia de la micorrización (F%). **Gráfica B:** Intensidad de micorrización (M%). **Gráfica C:** Intensidad de arbusculos en el sistema radical (A%). **Gráfica D:** Intensidad de arbusculos en la zona colonizada (a%). **Gráfica E:** Frecuencia de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (F-AP%). **Gráfica F:** Intensidad de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%). **Gráfica G:** Peso fresco de la raíz. **Gráfica H:** Peso fresco de la parte aérea.

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

5.2.2. Interacción entre el etileno y el ABA en el proceso de regulación de la micorrización

Igual que existe una interacción entre SA y ABA en la respuesta de la planta a ciertos hongos fitopatógenos (Mohr y Cahill, 2007), el ABA también parece estar

relacionado con la inhibición de la respuesta de defensa mediada por el etileno (Mohr y Cahill, 2007; Adie y col, 2007a). Durante este estudio, se ha observado como el etileno tiene un efecto negativo sobre la micorrización (apartado IV.2.1), mientras que el ABA parece ser un activador (apartado IV.4.2). Con estos indicios se decidió comprobar si la menor micorrización de los mutantes *Sitiens*, con reducida síntesis de ABA, está relacionada con cambios en la síntesis o percepción de etileno. Con esta finalidad se realizaron medidas de la concentración de etileno en los mutantes *Sitiens* (con una reducida capacidad de síntesis de ABA) y los silvestres Rheinlands Ruhm de tomate, y se comprobó el efecto que tiene sobre la micorrización de *Sitiens* la aplicación de inhibidores de la respuesta a etileno.

5.2.2.1. Síntesis de etileno en plantas alteradas en la síntesis de ABA

Se realizaron medidas de la síntesis de etileno en raíces micorrizadas de Rheinlands Ruhm y de los mutantes *Sitiens* durante la micorrización, a los 22, 36 y 44 días tras la inoculación con *G. intraradices* (ver apartado IV. 4.2.1 figura IV.34). Además se determinó si se producían cambios en la síntesis de etileno en dichas plantas debido a la aplicación exógena de ABA en concentración 40 μ M. Los resultados obtenidos mostraron que por un lado, la síntesis de etileno fue significativamente superior en los mutantes *Sitiens*, y por otro, la aplicación de ABA produjo una inhibición de la síntesis de etileno a partir de los 36dpi en ambas líneas (Figura IV.46). Curiosamente la aplicación de ABA provocó que los niveles de síntesis de etileno se mantuviesen constantes a lo largo de todo el ensayo.

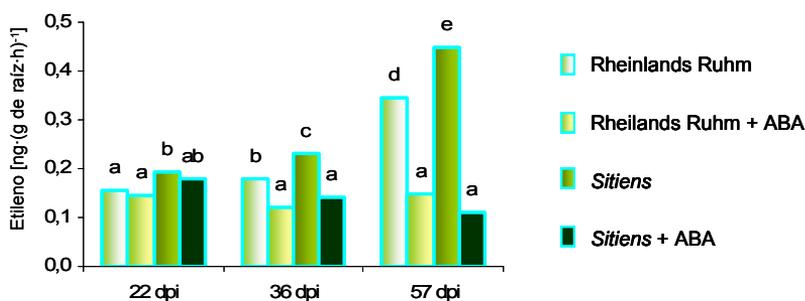


Figura IV.46: Producción de etileno en plantas de tomate Rheinlands Ruhm y *Sitiens* micorrizadas a los 22, 36 y 57 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi), tratadas y sin tratar con una solución 40 μ M de ABA.

Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

5.2.2.2. Efectos sobre la micorrización debidos a la inhibición de la respuesta a etileno en plantas alteradas en la biosíntesis de ABA

Al observar que la reducción de la síntesis de ABA se corresponde en *Sitiens* con un incremento en la producción de etileno, se comprobó si la inhibición de la micorrización en *Sitiens* estaba relacionada con este incremento en la síntesis de etileno. Con este fin, se bloqueó la percepción de etileno en los mutantes *Sitiens* y en la línea silvestre Rheinlands Ruhm, mediante la aplicación de una solución 30 μ M de tiosulfato de plata (STS), compuesto que bloquea los receptores de etileno. El STS se añadió en las mismas condiciones en las que se empleó en los ensayos anteriores (apartado IV.2.2.1), y no provocó cambios en el crecimiento de las plantas (Gráficas G y H de la figura IV.47).

La aplicación de STS en la línea silvestre de la variedad Rheinlands Ruhm, supuso un incremento del doble en la intensidad de micorrización (M%) respecto al tratamiento control, y de 1,4 veces en la intensidad de arbusculos en el sistema radical (A%), así como de 2,6 veces en la intensidad de arbusculos en la zona colonizada (a%), pero no afectó a la frecuencia de micorrización (F%) (Figura IV.47). De forma parecida, las plantas *Sitiens* tratadas con STS doblaron sus niveles de M% respecto a las plantas *Sitiens* sin tratar, aunque no presentaron incrementos significativos en A%, ni en a%. Sin embargo, sí que provocó un incremento de 1,6 veces en F% (Figura IV.47). Por otro lado, mientras que la aplicación de STS incrementó la frecuencia (F-AP%) y la intensidad (AP%) de la actividad fosfatasa alcalina fúngica en 1,7 y 2 veces respectivamente en plantas Rheinlands Ruhm, en los mutantes *Sitiens* supuso un incremento de 3 y 8,4 veces respectivamente (Gráficas E, F, Figura IV.47). A pesar de todo, en los mutantes *Sitiens* tratados con STS no se recuperó el nivel de las plantas silvestres para ninguno de los parámetros de micorrización estudiados.

Finalmente, con la aplicación de STS se recuperó la intensidad de la tinción de estructuras fúngicas en *Sitiens*, de forma similar a como lo hizo con la aplicación de ABA (Figura IV.48).

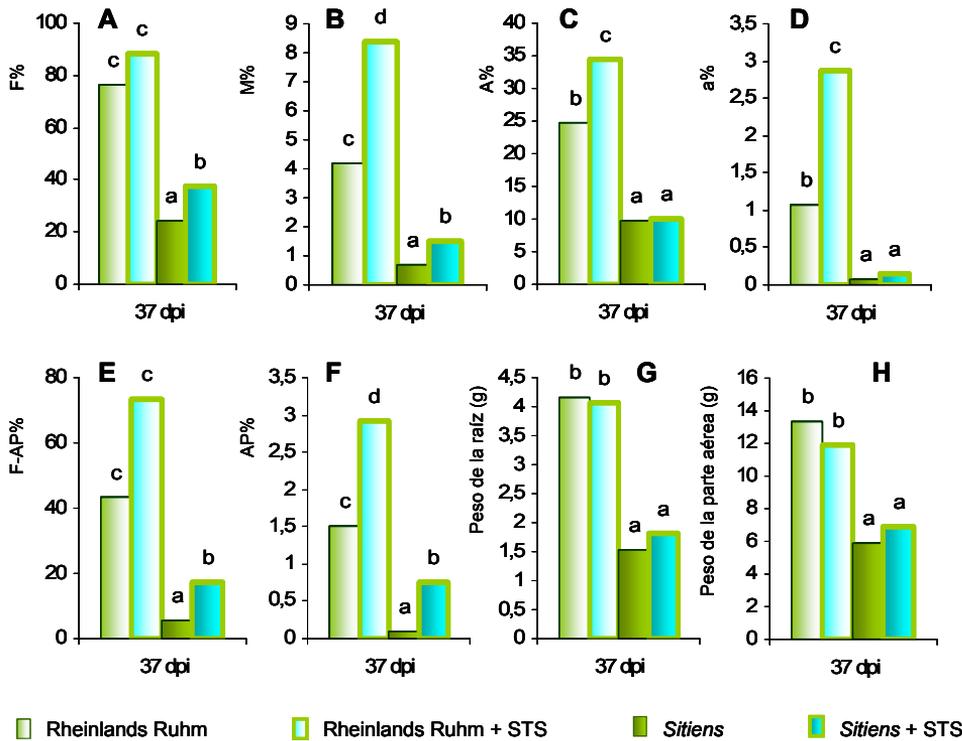


Figura IV.47: Parámetros de micorrización y crecimiento en plantas de tomate Rheinlands Ruhm y mutantes *Sitiens* micorrizadas y cosechadas a los 37 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi), controles no tratadas y tratadas con una solución 30 μ M de STS. **Gráfica A:** Frecuencia de la micorrización (F%). **Gráfica B:** Intensidad de micorrización (M%). **Gráfica C:** Intensidad de arbusculos en el sistema radical (A%). **Gráfica D:** Intensidad de arbusculos en la zona colonizada (a%). **Gráfica E:** Frecuencia de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (F-AP%). **Gráfica F:** Intensidad de la actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%). **Gráfica G:** Peso fresco de la raíz. **Gráfica H:** Peso fresco de la parte aérea. Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

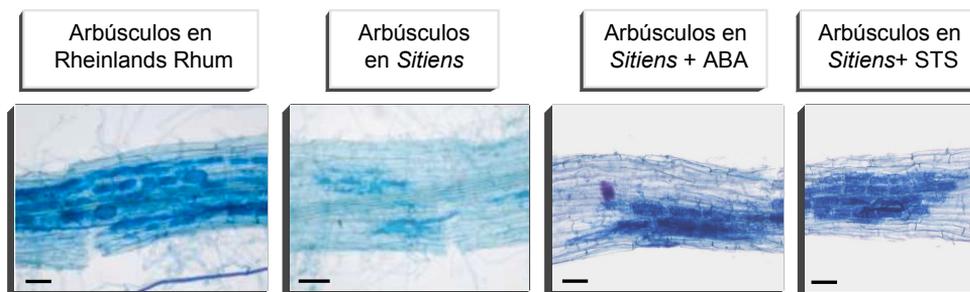


Figura IV.48: Fotografías con microscopio óptico de la tinción con azul-tripán de estructuras fúngicas, en raíces de tomate de la variedad silvestre Rheinlands Rhum y en mutantes *Sitiens*, controles y tratados con ABA 50 μ M y STS 30 μ M.

6. PARTICIPACIÓN DEL SA Y EL ETILENO EN LA REGULACIÓN DE LA MICORRIZACIÓN MEDIADA POR FOSFORO

Es un hecho demostrado que una mayor disponibilidad de fósforo en el suelo inhibe la formación de las micorrizas arbusculares, aunque se desconocen los mecanismos mediante los cuales las plantas cultivadas en medios con alta disponibilidad de este nutriente inhiben la formación de la micorrización. Puesto que tanto el ácido salicílico como el etileno son capaces de controlar el desarrollo de la micorrización de forma negativa, estas moléculas son unas posibles candidatas para mediar la inhibición por fósforo durante la micorrización.

En este apartado del trabajo de la presente tesis doctoral se describen los experimentos realizados para determinar la posible participación de estos dos compuestos, SA y etileno, en la inhibición de la micorrización medida por altas concentraciones de fosfato disponible y fácilmente asimilable por la raíz. Con este fin, se estudió la evolución de la micorrización en cultivos con plantas transgénicas alteradas en la capacidad de acumulación de SA, o percepción de etileno, y sometidas a distintas concentraciones de fósforo disponible.

6.1. Interacción entre el fósforo (P) y el SA en la regulación de la micorrización

6.1.1. Acción del P en plantas transgénicas con alta producción de SA

Para este estudio se utilizaron plantas de tabaco transgénicas CSA, cuya acumulación de SA es superior a la de las plantas silvestres de la variedad NN Samsun (Verberne y col, 2000). Las plantas silvestres y transgénicas se cultivaron en sustratos a los que no se añadió fósforo (tratamiento control) y en sustratos a los que se aplicaron 300ppm de fósforo en forma de Na_2HPO_4 , incrementando así la disponibilidad de fósforo. Mediante el análisis del porcentaje de raíz micorrizada por *G. intraradices* se estudió la evolución de la micorrización en ambas líneas, y bajo los diferentes tratamientos de fósforo añadido (Figura IV.49). Como ya se había comprobado en experimentos anteriores (apartado IV.1.1.1), la micorrización en la línea CSA fue inferior a la de la línea silvestre, debido a la mayor acumulación de SA. El tratamiento con 300ppm de fósforo en ambos tipos de plantas retrasó el inicio de la micorrización, y hasta los 45dpi no se detectaron estructuras fúngicas en las raíces, mientras que en las plantas control se detectaron estas estructuras a los 17dpi. Hasta la última cosecha, a los 56 dpi, no se detectaron diferencias en la micorrización entre

la línea silvestre y CSA en los tratamientos con 300ppm de fósforo en forma de fosfato, y en ambas líneas los niveles de micorrización sufrieron una fuerte reducción como consecuencia de la aplicación de las 300 ppm de fósforo (Figura IV.49).

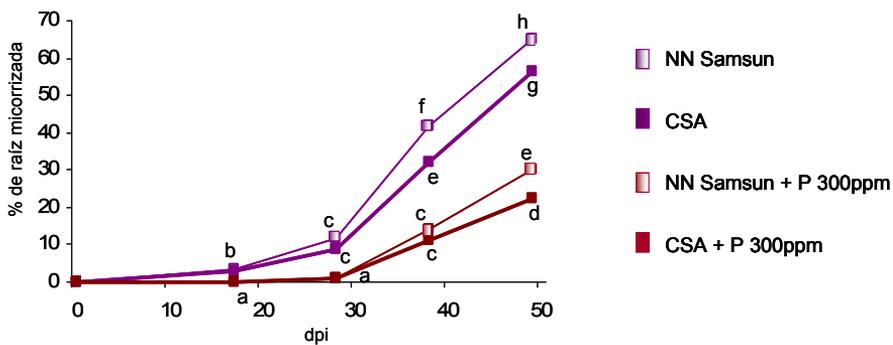


Figura IV.49: Porcentaje de raíz micorrizada en plantas de tabaco variedad NN Samsun y transgénicas CSA cosechadas a los 17, 28, 8 y 49 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi), controles y cultivadas con 300ppm de fósforo en forma de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

El cultivo de estas mismas plantas con cantidades inferiores de fósforo añadido, 150ppm de fósforo en forma de Na_2HPO_4 , mostró resultados similares. Tanto las plantas controles como las tratadas con 150ppm de fósforo mostraron estructuras micorrícicas desde la primera cosecha, 14 dpi, no apreciándose diferencias en la micorrización atribuibles a la presencia del fósforo añadido. El porcentaje de raíz micorrizada a los 27dpi tanto en plantas silvestres como transgénicas descendió como consecuencia de la aplicación de fósforo, siendo el descenso más leve en la línea silvestre. Así las plantas silvestres cultivadas con fósforo 150 ppm presentaron un valor de micorrización de 1,2 veces inferior al de las cultivadas sin fósforo añadido, mientras que el descenso en el porcentaje de micorrización por el cultivo con 150ppm de fósforo en la línea transgénica CSA fue de 1,7 veces (Figura IV.50)

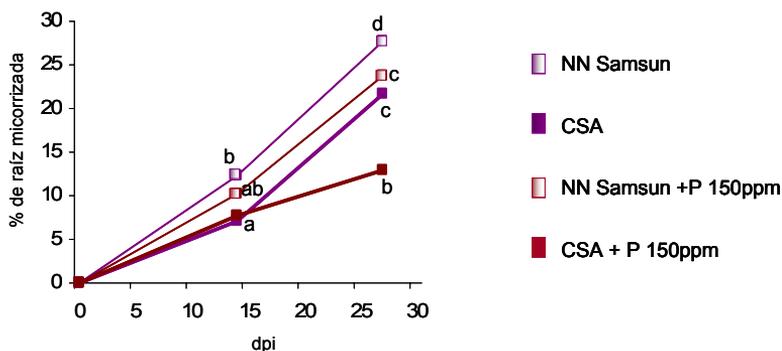


Figura IV.50: Porcentaje de raíz micorrizada en plantas de tabaco variedad NN Samsun y transgénicas CSA cosechadas a los 14 y 27 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi), controles y cultivadas con 150ppm de fósforo en forma de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

6.1.2. Acción del P en plantas transgénicas con deficiencias en la acumulación de SA

Los experimentos descritos en este apartado se realizaron con las plantas transgénicas de tabaco NahG, cuya capacidad de acumulación de SA es menor que las de su línea silvestre Xhanti (Gaffney y col, 1993), y se utilizó la misma metodología de estudio que para plantas CSA (apartado IV.6.1.1). Las plantas silvestres Xhanti y transgénicas NahG se cultivaron en condiciones control (sin aplicación de fósforo) y en sustratos a los que se aplicaron 300ppm de fósforo en forma de Na_2HPO_4 , incrementando así la disponibilidad de fósforo. Las plantas se inocularon con el hongo micorrícico *G. intraradices*, y se realizó un estudio secuencial de la evolución del porcentaje de raíz micorrizada (Figura IV.51). La micorrización en la línea NahG, a partir de los 28 días tras la inoculación (dpi), fue superior a la de la línea silvestre, corroborando resultados anteriormente obtenidos (apartado IV.1.1.2). El tratamiento con 300ppm fue efectivo desde el inicio del experimento, retrasando el inicio de la micorrización en todas las plantas. A los 65 dpi se detectaron claras diferencias en la micorrización tanto en la línea silvestre como NahG debidas a la aplicación de 300ppm de fósforo (Figura IV.51). La reducción en la micorrización debido a la aplicación de P fue similar en plantas silvestres y transgénicas NahG.

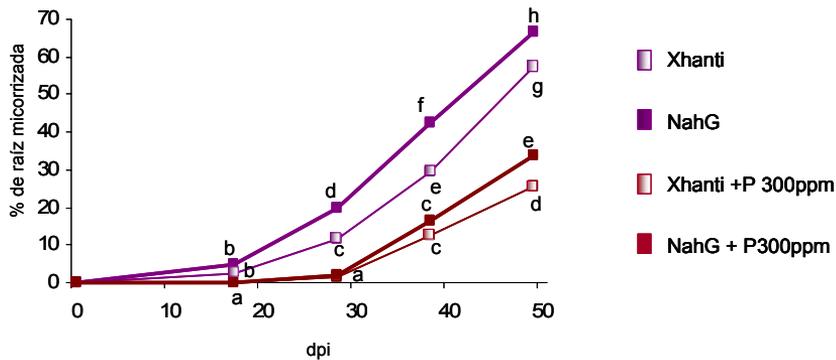


Figura IV.51: Porcentaje de raíz micorrizada en plantas de tabaco variedad Xhanti y transgénicas NahG cosechadas a los 17, 28, 8 y 49 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi), controles y cultivadas con 300ppm de fósforo en forma de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

El cultivo de plantas silvestres Xhanti y transgénicas NahG con 150ppm de fósforo añadido en forma de Na_2HPO_4 , también provocó una inhibición en el porcentaje de raíz micorrizada. En plantas silvestres la reducción fue de 2,9 y 1,4 veces respectivamente a los 14 y 27dpi tras la inoculación con *G. intraradices* (Figura IV.52). En cambio, en NahG no se observaron diferencias en el porcentaje de micorrización a los 14dpi debidas a la aplicación de P, aunque a los 27dpi la reducción en la micorrización debido a la aplicación de P fue proporcional (1,4 veces menor) a la de las plantas silvestres (Figura IV.52).

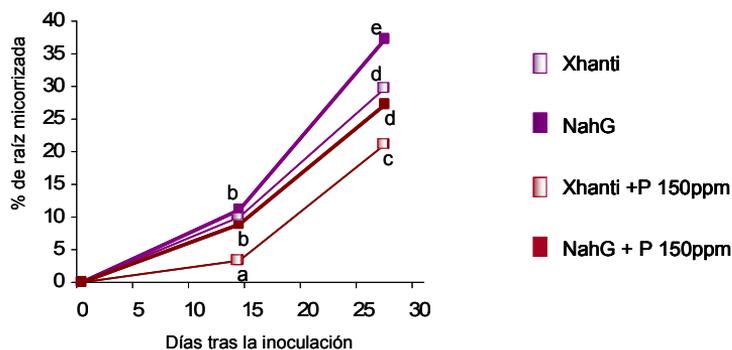


Figura IV.52: Porcentaje de raíz micorrizada en plantas de tabaco variedad silvestre Xhanti y de los transgénicas NahG, cosechadas a los 14 y 27 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi), controles y cultivadas con 150ppm de fósforo en forma de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Finalmente se comprobó el efecto sobre la micorrización de los mutantes NahG de tomate, y debidos a la aplicación de una dosis de 150ppm en suelo. A los 22 dpi, la aplicación de fósforo 150 ppm no afectó al porcentaje de micorrización de ninguna de las líneas, silvestre o transgénicas NahG (Figura IV.53). La inhibición de la micorrización como consecuencia de la aplicación de fósforo fue efectiva a partir de los 36 dpi en plantas NahG, provocando un leve descenso en la micorrización (Figura IV. 53). En cambio, a los 55 dpi, tanto las plantas NahG como las silvestres Moneymarker cultivadas con 150ppm de fosfato, presentaron una reducción de 4 y 6 veces respectivamente del porcentaje de raíz micorrizada respecto a sus controles no tratados (Figura IV. 53).

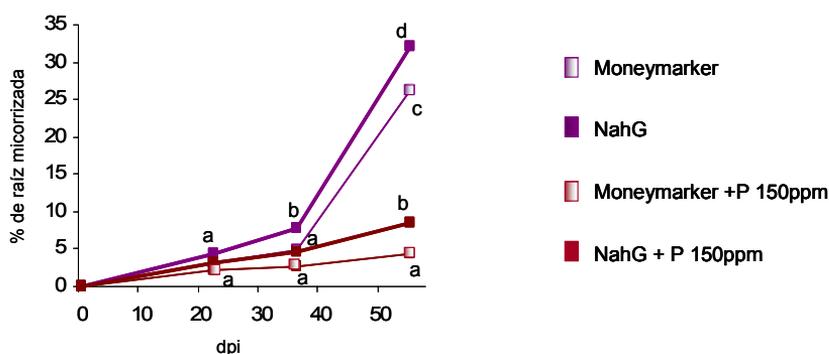


Figura IV.53: Porcentaje de raíz micorrizada en plantas de tomate variedad Moneymarker y transgénicas NahG, cosechadas a los 22, 36 y 55 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi), controles y cultivadas con 150ppm de fósforo añadido en forma de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

6.2. Interacción entre el fósforo (P) y el etileno en la regulación de la micorrización

En este estudio se utilizaron plantas mutantes de tomate afectados en su capacidad de percepción de etileno, las cuales se inocularon con el hongo arbuscular *G. intraradices*, y se trataron con una dosis de 150ppm de fósforo añadido como Na_2HPO_4 en suelo. Los mutantes utilizados fueron Never Ripe (NR), de la variedad de tomate Pearson, cuya mutación provoca la inhabilitación del receptor de etileno LeETR3 para unirse a la hormona, lo que hace a los mutantes mas insensibles al etileno (Klee, 2002).

Se realizó un análisis secuencial del porcentaje de raíz micorrizada en NR y en las plantas silvestres Pearson, realizando cuatro cosechas consecutivas durante el desarrollo de la simbiosis, tanto en cultivos con condiciones normales como en cultivos con 150ppm de fósforo añadido al suelo. La evolución de la micorrización siguió un patrón paralelo en ambas líneas cultivadas en condiciones control (ausencia de P añadido de manera exógena), si bien la micorrización de los mutantes NR fue mayor en las tres primeras cosechas (Figura IV.54). En las plantas silvestres Pearson y NR cultivadas con 150ppm de fósforo, la micorrización fue similar y significativamente menor a la observada en sus respectivos controles no tratados con fósforo, apreciándose un efecto inhibitor del P independiente de la sensibilidad al etileno en las plantas. Durante todo el ensayo, los valores de micorrización en las plantas cultivadas con fosfato añadido fueron siempre inferiores a los de las plantas cultivadas en condiciones normales (Figura IV.54).

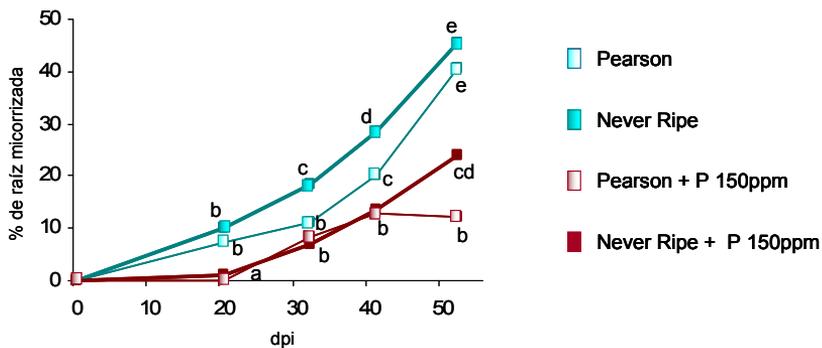
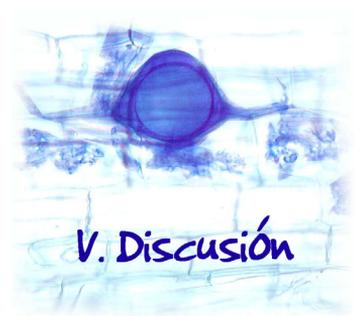


Figura IV.54: Porcentaje de raíz micorrizada en plantas de tomate variedad Pearson y de los mutantes Never Ripe a los 20, 32, 41 y 52 días tras la inoculación con *G. intraradices* (dpi), controles y cultivadas con 150ppm de fósforo añadido en forma de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Los valores representan las medias de los datos, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).



V. Discusión

V. DISCUSIÓN

En su ambiente natural, las plantas están en continuo contacto tanto con el medio físico que las rodea, como con otros organismos con los que convive, y como resultado de estas interacciones pueden generarse situaciones negativas de estrés abiótico o biótico para la planta, así como situaciones positivas de mejora de su desarrollo, tal y como ocurre en el caso de las interacciones con organismos mutualistas. La adaptación de la planta a su entorno físico y biológico dependerá en gran medida de su habilidad para percibir y reconocer a los distintos agentes que la afecten, y de la habilidad para responder a tiempo y de una forma eficiente ante cada situación. Actualmente, los conocimientos que se tienen respecto a la percepción por parte de las plantas de las señales que indican cambios en el medio, o la presencia de otros organismos, son escasos, pero aún son más precarios los conocimientos sobre la señalización interna en la planta que coordina y desencadena la respuesta a estos cambios. A pesar de las dificultades y los escasos conocimientos existentes, poco a poco se van obteniendo datos que dejan entrever que las distintas rutas de señalización, más que lineales, forman una intrincada red con frecuentes puntos de encuentro. De esta forma se abre un amplio abanico de posibilidades, y con la activación de unas y otras rutas el tipo de respuesta puede ser muy variada dependiendo del tipo de estímulo. Finalmente, la coordinación correcta de las rutas dará lugar a la producción de sustancias que aliviarán los daños producidos por la situación de estrés, o aprovecharán los beneficios de una situación beneficiosa.

Existen ciertas moléculas que, entre otras funciones, parecen actuar en la señalización de la planta durante su interacción con los distintos microorganismos, y frente a situaciones de estrés, entre ellas se encuentran el ácido salicílico (SA) y las fitohormonas ácido jasmónico (JA) y etileno. Hasta ahora, de entre todas las interacciones planta-microorganismo, las más estudiadas han sido las interacciones con microorganismos patógenos, por lo que es en estos casos donde se ha demostrado en mayor grado la importancia del SA, JA y etileno en los procesos de señalización y respuesta de plantas, y en este tipo de interacciones las tres moléculas están estrechamente relacionadas con la inducción de la respuesta de defensa (Metraux y col, 2002; Pozo y col, 2004; Okubara y Paulitz, 2005). Generalmente se admite, aunque es una consideración simplista, que el SA participa en mayor grado en la respuesta de la planta a la acción de microorganismos biotrofos, mientras que el etileno y JA están más asociados a respuestas de defensa frente a microorganismos necrotróficos. No obstante, existen muchas evidencias de interrelación y efectos sinérgicos y antagónicos entre estas señales moleculares en procesos de resistencia y defensa.

Estas mismas moléculas también forman parte de la activación de diversas rutas que se produce tras la interacción de la planta con algunos microorganismos simbióticos mutualistas, como las rizobacterias, donde el etileno y el JA se han relacionado con la inducción de la respuesta sistémica adquirida (ISR), encargados de la resistencia de la planta frente a otros microorganismos patógenos (Thomma y col, 2000). Por otro lado, tanto el SA como el etileno forman parte de la señalización durante la regulación de la nodulación, y del control del crecimiento de los nódulos de *Rhizobium* en leguminosas (Martínez-Abarca y col, 1998; Guinel y Geil, 2002; Van Spronsen y col, 2003).

Otra hormona que parece tener una función importante durante la respuesta de defensa de las plantas a estreses bióticos es el ABA, y su papel en estos procesos, principalmente en el ataque de patógenos, está tomado relevancia, aunque su función en este sentido es aún bastante desconocida y controvertida (Mauch-Mani y Mauch, 2005). Así, los niveles de ABA en la planta parecen ser determinantes de la susceptibilidad de la misma ante el ataque de microorganismos patógenos (Kettner y Dörffling, 1995; McDonald y Cahill, 1999; Henfling, 1980; Ward y col, 1989; Audenaert y col, 2002). Se ha sugerido que los niveles de ABA pueden ser claves en la regulación y función que esta hormona pueda tener en los diferentes sistemas planta-patógeno estudiados (Adie y col, 2007a), tal y como se ha demostrado en el caso del Etileno (Pierik y col, 2006).

La formación de la micorriza arbuscular (MA) es un proceso complejo que requiere la coordinación de la expresión génica de los dos organismos que participan de la asociación. Recientemente se han obtenido ciertos progresos en el conocimiento de los mecanismos de señalización activados en la planta durante el proceso de micorrización, sobre todo debido a la utilización de plantas mutantes afectadas en distintas etapas de la micorrización (Peterson y Guinel, 2000; Marsh y Schultze, 2001), y al uso de metodologías de DNA-array (Brechenmacher y col, 2004; Güimil y col, 2005; Hohnjec y col, 2005). Sin embargo, a pesar de los progresos realizados en el conocimiento sobre la biología molecular y genética de la asociación MA, aún no se conocen bien los acontecimientos bioquímicos y morfogenéticos mediados por hormonas vegetales durante la formación de MA. La idea de que un equilibrio entre el contenido hormonal y nutricional (respecto a los niveles de C, P y N) de la planta es un factor importante para la regulación de la micorrización, ha sido ampliamente debatida (Beyrle, 1995; Ludwig-Müller, 2000; Hause y col, 2007), e incluso se han apuntado ciertas funciones para fitohormonas en las asociaciones de ectomicorrizas y MA. La mayor parte de estas supuestas funciones son conjeturas basadas en pocos

datos, obtenidos principalmente en experimentos que implican la aplicación hormonal exógena o las medidas del contenido hormonal en plantas micorrizadas.

Ya que las fitohormonas etileno, JA y ABA, así como el SA, son compartidas en tan diversas interacciones entre planta y microorganismos, es lógico pensar que también participen durante la señalización de la simbiosis MA. Esta participación ya se ha sugerido anteriormente al desarrollo de esta tesis para el caso de etileno, SA y JA (Vierheilig y col, 1994; Blilou y col, 2000b; Hause y col, 2002; Vierheilig y Piche, 2002), aunque los datos disponibles se basan en experimentos de medida del contenido en raíz y del efecto ocasionado por su uso exógeno. En el caso del ABA, solo existían unos pocos indicios sobre su participación por ciertas evidencias indirectas surgidas de la determinación de variaciones en su contenido en raíz durante la micorrización (Danneberg y col, 1992; Meixner y col, 2005).

Por su parte, se ha demostrado la activación de numerosos mecanismos de defensa durante la micorrización (García-Garrido y Ocampo, 2002; García-Garrido y Vierheilig, 2007), los cuales se han relacionado con la compatibilidad entre los dos organismos que forman la simbiosis. En este sentido, la coordinación en la señalización de múltiples fitohormonas parece ser esencial durante la regulación del establecimiento y funcionalidad de la simbiosis (Beyrle, 1995; Ludwig-Müller, 2000). Sin embargo, apenas se tiene información sobre el modo de acción de estas moléculas señal, y aún menos sobre cual es su función durante la respuesta de la planta en la micorrización. Además, hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no existían datos previos al presente estudio sobre la posible interacción de las rutas donde participan cada una de ellas en el desarrollo de la simbiosis.

La diversidad genética y fenotípica de las distintas especies de plantas da lugar a diferencias en la producción, acumulación y sensibilidad de cada especie a las distintas fitohormonas, con lo cual, la respuesta de distintas especies de planta a la aplicación de cada hormona, así como la respuesta a la micorrización, pueden ser diferentes e incluso pueden presentar resultados opuestos en distintos ensayos (Regvar y col, 1996; Ishii y col, 1996; Ludwig-Müller y col, 2002). La especificidad de la respuesta en cada planta es tal, que incluso se han detectado diferencias en la respuesta genética de una misma planta infectada por distintos hongos micorrícicos (Massoumou y col, 2007). Hasta ahora, los experimentos realizados en otros estudios con unas u otras hormonas, en relación a su participación en la micorrización, se han realizado en diferentes plantas, por lo que a veces no son comparables. Esto ha dado lugar a una falta de conocimientos sobre la participación y la coordinación en la señalización de las distintas moléculas señal durante la micorrización. Con todo ello, se hace necesario el estudio de cada una de las rutas de señalización, así como su interacción,

utilizando una misma especie de planta y de hongo micorrízico. Una vez comprendido este proceso en determinadas especies modelo, la comprensión del mismo será más sencilla en el resto.

En el presente estudio se eligió como sistema modelo, la simbiosis micorrízica entre plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L) y el hongo *Glomus intraradices*. Se seleccionaron las plantas de tomate como modelo entre las solanáceas, grupo con una gran influencia agroeconómica, ya que se conocen numerosos mutantes insensibles o afectados en la señalización de las moléculas señal estudiadas en esta tesis. Por otro lado las plantas de tomate ofrecen la ventaja de que muestran un gran parecido en la expresión génica durante la maduración del fruto y el desarrollo con otras solanáceas como el pimiento y las berenjenas (Moore y col, 2005), además están muy cerca filogenéticamente de las plantas de patata (Martins y Barkman, 2005), por lo que posiblemente la regulación de la micorrización en el tomate sea bastante parecida a la del pimiento, berenjenas y patatas.

Por su parte, el género *Glomus* ha sido uno de los más utilizados en el estudio de la micorrización, y dentro de este género, se ha comprobado que el tamaño del genoma de *G. intraradices* es de los más pequeños (Hijri y Sanders, 2004), por lo que ha sido seleccionado como hongo modelo para la secuenciación de su ADN (<http://darwin.nmsu.edu/~fungi/>). Además, *G. intraradices* es uno de los pocos hongos arbusculares que se pueden cultivar en un sistema monoxénico libre de microorganismos contaminantes. Por todo ello, *G. intraradices* se seleccionó como hongo modelo en el presente estudio.

1. PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO SALICÍLICO (SA) EN EL PROCESO DE MICORRIZACIÓN, E IMPLICACIÓN EN LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA DE DEFENSA DE LA PLANTA DURANTE LA MISMA

Blilou y col. estudiaron los cambios en la producción de SA en raíces durante la simbiosis micorriza arbuscular (MA), y detectaron incrementos de los niveles de SA en raíces de guisante, tabaco y arroz. En todos sus ensayos, la mayor diferencia en la producción de SA se produjo durante la etapa inicial de la micorrización (Formación de los apresorios y penetración de las células epidérmicas por las hifas del hongo) (Blilou y col, 1999; Blilou y col, 2000a; Blilou y col, 2000b). En los estudios con plantas de arroz, el máximo en la producción de SA se relacionó con incrementos en la expresión de genes implicados con la defensa, tales como *Ltp b1* (Proteína transportadora de lípidos) y *Pal* (Fenil alanina amonio liasa) (Blilou y col, 2000b); mientras que en los estudios realizados con tabaco, el incremento máximo en SA

coincidió con la mayor actividad de las enzimas implicadas en reacciones de defensa catalasa y ascorbato peroxidasa (Blilou y col, 2000a). Con estos resultados, y en analogía a la función tradicional del SA como molécula señal en las reacciones de defensa contra patógenos, se le ha atribuido al SA una función en la inducción de una respuesta de defensa durante la micorrización (García-Garrido y Ocampo, 2002).

Al igual que ocurre durante la SAR (Resistencia sistémica adquirida), respecto a la cual existen estudios que indican que el efecto sistémico de SAR no se debe al transporte del SA sino a otra molécula señal (Vernooij y col, 1994; Meuwly y col, 1995), en la respuesta defensiva ante la micorrización el SA parece tener una acción local, y no sistémica. Prueba de ello es que la aplicación de SA sobre las hojas de plantas de papaya, capuchina y pepino no tiene ningún efecto sobre la micorrización (Ludwig-Müller y col, 2002), mientras que si lo tiene su aplicación sobre la raíz en plantas de arroz (Blilou y col, 2000b).

A diferencia de la respuesta de defensa a patógenos, la respuesta de defensa generada durante la micorrización parece ser transitoria y menos intensa (García-Garrido y Ocampo, 2002). Incluso, en los ensayos realizados durante la presente tesis con plantas de tabaco transgénicas PRms, se ha demostrado que la respuesta de defensa constitutiva activada en estas plantas no afecta a la micorrización del mismo modo que al desarrollo de otros hongos fitopatógenos. El gen *PRms*, codificante de una proteína relacionada con la defensa de plantas de maíz, tiene una alta homología con el grupo de proteínas PR-1 de tabaco (Casacuberta y col, 1991; Casacuberta y col, 1992), y su sobre-expresión en plantas de tabaco transgénicas (plantas PRms) origina la activación constitutiva de la expresión de genes considerados como marcadores de la expresión de la respuesta SAR, ofreciendo una mayor resistencia frente a la infección por los hongos patógenos de tabaco *Fusarium tabacinum*, *Cercospora nicotianae* y *Phytophthora nicotianae* (Murillo y col, 2003). En los ensayos de la presente tesis se ha comprobado como los transgénicos PRms, al contrario de lo que ocurre frente a hongos patógenos, son mas susceptibles que la línea silvestre a la colonización por *G. intraradices*. Murillo y col. demostraron que la proteína PRms se localiza alrededor de los plasmodesmos (Murillo y col, 1997), y proponen a esta proteína como un regulador del transporte a través de los mismos (Vía de transporte simplástico de sacarosa entre células), ya que en las plantas transgénicas PRms el patrón de transporte y acumulación de azúcares es diferente al de los silvestres, produciéndose una redistribución y mayor acumulación de sacarosa en detrimento de almidón, y un contenido muy alto de sacarosa en el floema (Murillo y col, 2003). Además, las plantas transgénicas que expresan constitutivamente el gen *PRms* presentan un crecimiento acelerado y una activación en el proceso de transporte de sacarosa desde

las hojas fotosintéticamente activas hasta las hojas sumidero. Según estos autores tanto el acumulo de sacarosa en el apoplasto, como los cambios de concentración osmótica en estas plantas podrían estimular la respuesta de defensa de las plantas ante microorganismos patógenos (Murillo y col, 2003). En cambio, en el caso de la interacción con hongos micorrícicos, estos cambios en la distribución de azúcares parecen favorecer el desarrollo de la micorrización, posiblemente por el aumento en la disponibilidad de azúcares para el hongo arbuscular, dado que la sacarosa translocada en la interfase simbiótica es hidrolizada a glucosa y fructosa por invertasas asociadas a la pared celular de la planta, y los monosacáridos son posteriormente utilizados por el hongo para su desarrollo (Solaiman y Saito, 1997; Smith y col, 2001).

En el presente estudio también se ha comprobado como en las plantas PRms se genera una ligera reducción en la producción de la hormona etileno, también relacionada con la defensa, y una menor acumulación del SA al final del proceso de la micorrización. Estos resultados demuestran una variación de la respuesta de defensa de los transgénicos PRms, y cabe la posibilidad de que estos cambios en la producción de etileno y SA en PRms sean en parte responsables de la mayor micorrización de estas plantas, tal y como se discutirá más adelante. Sin embargo, los cambios observados en la producción de SA son demasiado tardíos para originar las diferencias observadas en la micorrización.

Apoyando la teoría de la inducción de defensa contra el hongo micorrícico mediada por SA, en los estudios con las plantas transgénicas CSA de tabaco (con una mayor acumulación de SA) y NahG de tabaco, tomate y *Lotus japonicus* (con niveles inferiores de SA) realizados en esta tesis, se comprobó que existe una relación inversa entre la cantidad de SA endógeno en la raíz, y la velocidad de dispersión de la micorrización. Las diferencias en micorrización solo se observaron en las primeras etapas de la simbiosis, es decir, cuando se formaron los primeros apresorios y el hongo empezó a penetrar y expandirse por la raíz, pero no afectó a la capacidad máxima de micorrización de las plantas. Por otro lado, ya se comprobó previamente que la aplicación de SA sobre las raíces de plantas de arroz provoca un retraso en el desarrollo de la micorrización, pero que no afecta ni a la capacidad máxima de micorrización de las plantas, ni a la capacidad infectiva del hongo micorrícico (Blilou y col, 2000b). Curiosamente, en esta tesis se ha comprobado como en plantas de tabaco, a partir de unos niveles de micorrización de aproximadamente el 10%, cuando se han formado los primeros arbusculos y el hongo empieza a dispersarse por la raíz, no se producen cambios en la expresión de numerosos genes relacionados con la defensa, y en su mayoría regulados por el SA (*PAL-18*, *PAL-27*, *PR1b*, *PR1a*, *PR2*,

PR3, *PR5*, *LTP*, *APX* y *CAT*), ni entre las platas micorrizadas y no micorrizadas, ni entre las silvestres y transgénicas con alteraciones en la capacidad de acumulación de SA. En vista de estos resultados se deduce que, muy posiblemente, el SA no participe en el control del desarrollo de la micorrización tras la entrada del hongo dentro de la raíz, y tras la formación de los primeros arbusculos.

En los experimentos de medida del número de unidades de infección en plantas de tabaco de fenotipo silvestre y mutante NahG se comprobó como los mutantes deficientes en SA poseen mayor porcentaje de unidades de infección en la raíz, lo que sugiere una mayor capacidad de penetración del hongo en estas plantas. Teniendo en cuenta que Blilou y col. demostraron que el SA no afecta al desarrollo extraradical de las hifas ni a la posibilidad de formar apresorios, pero sí retrasa el desarrollo de la micorrización (Blilou y col, 2000b), y que los resultados del presente trabajo confirman que el SA participa en la regulación del número de puntos de infección, es posible sugerir que la función del SA está relacionada con la resistencia a la penetración de la planta por el hongo. Por lo tanto, el SA no afectará a la capacidad de adhesión del hongo a la raíz, pero sí a su capacidad de penetración en la raíz. Esta respuesta de defensa se produciría en etapas iniciales de la micorrización, y no en etapas posteriores, por lo que no se ha encontrado inducción en la expresión de genes relacionados con la defensa una vez establecida la micorrización. Con esta hipótesis también se explica el retraso en la micorrización que se produce al inicio de la fase exponencial del desarrollo de la micorrización en las plantas CSA, puesto que teniendo mayores niveles de SA, el número de puntos de infección es menor. Del mismo modo, el mayor número de puntos de infección encontrado en NahG, está relacionado con un desarrollo de la micorrización más rápido.

Tal y como se ha demostrado en una gran variedad de plantas como el tomate (Vierheilig y col, 1994), tabaco (Blilou y col, 2000a) y guisante (Wyss y col, 1991), después de un rápido incremento en el porcentaje de colonización, se produce una estabilización en la curva de micorrización correspondiente a la capacidad máxima de micorrización de cada planta. Este máximo también se ha observado en los ensayos realizados durante esta tesis doctoral con *G. intraradices* y plantas de tabaco CSA y Samsun NN. En ambas líneas la producción de SA aumentó progresivamente en las raíces de tabaco micorrizadas conforme aumentó la edad de las plantas, hecho que también ha sido comprobado en plantas de arroz inoculadas con *G. mosseae* (Blilou y col, 1999). Si bien la tendencia es la misma, los valores de SA en los transgénicos CSA fueron marcadamente superiores a los de las plantas silvestres Samsun NN, acentuándose esta diferencia con la edad. A pesar de ello, en ambas líneas se alcanzó el mismo máximo de micorrización. De aquí se deduce que la producción de SA no

debe afectar ni a la extensión intraradical del hongo, ni a la formación de los arbusculos. Por lo tanto, aunque la micorrización progrese a velocidad superior en Samsun NN por la mayor penetración del hongo en la raíz, en CSA continúa progresando por la extensión de las hifas que ya han entrado en la misma.

Este mismo razonamiento explica que las plantas NahG de *L. japonicus* alcanzasen antes los valores máximos de micorrización que los silvestres, puesto que la menor acumulación de SA favorece la formación de más unidades de infección. Probablemente en los ensayos de tomate y tabaco realizados con *G. intraradices*, los silvestres no alcanzaron los niveles de los mutantes NahG porque el ensayo no duró el tiempo suficiente para que ambas líneas llegasen al máximo, aunque sí que se observó una disminución en la diferencia de micorrización entre ambas líneas en las últimas cosechas. El mismo efecto en el patrón de micorrización observado con *G. intraradices*, se observó en plantas de tabaco CSA y NahG micorrizadas con *G. mosseae*, produciéndose un retraso en la micorrización de CSA respecto a Samsun NN, y un adelanto en la micorrización en NahG respecto a las silvestres Xhanti. También en estos casos los mutantes y transgénicos alcanzaron los mismos valores máximos de micorrización, confirmando que el SA no participa en el proceso de regulación de la micorrización durante el desarrollo intraradical del hongo.

Se ha comprobado que el SA también participa en la regulación de otras interacciones simbióticas con raíces de plantas, como es el caso de la simbiosis entre *Rhizobium* y leguminosas (Martínez-Abarca y col, 1998; Lian y col, 2000; Van Spronsen y col, 2003; Stacey y col, 2006). Recientemente, Stacey y col. se valieron de los transgénicos NahG de *L. japonicus* y *Medicago truncatula* para demostrar que el SA participa en el control del número de puntos de infección de *Rhizobium* en la raíz (Stacey y col, 2006), al igual que ocurre en el caso de la micorrización. Esta coincidencia en el modo de actuar del SA en ambas simbiosis no es la única, ya que ambas simbiosis comparten numerosos pasos en la señalización de la regulación, detectadas gracias a los mutantes Myc-/Nod- de leguminosas, incapaces de micorrizarse o de formar nódulos (Marsh y Schultze, 2001; Guinel y Geil, 2002). Así, Blilou y col. ya habían relacionado la supresión de la micorrización y nodulación en mutantes de guisante afectados en el gen *Sym30*, con un incremento en la acumulación de SA libre. Sin embargo este incremento selectivo en la acumulación de SA no se produjo con la inoculación de la bacteria patógena *Pseudomonas syringae* (Blilou y col, 1999), lo cual indica que la mutación del gen *Sym30* afecta a la regulación de la respuesta de defensa mediada por SA en las relaciones simbióticas, pero no en la relación con patógenos.

Respecto a la función de los genes simbióticos *Sym19* y *Sym30*, durante esta tesis se pudo comprobar como la mutación en dichos genes provoca una acumulación diferencial del gen *PI206* en las plantas de guisante mutantes *Sym19* y *Sym30* inoculadas por *G. intraradices*, siendo su expresión mayor en los mutantes que en el silvestre. Apoyando estos resultados, Ruiz-Lozano y col. encontraron una inducción de *PI206* en guisante tras la inoculación con *G. mosseae*, estando esta inducción relacionada directamente con la formación de apresorios (Ruiz-Lozano y col, 1999). La expresión de *PI206* es inducible por SA en plantas de guisante, y su mayor expresión en los mutantes posiblemente esté mediada por la acumulación de SA en los mutantes como respuesta a la formación de los apresorios (Blilou y col, 1999), y ocasionada a su vez por la desregulación de la respuesta defensiva en los mutantes *Sym19* y *Sym30*. Se puede deducir que el correcto funcionamiento de los genes *Sym30* y *Sym19* modula la respuesta defensiva de la planta frente a hongos arbusculares a través del control de moléculas señal como el SA, permitiendo la colonización y el establecimiento de la simbiosis mutualista. A diferencia de los resultados obtenidos en los ensayos con *PI206*, la expresión del gen de nodulina temprana *ENOD12* tan solo se observó en el fenotipo silvestre inoculado, ya que fue la única línea capaz de micorrizarse.

En resumen, los resultados de los experimentos realizados con plantas transgénicas alteradas en su capacidad de acumulación de SA, junto a los estudios de expresión génica y análisis comparativo de proteínas PR (*PI206* y *PI49*) en ensayos de micorrización en mutantes Myc-/Nod-, demuestran que el SA forma parte de la respuesta de la planta a la micorrización, y que la modulación en los niveles de SA endógeno en raíz repercute en la curva de micorrización, estableciéndose una relación inversa entre contenido en SA de la raíz y capacidad inicial de micorrización. El grado y tipo de afectación de la micorrización debida al SA sugiere que la participación de este compuesto es importante en etapas iniciales de la micorrización, concretamente durante la penetración de las hifas fúngicas en la raíz, confirmando resultados previos del grupo de investigación que determinaron incrementos transitorios de SA en estas etapas iniciales (Blilou y col, 1999). Los resultados del análisis comparativo de la expresión de genes inducibles por SA, tanto en plantas de fenotipo silvestre como mutantes de guisante Nod-/Myc-, sugiere que la alteración en el programa simbiótico de la planta conlleva variaciones en la respuesta de defensa, mediadas por SA y generadas en leguminosas tanto frente a *Rhizobium* como frente a hongos arbusculares.

2. PARTICIPACIÓN DEL ETILENO EN EL PROCESO DE MICORRIZACIÓN

El etileno es una hormona vegetal, que igual que el SA, está muy relacionada con la respuesta de defensa en plantas frente a microorganismos patógenos (Hoffman y col, 1999; Asai y col, 2000; Greenberg y col, 2000; Cristescu y col, 2002), y en el caso de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas, se ha relacionado con la autorregulación de la nodulación (Zaat y col, 1989; Heidstra y col, 1997; Oldroyd y col, 2001; Guinel y Geil, 2002). Sin embargo, la participación del etileno en la regulación de la micorrización aún no está bien determinada, ya que se han observado efectos tanto negativos como positivos de esta fitohormona sobre la micorrización. Así, se observó que el etileno produjo un descenso en la micorrización de *M. truncatula*, naranjo trifoliado, guisante y puerro por los hongos micorrícicos *G. mosseae*, *G. ramisporophora*, y *G. aggregarum* respectivamente (Azcón-Aguilar y col, 1981; Ishii y col, 1996; Geil y col, 2001; Geil y Guinel, 2002). En cambio, Ishii y col demostraron que concentraciones bajas de etileno pueden estimular la germinación de las esporas del hongo micorrícico *G. ramisporophora* (Ishii y col, 1996). Teniendo en cuenta los resultados de estos estudios previos, en la presente tesis doctoral se decidió estudiar el efecto que tiene sobre la micorrización tanto la aplicación de la hormona, como los cambios en su percepción derivados de la aplicación de compuestos químicos, o de mutaciones en la planta. Para ello se utilizó un único modelo biológico de estudio con plantas de tomate (*S. lycopersicum* L.) y el hongo micorrícico *G. intraradices*.

Durante los ensayos realizados en este trabajo se pudo observar como la aplicación de ethephon (compuesto que libera etileno al solubilizarse en el agua) en la rizosfera de plantas de tomate inoculadas con *G. intraradices* afectó negativamente a la micorrización. Entre los parámetros de micorrización estudiados se observó un mayor descenso de la frecuencia de la micorrización (F%), la intensidad de arbusculos (a%) y en consecuencia, la actividad fosfata alcalina del hongo micorrícico (AP%) ya que la actividad AP está estrechamente ligada a los arbusculos (Tisserant y col, 1993). El efecto que tiene el etileno sobre a% y AP% indica que existe una acción directa del etileno sobre la formación y funcionalidad de los mismos. Confirmando estos resultados, la actividad AP% observada en los ensayos de este trabajo también se incrementó en las plantas transgénicas ACD de tomate, cuya síntesis de etileno es menor que en las plantas silvestres (Klee y col, 1991).

En la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas se ha demostrado que el etileno tiene una función reguladora durante la organogénesis de los nódulos (Drennan y Norton, 1972; Lee y LaRue, 1992a; Penmetsa y Cook, 1997; Nukui y col, 2000). Teniendo en cuenta

el alto grado de similitudes encontradas durante la regulación de ambas simbiosis, y los resultados obtenidos en este trabajo, se puede intuir que el etileno participa en la autorregulación de los principales órganos nutricionales y de intercambio en ambas simbiosis, los nódulos y los arbúsculos.

Dado el efecto negativo del ethephon sobre F%, es probable que esta hormona active cierta respuesta a nivel de las células epidérmicas que inhiba la penetración del hongo en la raíz, con lo cual disminuiría el número de puntos de entrada y con ello la extensión de la micorrización. En este último caso, el etileno podría activar dicha respuesta de defensa en las células epidérmicas mediante la modulación de los picos de Ca^{2+} , de forma similar al mecanismo de acción postulado para la simbiosis con *Rhizobium* (Oldroyd y col, 2001; Guinel y Geil, 2002), donde ya se ha demostrado la acción negativa del etileno sobre el número de puntos de infección en diversos ensayos (Guinel y LaRue, 1992; Penmetsa y Cook, 1997; Oldroyd y col, 2001).

Hasta ahora, los resultados obtenidos sobre la aplicación de ethephon a plantas de fenotipo silvestre han demostrado un papel inhibitorio de la micorrización mediado por etileno. Sin embargo, en los experimentos con plantas transgénicas ACD (con baja capacidad de producción de etileno (Klee y col, 1991) se ha podido comprobar que la baja producción de etileno supone una menor micorrización durante las primeras etapas de la formación de la simbiosis, aunque no afecta a la capacidad final de micorrización de la planta. Además, contrariamente a lo que ocurre con la variedad silvestre, la aplicación de ethephon a plantas ACD provocó un aumento de la micorrización en las primeras etapas de la micorrización, y sin embargo la inhibió en etapas posteriores. Es posible que las bajas concentraciones de etileno estimulen la germinación de las esporas del hongo micorrízico como ocurre con *G. ramisporophora* (Ishii y col, 1996), por lo que el etileno liberado por la raíz activaría la germinación de las esporas del hongo, permitiendo así un inicio más rápido de micorrización. En el caso de las raíces de ACD esta estimulación no se debe producir por su baja producción de etileno, y la aplicación de ethephon en la rizosfera de las plantas ACD puede liberar el etileno suficiente para estimular la germinación de las esporas del hongo y con ello el inicio de la micorrización. En etapas posteriores, la aplicación progresiva de ethephon supone un aumento mayor de etileno en la raíz que inhibe la formación de los arbúsculos y el desarrollo del hongo.

Por otro lado, en el presente estudio no se han detectado cambios en la producción de etileno durante la micorrización de plantas de tomate con *G. intraradices*, tal y como se ha descrito con anterioridad en investigaciones realizadas con *G. mosseae* (Alexander y col, 1988; Vierheilig y col, 1994). En otras investigaciones, se ha determinado el efecto que tiene la micorrización sobre la ruta de síntesis del

etileno, mostrando resultados contradictorios: mientras que en plantas de patata y lino se detectó una disminución en la actividad de la enzima ACO, catalizadora del último paso en la síntesis de etileno (Dugassa y col, 1996; McArthur y Knowles, 1992), en papaya se detectaron aumentos en la producción de etileno en cultivos micorrizados bien irrigados y descensos en el contenido de etileno en situaciones de estrés hídrico (Cruz y col, 2000). Posiblemente, estos descensos en la síntesis de etileno, especialmente los producidos bajo estrés hídrico, sean provocados por la propia planta, tras el reconocimiento del hongo micorrízico, para favorecer de este modo la micorrización de la raíz en las condiciones adecuadas.

La ausencia de cambios en la síntesis de etileno en plantas de tomate durante la micorrización da lugar al planteamiento de una nueva cuestión: ¿cómo se modula el control mediado por el etileno en estas plantas si no se producen cambios en su producción? En este sentido, un paso clave en la ruta de acción de cualquier señal es la percepción, y en el caso del etileno parece tener un papel especial debido a su complejidad. En *Arabidopsis thaliana* se han encontrado 5 receptores distintos con un modo de acción similar a los 6 tipos encontrados en plantas de tomate (Klee, 2002; Alonso y Stepanova, 2004). Estos receptores de etileno inhiben por defecto a la cadena de señales que median la acción del etileno, pero en el momento en que los receptores se unen al etileno se produce la inactivación de los mismos, y dejan por tanto de inhibir la ruta de señalización del etileno (Gao y col, 2003; Huang y col, 2003). Se estima que el etileno permanece unido a los receptores unas 12h (Schaller y Bleeker, 1995), lo cual implica una activación a la respuesta a etileno de un tiempo demasiado largo, por ello se ha postulado que la planta controla esta activación mediante la síntesis de nuevos receptores que inhiben de nuevo a la respuesta a etileno, tal y como ocurre durante la respuesta de hipersensibilidad del tomate a la bacteria patógena *Xanthomonas campestris* (Ciardi y col, 2001). De este modo la planta controlaría la respuesta al etileno con una rápida inducción de su señalización usando pequeñas cantidades de etileno que se unen e inactivan a sus receptores, y una posterior inhibición de su señalización mediante la síntesis de nuevos receptores.

Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, se han realizado muy pocos estudios sobre la modulación de la percepción del etileno en la nodulación, y ninguno en el caso de la micorrización. En la simbiosis con *Rhizobium*, la inactivación de los receptores de etileno por la aplicación del ión Ag^+ , que se une a los receptores impidiendo su unión a la hormona (Sisler y Serek, 2003), provocó un incremento en el número de nódulos en plantas silvestres (Lee y LaRue, 1992b; Nukui y col, 2000), y restauró el fenotipo de mutantes de guisante no nodulantes, Nod- (Fearn y LaRue, 1991; Markwei y LaRue, 1997; Guinel y Sloetjes, 2000). Estos datos reafirman el

papel del etileno como molécula reguladora del número de nódulos. En el caso de la simbiosis micorriza arbuscular, los ensayos realizados durante la presente tesis doctoral han demostrado que la aplicación de Ag^+ en las raíces en forma de tiosulfato de plata (STS) produjo un aumento notable en todos los parámetros de micorrización, excepto en F%, puesto que las medidas se realizaron en etapas ya avanzadas de la micorrización y F% había alcanzado los valores máximos. Estos resultados confirman la acción negativa del etileno sobre la micorrización, además de demostrar la importancia que tiene la percepción del etileno para la regulación de la micorrización.

Para corroborar la acción del etileno y comprobar la importancia de sus receptores en el proceso de regulación de la micorrización, se diseñaron experimentos con plantas mutantes disminuidas en la actividad de los receptores LeETR3 o NR de tomate. En estas plantas los receptores LeETR3 son incapaces de unirse al etileno, por lo que la respuesta a la hormona está constantemente inhibida (Lanahan y col, 1994; Klee, 2002). El hecho de que la mutación NR, al igual que la aplicación de STS, también provoque un aumento en el porcentaje de raíz micorrizada, reafirma que la percepción correcta del etileno es necesaria para la regulación de la simbiosis. Por otro lado, la insensibilidad al etileno en plantas NR no afectó a la capacidad máxima de micorrización en tomate, como tampoco lo hizo la aplicación de ethephon, por lo que deben de existir otras cadenas de señales que intervengan en la regulación de la micorrización, y especialmente en el control del nivel máximo de micorrización.

Una prueba más de la importancia que tienen los receptores de etileno en la regulación de la micorrización se obtuvo al comprobar el efecto que tiene sobre el desarrollo de la simbiosis la carencia de alguno de estos receptores de etileno en plantas de tomate. La pérdida de un tipo de receptores supone la falta de un grupo de proteínas que inhiban la respuesta a etileno, además de que al haber menos receptores se necesitan pequeñas cantidades de etileno para unirse a los restantes, y por tanto la respuesta a etileno se producirá con menores cantidades de etileno, siendo las plantas más sensibles a la acción de esta hormona. De este modo, los transgénicos de tomate ETR4AS y ETR6AS, donde se han silenciado los genes de los receptores LeETR4 y LeETR6 respectivamente (Tieman y col, 2000), son más sensibles al etileno y cabría esperar que su micorrización se afectase en mayor grado por el etileno que en el cultivar silvestre. Efectivamente, en ambos transgénicos se produjo una reducción similar a la obtenida mediante la aplicación de ethephon a la variedad silvestre, afectando dicha reducción a todos los parámetros de micorrización contabilizados, con ciertas excepciones puntuales que se analizarán más adelante. La mayor sensibilidad de estos mutantes al etileno no produjo cambios en la síntesis de la hormona, por lo que los resultados solo pueden deberse a las variaciones producidas

en la sensibilidad de la planta, reforzando así la importancia de la percepción en la regulación de la simbiosis.

La aplicación de ethephon sobre las raíces de los transgénicos ETR4AS y ETR6AS produjo un descenso aún mayor en todos los parámetros de micorrización, excepto en la frecuencia de micorrización, medida al inicio del proceso de micorrización. Durante estas primeras etapas de micorrización la frecuencia de las estructuras fúngicas en la raíz se debe principalmente al los puntos de infección del hongo, y estos podrían estar regulados por la modulación de los picos de Ca^{2+} (Oldroyd y col, 2001; Guinel y Geil, 2002). Posiblemente un exceso en la respuesta al etileno en estas líneas más sensibles y tratadas con ethephon, pueda provocar un cambio diferente en la frecuencia o intensidad de los picos de Ca^{2+} que favorezca la penetración del hongo.

Curiosamente, la aplicación de ethephon también provocó un incremento en la intensidad de arbúsculos (A%) y en la actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%) transitorios en ETR6AS que no se observó en ETR4AS. Este incremento transitorio y específico en plantas ETR6AS de A% y AP% puede deberse a una función diferencial de este tipo de receptor durante la micorrización, por lo que la participación en la regulación de micorrización debe de ser diferente para cada uno de estos receptores. En este sentido, se ha comprobado como, dependiendo de la situación fisiológica de la planta, se produce la inducción de uno u otro receptor, y que no todos se expresan con la misma intensidad en cada órganos de la planta (Klee, 2002). Por todo esto la función de los distintos receptores debe de ser diferente en cada proceso, y dependiente del órgano donde se localicen los receptores. Para complicar aún más el estudio de la percepción de etileno, posiblemente no todos los receptores tengan la misma afinidad por la hormona (O'Malley y col, 2005), luego su respuesta variará en función de la concentración de etileno presente.

En resumen, la regulación de la respuesta a etileno durante la micorrización en plantas de tomate se debe principalmente a la modulación de la expresión y actividad de sus receptores, más que por la regulación de su síntesis. Esta respuesta a etileno durante la micorrización dependerá de la concentración de etileno, y según los datos de otras investigaciones y los obtenidos en este trabajo, el etileno podría actuar en tres etapas distintas de la micorrización: En la germinación de las esporas del hongo; Durante la penetración de la epidermis, la cual podría estar mediada por los picos de Ca^{2+} intercelular; Y durante el desarrollo de los arbúsculos. Por otro lado, el etileno no afecta a la capacidad máxima de micorrización de la planta, y por lo tanto deben participar otras moléculas señal en la regulación de la micorrización, y especialmente en el control del nivel máximo de micorrización.

3. PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO JASMÓNICO (JA) EN EL PROCESO DE MICORRIZACIÓN

Los estudios sobre la participación del JA en la regulación de la formación de la simbiosis micorriza arbuscular, y realizados previamente a la realización de esta tesis doctoral, sugieren distintas posibilidades de actuación, a veces contradictorias y derivadas de un efecto dosis-dependiente (Hause y col, 2007). Así, experimentos de aplicación de MeJA (Metiljasmonato) en hojas de *Carica papaya*, *Tropeaolum majus* y *Cucumis sativus* mostraron un claro efecto inhibitorio sistémico en la micorrización de estas plantas por dicho compuesto (Ludwig-Müller y col, 2002). Sin embargo, el tratamiento de plantas de *Allium sativum* con concentraciones bajas de JA estimuló el desarrollo de la micorrización (Regvar y col, 1996). Por otro lado, las medidas de la concentración de JA en las raíces han puesto de manifiesto incrementos en la concentración de JA y sus derivados en raíces micorrizadas de *Hordeum vulgare* (Hause y col, 2002), *Cucumis sativus* (Vierheilig y col, 2002), *Glycine max* (Meixner y col, 2005) y *Medicago truncatula* (Stumpe y col, 2005). Aún más, se ha correlacionado el incremento en JA detectado en raíces micorrizadas con la expresión de genes relacionados con la biosíntesis y la respuesta a JA. Dado que dicha expresión se ha identificado en células vegetales que contienen arbuscúlos, se ha sugerido una función esencial del JA en el correcto desarrollo del arbuscúlo (Hause y col, 2002; Isayenkov y col, 2005).

En vista de estos antecedentes, en la presente tesis doctoral se planteó estudiar el efecto que tiene sobre la micorrización la aplicación de MeJA, así como la falta de sensibilidad a dicho compuesto derivada de una mutación en la ruta de percepción de JA. Igual que se hizo con el estudio de la participación del etileno en este proceso, se utilizó un único modelo biológico de estudio con plantas de tomate (*S. lycopersicum* L.) y el hongo micorrízico *G. intraradices*. Así, se realizaron aplicaciones locales en la rizosfera, y sistémicas en la parte aérea de distintas dosis de MeJA, y se estudió la micorrización de los mutantes de tomate *jai-1* (Jasmonate Acid Insensitive 1), caracterizados por su insensibilidad a MeJA (Li y col, 2001; Li y col, 2002; Zhao y col, 2003).

Los resultados que se obtuvieron tras a la aplicación foliar de MeJA concuerdan con los obtenidos por Ludwig-Müller y col. (Ludwig-Müller y col, 2002). Estos autores trataron plantas de *T. majus*, *C. papaya* y *C. sativus* con concentraciones de 0,05mM, 0,5mM y 5mM de MeJA y observaron un efecto de supresión de la colonización arbuscular en la raíz. En los ensayos de esta tesis se observó un efecto supresor similar, de modo que en plantas de tomate tratadas con 5 μ M, 50 μ M y 500

μM de MeJA en hoja se originó un descenso en los valores del porcentaje de raíz micorrizada. La medida secuencial de la colonización fúngica a lo largo del tiempo de aplicación permitió establecer que la aplicación foliar de MeJA reduce la micorrización en etapas tardías del desarrollo de la simbiosis, teniendo el efecto similar con $5 \mu\text{M}$ o $50 \mu\text{M}$. La aplicación de dosis menores de MeJA sobre las hojas, $0,5\mu\text{M}$ y $0,05\mu\text{M}$, solo afectó a la intensidad de los arbúsculos, por lo que el MeJA debe de afectar principalmente a estas estructuras del hongo. Apoyando esta acción sistémica del JA en la micorrización, Vierheilig y col. detectaron que se produce una inducción sistémica en la producción de JA en toda la raíz por la micorrización de una parte de las raíces de *C. sativus* (Vierheilig y col, 2002). Es posible que el JA tenga la función de regular el desarrollo de los arbúsculos en la raíz, y que la extensión del hongo provoque un aumento de JA a nivel sistémico que, entre otras consecuencias, sea responsable de parte del efecto bioprotector sistémico existente en plantas micorrizadas (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007).

La reducción sistémica de la micorrización por la aplicación foliar de MeJA puede deberse a la activación en la planta de los mecanismos de defensa mediados por JA. En este sentido se ha estudiado ampliamente el papel de JA en la activación de mecanismos de defensa en plantas frente a procesos como heridas y ataque de herbívoros o de microorganismos patógenos (Gundlach y col, 1992; Wasternack y Hause, 2002; Kessler y Baldwin, 2002). Además, el papel del JA como mediador en respuestas de tipo defensivo está relacionado, frecuentemente, con una acción sinérgica con etileno (Rojo y col, 2003; Lorenzo y Solano, 2005), de ahí que en nuestras determinaciones se incluyeran medidas de producción de etileno en raíz tras aplicación de MeJA en hojas. Si bien los resultados de estas determinaciones se discutirán en detalle en un capítulo posterior, en este apartado se avanza que tras la aplicación de MeJA en hojas se pudo detectar, a tiempos cortos (4 horas después de la aplicación), un incremento transitorio de etileno en las hojas que fue proporcional a la dosis de MeJA aplicada. Dicho incremento también se detectó en la raíz con la dosis más alta de MeJA aplicado en el tallo. Los aumentos en la producción de etileno fueron transitorios, y trascurridas 24 horas de la aplicación de MeJA las diferencias en los niveles de etileno entre las plantas tratadas y no tratadas desaparecieron. Por tanto, y dado que la aplicación de MeJA se realizó dos veces por semana, se puede concluir que los efectos sobre la micorrización de la aplicación de MeJA puedan deberse en parte a la inducción consecutiva y transitoria de etileno.

Contrariamente a los resultados obtenidos por la aplicación foliar, la aplicación de dosis bajas de MeJA en raíz ($0,5 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$) tuvo un efecto positivo sobre el desarrollo de la micorrización, y solo las altas dosis aplicadas en suelo ($50\mu\text{M}$) le

afectaron de forma negativa, coincidiendo estos resultados con los obtenidos por Regvar y col. (Regvar y col, 1996) en *A. sativum*. Además, a diferencia de la inhibición sistémica por MeJA que afectó a parámetros de micorrización como la intensidad de arbusculos y la actividad AP, la aplicación de bajas dosis en raíz favoreció principalmente la frecuencia de la micorrización. Claramente estos resultados evidencian efectos opuestos y dependientes de la dosis de MeJA aplicada, así como de si su vía de acción es local o sistémica.

Así, las bajas dosis de MeJA aplicado en el suelo incrementaron la frecuencia de micorrización, y dado que también se detectó un aumento en el número de unidades de infección, muy posiblemente el mayor número de unidades de infección en la raíz sea el responsable de la mayor micorrización encontrada en las plantas tratadas con MeJA en suelo. El JA por tanto favorecerá el desarrollo de la simbiosis incrementando bien la susceptibilidad de la planta a la infección, o bien la capacidad de infección del hongo en el suelo. Sin embargo, según resultados publicados con anterioridad, el MeJA no causa un efecto directo de incremento de crecimiento y ramificación en las hifas de hongos arbusculares (Buee y col, 2000), y por tanto el incremento de unidades de infección en la raíz tratada con dosis bajas de MeJA debe ser producido por un factor activado en la raíz y dependiente de JA. En este sentido se conoce que tanto la aplicación exógena de MeJA, como la manipulación génica de plantas de tomate, permitiendo una expresión constitutiva de la ruta de señalización mediada por JA, incrementa la producción de metabolitos secundarios en la planta y activa la transcripción de genes que codifican enzimas de la ruta del fenil-propanoico (Chen y col, 2006). Entre los metabolitos incrementados en la ruta del fenil-propanoico se encuentran los flavonoides, sustancias de gran importancia en la estimulación de la micorrización (Vierheilig y Piche, 2002). Por tanto estos resultados apuntan a que otras sustancias cuya producción es estimulada por JA, posiblemente flavonoides, son responsables del incremento de la frecuencia de micorrización en las primeras etapas de colonización, y en consecuencia del resto de los parámetros de micorrización estudiados.

Además de técnicas histoquímicas, se utilizaron metodologías de análisis molecular para determinar los efectos sobre la micorrización de la aplicación de MeJA en hojas con dosis bajas, o en suelo con dosis altas. Para ello, se estudiaron los niveles de acumulación del gen rRNA 18S de *G. intraradices* en la raíz como medida de la cantidad total de hongo, así como la cantidad de transcritos de los genes *GiALP* y *LePT4*, como medida de la actividad de los arbusculos. El gen *GiALP* codifica una enzima fosfatasa alcalina de *G. intraradices* relacionada con el intercambio de nutrientes en los arbusculos (Aono y col, 2004). Por otro lado, el gen *LePT4* de

tomate (Nagy y col, 2005) codifica un transportador de fósforo ortólogo al gen *MtPT4* de *M. truncatula* (Harrison y col, 2002) que se expresa exclusivamente en los arbúsculos y es usado como marcador de la formación de arbúsculos (Isayenkov y col, 2004), siendo *MtPT4* indispensable para una correcta micorrización (Javot y col, 2007). En estos ensayos se comprobó como la reducción en los niveles de rRNA fúngico en plantas tratadas y no tratadas con MeJA no fue considerable, aunque, por el contrario, los niveles de transcritos de *GiALP*, y en mayor medida de *LePT4* fueron marcadamente inferiores en las plantas tratadas con MeJA. Este resultado confirma que el MeJA afecta particularmente y de manera negativa el desarrollo arbuscular. Por otra parte, y aunque no está confirmado que el gen *GiALP* codifique la isoenzima ALP (o fosfatasa alcalina, AP) detectada mediante técnicas histoquímicas, si es cierto que las determinaciones de la expresión génica sugieren que dicho gen participa mayoritariamente en procesos de intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo, y no tanto en procesos de captación de nutrientes por el hongo de la rizosfera (Aono y col, 2004). Aunque resultados previos también sugieren que la expresión del gen *GiALP* no es dependiente del grado de infección (Aono y col, 2004), los resultados del presente trabajo apuntan a que posiblemente sea dependiente del porcentaje y funcionalidad de los arbúsculos.

Resultados recientes de Isayenkov y col, muestran que la reducción en los niveles internos de JA debidos a una represión de la expresión del gen alen oxido cyclasa (AOC1), que participa en la síntesis de JA en raíces de *M. truncatula*, conlleva una reducción de la micorrización y de la tasa de formación de arbúsculos (Isayenkov y col, 2005). Estos resultados podrían estar en contradicción con los obtenidos en esta tesis doctoral en cuanto a que la aplicación de JA, y por tanto el incremento de su concentración en raíz, produce un efecto negativo sobre la formación de arbúsculos. No obstante, otros estudios (Hause y col, 2007) apuntan que el efecto de sobre-expresión del mismo gen *MtOAC1* de *M. truncatula* provoca incrementos en los niveles de JA en la raíz y una reducción de la micorrización y de la tasa de formación de arbúsculos, siendo este resultado contradictorio y opuesto a los resultados de Isayenkov y col (Isayenkov y col, 2005). Por su parte Tejeda Sartorius y col. demostraron que cierta cantidad de JA es necesaria para la micorrización en tomate, ya que la mutación *spr-2*, que provoca una importante disminución en la síntesis de JA, da lugar a una drástica caída en el número de arbúsculos. Sin embargo, en los mutantes *spr-1*, donde la síntesis de JA no se ve tan afectada, la micorrización es la misma que en los silvestres (Tejeda-Sartorius y Délano-Fier, 2006). En resumen, se pueden observar efectos similares en la micorrización ocasionados por alteraciones contrapuestas en los niveles de JA. La explicación a estos efectos contrapuestos

podría estar en las distintas funciones del JA durante la micorrización, dependientes en muchos casos de la dosis y de la localización del efecto. En concreto los efectos del JA sobre la micorrización podrían deberse a:

- * Variaciones en la disponibilidad de carbohidratos para el hongo, ya que el JA interviene en la redistribución de nutrientes en la planta, y se ha demostrado que ciertas invertasas inducidas por la micorrización son inducibles por JA, como la invertasa *LIN6* de tomate (Strack y col, 2003). Esto demuestra que el JA puede estimular la translocación de azúcares, ya que *LIN6* además se expresa en tejidos con altos requerimientos nutricionales (Godt y Roitsch, 1997). En concordancia con esta hipótesis, se ha observado la inducción de invertasas durante la micorrización (Schaarschmidt y col, 2006).
- * Un efecto negativo en el metabolismo de flavonoides por la reducción de los niveles de JA, ya que existe una relación entre los niveles de JA y al síntesis de flavonoides (Chen y col, 2006), y en consecuencia que los flavonoides dejen de propiciar el desarrollo del hongo micorrícico (Vierheilig y Piche, 2002).
- * La inducción de la expresión de genes de respuesta defensiva, la cual puede repercutir tanto en la modulación de la micorrización, como en la capacidad de respuesta de la planta a patógenos (García-Garrido y Vierheilig, 2007).
- * Variaciones en la remodelación del citoesqueleto que se produce en las células con arbusculos y próximas a estos (Blancaflor y col, 2001; Genre y Bonfante, 1997; Genre y Bonfante, 1998). Aunque no existen pruebas de la relación directa del JA y los cambios en el citoesqueleto ocurridos durante la micorrización, si se ha demostrado que el JA es capaz de producir cambios en los microtúbulos, y de inducir la expresión de un gen codificante para una β -tubulina (Koda, 1997; Manthey y col, 2004).
- * La participación del JA en la modulación de los picos de Ca^{2+} intracelular, igual que el etileno, ya que ambas hormonas provocan diferentes patrones en la modulación de estos picos (Sun y col, 2006). La modulación en los picos de Ca^{2+} intracelular se ha demostrado como un evento molecular importante durante la nodulación, y se ha sugerido que también lo sea durante la micorrización (Harrison, 2005).

En los experimentos realizados en esta tesis, la supresión de la micorrización se obtuvo principalmente mediante inducción sistémica de MeJA aplicado en hojas, por lo que este efecto de supresión estaría más ligado a la ruta de señalización y activación génica mediada por JA, que a un efecto de concentración de JA en la raíz. El uso de mutantes *jai-1* nos permitió esclarecer 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 *LeCO1*, homólogo al gen *COI1* (Coratine Insensitive) de *Arabidopsis* (Feys y col, 1994), y la proteína COI1 en *Arabidopsis* es una proteína del tipo F-box necesaria para la activación de genes de defensa inducidos por JA. Los mutantes *jai1* de tomate exhiben ciertas propiedades fenotípicas relacionadas con la defensa, como son su incapacidad para expresar genes inducibles por JA, una reducida resistencia a ciertos ácaros, un desarrollo anormal de los tricomas, insensibilidad a la coratina y resistencia incrementada a *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (Zhao y col, 2003; Li y col, 2004b).

Durante los ensayos del presente estudio, los mutantes *jai-1* manifestaron una mayor capacidad de micorrización, demostrándose que la ruta de señalización del JA es esencial para la regulación de la micorrización. El descenso en la sensibilidad al JA es suficiente para incrementar la micorrización, sin que se produzca una alteración en los niveles endógenos de dicho compuesto. Este resultado constituye la primera evidencia clara y directa de que el JA contribuye a la regulación negativa de la micorrización. Tanto la intensidad de la colonización, como la de arbusculos y de actividad AP se incrementaron considerablemente en mutantes *jai1* frente a la línea silvestre. Además, el análisis de transcritos de los genes *GiALP* y *LePT4* confirmó los datos histoquímicos, observándose un marcado aumento de la expresión de dichos genes en las raíces de plantas micorrizadas mutantes *jai1* insensibles a MeJA en relación con las plantas silvestres sensibles a dicho compuesto. Este incremento de expresión génica fue evidente sobre todo en los tiempos de cosecha donde se observó una mayor deficiencia histoquímica en los parámetros de intensidad de micorrización y de arbusculos.

En conclusión, el presente estudio ha permitido demostrar una doble función del JA durante la micorrización. En primer lugar, una acción negativa, derivada de los experimentos realizados con plantas mutantes insensibles a MeJA y de los estudios de inducción sistémica de resistencia a la micorrización por aplicación foliar de MeJA. Estos estudios sugieren que la ruta de señalización y activación génica mediada por JA, importante en muchas de las interacciones de patógenos con plantas, también media en los fenómenos de interacción de hongos arbusculares con la raíz hospedadora, especialmente en los relacionados con la actividad de los arbusculos. En segundo lugar, el JA tiene una acción positiva sobre la MA, derivada de la aplicación de dosis bajas de MeJA en la raíz que promueve la micorrización, 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.

4. PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO ABCÍSCICO (ABA) EN EL PROCESO DE MICORRIZACIÓN

Dado el papel fundamental del ABA como molécula reguladora de procesos de crecimiento y desarrollo en plantas, así como de interacción de estas con el medio, es lógico pensar que también pueda participar en el desarrollo de la simbiosis micorriza arbuscular. En este sentido, fueron pioneros los experimentos de cuantificación y medida del contenido en ABA en plantas micorrizadas, intentando relacionar el contenido en ABA con la micorrización. Los experimentos realizados al respecto revelan que el contenido en raíces de plantas micorrizadas suele incrementar o mantenerse inalterado respecto a las medidas obtenidas en plantas controles no micorrizadas. Así, se ha determinado un incremento en ABA en raíces de plantas micorrizadas como maíz o soja (Danneberg y col, 1992; Meixner y col, 2005), viéndose inalterados estos niveles en otras interacciones, como el caso de plantas de *Bouteloua gracilis* micorrizadas (Allen y col, 1982). También se ha determinado el efecto sistémico de la infección de la raíz por hongos arbusculares sobre la capacidad de acumulación de ABA en la parte aérea de las plantas, encontrándose resultados un tanto contradictorios. Los cambios en los niveles de ABA en la parte aérea de las plantas micorrizadas pueden estar más relacionados con la respuesta a condiciones adversas de sequía y estrés salino moduladas durante la micorrización, que a cambios relacionados con la propia formación de la simbiosis. Curiosamente también se ha detectado ABA en hifas fúngicas del interior de la raíz micorrizada (Esch y col, 1994), sugiriéndose un papel de este compuesto en el flujo de agua y sales entre el hongo y la planta.

No obstante, los datos que se disponían cuando se comenzó este trabajo de investigación no apuntaban a ningún papel específico del ABA durante la micorrización, por lo que se decidió profundizar en este aspecto. Para ello se eligió una estrategia novedosa en la investigación sobre micorrizas arbusculares: la utilización de plantas mutantes afectados en la síntesis de ABA, los cuales habían sido empleados con éxito en estudios sobre la función del ABA en la regulación del crecimiento vegetal (Sharp y col, 2000) y susceptibilidad de plantas a patógenos (Audenaert y col, 2002). Además, se completó el estudio con experimentos de aplicación de la hormona sobre plantas de tomate. Los mutantes utilizados fueron los de la línea *Sitiens* de tomate, caracterizados por tener niveles residuales de ABA (8% respecto a la variedad silvestre) y ser incapaces, entre otras funciones, de responder a estímulos como el estrés hídrico, heridas, calor, o estimulación por corriente eléctrica (Herde y col, 1999).

Los resultados obtenidos durante este trabajo muestran claramente una disminución de la capacidad de micorrización por *G. intraradices* en los mutantes *Sitiens* respecto al cultivar silvestre Rheinlands Ruhm. También se ha observado una activación de la capacidad de micorrización debido a la aplicación exógena de ABA, tanto en el cultivar silvestre, como en el mutante *Sitiens*. De estos resultados se deduce que los niveles endógenos de ABA en la raíz son esenciales para una correcta micorrización. Todos los valores de los parámetros de micorrización determinados en el presente estudio mostraron un descenso significativo en el mutante respecto al valor obtenido en el cultivar silvestre (en su mayoría del 60-80%), y los más afectados fueron la intensidad de micorrización (M%), la intensidad de arbusculos (A% y a%), y en consecuencia, también la intensidad de actividad fosfatasa alcalina fúngica (AP%). Cuando se aplicó ABA de manera exógena a las raíces de plantas de fenotipo silvestre, también se obtuvieron los mayores incrementos en los parámetros de intensidad de micorrización e intensidad de arbusculos en el sistema, mientras que en *Sitiens* incrementaron especialmente los parámetros A%, a% y AP%. Por tanto, estos resultados podrían significar que el ABA actúa de manera positiva sobre la micorrización, incrementando bien la capacidad de formación de los arbusculos, bien la estabilización del número de arbusculos, ya que es posible que las bajas concentraciones de ABA en el mutante sean causa de una degradación prematura de los mismos.

La cuantificación de actividad AP en la raíz y la medida relativa del número de arbusculos pertenecientes a tres estadios diferentes de desarrollo, permitió demostrar que el ABA es necesario para el desarrollo completo de arbusculos y su funcionalidad. En los mutantes *Sitiens* la mayoría de los arbusculos cuantificados fueron arbusculos en formación (o degradación) con pocas ramificaciones, siendo estas más gruesas de lo normal, mientras que el número de arbusculos maduros y muy ramificados fue drásticamente minoritario. En raíces de plantas de fenotipo silvestre, por el contrario, predominaron los arbusculos maduros. Estos resultados explican el bajo rendimiento de los arbusculos en *Sitiens*, cuantificado tanto con la actividad AP como con el número de vesículas formadas en las raíces micorrizadas de *Sitiens*, que fue drásticamente inferior al de Rheinlands Ruhm (posiblemente por la falta de nutrientes carbonados para el hongo micorrízico a causa del mal funcionamiento de los arbusculos). En consonancia con estos resultados, la aplicación de ABA supuso la recuperación tanto de la morfología normal de los arbusculos, como de la frecuencia e intensidad de la actividad AP en las plantas *Sitiens*, demostrando la necesidad de ABA para el desarrollo completo de arbusculos y para su funcionalidad.

Según los resultados de este trabajo de investigación, el posible aporte de ABA por el hongo micorrícico a la raíz (Esch y col, 1994) no es suficiente para permitir una correcta colonización en los mutantes *Sitiens*, lo cual indica claramente que es necesario un mecanismo activo de síntesis de ABA en la raíz para asegurar un correcto funcionamiento de la micorrización.

Además de restaurar la actividad AP de los arbusculos con la aplicación de ABA, expresión de una correcta formación y funcionamiento de estos, en estos experimentos se recuperó la capacidad de crecimiento de las plantas *Sitiens*. Sin embargo, la aplicación exógena de ABA no fue suficiente para recuperar completamente la frecuencia y la intensidad de micorrización, y por tanto la capacidad colonizadora del hongo en estas plantas. Los niveles de ABA añadidos no son suficientes para recuperar la correcta relación planta-hongo en las plantas *Sitiens*, y este efecto puede deberse al menos a dos posibilidades que se explican a continuación. En primer lugar, puede existir un efecto dependiente del fenotipo en la respuesta a ABA, teniendo la variedad silvestre Rheinlands Ruhm y el mutante *Sitiens* distinta sensibilidad al ABA. Esta hipótesis es factible según los resultados de expresión diferencial del gen de respuesta a ABA *LE4* observados en los ensayos del presente estudio, donde se ha evidenciado distinta sensibilidad por el ABA en plantas silvestres y mutantes, y por consiguiente un claro efecto de respuesta a ABA dependiente del fenotipo. En segundo lugar, es posible que algún factor derivado de la mutación inhiba el desarrollo normal de la micorrización. En este sentido se ha comprobado como en los mutantes *Sitiens*, afectados en la última enzima de la ruta de síntesis de ABA, acumulan el alcohol-abscísico, molécula derivada del ABA-Aldehído que es precursor del ABA (Taylor y col, 1988). Es posible que la acumulación del alcohol-abscísico provoque la alteración de otras rutas metabólicas relacionadas con la síntesis de ABA, en concreto la ruta de los carotenoides, entre las que podría estar la ruta de síntesis de las estrigolactonas, a las que recientemente se les ha atribuido una función como inductoras del desarrollo extraradical de hongo micorrícico (Akiyama y col, 2005; Tawaraya y col, 2006; Besserer y col, 2006). Posiblemente las estrigolactonas también induzcan el desarrollo intraradical del hongo micorrícico (Gómez-Roldán y col, 2006), y su carencia podría provocar un descenso en la micorrización que explicaría porque en *Sitiens* no se puede recuperar del todo la intensidad de la micorrización, aunque sí la actividad de los arbusculos. Otra posibilidad es que la acumulación alcohol-abscísico active otras rutas derivadas de la síntesis de los carotenoides, como por ejemplo la ruta de síntesis del apocarotenoide blumenina, derivado de la ciclohexenona, que resulta ser un potente inhibidor de la micorrización tanto a nivel local como a nivel sistémico (Fester y col, 1999; Vierheilig y col, 2000c).

Esta última posibilidad también explicaría la inhibición en la micorrización que se produce en *Sitiens* y que no es recuperable con la aplicación de ABA.

La importancia en la micorrización de la ruta de síntesis de los carotenoides, de donde deriva la síntesis de ABA y de otras moléculas como las estrigolactonas, es un hecho demostrado. Se ha observado la inducción que se produce en la expresión de genes codificantes de enzimas de esta ruta durante la micorrización, y así se ha detectado la inducción de la expresión del gen *DXS1*, codificante de las enzimas DXS en *M. truncatula*, y se cree que el gen homólogo de *DXS1* en tomate también se induce durante la micorrización (Walter y col, 2002). Además, se ha detectado una inducción de los genes *PDS* y *ZDS*, codificantes de las enzimas fitoeno desaturasa y ζ -caroteno desaturasa, durante la micorrización de plantas de tabaco y *M. truncatula* respectivamente (Fester y col, 2002; Lohse y col, 2005). Por su parte, la aplicación de norflurazón, inhibidor de la enzima PDS, provoca la acumulación de su sustrato en raíces micorrizadas de aciano, perejil, opio, tagetes y ruda (Fester y col, 2005). Estos resultados hacen evidente la activación de la ruta de los carotenoides durante la micorrización, y sin embargo no se han detectado incrementos en la cantidad de carotenoides en las raíces micorrizadas (Fester y col, 2002), por lo que probablemente la activación de esta ruta esté más orientada a la síntesis de otros compuestos como el ABA. Se han encontrado otras pruebas más evidentes sobre la importancia del correcto funcionamiento de esta ruta de síntesis en esta simbiosis, procedentes de los ensayos de Gómez-Roldán y col (Gómez-Roldán y col, 2006), que inhibieron la enzima PDS en plantas de maíz mediante la aplicación de fluridona, y la enzima ZDS por la mutación y^9 . Estas inhibiciones provocaron un fuerte descenso en la micorrización, que en el caso de la aplicación de fluridona se restituyó con la aplicación del un análogo sintético de las estrigolactonas, el GR24. Sin embargo en los mutantes y^9 no consiguieron recuperar la micorrización con la aplicación de GR24 (Gómez-Roldán y col, 2006). Posiblemente la mutación y^9 afecte más drásticamente a la ruta de síntesis de los carotenoides que la fluridona, y por tanto provoque un mayor descenso del ABA en estas plantas que impide la correcta formación de la micorrización a pesar de la aplicación de GR24, tal y como se observó en los ensayos con los mutantes *Sitiens*.

El efecto del ABA como inductor de la susceptibilidad de la planta a la colonización por el hongo micorrícico en tomate es similar al efecto descrito en otras plantas frente a hongos patógenos, como *Phytophthora infestans* en patata (Henfling, 1980), *P. megasperma* en soja (Ward y col, 1989), *Peronospora tabacina* en tabaco (Salt y col, 1986), y *Botrytis cinerea* en tomate (Kettner y Dörffling, 1995; Audenaert y col,

2002). Estos resultados indican que la señalización del ABA podría mediar las interacciones entre las plantas y los hongos, tanto patógenos como mutualistas. Apoyando esta hipótesis, Li y col. demostraron que la inyección de ABA en hojas de judía provoca un incremento en el número de haustorios de roya en dichas hojas (Li y Heath, 1990), igual que incrementa el número de arbusculos en las raíces micorrizadas. Como es sabido, los haustorios de hongos patógenos y los arbusculos de los hongos micorrícicos son las principales fuentes de obtención de nutrientes de ambos hongos, y las dos estructuras comparten una morfología y funcionalidad similar (Harrison, 1999; Hahn y Mendgen, 2001).

En conclusión, el uso de mutantes afectados en la producción de ABA nos ha permitido demostrar la importancia y necesidad de este compuesto para la formación de la simbiosis micorriza arbuscular, siendo primordial para un correcto desarrollo y funcionalidad de los arbusculos. Los mecanismos moleculares por los cuales el ABA ejerce su acción durante la micorrización son objeto de estudio actual en el grupo de investigación, y en un apartado posterior se discutirá como uno de estos posibles mecanismos está implicado en la modulación negativa de la respuesta a etileno en plantas.

5. INTERACCIÓN ENTRE LAS DISTINTAS MOLÉCULAS SEÑAL DURANTE EL PROCESO DE REGULACIÓN DE LA MICORRIZACIÓN

La respuesta de una planta a cualquier estímulo externo o interno nunca es el resultado de la activación lineal de una única ruta de señalización hormonal, sino que es la consecuencia de una compleja red de interacciones entre distintas rutas de señalización. Distintos estímulos provocan una activación asimétrica de esas redes señalizadoras complejas y el balance final de interacciones entre las mismas es el que determina las respuestas específicas al estímulo inicial. Existen numerosas evidencias de que la célula vegetal es capaz de combinar de distintas formas las mismas rutas hormonales para determinar respuestas muy distintas a diferentes estímulos. Un ejemplo claro lo constituye la respuesta de las plantas a patógenos y heridas. Aunque en ambos casos la planta activa las rutas de señalización de ácido jasmónico (JA) y de etileno, combina estas dos rutas de distinta forma para que las respuestas finales sean diferentes y específicas para cada estímulo. Por tanto, la comprensión de cualquier ruta requiere también de la comprensión de las interacciones que establece con otras para responder adecuadamente un estímulo determinado.

En apartados anteriores de este capítulo se ha discutido de forma independiente como el SA y el etileno participan en el control de la micorrización, así como la

acción sobre la misma del JA, dependiente de la dosis aplicada y de su sistema de señalización (local o sistémico), además del efecto del ABA favoreciendo la simbiosis. Con estos resultados cabría la posibilidad de que la acción entre algunas señales como el SA, JA y el etileno formasen parte de la misma cadena de señalización que regulase la micorrización, aunque también sería posible que su señalización perteneciese a rutas diferentes e independientes. Teniendo en cuenta la interrelación que tienen estas moléculas señal durante la señalización en numerosas interacciones patogénicas (Pieterse y col, 1998; Van Wees y col, 1999; Thomma y col, 2001; Berrocal-Lobo y col, 2002), demostrándose efectos sinérgicos, antagónicos o independientes entre ellas (Devadas y col, 2002; Berrocal-Lobo y col, 2002; Buzi y col, 2004), cabe sospechar una relación y combinación particular de estas rutas hormonales para determinar respuestas específicas durante la micorrización.

De las interacciones hormonales que se producen durante la infección de la planta por microorganismos patógenos, cabe destacar la relación del JA con el etileno. Ambas hormonas actúan conjuntamente en la activación de la respuesta de defensa en numerosas ocasiones (Penninckx y col, 1998; Pieterse y col, 1998; Van Wees y col, 1999; Thomma y col, 2001; Ellis y Turner, 2001; Berrocal-Lobo y col, 2002), compartiendo incluso pasos comunes en la señalización (Kauss y col, 1992; Kauss y col, 1994; Lorenzo y col, 2003). En los ensayos realizados en el presente estudio con tomate y el hongo micorrízico *G. intraradices*, se observó una relación directa entre la aplicación de MeJA en parte aérea y dosis relativamente altas en raíces, y un incremento en la producción de etileno. Estos resultados coincidieron con la inhibición de la intensidad de arbusculos en el sistema. Sin embargo, los incrementos observados en la producción de etileno tras la aplicación de MeJA fueron transitorios y desaparecieron a las 24 horas de la aplicación. Dado que ambas hormonas tienen un efecto negativo en la micorrización, y especialmente en la formación de los arbusculos, se deduce que la inhibición de la micorrización mediada por el JA, especialmente a nivel sistémico, puede deberse, al menos en parte, a la inducción transitoria de la síntesis de etileno.

Por otra parte, ya se ha discutido en un apartado anterior como la aplicación de dosis menores de MeJA sobre la raíz de la planta produce una inducción en la micorrización, que además coinciden con una reducción transitoria en la producción de etileno en hojas y raíces. Dado que ambas hormonas afectan principalmente a la intensidad de los arbusculos y a su funcionalidad, estos resultados son una prueba más de que el JA afecta a la producción de etileno, y de que estas variaciones en la síntesis de etileno, aunque transitorias, podrían tener consecuencias en la mayor o menor micorrización de la planta por la aplicación de distintas concentraciones de

MeJA. Sin embargo, mientras que tras la aplicación de MeJA si que se afectó la capacidad máxima de micorrización de las plantas, esta no varió con los cambios en la cantidad o percepción de etileno. Por esta razón se puede concluir que una parte del mecanismo de regulación de la micorrización mediado por el JA debe ser independiente del etileno.

Por otro lado, las variaciones en la sensibilidad al JA de los mutantes *jai1* (homocigotos *jai1/jai1*, insensibles a esta hormona) no presentaron variaciones constitutivas en la síntesis de etileno, y sin embargo, la aplicación de etileno afectó a la micorrización de los mutantes *jai1* en mayor proporción que a las plantas sensibles al JA, es decir, que la falta de sensibilidad al JA modifica la acción del etileno sobre la micorrización. En vista de estos resultados, lo más probable es que el JA controle en cierta medida la respuesta al etileno durante la micorrización, por lo cual, al no responder los mutantes *jai1* al JA, el efecto inhibitor del etileno sobre la micorrización es mayor en *jai1* que en las plantas silvestres. De estos resultados también se deduce que la señalización del etileno debe de ser posterior a la percepción del JA, puesto que en caso contrario la micorrización en los mutantes *jai1* no se afectaría por el etileno aplicado. Apoyando esta conclusión, de forma similar a lo que ocurre durante la micorrización, en la inducción de la ISR por rhizobacterias se ha demostrado que la participación del etileno es posterior a la del JA (Van Wees y col, 2000; Ton y col, 2001).

Además de la interacción JA-etileno en la regulación de la micorrización, durante el transcurso del trabajo de investigación expuesto en la presente memoria también se estudió la posible interacción de ambas fitohormonas con el SA. En este sentido, se pudo observar que la menor acumulación de SA en los transgénicos NahG, está relacionada con un incremento en la sensibilidad tanto al MeJA, como al ethephon, reguladores negativos de la micorrización. De este modo la inhibición de la micorrización en plantas NahG fue notable con la aplicación de bajas concentraciones de ambos compuestos, mientras que las mismas dosis apenas afectaron a las líneas silvestres o bien provocaron incrementos en la micorrización (como ocurrió tras la aplicación de bajas concentraciones de MeJA en la raíz de las plantas silvestres). Este resultado sugiere que la señalización de etileno y JA durante la micorrización depende en parte de los niveles de SA, ya que al disminuir los niveles de SA en plantas NahG, la inhibición que éste pueda ejercer sobre la señalización del JA o el etileno es menor, y en consecuencia el efecto inhibitor de ambas hormonas sobre la micorrización será mayor.

Como se ha mencionado anteriormente, parece existir una relación entre el JA y el etileno, en la que el etileno actuaría después que el JA en la regulación de la micorrización. Por tanto, es posible que el SA afecte primero a la señalización del JA, y de forma secundaria a la del etileno. Apoyando estas suposiciones, y en comparación con otras interacciones planta-microorganismo, este efecto antagónico del SA sobre la señalización del JA también se ha observado en interacciones patogénicas (Bowling y col, 1997; Van Wees y col, 1999; Fidantsef y col, 1999). Además, en numerosos estudios con *Arabidopsis* ya se ha comprobado como el SA inhibe la expresión del gen *PDF1.2*, cuyo producto participa en la señalización tanto del JA como del etileno durante la respuesta de defensa (Clarke y col, 2000; Gupta y col, 2000; Petersen y col, 2000; Jirage y col, 2001; Clarke y col, 2001). Del mismo modo, mutaciones que impiden la señalización o biosíntesis del SA provocan incrementos en la expresión de *PDF1.2* (Spoel y col, 2003). Probablemente, en plantas de tomate el SA actúe inhibiendo la expresión de algún gen homólogo a *PDF1.2*, y necesario para la señalización del JA y el etileno. Sin embargo, la posibilidad de que el SA provoque cambios en la producción de alguna de estas hormonas es menor, dado que en los ensayos realizados en el presente estudio no se encontraron diferencias en la síntesis de etileno entre las plantas NahG y las silvestres.

En una visión general y retomando conclusiones descritas anteriormente sobre el grado y tipo de afectación de la micorrización debida al SA, es posible sugerir que la participación del SA afecta a etapas iniciales de la micorrización, las de formación de apresorios y penetración, confirmando resultados previos del grupo de investigación que determinaron incrementos transitorios de SA en estas etapas iniciales (Blilou y col, 1999). Estos incrementos de SA podrían ser responsables tanto de la inducción transitoria de genes de defensa inducibles por SA (tal y como se ha explicado para el caso del gen *PI206*), y a su vez actuar como señal reguladora de la acción del JA y el etileno, controlando en cierto grado y de forma negativa la señalización de ambas hormonas, que afectan a etapas posteriores de desarrollo de la simbiosis tales como la formación y funcionalidad de los arbusculos.

La última hormona estudiada en el transcurso de esta tesis doctoral fue el ABA, que tal y como se ha explicado anteriormente potencia el desarrollo de la micorrización, a diferencia de lo que ocurre con el SA, JA y etileno. Del mismo modo, el ABA está principalmente relacionado con incrementos en la susceptibilidad de la planta a la infección por microorganismos patógenos (Kettner y Dörffling, 1995; McDonald y Cahill, 1999; Henfling, 1980; Ward y col, 1989; Audenaert y col, 2002). Se ha sugerido que otros factores, aparte del carácter necrotrófico o biotrófico del

patógeno, intervienen en el mecanismo de actuación del ABA en cada interacción planta-patógeno, y que el mecanismo de acción del ABA puede deberse en parte a interferencias con otras rutas de señalización (SA o etileno/JA) (Mohr y Cahill, 2007; Adie y col, 2007b). Este incremento en la susceptibilidad a la infección por el ABA se ha relacionado en algunas ocasiones con la inhibición de la señalización de alguna de las otras tres moléculas señal, como el SA (Audenaert y col, 2002; Mohr y Cahill, 2007), pero en los ensayos realizados en esta investigación con tomate y *G. intraradices* no se encontraron diferencias en los niveles de SA total o libre en plantas *Sitiens*, mutantes con una baja producción de ABA. Estos resultados no niegan un efecto negativo del ABA durante la señalización del SA, pero si un efecto sobre su síntesis.

En lo que respecta a la interacción ABA-etileno, existe una relación inversa entre la cantidad de ABA en la raíz, y la producción de etileno. La relación antagónica entre el ABA y el etileno se ha demostrado durante diferentes etapas del desarrollo vegetal en plantas de *Arabidopsis* (Beaudoin y col, 2000; Ghassemian y col, 2000), maíz (Spollen y col, 2000) y tomate (Sharp y col, 2000). Concretamente, en plantas de maíz y tomate se ha comprobado como, igual que ocurre en los ensayos expuestos en esta tesis, la falta de ABA en la planta provoca un aumento en la producción de etileno (Sharp y col, 2000; Spollen y col, 2000). Además, la interferencia entre ABA y etileno también se ha demostrado en interacciones planta patógeno, siendo sus efectos antagónicos (Anderson y col, 2004). En esta tesis se ha comprobado como la aplicación de ABA sobre las raíces de plantas de tomate produjo una reducción en la síntesis de etileno que se relacionó, conforme a los efectos anteriormente demostrados del etileno sobre la micorrización, con un notable incremento en el desarrollo de la simbiosis. Estos resultados apoyan la hipótesis de parte de los efectos que tiene el ABA sobre la micorrización se deben al control que ejerce el ABA sobre la producción de etileno.

Como prueba de que la baja micorrización obtenida en los mutantes de tomate con una escasa producción de ABA, se debe en parte a los incrementos observados en la producción de etileno, la aplicación del inhibidor de la percepción del etileno STS produjo un incremento en la micorrización de los mutantes *Sitiens*. La pérdida de percepción de etileno en *Sitiens* incrementó principalmente la actividad de sus arbusculos, determinada mediante la tinción de la actividad fosfatasa alcalina (AP) del hongo micorrízico. Seguramente, debido a la mejora en la funcionalidad de los arbusculos por la aplicación de STS, se produjo también un incremento en la frecuencia y en la intensidad de la micorrización, pero no en la intensidad de los arbusculos. El incremento observado en la actividad AP en *Sitiens* tras la aplicación de STS fue muy superior al observado en los silvestres con el mismo tratamiento, lo cual

confirma que el etileno tiene una mayor influencia sobre la micorrización de *Sitiens* que en los silvestres. En platas *Sitiens*, la producción de ABA es muy inferior a la de los silvestres, y la capacidad de formación y funcionalidad de los arbusculos está muy limitada, por lo que se puede deducir que el ABA favorece la formación y funcionalidad de los arbusculos mediante el control de los niveles de etileno.

Por otro lado, la aplicación de STS en los mutantes *Sitiens* reestableció en gran parte la estructura de los arbusculos, en los cuales se observó un mayor desarrollo mediante la tinción del hongo, llegando a ser similar al de las plantas silvestres. Sin embargo, aunque la aplicación de STS supuso una mejora en la funcionalidad y formación de los arbusculos, la intensidad de AP no alcanzó los valores de la línea silvestre, mientras que si lo hizo tras la aplicación de ABA. Además, la reducción de la percepción de etileno no afectó a la intensidad de los arbusculos en *Sitiens*, aunque si que la incrementó en la línea silvestre de tomate. LeNoble y col. obtuvieron resultados similares, los cuales no consiguieron restaurar totalmente el crecimiento de las hojas en plantas de tomate mutantes, deficientes en la síntesis de ABA, con la aplicación de STS, y sí con la aplicación de ABA, lo cual indica que el ABA tiene una vía de acción sobre el crecimiento de la planta independiente del etileno (LeNoble y col, 2003). Del mismo modo, el ABA ha de tener una ruta de señalización independiente del etileno y que afecta al desarrollo de la simbiosis micorriza arbuscular a nivel de la funcionalidad de los arbusculos, y puede que también de su formación.

Además del SA, JA y etileno, otra molécula que tiene un fuerte efecto inhibidor sobre la micorrización es el fosfato (McArthur y Knowles, 1992), y a pesar de que su función como molécula reguladora de la micorrización ha sido ampliamente estudiada en las últimas décadas, aún no se conoce su modo de actuación. La inhibición de la micorrización producida en suelos con altas cantidades de fósforo asimilable se ha relacionado con una mayor inducción de la respuesta de defensa (Edriss y col, 1984; Kapulnik y col, 1998; Lambais y Mehdy, 1998), y en algunos casos esta respuesta ha sido inducida por análogos del SA (David y col, 1998). En cambio en los estudios realizados en esta Tesis doctoral no hemos podido constatar un efecto diferencial debido a la presencia una mayor cantidad de fósforo en el sustrato entre plantas de tomate y tabaco silvestres y transgénicas NahG, con menor capacidad de acumulación de SA. La mayor presencia de fósforo en el sustrato tan solo provocó un retraso en el inicio de la fase exponencial de la micorrización paralelo en ambas líneas. Del mismo modo, en plantas transgénicas de tabaco CSA, con mayor producción y acumulación de SA, la micorrización en sustratos ricos en fósforo siguió siendo

inferior a la de las plantas silvestres, igual que ocurrió en sustratos con una cantidad menor de fosfato. Por tanto, la mayor o menor presencia de SA en las raíces de plantas micorrizadas no varió el efecto inhibitorio de fósforo sobre la micorrización, por lo que probablemente el efecto inhibitorio del fosfato sea independiente de la acción del SA.

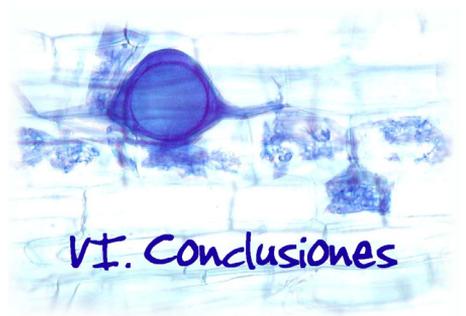
De forma similar, el incremento en la cantidad de fósforo disponible en el sustrato, inhibió en igual proporción tanto la micorrización de plantas de tomate silvestres como de mutantes NR insensibles al etileno. La micorrización en plantas NR fue superior a la de los silvestres independientemente de los niveles de fósforo disponible en el suelo, y la menor sensibilidad al etileno en las raíces de plantas de tomate micorrizadas no varió el efecto inhibitorio de fósforo sobre la micorrización, por lo que es probable que la vía de inhibición de la micorrización mediada por el fósforo sea independiente a la del etileno.

Como resumen de lo discutido en este capítulo, se ha demostrado que la regulación de la micorrización no se debe solo a la simple acción de rutas independientes que la inhiban, o activen, como puede ocurrir con el SA y el ABA, sino a un equilibrio en la activación de distintas rutas, donde la activación de una de ellas inhibe o regula la de otras. Los resultados presentados en la memoria de esta Tesis doctoral confirman la capacidad de la planta de combinar distintas rutas hormonales para determinar respuestas específicas frente a la micorrización, al igual que ocurre frente a otros estímulos ambientales. La comprensión de cualquier ruta requiere también conocer las interacciones que establece con otras rutas, y como se regulan esas interacciones desde un punto de vista molecular.

En la figura V.1, se resumen la mayoría de las conclusiones de este trabajo de investigación, y las posibles formas de regulación de la micorrización que se deducen de los resultados del presente estudio.



Figura V.1: Red de señalización que regula la micorrización. En la parte superior de la figura se representa la red de señales que regula la micorrización, donde las elipses representan a las distintas moléculas señal estudiadas, en marrón se representa la ruta del fósforo, en azul oscuro la del SA que afecta negativamente a las rutas del JA (en naranja) y del etileno (en azul claro), y en verde se representa la del ABA que inhibe a la síntesis de etileno. El JA afecta a la señalización y síntesis del etileno. Las flechas representan a la ruta de señalización de cada molécula señal que activa (+) o inhibe (-) a la micorrización. Las líneas discontinuas se refieren a las interacciones mutuas entre las moléculas señal que afectan tanto a las rutas de señalización como a la síntesis, y pueden actuar activando (+) o inhibiendo (-). En la parte inferior de la figura se representan las distintas etapas de la micorrización (penetración del hongo en la raíz, y formación y funcionalidad de los arbuscúlos) sobre los que actúa cada ruta de señalización, bien activando la micorrización (+), bien inhibiéndola (-).



VI. Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

1. El grado y tipo de alteración de la micorrización, debido a la variación de los niveles endógenos de ácido salicílico de la planta, sugiere que este compuesto es importante en etapas iniciales de la micorrización, como la penetración del hongo arbuscular en la raíz.
2. Durante la micorrización de *Pisum sativum* por *G. intraradices*, la alteración en el programa simbiótico de la planta por mutación en los genes *Sym30* y *Sym19*, cuya expresión se produce en etapas tempranas de la micorrización, conlleva la alteración de la respuesta de ciertos genes de defensa regulados por ácido salicílico.
3. La expresión constitutiva del gen de defensa PRms no incrementa la capacidad de resistencia de plantas de arroz y tabaco a la infección por hongos arbusculares, a diferencia de lo que ocurre con hongos patógenos. Por el contrario, la sobre-expresión de PRms favorece la micorrización de las plantas, posiblemente como consecuencia de un incremento en la disponibilidad de azúcares para el hongo micorrízico.
4. El etileno participa en funciones múltiples y antagónicas que intervienen en la regulación de la simbiosis entre *S. lycopersicum* y *G. intraradices*: Por un lado, favorece el inicio de la micorrización, y por otro, inhibe el desarrollo de la simbiosis afectando a la funcionalidad de los arbusculos, entre otros valores. En la acción del etileno durante la micorrización tienen un papel esencial y determinante los receptores de etileno, entre los cuales es probable que cada tipo influya de distinta forma en la micorrización.
5. El efecto del ácido jasmónico sobre el desarrollo de la simbiosis entre *S. lycopersicum* y *G. intraradices* es dosis-dependiente: La aplicación en raíz de bajas concentraciones de metil jasmonato favorece el desarrollo de la micorrización, incrementándose los puntos de infección; Sin embargo, tanto la aplicación en raíz de altas concentraciones de metil jasmonato, como la activación sistémica de la respuesta a metil jasmonato, inhiben la micorrización. La regulación de la micorrización es dependiente de la correcta funcionalidad de la ruta de señalización activada por el ácido jasmónico.
6. El ácido abscísico es necesario en la formación de la simbiosis entre *S. lycopersicum* y *G. intraradices*, participando en la formación completa de los arbusculos y en su correcta funcionalidad.

7. La regulación de la simbiosis entre *S. lycopersicum* y *G. intraradices* no se debe solo a la acción independiente de las rutas de señalización de cada fitohormona, sino a combinación de distintas rutas hormonales en la planta que determina respuestas específicas para la micorrización. De este modo: los niveles de ácido salicílico afectan a la señalización de etileno y ácido jasmónico durante la micorrización; La respuesta al ácido jasmónico afecta a la señalización del etileno durante la micorrización, ya que parte de los efectos positivos o negativos del ácido jasmónico sobre la micorrización posiblemente se deban a la inhibición o inducción transitoria de la síntesis de etileno; Y parte del efecto del ácido abscísico durante la formación de los arbusculos muy probablemente se deba a su acción antagonista sobre la síntesis de etileno.

8. El efecto inhibitor del fósforo sobre la micorrización de *S. lycopersicum* por *G. intraradices* es independiente de los niveles de ácido salicílico y de la capacidad de percepción de etileno de la planta.



VII. Bibliografía

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abel, S., Ticconi, C.A., y Delatorre, C.A. (2002) Phosphate sensing in higher plants. *Physiologia Plantarum*. **115**: 1-8.
- Abeles, F.B., Morgan, P.W., y Saltveit, M.E. (1992) Ethylene in plant biology. Academic Press. San Diego
- Adams-Phillips, L.C., Barry, C., Kannan, P., Leclercq, J., Bouzayen, M., y Giovannoni, J. (2004) Evidence that CTR1-mediated ethylene signal transduction in tomato is encoded by a multigene family whose members display distinct regulatory features. *Plant Molecular Biology*. **54**: 387-404.
- Adie, B., Pérez-Pérez, J., Pérez-Pérez, M., Godoy, M., Sánchez-Serrano, J.J., Hmelz, E., y Solano, R. (2007a) ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **19**: 1665-1681.
- Adie, B., Chico, J.M., Rubio-Somoza, I., y Solano, R. (2007b) Modulation of plant defenses by ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation*. **26**: 160-177.
- Akiyama, K., Matsuzaki, K., y Hayashi, H. (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*. **435**: 824-827.
- Albinsky, D., Masson, J.E., Bogucki, A., Afsar, K., Vass, I., Nagy, F., y Paszkowski, J. (1999) Plant responses to genotoxic stress are linked to an ABA/salinity signaling pathway. *The Plant Journal*. **17**: 73-82.
- Albrecht, C., Geurts, R., Lapeyrie, F., y Bisseling, T. (1998) Endomycorrhizae and rhizobial Nod factors both require SYM8 to induce the expression of the early nodulin genes *PsENOD5* and *PsENOD12A*. *The Plant Journal*. **15**: 605-614.
- 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.
- Allen, M.F. (1996) The ecology of arbuscular mycorrhizas: A look back into the 20th century and a peek into the 21st. *Mycological Research*. **100**: 769-782.
- Allen, M.F., Allen, E.B., y Friese, C.F. (1989) Responses of the 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.
- Alonso, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S., y Ecker, J.R. (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science*. **284**: 2148-2152.
- Alonso, J.M. y Stepanova, A.N. (2004) The Ethylene Signaling Pathway. *Science*. **306**: 1513-1515.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Solano, R., Wisman, E., Ferrari, S., Ausubel, F.M., y Ecker, J.R. (2003) Five components of the ethylene-response pathway identified in a screen for weak ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **100**: 2992-2997.

- Alwine, J.C., Kemp, D.J., y Stark, G.R. (1977)** Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **74**: 5350-5354.
- Ames, R.N., Reid, C.P.P., y Ingham, E.R. (1984)** Rhizosphere bacterial population responses to root colonization by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist*. **96**: 555-563.
- 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.
- Anderson, J.P., Badruzaufari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R., y Kazan, K. (2004)** Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-Ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **16**: 3460-3479.
- Andrade, G., Mihara, K.L., Linderman, R.G., y Bethlenfalvay, G.J. (1997)** Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*. **192**: 71-79.
- Andrade, G., Mihara, K.L., Linderman, R.G., y Bethlenfalvay, G.J. (1998)** Soil aggregation status and rhizobacteria in the mycorrhizosphere. *Plant and Soil*. **202**: 89-96.
- Ane, J.M., Kiss, G.B., Riely, B.K., Penmetza, R.V., Oldroyd, G.E.D., 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* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science*. **303**: 1364-1367.
- Aono, T., Maldonado-Mendoza, I.E., Dewbre, G.R., Harrison, M.J., y Saito, M. (2004)** Expression of alkaline phosphatase genes in arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist*. **162**: 525-534.
- Arines, J., Quintela, M., Vilariño, A., y Palma, J.M. (1994)** Protein patterns and superoxide dismutase activity in non-mycorrhizal and arbuscular mycorrhizal *Pisum sativum* L. plants. *Plant and Soil*. **166**: 37-45.
- Armstrong, L. y Peterson, R.L. (2002)** The interface between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and root cells of *Panax quinquefolius*: a Paris-type mycorrhizal association. *Mycologia*. **94**: 587-595.
- Aroca, R., Porcel, R., y Ruiz-Lozano, J.M. (2007)** How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses. *New Phytologist*. **173**: 808-816.
- Arriagada, C., Herrera, M., Borie, F., y Ocampo, J.A. (2007)** Contribution of arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi to the aluminum resistance of eucalyptus globulus. *Water, Air, and Soil Pollution*. **182**: 383-394.
- Asai, T., Stone, J.M., Heard, J.E., Kovtun, Y., Yorgey, P., Sheen, J., y Ausubel, F.M. (2000)** Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell*. **12**: 1823-1835.
- Assante, G., Merlini, L., y Nasini, G. (1977)** (+)-Abscisic acid, a metabolite of the fungus *Cercospora rosicola*. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. **33**: 1556-1557.
- Audenaert, K., De Meyer, G.B., y Hofte, M.M. (2002)** Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to botrytis cinerea and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiology*. **128**: 491-501.
- Auge, R.M., Stodola, A.J.W., Tims, J.E., y Saxton, A.M. (2001)** Moisture retention properties of a mycorrhizal soil. *Plant and Soil*. **230**: 87-97.
- Azcón-Aguilar, C. y Barea, J.M. (1997)** Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens - an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*. **6**:

- 457-464.
- Azcón-Aguilar, C., Díaz-Rodríguez, R.M., y Barea, J.M. (1986)** Effect of free-living fungi on the germination of *Glomus mosseae* on soil extract. *En: Physiological and genetical aspects of mycorrhizae: proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae. Editores: Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. INRA, Dijon, Francia. 515-519*
- 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.
- Baath, E. y Hayman, D.S. (1983)** Plant-growth responses to vesicular arbuscular mycorrhiza .14. Interactions with verticillium wilt on tomato plants. *New Phytologist. 95:* 419-426.
- Baath, E. y Hayman, D.S. (1984)** No effect of VA mycorrhiza on red core disease of strawberry. *Transactions of the British Mycological Society. 82:* 534-536.
- Bago, B., Azcón-Aguilar, C., Goulet, A., y Piche, Y. (1998a)** Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist. 139:* 375-388.
- Bago, B., Azcón-Aguilar, C., y Piche, Y. (1998b)** Architecture and developmental dynamics of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions. *Mycologia. 90:* 52-62.
- Bago, B., Pfeffer, P., y Shachar-Hill, Y. (2001)** Could the urea cycle be translocating nitrogen in the arbuscular mycorrhizal symbiosis? *New Phytologist. 149:* 4-8.
- Bago, B., Pfeffer, P.E., Abubaker, J., Jun, J., Allen, J.W., Brouillette, J., Douds, D.D., Lammers, P.J., y Shachar-Hill, Y. (2003)** Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiology. 131:* 1496-1507.
- Bago, B., Zipfel, W., Williams, R.M., Jun, J., Arreola, R., Lammers, P.J., Pfeffer, P.E., y Shachar-Hill, Y. (2002)** Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology. 128:* 108-124.
- Balestrini, R., Romera, C., Puigdomènech, 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.
- Ballester, A.R., Lafuente, M.T., y González-Candelas, L. (2006)** Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit-*Penicillium digitatum* interaction. *Postharvest Biology and Technology. 39:* 115-124.
- Bano, A. y Harper, J.E. (2002)** Plant growth regulators and phloem exudates modulate root nodulation of soybean. *Functional Plant Biology. 29:* 1299-1307.
- Bano, A., Harper, J.E., Auge, R.M., y Neuman, D.S. (2002)** Changes in phytohormone levels following inoculation of two soybean lines differing in nodulation. *Functional Plant Biology. 29:* 965-974.
- 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.
- Barker, S.J., Stummer, B., Gao, L., Dispain, I., O'Connor, P.J., y Smith, S.E. (1998)** A mutant in *Lycopersicon esculentum* Mill. with highly reduced VA mycorrhizal colonization:

- isolation and preliminary characterisation. *The Plant Journal*. **15**: 791-797.
- Barry, C.S., Llop-Tous, M.I., y Grierson, D. (2000)** The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiology*. **123**: 979-986.
- Beaudoin, N., Serizet, C., Gosti, F., y Giraudat, J. (2000)** Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *The Plant Cell*. **12**: 1103-1116.
- 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., Azcón-Aguilar, C., y Ferrol, N. (2000)** Alterations in the plasma membrane polypeptide pattern of tomato roots (*Lycopersicon esculentum*) during the development of arbuscular mycorrhiza. *Journal of Experimental Botany*. **51**: 747-754.
- Benhamou, N., Fortin, J.A., Hamel, C., St-Arnaud, M., y Shatilla, A. (1994)** Resistance responses to mycorrhizal Ri T-DNA-transformed carrot roots to infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. chrysanthemi. *Phytopathology*. **84**: 958-968.
- Berrocal-Lobo, M. y Molina, A. (2004)** Ethylene response factor 1 mediates *Arabidopsis* resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **17**: 763-770.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A., y Solano, R. (2002)** Constitutive expression of Ethylene-Response-Factor1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant Journal*. **29**: 23-32.
- Berta, G., Fusconi, A., y Trotta, A. (1993)** VA mycorrhizal infection and the morphology and function of root systems. *Environmental and Experimental Botany*. **33**: 159-173.
- Berta, G., Trotta, A., Fusconi, A., Hooker, J.E., Munro, M., Atkinson, D., Giovannetti, M., Moroni, S., Fortuna, P., y Tisserant, B. (1995)** Arbuscular mycorrhizal induced changes to plant growth and root system morphology in *Prunus cerasifera*. *Tree Physiology*. **15**: 281-293.
- Besserer, A., Puech-Pages, V., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A., Roy, S., Portais, J.C., Roux, C., Becard, G., y Sejalon-Delmas, N. (2006)** Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLOS Biology*. **4**: 1239-1247.
- Bethlenfalvay, G.J. y Linderman, R.G. (1992)** Mycorrhizae in sustainable agriculture. American Society of Agronomy : Crop Science Society of America : Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin, USA
- Bever, J.D. (2002)** Host-specificity of AM fungal population growth rates can generate feedback on plant growth. *Plant and Soil*. **244**: 281-290.
- Beyle, H. (1995)** The role of phytohormones in the function and biology of mycorrhizas. *En: Mycorrhiza structure, function, molecular biology and biotechnology. Editores: Varma, A. y Hock, B. Springer-Verlag, Berlin.* 365-390
- Beyle, H.F., Smith, S.E., Peterson, R.L., y Franco, C.M.M. (1995)** Colonization of *Orchis morio* protocorms by a mycorrhizal fungus - Effects of nitrogen nutrition and glyphosate in modifying the responses. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique*. **73**: 1128-1140.
- Bianciotto, V., Bandi, C., Minerdi, D., Sironi, M., Tichy, H.V., y Bonfante, P. (1996)** An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**: 3005-3010.
- Bianciotto, V., Barbiero, G., y Bonfante, P. (1995)** Analysis of the cell cycle in an arbuscular mycorrhizal fungus by flow cytometry and bromodeoxyuridine labelling. *Protoplasma*. **188**: 161-169.
- Bianciotto, V. y Bonfante, P. (1993)** Evidence of DNA replication in an arbuscular

- mycorrhizal fungus in the absence of the host plant. *Protoplasma*. **176**: 100-105.
- Bianciotto, V., Lumini, E., Lanfranco, L., Minerdi, D., Bonfante, P., y Perotto, S.** (2000) Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the family *Gigasporaceae*. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**: 4503-4509.
- Bidartondo, M.I., Redecker, D., Hijri, I., Wiemken, A., Bruns, T.D., Dominguez, L., Sersic, A., Leake, J.R., y Read, D.J.** (2002) Epiparasitic plants specialized on arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*. **419**: 389-392.
- 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.
- Blee, K.A. y Anderson, A.J.** (1996) Defense-related transcript accumulation in *Phaseolus vulgaris* L. colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith. *Plant Physiology*. **110**: 675-688.
- Blilou, I., Bueno, P., Ocampo, J.A., y García-Garrido, J.M.** (2000a) Induction of catalase and ascorbate peroxidase activities in tobacco roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal *Glomus mosseae*. *Mycological Research*. **104**: 722-725.
- Blilou, I., Ocampo, J.A., y García-Garrido, J.M.** (1999) Resistance of pea roots to endomycorrhizal fungus or *Rhizobium* correlates with enhanced levels of endogenous salicylic acid. *Journal of Experimental Botany*. **50**: 1663-1668.
- Blilou, I., Ocampo, J.A., y García-Garrido, J.M.** (2000b) Induction of Ltp (lipid transfer protein) and Pal (phenylalanine ammonia-lyase) gene expression in rice roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Journal of Experimental Botany*. **51**: 1969-1977.
- Bodker, L., Kjoller, R., y Rosendahl, S.** (1998) Effect of phosphate and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on disease severity of root rot of peas (*Pisum sativum*) caused by *Aphanomyces euteiches*. *Mycorrhiza*. **8**: 169-174.
- Bohlmann, H., Vignutelli, A., Hilpert, B., Miersch, O., Wasternack, C., y Apel, K.** (1998) Wounding and chemicals induce expression of the *Arabidopsis thaliana* gene Thi2.1, encoding a fungal defense thionin, via the octadecanoid pathway. *FEBS Letters*. **437**: 281-286.
- Boller, T.** (1991) Ethylene in pathogenesis and disease resistance. *En: The plant hormone ethylene*. Editores: Mattoo, A.K. y Suttle, J.C. CRC Press, Boca Raton, 293-314
- 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., Balestrini, R., y Mend Gen, K.** (1994) Storage and secretion processes in the spore of *Gigaspora margarita* Becker & Hall as revealed by high-pressure freezing and freeze substitution. *New Phytologist*. **128**: 93-101.
- 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **13**: 1109-1120.
- 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 Puigdomènech, P.** (1996) Transcriptional activation of a maize alpha-tubulin gene in mycorrhizal maize and transgenic tobacco plants. *The Plant Journal*. **9**: 737-743.
- 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, Florida. 5-33
- Bothe, H., Klingner, A., Kaldorf, M., Schmitz, O., Esch, H., Hundeshagen, B., y Kernebeck, H. (1994)** Biochemical approaches to the study of plant-fungal interactions in arbuscular mycorrhiza. *Experientia*. **50**: 919-925.
- Bowling, S.A., Clarke, J.D., Liu, Y.D., Klessig, D.F., y Dong, X.N. (1997)** The cpr5 mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell*. **9**: 1573-1584.
- Bradbury, S.M., Peterson, R.L., y Bowley, S.R. (1991)** Interactions between three alfalfa nodulation genotypes and two *Glomus species*. *New Phytologist*. **119**: 115-120.
- Brader, G., Tas, E., y Palva, E.T. (2001)** Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in *Arabidopsis* by culture filtrates of the nonspecific pathogen *Erwinia carotovora*. *Plant Physiology*. **126**: 849-860.
- Brading, P.A., Hammond-Kosack, K.E., Parr, A., y Jones, J.D.G. (2000)** Salicylic acid is not required for Cf-2- and Cf-9-dependent resistance of tomato to *Cladosporium fulvum*. *Plant Journal*. **23**: 305-318.
- Brechenmacher, L., Weidmann, S., Van Tuinen, D., Chatagnier, O., Gianinazzi, S., Franken, P., y Gianinazzi-Pearson, V. (2004)** Expression profiling of up-regulated plant and fungal genes in early and late stages of *Medicago truncatula*-*Glomus mosseae* interactions. *Mycorrhiza*. **14**: 253-262.
- Breuninger, M., Trujillo, C.G., Serrano, E., Fischer, R., y Requena, N. (2004)** Different nitrogen sources modulate activity but not expression of glutamine synthetase in arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Genetics and Biology*. **41**: 542-552.
- Brogue, K., Chet, I.L.A.N., Holliday, M.A.R.K., Cressman, R., Biddle, P.H.Y.L., Knowlton, S., Mauvais, C.J., y Broglie, R. (1991)** Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science*. **254**: 1194-1197.
- Brundrett, 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.
- 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**: 693-8.
- Burke, D.J., Hamerlynck, E.P., y Hahn, D. (2002)** Interactions among plant species and microorganisms in salt marsh sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**: 1157-1164.
- Buzi, A., Chilosi, G., De Sillo, D., y Magro, P. (2004)** Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. *Journal of Phytopathology*. **152**: 34-42.
- Caba, J.M., Recalde, L., y Ligeró, F. (1998)** Nitrate-induced ethylene biosynthesis and the control of nodulation in alfalfa. *Plant Cell and Environment*. **21**: 87-93.
- Caba, J.M., Centeno, M.L., Fernández, B., Gresshoff, P.M., y Ligeró, F. (2000)** Inoculation and nitrate alter phytohormone levels in soybean roots: differences between a supernodulating mutant and the wild type. *Planta*. **211**: 98-104.
- Calvet, C., Pera, J., y Barea, J.M. (1993)** Growth response of marigold (*tagetes-erecta* l) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. *Plant and Soil*. **148**: 1-6.
- Cancel, J.D. y Larsen, P.B. (2002)** Loss-of-function mutations in the ethylene receptor ETR1 cause enhanced sensitivity and exaggerated response to ethylene in *Arabidopsis*.

- Plant Physiology*. **129**: 1557-1567.
- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S., y Dong, X. (1994)** Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *The Plant Cell*. **6**: 1583-1592.
- Carling, D.E. y Brown, M.F. (1982)** Anatomy and physiology of vesicular-arbuscular and nonmycorrhizal roots. *Phytopathology*. **72**: 1108-1114.
- Caron, M., Fortin, J.A., y Richard, C. (1986a)** Effect of *Glomus intraradices* on infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* in tomatoes over a 12-week period. *Canadian Journal of Botany*. **64**: 552-556.
- Caron, M., Fortin, J.A., y Richard, C. (1986b)** Effect of phosphorus concentration and *Glomus intraradices* on *Fusarium* crown and root rot of tomatoes. *Phytopathology*. **76**: 942-946.
- Carpenter-Boggs, L., Loynachan, T.E., y Stahl, P.D. (1995)** Spore germination of *Gigaspora margarita* stimulated by volatiles of soil-isolated actinomycetes. *Soil Biology and Biochemistry*. **27**: 1445-1451.
- Carvalho, L.M., Caçador, I., y Martins-Loução, M.A. (2001)** Temporal and spatial variation of arbuscular mycorrhizas in salt marsh plants of the Tagus estuary (Portugal). *Mycorrhiza*. **11**: 303-309.
- Casacuberta, J.M., Puigdomènech, P., y Segundo, B.S. (1991)** A gene coding for a basic pathogenesis-related (PR-like) protein from *Zea mays*. Molecular cloning and induction by a fungus (*Fusarium moniliforme*) in germinating maize seeds. *Plant Molecular Biology*. **16**: 527-536.
- Casacuberta, J.M., Raventós, D., Puigdomènech, P., y Segundo, B.S. (1992)** Expression of the gene encoding the pr-like protein prms in germinating maize embryos. *Molecular and General Genetics*. **234**: 97-104.
- Catford, J.G., Staehelin, C., Lerat, S., Piche, Y., y Vierheilig, H. (2003)** Suppression of arbuscular mycorrhizal colonization and nodulation in split-root systems of alfalfa after pre-inoculation and treatment with Nod factors. *Journal of Experimental Botany*. **54**: 1481-1487.
- Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, R.V., Journet, E.P., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C., y Denarie, J. (2000)** Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. *The Plant Cell*. **12**: 1647-1666.
- Chabot, S., Becard, G., y Piche, Y. (1992)** Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. *Mycologia*. **84**: 315-321.
- Chang, C., Kwok, S.F., Bleecker, A.B., y Meyerowitz, E.M. (1993)** *Arabidopsis* ethylene-response gene Etr1 - similarity of product to 2-component regulators. *Science*. **262**: 539-544.
- Charbonneau, G.A. y Newcomb, W. (1985)** Growth regulators in developing effective root nodules of the garden pea (*Pisum sativum* L.). *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*. **180**: 667-681.
- 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.
- Chen, Y.F., Randlett, M.D., Findell, J.L., y Schaller, G.E. (2002)** Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*. **277**: 19861-19866.
- Cheong, J.J. y Choi, Y.D. (2003)** Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in Genetics*. **19**: 409-413.

- Ciardi, J.A., Tieman, D.M., Jones, J.B., y Klee, H.J. (2001)** Reduced expression of the tomato ethylene receptor gene LeETR4 enhances the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **14**: 487-495.
- Clapp, J.P., Rodríguez, A., y Dodd, J.C. (2002)** Glomales rRNA gene diversity - all that glisten's is not necessarily glomalean? *Mycorrhiza*. **12**: 269-270.
- Clark, R.B. y Zeto, S.K. (2000)** Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of Plant Nutrition*. **23**: 867-902.
- 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*. *The 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, A., Plant, A.L., Moses, M.S., y Bray, E.A. (1991)** Organ-specific and environmentally regulated expression of two abscisic acid-induced genes of tomato : Nucleotide sequence and analysis of the corresponding cDNAs. *Plant Physiology*. **97**: 1367-1374.
- Cohen, Y., Gisi, U., y Niderman, T. (1993)** Local and Systemic Protection Against *Phytophthora*-Infestans Induced in Potato and Tomato Plants by Jasmonic Acid and Jasmonic Methyl-Ester. *Phytopathology*. **83**: 1054-1062.
- Conconi, A., Smerdon, M.J., Howe, G.A., y Ryan, C.A. (1996)** The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. *Nature*. **383**: 826-829.
- Conrath, U., Pieterse, C.M.J., y Mauch-Mani, B. (2002)** Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*. **7**: 210-216.
- Cordier, C., Gianinazzi, S., y Gianinazzi-Pearson, V. (1996)** Colonisation patterns of root tissues by *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* related to reduced disease in mycorrhizal tomato. *Plant and Soil*. **185**: 223-232.
- Cordier, C., Pozo, M.J., Gianinazzi, S., y Gianinazzi-Pearson, V. (1998)** Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **11**: 1017-1028.
- Corkidi, L. y Rincón, E. (1997)** Arbuscular mycorrhizae in a tropical sand dune ecosystem on the Gulf of Mexico. *Mycorrhiza*. **7**: 9-15.
- Cowan, A., Cairns, A., y Bartels-Rahm, B. (1999)** Regulation of abscisic acid metabolism: towards a metabolic basis for abscisic acid-cytokinin antagonism. *Journal of Experimental Botany*. **50**: 595-603.
- Cristescu, S.M., De Martinis, D., Hekkert, S.T., Parker, D.H., y Harren, F.J.M. (2002)** Ethylene production by *Botrytis cinerea* in vitro and in tomatoes. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**: 5342-5350.
- Crocoll, C., Kettner, J., y Dörffling, K. (1991)** Abscisic acid in saprophytic and parasitic species of fungi. *Phytochemistry*. **30**: 1059-1060.
- Cruz, A.F., Ishii, T., y Kadoya, K. (2000)** Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on tree growth, leaf water potential, and levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and ethylene in the roots of papaya under water-stress conditions. *Mycorrhiza*. **10**: 121-123.
- Cutler, A.J. y Krochko, J.E. (1999)** Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science*. **4**: 472-478.

- da Silva, G., Lumini, E., Maia, L., Bonfante, P., y Bianciotto, V. (2006) Phylogenetic analysis of *Glomeromycota* by partial LSU rDNA sequences. *Mycorrhiza*. **16**: 183-189.
- Dalpé, Y., Diop, T.A., Plenchette, C., y Gueye, M. (2000) Glomales species associated with surface and deep rhizosphere of *Faidherbia albida* in Senegal. *Mycorrhiza*. **10**: 125-129.
- Dangar, T.K. y Basu, P.S. (1984) Seasonal changes and metabolism of plant hormones in root nodules of *Lens* sp. *Biologia Plantarum*. **26**: 253-259.
- Dangar, T.K. y Basu, P.S. (1987) Studies on plant-growth substances, IAA metabolism and nitrogenase activity in root-nodules of *Phaseolus aureus* roxb. var. *mungo*. *Biologia Plantarum*. **29**: 350-354.
- Dangl, J.L. y Jones, J.D.G. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*. **411**: 826-833.
- Daniell, T.J., Husband, R., Fitter, A.H., y Young, J.P.W. (2001) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiology Ecology*. **36**: 203-209.
- 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 of Plant Physiology*. **141**: 39.
- 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*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **11**: 489-497.
- David-Schwartz, R., Gadkar, V., Wininger, S., Bendov, R., Galili, G., Levy, A.A., y Kapulnik, Y. (2003) Isolation of a premycorrhizal infection (*pmi2*) mutant of tomato, resistant to arbuscular mycorrhizal fungal colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **16**: 382-388.
- Davis, R.M. y Menge, J.A. (1980) Influence of *Glomus fasciculatus* and soil-phosphorus on *Phytophthora* root-rot of citrus. *Phytopathology*. **70**: 447-452.
- Davis, R.M., Menge, J.A., y Erwin, D.C. (1979) Influence of *Glomus fasciculatus* and soil-phosphorus on *Verticillium* wilt of cotton. *Phytopathology*. **69**: 453-456.
- Davis, R.M., Menge, J.A., y Zentmyer, G.A. (1978) Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on *Phytophthora* root-rot of three crop plants. *Phytopathology*. **68**: 1614-1617.
- Dean, J.V., Devarenne, T.P., Lee, I.S., y Orlofsky, L.E. (1995) Properties of a 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.
- Dehne, H.W. (1982) Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant-pathogens. *Phytopathology*. **72**: 1115-1119.
- Dehne, H.W. y Schonbeck, F. (1979) Influence of endotrophic mycorrhiza on plant diseases. II. Phenol metabolism and lignification [*Fusarium oxysporum*]. *Journal of Phytopathology*. **95**: 210-216.
- Delaney, T.P., Friedrich, L., y Ryals, J.A. (1995) *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **92**: 6602-6606.
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gutrella, M., Kessmann, H., Ward, E., y Ryals, J. (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*. **266**: 1247-1250.
- Delaney, T.P. (2000) New mutants provide clues into regulation of systemic acquired

- resistance. *Trends in Plant Science*. **5**: 49-51.
- Delp, G., Smith, S.E., y Barker, S.J. (2000)** Isolation by differential display of three partial cDNAs potentially coding for proteins from the VA mycorrhizal *Glomus intraradices*. *Mycological Research*. **104**: 293-300.
- 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, V.L. y Garbaye, J. (1989)** Microorganisms stimulating the establishment of mycorrhizal symbiosis - A review. *European Journal of Forest Pathology*. **19**: 54-64.
- Devadas, S.K., Enyedi, A., y Raina, R. (2002)** The *Arabidopsis* hrl1 mutation reveals novel overlapping roles for salicylic acid, jasmonic acid and ethylene signalling in cell death and defence against pathogens. *The Plant Journal*. **30**: 467-480.
- Devoto, A., Nieto-Rostro, M., Xie, D.X., 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.
- Dietrich, R.A., Delaney, T.P., Uknes, S.J., Ward, E.R., Ryals, J.A., y Dangi, J.L. (1994)** *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance responses. *Cell*. **77**: 565-577.
- Dixon, R.A. y Harrison, M.J. (1994)** Early events in the activation of plant defense responses. *Annual Review of Phytopathology*.: 479-501.
- Dixon, R.K., Garrett, H.E., y Cox, G.S. (1989)** Boron fertilization, vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization and growth of *Citrus jambhiri* Lush. *Journal of Plant Nutrition*. **12**: 687-700.
- Doares, S.H., Narvaezvasquez, 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.
- Dorffling, K. (1984)** Abscisic acid in phytopathogenic fungi of the genera *Botrytis*, *Ceratocystis*, *Fusarium*, and *Rhizoctoma*. *Zeitschrift für Naturforschung, Section C, Biosciences*. **39**: 683-684.
- Douds, D.D., Galvez, L., Becard, G., y Kapulnik, Y. (1998)** Regulation of arbuscular mycorrhizal development by plant host and fungus species in alfalfa. *New Phytologist*. **138**: 27-35.
- Douds, D.D., Galvez, L., Franke-Snyder, M., Reider, C., y Drinkwater, L.E. (1997)** Effect of compost addition and crop rotation point upon VAM fungi. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. **65**: 257-266.
- Douds, D.D. y Nagahashi, G. (2000)** Signaling and recognition events prior to colonization of roots by arbuscular mycorrhiza fungi. *En: Current avances in Mycorrhizae Research*. Editores: Podila, G.K. y Douds, D.D. APP Press, St. Paul, USA. 127-140
- Drennan, D.S.H. y Norton, C. (1972)** Effect of Ethrel on Nodulation in *Pisum-Sativum* l. *Plant and Soil*. **36**: 53-&.
- Droby, S., Porat, R., Cohen, L., Weiss, B., Shapiro, B., Philosoph-Hadas, S., y Meir, S. (1999)** Suppressing green mold decay in grapefruit with postharvest jasmonate application. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. **124**: 184-188.
- Duc, G., Trouvelot, A., Gianinazzi-Pearson, V., y Gianinazzi, S. (1989)** First report of non-mycorrhizal plant mutants (Myc-) obtained in pea (*Pisum sativum* L.) and fababean (*Vicia faba* L.). *Plant Science*. **60**: 215-222.
- 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.
- Dutra, P.V., Abad, M., Almela, V., y Agusti, M. (1996)** Auxin interaction with the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith improves vegetative growth of two citrus rootstocks. *Scientia Horticulturae*. **66**: 77-83.
- Eason, W.R., Newman, E.I., y Chuba, P.N. (1991)** Specificity of interplant cycling of phosphorus - the role of mycorrhizas. *Plant and Soil*. **137**: 267-274.
- 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 the American Society for Horticultural Science*. **109**: 587-590.
- 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.
- Elias, K.S. y Safir, G.R. (1987)** Hyphal elongation of *Glomus fasciculatus* in response to root exudates. *Applied and Environmental Microbiology*. **53**: 1928-1933.
- 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.
- Elsen, A., Declerck, S., y De Waele, D. (2001)** Effects of *Glomus intraradices* on the reproduction of the burrowing nematode (*Radopholus similis*) in dioxenic culture. *Mycorrhiza*. **11**: 49-51.
- Engvild, K.C. (1987)** Nodulation and Nitrogen-Fixation Mutants of Pea, *Pisum-Sativum*. *Theoretical and Applied Genetics*. **74**: 711-713.
- Epple, P., Apel, K., y Bohlmann, H. (1995)** An Arabidopsis-Thaliana Thionin Gene Is Inducible Via A Signal-Transduction Pathway Different from That for Pathogenesis-Related Proteins. *Plant Physiology*. **109**: 813-820.
- Esch, H., Hundeshagen, B., Schneider-Poetsh, H., 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.
- Estabrook, E.M. y Sengupta-Gopalan, C. (1991)** Differential expression of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase during soybean nodule development. *The Plant Cell*. **3**: 299-308.
- Fang, Y. y Hirsch, A.M. (1998)** Studying early nodulin gene ENOD40 expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa. *Plant Physiology*. **116**: 53-68.
- 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*. **87**: 7713-7716.
- Fearn, J.C. y LaRue, T.A. (1991)** Ethylene inhibitors restore nodulation to sym-5 mutants of *Pisum-Sativum* l Cv Sparkle. *Plant Physiology*. **96**: 239-244.
- Ferrol, N., Barea, J.M., y Azcón-Aguilar, C. (2000)** The plasma membrane H⁺ ATPase gene family in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Current Genetics*. **37**: 112-118.
- Fester, T. y Hause, G. (2005)** Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. *Mycorrhiza*. **15**: 373-379.
- Fester, T., Maier, W., y Strack, D. (1999)** Accumulation of secondary compounds in barley and wheat roots in response to inoculation with an arbuscular mycorrhizal fungus and co-inoculation with rhizosphere bacteria. *Mycorrhiza*. **8**: 241-246.
- Fester, T., Schmidt, D., Lohse, S., Walter, M., Giuliano, G., Bramley, P., Fraser, P.,**

- Hause, B., y Strack, D. (2002)** Stimulation of carotenoid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots. *Planta*. **216**: 148-154.
- Fester, T., Strack, D., y Hause, B. (2001)** Reorganization of tobacco root plastids during arbuscule development. *Planta*. **213**: 864-868.
- 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.J.F., 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.
- Fidantsef, A.L., Stout, M.J., Thaler, J.S., Duffey, S.S., y Bostock, R.M. (1999)** Signal interactions in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **54**: 97-114.
- Fitze, D., Wiepning, A., Kaldorf, M., y Ludwig-Müller, J. (2005)** Auxins in the development of an arbuscular mycorrhizal symbiosis in maize. *Journal of Plant Physiology*. **162**: 1210-1219.
- Forster, S.M. y Nicolson, T.H. (1981)** Aggregation of sand from a maritime embryo sand dune by microorganisms and higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*. **13**: 199-203.
- Fortin, J.A., Becard, G., Declerck, S., Dalpe, Y., St Arnaud, M., Coughlan, A.P., y Piche, Y. (2002)** Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Canadian Journal of Botany*. **80**: 1-20.
- Francis, R. y Read, D.J. (1994)** The contributions of mycorrhizal fungi to the determination of plant community structure. *Plant and Soil*. **159**: 11-25.
- Frank, B. (1885)** Über die auf Wurselsymbiosen beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Ber Dtsch Bot Ges.*
- Franken, P. y Gnädinger, F. (1994)** Analysis of parsley arbuscular endomycorrhiza: infection development and mRNA levels of defense-related genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **7**: 612-620.
- Franken, P., Lapopin, L., Meyer-Gauen, G., y Gianinazzi-Pearson, V. (1997)** RNA accumulation and genes expressed in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora rosea*. *Mycologia*. **89**: 293-297.
- Frederick, R.D., Thilmony, R.L., Sessa, G., y Martin, G.B. (1998)** Recognition specificity for the bacterial avirulence protein AvrPto is determined by Thr-204 in the activation loop of the tomato Pto kinase. *Molecular Cell*. **2**: 241-245.
- Fritz, M., Jakobsen, I., Lyngkjaer, M., Thordal-Christensen, H., y Pons-Kuhnemann, J. (2006)** Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. *Mycorrhiza*. **16**: 413-419.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., y Ryals, J. (1993)** Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*. **261**: 754-756.
- Gallaud, J. (1905)** Étude sur les mycorrhizes endotrophes. *Rev. Gén. Bot.* **17**: 5-48.
- Gao, Z., Chen, Y.F., Randlett, M.D., Zhao, X.C., Findell, J.L., Kieber, J.J., y Schaller, G.E. (2003)** Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. *The Journal Of Biological Chemistry*. **278**: 34725-34732.
- García, I.V. y Mendoza, R. (2007)** Arbuscular mycorrhizal fungi and plant symbiosis in a saline-sodic soil. *Mycorrhiza*. **17**: 167-174.

- García-Garrido, J.M., García-Romera, I., y Ocampo, J.A. (1992)** Cellulase production by the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol and Gerd) Gerd and Trappe. *New Phytologist*. **121**: 221-226.
- 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. (1989)** Effect of VA mycorrhizal infection of tomato on damage caused by *Pseudomonas syringae*. *Soil Biology and Biochemistry*. **21**: 165-167.
- García-Garrido, J.M. y Ocampo, J.A. (2002)** Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal Experimental Botany*. **53**: 1377-86.
- García-Garrido, J.M. y Vierheilig, H. (2007)** From a germinating spore to an established arbuscular mycorrhiza: Signalling and regulation. *En: Advances in mycorrhizal biotechnology: a Canadian perspective*. Editores: Khasa, D., Piche, Y., y Coughlan, A. Research Press (En prensa), Ottawa.
- García-Romera, I., García-Garrido, J.M., Martínez-Molina, E., y Ocampo, J.A. (1991)** Production of pectolytic enzymes in lettuce root colonized by *Glomus mosseae*. *Soil Biology and Biochemistry*. **23**: 597-601.
- Garg, N. y Geetanjali. (2007)** Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signaling. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. **27**: 59-68.
- Garmendia, I., Aguirreolea, J., y Goicoechea, N. (2006)** Defence-related enzymes in pepper roots during interactions with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Verticillium dahliae*. *Biocontrol*. **51**: 293-310.
- Garriok, M.L., Peterson, R.L., y Ackerley, C.A. (1989)** Early stages in colonization of *Allium porrum* (leek) roots by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*. *New Phytologist*. **112**: 85-92.
- Gaur, A. y Adholeya, A. (2002)** Arbuscular-mycorrhizal inoculation of five tropical fodder crops and inoculum production in marginal soil amended with organic matter. *Biology and Fertility of Soils*. **35**: 214-218.
- Gazey, C., Abbott, L.K., y Robson, A.D. (2004)** Indigenous and introduced arbuscular mycorrhizal fungi contribute to plant growth in two agricultural soils from south-western Australia. *Mycorrhiza*. **14**: 355-362.
- 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 mycorrhizas as a result of exogenous ethylene treatment. *Mycorrhiza*. **11**: 137-143.
- Genre, A. y Bonfante, P. (1997)** A mycorrhizal fungus changes microtubule orientation in tobacco root cells. *Protoplasma*. **199**: 30-38.
- Genre, A. y Bonfante, P. (1998)** Actin versus tubulin configuration in arbuscule-containing cells from mycorrhizal tobacco roots. *New Phytologist*. **140**: 745-752.
- 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.
- Ghassemian, M., Nambara, E., Cutler, S., Kawaide, H., Kamiya, Y., y McCourt, P. (2000)** Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **12**: 1117-1126.
- Gianinazzi, S. (1991)** Vesicular-arbuscular (Endo-) mycorrhizas - cellular, biochemical and

- genetic-aspects. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. **35**: 105-119.
- 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. & Gerd.). *New Phytologist*. **82**: 127-132.
- Gianinazzi-Pearson, V. (1996)** Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *The Plant Cell*. **8**: 1871-1883.
- Gianinazzi-Pearson, V., Arnould, C., Oufattole, M., Arango, M., y Gianinazzi, S. (2000)** Differential activation of H⁺-ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco. *Planta*. **211**: 609-613.
- Gianinazzi-Pearson, V., Branzanti, B., y Gianinazzi, S. (1989)** In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis*. **7**: 243-255.
- Gianinazzi-Pearson, V., Smith, S.E., Gianinazzi, S., y Smith, F.A. (1991a)** Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas. V. Is H⁺-ATPase a component of ATP-hydrolysing enzyme activities in plant-fungus interfaces? *New Phytologist*. **117**: 61-74.
- Gianinazzi-Pearson, V., Dumas-Gaudot, E., Gollotte, A., Alaqui, A.T., y Gianinazzi, S. (1996)** Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. **133**: 45-57.
- Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. (1978)** Enzymatic studies on the metabolism of vesicular arbuscular mycorrhiza. II. soluble alkaline phosphatase specific to mycorrhizal infection in onion roots. *Physiological Plant Pathology*. **12**: 45-53.
- Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S., Guillemin, J.P., Trouvelot, A., y Duc, G. (1991b)** Genetic and cellular analysis of resistance to vesicular arbuscular (VA) mycorrhizal fungi in pea mutants. *En: Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. *Editores*: Hennecke, H. DPS Verma, Dordrecht, Netherlands. 42
- Gianinazzi-Pearson, V., Gollote, A., Lherminier, J., Tisserant, B., Franken, P., Dumas-Gaudot, E., Van Tuinen, D., y Gianinazzi, S. (1995)** Cellular and molecular approaches in the characterization of symbiotic events in functional arbuscular mycorrhizal associations. *Canadian Journal of Botany*. **73**: S526-S532.
- Gianinazzi-Pearson, V., Tahiri-Alaoui, A., Antoniw, J.F., Gianinazzi, S., y Dumas, E. (1992)** Weak expression of the pathogenesis related PR-b1 gene and localization of related protein during symbiotic endomycorrhizal interactions in tobacco roots. *Endocyt Cell Res*. **8**: 177-185.
- 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. y Mosse, B. (1980)** An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *The New phytologist*. **84**: 489-500.
- Giovannetti, M.A., Sbrana, C.R., Avio, L.U., Citernes, A.S., y Logi, C.A. (1993)** Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytologist*. **125**: 587-593.
- Giovannetti, M.A., Sbrana, C.R., Citernes, A.S., y Avio, L.U. (1996)** Analysis of factors involved in fungal recognition responses to host-derived signals by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. **133**: 65-71.
- Giovannetti, M.A., Sbrana, C.R., y Logi, C.A. (1994)** Early processes involved in host recognition by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. **127**: 703-709.
- Glazebrook, J., Rogers, E.E., y Ausubel, F.M. (1996)** Isolation of *Arabidopsis* mutants

- with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics*. **143**: 973-982.
- Godt, D.E. y Roitsch, T. (1997)** Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism. *Plant Physiology*. **115**: 273-282.
- Gollotte, A., Gianinazzi-Pearson, V., Giovannetti, M., Sbrana, C., Avio, L.U., y Gianinazzi, S. (1993)** Cellular localization and cytochemical probing of resistance reactions to arbuscular mycorrhizal fungi in a 'locus a' myc- mutant of *Pisum sativum* L. *Planta*. **191**: 112-122.
- Gómez-Roldán, V., Puech, V., Girard, D., Bouwmeester, H., Bécard, G., y Roux, C. (2006)** How essential are strigolactones in the arbuscular mycorrhizal symbiosis? *En: Fifth International Conference on Mycorrhiza. Editores: Barea, J.M., Azcón, C., Gutiérrez, F., González, F., y Molina, A.J. Gráficas Zaidín, Granda, España.* 56
- González-Guerrero, M., Azcón-Aguilar, C., Mooney, M., Valderas, A., MacDiarmid, C.W., Eide, D.J., y Ferrol, N. (2005)** Characterization of a *Glomus intraradices* gene encoding a putative Zn transporter of the cation diffusion facilitator family. *Fungal Genetics and Biology*. **42**: 130-140.
- González-Pasayo, R. y Martínez-Romero, E. (2000)** Multiresistance genes of *Rhizobium etli* CFN42. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **13**: 572-577.
- Govindarajulu, 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.
- Graham, J. y Egel, D.S. (1988)** *Phytophthora* root rot development on mycorrhizal and phosphorus-fertilized nonmycorrhizal sweet orange seedlings. *Plant Disease*. **72**: 611-614.
- Graham, J.H., Leonard, R.T., y Menge, J.A. (1981)** Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Plant Physiology*. **68**: 548-552.
- Greenberg, J.T., Silverman, F.P., y Liang, H. (2000)** Uncoupling salicylic acid-dependent cell death and defense-related responses from disease resistance in the *Arabidopsis* mutant *acd5*. *Genetics*. **156**: 341-350.
- Gu, Y.Q., Yang, C., Thara, V.K., Zhou, J., y Martin, G.B. (2000)** *Pti4* is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the *Pto* kinase. *Plant Cell*. **12**: 771-785.
- Guadarrama, P. y Álvarez-Sánchez, F.J. (1999)** Abundance of arbuscular mycorrhizal fungi spores in different environments in a tropical rain forest, Veracruz, Mexico. *Mycorrhiza*. **8**: 267-270.
- Guenoune, D., Galili, S., Phillips, D.A., Volpin, H., Chet, I., Okon, Y., y Kapulnik, Y. (2001)** The defense response elicited by the pathogen *Rhizoctonia solani* is suppressed by colonization of the AM-fungus *Glomus intraradices*. *Plant Science*. **160**: 925-932.
- Güimil, S., Chang, H.S., Zhu, T., Sesma, A., Osbourn, A., Roux, C., Ioannidis, V., Oakeley, E.J., Docquier, M., Descombes, P., Briggs, S.P., y Paszkowski, U. (2005)** Comparative transcriptomics of rice reveals an ancient pattern of response to microbial colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **102**: 8066-8070.
- Guinel, F.C. y Geil, R.D. (2002)** A model for the development of the rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses in legumes and its use to understand the roles of ethylene in the establishment of these two symbioses. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique*. **80**: 695-720.
- Guinel, F.C. y LaRue, T.A. (1992)** Ethylene inhibitors partly restore nodulation to pea

- mutant E107 (Brz). *Plant Physiology*. **99**: 515-518.
- Guinel, F.C. y Sloetjes, L.L. (2000)** Ethylene is involved in the nodulation phenotype of *Pisum sativum* R50 (sym 16), a pleiotropic mutant that nodulates poorly and has pale green leaves. *Journal of Experimental Botany*. **51**: 885-894.
- 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*. **89**: 2389-2393.
- 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.
- Gutierrez-Martínez, P., Lopez-Gomez, R., y Gomez-Lim, M.A. (2001)** Identification of an ETR1-homologue from mango fruit expressing during fruit ripening and wounding. *Journal of Plant Physiology*. **158**: 101-108.
- Guttenberger, M. (2000)** Arbuscules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi inhabit an acidic compartment within plant roots. *Planta*. **211**: 299-304.
- Hahn, M. y Mendgen, K. (2001)** Signal and nutrient exchange at biotrophic plant-fungus interfaces. *Current Opinion in Plant Biology*. **4**: 322-327.
- Hanahan, D. (1983)** Studies on Transformation of Escherichia-Coli with Plasmids. *Journal of Molecular Biology*. **166**: 557-580.
- Harbone, J.B. (1980)** Plant phenolics. *En: Secondary plant products*. Editores: Bell, E.A. y Charlwood, B.V. Springer Verlag, Berlin. 329-402
- Harley, J.L. y Smith, S.E. (1983)** Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press Inc. London and New York
- Harms, K., Ramirez, I., y Pena-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.
- Harrier, L.A., Wright, F., y Hooker, J.E. (1998)** Isolation of the 3-phosphoglycerate kinase gene of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerdemann & Trappe. *Current Genetics*. **34**: 386-392.
- Harrison, M. (1999)** Biotrophic interfaces and nutrient transport in plant/fungal symbioses. *Journal of Experimental Botany*. **50**: 1013-1022.
- Harrison, M. y Van Buuren, M.L. (1995)** A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature*. **378**: 626-629.
- Harrison, M.J. (1996)** A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *The Plant Journal*. **9**: 491-503.
- Harrison, M.J. (2005)** Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology*. **59**: 19-42.
- Harrison, M.J., Dewbre, G.R., y Liu, J. (2002)** A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *The Plant Cell*. **14**: 2413-2429.
- Harrison, M.J. y Dixon, R.A. (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**: 643-654.
- Harrison, M.J. y Dixon, R. (1994)** Spatial patterns of expression of flavonoid/isoflavonoid pathway genes during interactions between roots of *Medicago truncatula* and the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *The Plant Journal*. **6**: 9-20.
- 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. *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*. **68**: 101-110.
- Hayman, D.S. (1982)** Influence of soils and fertility on activity and survival of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytopathology*. **72**: 1119-1125.
- He, P., Chintamanani, S., Chen, Z.Y., Zhu, L.H., Kunkel, B.N., Alfano, J.R., Tang, X.Y., y Zhou, J.M. (2004)** Activation of a COI1-dependent pathway in *Arabidopsis* by *Pseudomonas syringae* type III effectors and coronatine. *Plant Journal*. **37**: 589-602.
- Heidstra, R., Yang, W.C., Yalcin, Y., Peck, S., Emons, A.M., Van Kammen, A., y Bisseling, T. (1997)** Ethylene provides positional information on cortical cell division but is not involved in Nod factor-induced root hair tip growth in *Rhizobium*-legume interaction. *Development*. **124**: 1781-1787.
- Heijden, M., Boller, T., Wiemken, A., y Sanders, I.R. (1998)** Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology*. **79**: 2082-2091.
- Helgason, T., Watson, I.J., y Young, J.P.W. (2003)** Phylogeny of the *Glomerales* and *Diversisporales* (Fungi : *Glomeromycota*) from actin and elongation factor 1-alpha sequences. *Fems Microbiology Letters*. **229**: 127-132.
- Henfling, J.W.D.M. (1980)** Effect of abscisic-acid on rishitin and lubimin accumulation and resistance to *Phytophthora infestans* and *Cladosporium cucumerinum* in potato-tuber tissue-slices. *Phytopathology*. **70**: 1074-1078.
- 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., Pena Cortes, 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.
- Hewitt, E.J. (1952)** Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. *Em: Technical communication* (Commonwealth bureau of horticulture and plantation crops) , 22. Commonwealth Agricultural Bureaux (Farnham Royal, Bucks), Gran Bretaña. 547
- Hijri, M. y Sanders, I.R. (2004)** The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is haploid and has a small genome size in the lower limit of eukaryotes. *Fungal Genetics and Biology*. **41**: 253-261.
- Hildebrandt, U., Regvar, M., y Bothe, H. (2007)** Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*. **68**: 139-146.
- Hirsch, A.M., Fang, Y., Asad, S., y Kapulnik, Y. (1997)** The role of phytohormones in plant-microbe symbioses. *Plant and Soil*. **194**: 171-184.
- Hodge, A., Campbell, C.D., y Fitter, A.H. (2001)** An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature*. **413**: 297-299.
- Hoffman, T., Schmidt, J.S., Zheng, X.Y., y Bent, A.F. (1999)** Isolation of ethylene-insensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for-gene disease resistance. *Plant Physiology*. **119**: 935-949.
- Hohnjec, N., Perlick, A.M., Puhler, A., y Kuster, H. (2003)** The *Medicago truncatula* sucrose synthase gene MtSucS1 is activated both in the infected region of root nodules

- and in the cortex of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **16**: 903-915.
- Hohnjec, N., Vieweg, 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.
- Holford, I.C.R. (1997) Soil phosphorus: Its measurement, and its uptake by plants. *Australian Journal of Soil Research*. **35**: 227-239.
- Hua, J., Chang, C., Sun, Q., y Meyerowitz, E.M. (1995) Ethylene insensitivity conferred by *Arabidopsis ers* gene. *Science*. **269**: 1712-1714.
- Hua, J. y Meyerowitz, E.M. (1998) Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*. **94**: 261-271.
- Hua, J., Sakai, H., Nourizadeh, S., Chen, Q.H.G., Bleecker, A.B., Ecker, J.R., y Meyerowitz, E.M. (1998) EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **10**: 1321-1332.
- Huang, Y., Li, H., Hutchison, C.E., Laskey, J., y Kieber, J.J. (2003) Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: For Cell And Molecular Biology*. **33**: 221-233.
- Huq, E., Hossain, M.A., Hirayama, L., y Hoges, T.R. (1997) Characterization of a cDNA encoding a polyubiquitin gene in rice. *Plant Physiology*. **113**: 305.
- Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A., y Metraux, J.P. (2003) Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **16**: 851-858.
- Imaizumi-Anraku, H., Takeda, N., Charpentier, M., Perry, J., Miwa, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murakami, Y., Mulder, L., Vickers, K., Pike, J., Allan Downie, J., 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.
- Imhof, S. (1999) Root morphology, anatomy and mycotrophy of the achlorophyllous *Voyria aphylla* L (Jacq.) Pers. (*Gentianaceae*). *Mycorrhiza*. **9**: 33-39.
- Isayenkov, S., Fester, T., y Hause, B. (2004) Rapid determination of fungal colonization and arbuscule formation in roots of *Medicago truncatula* using real-time (RT) PCR. *Journal of Plant Physiology*. **161**: 1379-1383.
- 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.
- Ivashuta, S., Liu, J., Liu, J., Lohar, D.P., Haridas, S., Bucciarelli, B., VandenBosch, K.A., Vance, C.P., Harrison, M.J., y Gantt, J.S. (2005) RNA interference identifies a calcium-dependent protein kinase involved in *Medicago truncatula* root development. *The Plant Cell*. **17**: 2911-2921.
- Jabaji-Hare, S., Deschene, A., y Kendrick, B. (1984) Lipid content and composition of vesicles of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycologia*. **76**: 1024-1030.
- Jacobi, L., Petrova, O., Tsyganov, V., Borisov, A., y Tikhonovich, I. (2003a) Effect of mutations in the pea genes *Sym33* and *Sym40*. I Arbuscular mycorrhiza formation and

- function. *Mycorrhiza*. **13**: 3-7.
- Jacobi, L., Zubkova, L., Barmicheva, E., Tsyganov, V., Borisov, A., y Tikhonovich, I. (2003b)** Effect of mutations in the pea genes *Sym33* and *Sym40*. II Dynamics of arbuscule development and turnover. *Mycorrhiza*. **13**: 9-16.
- Jakobsen, I., Abbott, L.K., y Robson, A.D. (1992)** External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L.. 1. Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. *New Phytologist*. **120**: 371-380.
- Javot, H., Penmetsa, R.V., Terzaghi, N., Cook, D.R., y Harrison, M.J. (2007)** A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **104**: 1720-1725.
- Jeffries, P. y Barea, J.M. (2001)** Arbuscular mycorrhiza- A key component of sustainable plant-soil ecosystems. *En: The Mycota, Vol. IX: Fungal associations. Editores: Hock, B. Springer-Verlag, Berlín.* 95-113
- Jentschel, K., Thiel, D., Rehn, F., y Ludwig-Muller, J. (2007)** Arbuscular mycorrhiza enhances auxin levels and alters auxin biosynthesis in *Tropaeolum majus* during early stages of colonization. *Physiologia Plantarum*. **129**: 320-333.
- Jiang, X.Y., Omarov, R.T., Zhazira Yesbergenova, S., y Sagi, M. (2004)** The effect of molybdate and tungstate in the growth medium on abscisic acid content and the Mo-hydroxylases activities in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science*. **167**: 297-304.
- Jirage, D., Zhou, N., Cooper, B., Clarke, J.D., Dong, X.N., y Glazebrook, J. (2001)** Constitutive salicylic acid-dependent signaling in *cpr1* and *cpr6* mutants requires PAD4. *Plant Journal*. **26**: 395-407.
- Johansen, A., Finlay, R., y Olsson, P.A. (1996)** Nitrogen metabolism of external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist*. **133**: 705-712.
- Johnson, D., Leake, J.R., Ostle, N., Ineson, P., y Read, D.J. (2002)** In situ ¹³C₂ pulse-labelling of upland grassland demonstrates a rapid pathway of carbon flux from arbuscular mycorrhizal mycelia to the soil. *New Phytologist*. **153**: 327-334.
- Journet, E.P., El-Gachtouli, N., Vernoud, V., de Billy, F., Pichon, M., Dedieu, A., Arnould, C., Morandi, D., Barker, D.G., y Gianinazzi-Pearson, V. (2001)** *Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **14**: 737-748.
- Kaldorf, M., Schmelzer, E., y Bothe, H. (1998)** Expression of maize and fungal nitrate reductase genes in arbuscular mycorrhiza. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **11**: 439-448.
- Kaldorf, M., Zimmer, W., y Bothe, H. (1994)** Genetic-evidence for the occurrence of assimilatory nitrate reductase in arbuscular mycorrhizal and other fungi. *Mycorrhiza*. **5**: 23-28.
- Kaldorf, M. y Ludwig-Müller, J. (2000)** AM fungi might affect the root morphology of maize by increasing indole-3-butyric acid biosynthesis. *Physiologia Plantarum*. **109**: 58-67.
- Kapoor, R. y Bhatnagar, A. (2007)** Attenuation of cadmium toxicity in mycorrhizal celery (*Apium graveolens* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **23**: 1083-1089.
- Kapulnic, Y., Volpin, H., Itzhaki, H.A.N.N., Ganon, D.A.N.A., Galili, S.H.M.U., David, R.A.K.E., Shaul, O., Elad, Y.I.G.A., Chet, I.L.A.N., y Okon, Y. (1996)** Suppression of defence responses in mycorrhizal alfalfa and tobacco roots. *New Phytologist*. **133**: 59-64.
- Kapulnic, Y., David, R., Shaul, O., Sinvany, G., Ganon, D., Ginzberg, I., Galili, S., Badani, H., Wininger, S., y Ben-Dor, B. (1998)** Induction and suppression of gene expression in alfalfa and tobacco endomycorrhizal fungal communication. *En: Second*

- International Conference on Mycorrhiza. *Editores*: Ahonen-Jonnarth, U., Danell, E., Frasson, P., Karén, O., Lindahl, B., Rangel, I., y Finlay, R. SLU Service/repro, Uppsala, Uppsala, Sweden. 95
- 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.
- Kay, R., Chan, A., Daly, M., y McPherson, J. (1987)** Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science*. **236**: 1299-1302.
- Kazuya, I., Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., Kreis, M., Zhang, S., y Hirt, H. (2002)** Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science*. **7**: 301-308.
- Kende, H. (1993)** Ethylene Biosynthesis. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. **44**: 283-307.
- Kendrick, B. y Berch, S. (1985)** Mycorrhizae: Applications in agriculture and forestry. *En: Comprehensive biotechnology : the principles, applications, and regulations of biotechnology in industry, agriculture, and medicine / editor-in-chief. Editores*: Moo-Young, M. Oxford [Oxfordshire] : Pergamon, 109-152
- Kessler, A. y Baldwin, I.T. (2002)** Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology*. **53**: 299-328.
- Kettner, J. y Dörffling, K. (1995)** Biosynthesis and metabolism of abscisic acid in tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Planta*. **196**: 627-634.
- Khan, A.G. (1993)** Occurrence and importance of mycorrhizae in aquatic trees of New South Wales, Australia. *Mycorrhiza*. **3**: 31-38.
- Kieber, J.J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K.A., y Ecker, J.R. (1993)** CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell*. **72**: 427-441.
- Kim, C.Y., Liu, Y.D., Thorne, E.T., Yang, H.P., Fukushige, H., Gassmann, W., Hildebrand, D., Sharp, R.E., y Zhang, S.Q. (2003)** Activation of a stress-responsive mitogen-activated protein kinase cascade induces the biosynthesis of ethylene in plants. *Plant Cell*. **15**: 2707-2718.
- Kinkema, M., Fan, W., y Dong, X. (2000)** Nuclear Localization of NPR1 Is Required for Activation of PR Gene Expression. *THE PLANT CELL*. **12**: 2339-2350.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C., y Stalpers, J.A. (2001)** Dictionary of the fungi. CABI Bioscience ; CAB International. Oxon, UK
- Kjoller, R. y Rosendahl, S. (1997)** The presence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* influences enzymatic activities of the root pathogen *Aphanomyces euteiches* in pea roots. *Mycorrhiza*. **6**: 487-491.
- Klee, H.J., Hayford, M.B., Kretzmer, K.A., Barry, G.F., y Kishore, G.M. (1991)** Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *Plant Cell*. **3**: 1187-1193.
- Klee, H. y Tieman, D. (2002)** The tomato ethylene receptor gene family: Form and function. *Physiologia Plantarum*. **115**: 336-341.
- Klee, H.J. (2002)** Control of ethylene-mediated processes in tomato at the level of receptors. *Journal of Experimental Botany*. **53**: 2057-2063.
- Kloek, A.P., Verbsky, M.L., Sharma, S.B., Schoelz, J.E., Vogel, J., Klessig, D.F., y Kunkel, B.N. (2001)** Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis*

- thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanisms. *Plant Journal*. **26**: 509-522.
- Kneer, R., Poulev, A.A., Olesinski, A., y Raskin, I. (1999)** Characterization of the elicitor-induced biosynthesis and secretion of genistein from roots of *Lupinus luteus* L. *Journal of Experimental Botany*. **50**: 1553-1559.
- Koda, Y. (1997)** Possible involvement of jasmonates in various morphogenic events. *Physiologia Plantarum*. **100**: 639-646.
- Köhler, R.H. y Hanson, M.R. (2000)** Plastid tubules of higher plants are tissue-specific and developmentally regulated. *Journal of Cell Science*. **113**: 81-89.
- Koide, R.T. y Dickie, I.A. (2002)** Effects of mycorrhizal fungi on plant populations. *Plant and Soil*. **244**: 307-317.
- Koske, R.E., Sutton, J.C., y Sheppard, B.R. (1975)** Ecology of *Endogone* in Lake Huron sand dunes. *Canadian Journal of Botany*. **53**: 87-93.
- Kosugi, S. y Ohashi, Y. (2000)** Cloning and DNA-binding properties of a tobacco Ethylene-Insensitive3 (EIN3) homolog. *Nucleic Acids Research*. **28**: 960-967.
- Kosuta, S., Chabaud, M., Lougnon, G., Gough, C., Denarie, J., Barker, D.G., y Becard, G. (2003)** A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*. **131**: 952-962.
- Kovtun, Y., Chiu, W.L., Zeng, W.K., y Sheen, J. (1998)** Suppression of auxin signal transduction by a MAPK cascade in higher plants. *Nature*. **395**: 716-720.
- Kozłowski, G., Buchala, A., y Metraux, J.P. (1999)** Methyl jasmonate protects Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] seedlings against *Pythium ultimum* Trow. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **55**: 53-58.
- Krajinski, F., Hause, B., Gianinazzi-Pearson, V., y Franken, P. (2002)** Mth1, a plasma membrane H⁺-ATPase gene from *Medicago truncatula*, shows arbuscule-specific induced expression in mycorrhizal tissue. *Plant Biology*. **4**: 754-761.
- Kuc, J. (2001)** Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *European Journal of Plant Pathology*. **107**: 7-12.
- Kuhn, G., Hijri, M., y Sanders, I.R. (2001)** Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*. **414**: 745-748.
- Lambais, M.R. y Mehdy, M.C. (1993)** Suppression of endochitinase, β -1,3-endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **6**: 75-83.
- Lambais, M.R. y Mehdy, M.C. (1996)** Soybean roots infected by *Glomus intraradices* strains differing in infectivity exhibit differential chitinase and β -1,3-glucanase expression. *New Phytologist*. **134**: 531-538.
- Lambais, M.R. y Mehdy, 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.
- Lammers, P.J., Jun, J., Abubaker, J., Arreola, R., Gopalan, A., Bago, B., Hernandez-Sebastia, C., Allen, J.W., Douds, D.D., Pfeffer, P.E., y Shachar-Hill, Y. (2001)** The glyoxylate cycle in an arbuscular mycorrhizal fungus. Carbon flux and gene expression. *Plant Physiology*. **127**: 1287-1298.
- Lanahan, M.B., Yen, H.C., Giovannoni, J.J., y Klee, H.J. (1994)** The Never Ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell*. **6**: 521-530.
- Landwehr, M., Hildebrandt, U., Wilde, P., Nawrath, K., Tóth, T., Biró, B., y Bothe, H. (2002)** The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus geosporum* in European saline, sodic

- and gypsum soils. *Mycorrhiza*. **12**: 199-211.
- 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 developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Plant Physiology*. **159**: 1329-1339.
- Lashbrook, C.C., Tieman, D.M., y Klee, H.J. (1998)** Differential regulation of the tomato ETR gene family throughout plant development. *Plant Journal*. **15**: 243-252.
- Leake, J.R. (1994)** The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist*. **127**: 171-216.
- Leclercq, J., Adams-Phillips, L.C., Zegzouti, H., Jones, B., Latche, A., Giovannoni, J.J., Pech, J.C., y Bouzayen, M. (2002)** LeCTR1, a tomato CTR1-like gene, demonstrates ethylene signaling ability in arabidopsis and novel expression patterns in tomato. *Plant Physiology*. **130**: 1132-1142.
- Lee, J.H. y Kim, W.T. (2001)** Molecular and biochemical characterization of VR-EILS encoding mung bean ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE proteins. *Plant Physiology*. **132**: 1475-1488.
- Lee, K.H. y LaRue, T.A. (1992a)** Exogenous ethylene inhibits nodulation of *Pisum-sativum* l Cv Sparkle. *Plant Physiology*. **100**: 1759-1763.
- Lee, K.H. y LaRue, T.A. (1992b)** Pleiotropic effects of Sym-17 - a mutation in *Pisum-sativum* l Cv Sparkle causes decreased nodulation, altered root and shoot growth, and increased ethylene production. *Plant Physiology*. **100**: 1326-1333.
- LeNoble, M.E., Spollen, W.G., y Sharp, R.E. (2003)** Maintenance of shoot growth by endogenous ABA: Genetic assessment of the involvement of the ethylene suppression. *Journal of Experimental Botany*. **55**: 237-245.
- Leon, J., Yalpani, N., Raskin, I., y Lawton, M.A. (1993)** Induction of benzoic acid 2-hydroxylase in virus-inoculated tobacco. *Plant Physiology*. **103**: 323-328.
- 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, A. y Heath, M.C. (1990)** Effect on plant growth regulators on the interactions between bean plants and rust fungi non-pathogenic on beans. *Physiology and Molecular Plant Pathology*. **37**: 245-254.
- Li, J., Brader, G., y Palva, E.T. (2004a)** The WRKY70 transcription factor: A node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell*. **16**: 319-331.
- 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, L., Li, C., Lee, G.I., y Howe, G.A. (2002)** Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **99**: 6416-6421.
- Li, L., Zhao, Y., McCaig, B.C., Wingerd, B.A., Wang, J., Whalon, M.E., Pichersky, E., y Howe, G.A. (2004b)** 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.
- Li, X., Zhang, Y., Clarke, J.D., Li, Y., y Dong, X. (1999)** Identification and cloning of a negative regulator of systemic acquired resistance, SNI1, through a screen for suppressors of npr1-1. *Cell*. **98**: 329-339.

- Lian, B., Zhou, X., Miransari, M., y Smith, D.L. (2000) Effects of salicylic acid on the development and root nodulation of soybean seedlings. *Journal of Agronomy and Crop Science*. **185**: 187-192.
- Ligero, F., Lluch, C., y Olivares, J. (1986) Evolution of ethylene from roots of *Medicago sativa* plants inoculated with *Rhizobium-meliloti*. *Journal of Plant Physiology*. **125**: 361-365.
- Liu, J., Maldonado-Mendoza, I.E., Lopez-Meyer, M., Cheung, F., Town, C.D., y Harrison, M.J. (2007) Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *The Plant Journal*. **50**: 529-544.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**: 3473-3479.
- Lohse, S., Hause, B., Hause, H., y Fester, T. (2006) FtsZ characterization and immunolocalization in the two phases of plastid reorganization in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant & cell physiology*. **47**: 1124-1134.
- Lohse, S., Schliemann, W., Ammer, C., Kopka, J., Strack, D., y Fester, T. (2005) Organization and metabolism of plastids and mitochondria in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*. **139**: 329-340.
- 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) Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Current Opinion in Plant Biology*. **8**: 532-540.
- Ludwig-Müller, J. (2000) Hormonal balance in plants during colonization by mycorrhizal fungi. *En: Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Editores: Kapulnic, Y. y Douds, D.D. Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands. 263-285
- Ludwig-Müller, J., Bennett, R.N., García-Garrido, J.M., Piche, Y., y Vierheilig, H. (2002) Reduced arbuscular mycorrhizal root colonization in *Tropaeolum majus* and *Carica papaya* after jasmonic acid application can not be attributed to increased glucosinolate levels. *Journal of Plant Physiology*. **159**: 517-523.
- Ludwig-Müller, J., Kaldorf, M., Sutter, 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., Schubert, B., y Pieper, K. (1995) Regulation of IBA synthetase from maize (*Zea mays* L.) by drought stress and ABA. *Journal of Experimental Botany*. **46**: 423-432.
- Lund, 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.
- MacDonald, R.M. y Lewis, M. (1978) Occurrence of some acid-phosphatases and dehydrogenases in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *New Phytologist*. **80**: 135-141.
- Mäder, P., Edenhofer, S., Boller, T., Wiemken, A., y Niggli, U. (2000) Arbuscular mycorrhizae in a long-term field trial comparing low-input (organic, biological) and high-input (conventional) farming systems in a crop rotation. *Biology and Fertility of Soils*. **31**: 150-156.
- 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.
- Maier, W., Peipp, H., Schmidt, J., Wray, V., y Strack, D. (1995) Levels of a terpenoid glycoside (Blumenin) and cell wall-bound phenolics in some cereal mycorrhizas. *Plant*

- Physiology*. **109**: 465-470.
- Maier, W., Schneider, B., y Strack, D. (1998)** Biosynthesis of sesquiterpenoid cyclohexenone derivatives in mycorrhizal barley roots proceeds via the glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate pathway. *Tetrahedron Letters*. **39**: 521-524.
- Malamy, J., Hennig, J., y Klessig, D.F. (1992)** Temperature-dependent induction of salicylic-acid and its conjugates during the resistance response to tobacco mosaic-virus infection. *Plant Cell*. **4**: 359-366.
- Maldonado-Mendoza, I.E., Dewbre, G.R., Blaylock, L., y Harrison, M.J. (2005)** Expression of a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene, Mt-XTH1, from *Medicago truncatula* is induced systemically in mycorrhizal roots. *Gene*. **345**: 191-197.
- Maldonado-Mendoza, I.E., Dewbre, G.R., y Harrison, M.J. (2001)** A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **14**: 1140-1148.
- Manthey, K., Krajinski, F., Hohnjec, N., Firnhaber, C., Puhler, A., Perlick, A.M., y Kuster, H. (2004)** Transcriptome profiling in root nodules and arbuscular mycorrhiza identifies a collection of novel genes induced during *Medicago truncatula* root endosymbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **17**: 1063-1077.
- Markwei, C.M. y LaRue, T.A. (1997)** Phenotypic characterization of sym 21, a gene conditioning shoot-controlled inhibition of nodulation in *Pisum sativum* cv. Sparkle. *Physiologia Plantarum*. **100**: 927-932.
- 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.
- Marschner, P. y Crowley, D.E. (1996)** Physiological activity of a bioluminescent *Pseudomonas fluorescens* (strain 2-79) in the rhizosphere of mycorrhizal and non-mycorrhizal pepper (*Capsicum annuum* L.). *Soil Biology and Biochemistry*. **28**: 869-876.
- Marschner, P., Crowley, D.E., y Higashi, R.M. (1997)** Root exudation and physiological status of a root-colonizing fluorescent pseudomonad in mycorrhizal and non-mycorrhizal pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant and Soil*. **189**: 11-20.
- Marsh, J.F. y Schultze, M. (2001)** Analysis of arbuscular mycorrhizas using symbiosis-defective plant mutants. *New Phytologist*. **150**: 525-532.
- Martínez-Abarca, F., Herrera-Cervera, J.A., Bueno, P., Sanjuan, J., Bisseling, T., y Olivares, J. (1998)** Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium meliloti* - Alfalfa symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **11**: 153-155.
- Martins, T.R. y Barkman, T.J. (2005)** Reconstruction of *Solanaceae* phylogeny using the nuclear gene SAMT. *Systematic Botany*. **30**: 435-447.
- 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**: 223-234.
- 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 orobanche spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiology*. **139**: 920-934.
- 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.

- Mauch-Mani, B. y Mauch, F. (2005)** The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion Plant Biology*. **8**: 409-414.
- Mayo, K., David, R., y Motta, J. (1986)** Stimulation of germination of spores of *Glomus versiforme* by spore-associated bacteria. *Mycologia*. **78**: 426-431.
- 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.
- McCarty, D.R. (1995)** Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **46**: 71-93.
- McConn, M. y Browse, J. (1996)** The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an arabidopsis mutant. *Plant Cell*. **8**: 403-416.
- McDonald, K.L. y Cahill, D.M. (1999)** Influence of abscisic acid and the abscisic acid biosynthesis inhibitor, norflurazon, on interactions between *Phytophthora sojae* and Soybean (*Glycine max*). *European Journal of Plant Pathology*. **105**: 651-658.
- 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.
- Meir, S., Droby, S., Davidson, H., Alsevia, S., Cohen, L., Horev, B., y Philosop-Hadas, S. (1998)** Suppression of *Botrytis* rot in cut rose flowers by postharvest application of methyl jasmonate. *Postharvest Biology and Technology*. **13**: 235-243.
- 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.
- Mellor, R.B. y Collinge, D.B. (1995)** A Simple-Model Based on Known Plant Defense Reactions Is Sufficient to Explain Most Aspects of Nodulation. *Journal of Experimental Botany*. **46**: 1-18.
- Melotto, M., Underwood, A., Koczan, J., Nomura, K., y He, S.Y. (2006)** Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*. **126**: 969-980.
- Mendgen, K., Hahn, M., y Deising, H. (1996)** Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*. **34**: 367-386.
- Metraux, J.P., Nawrath, C., y Genoud, T. (2002)** Systemic acquired resistance. *Euphytica*. **124**: 237-243.
- Meuwly, P., Molders, W., Buchala, A., y Metraux, J.P. (1995)** Local and systemic biosynthesis of salicylic acid in infected cucumber plants. *Plant Physiology*. **109**: 1107-1114.
- Meyer, J.R. y Linderman, R.G. (1986a)** Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. *Soil Biology and Biochemistry*. **18**: 185-190.
- Meyer, J.R. y Linderman, R.G. (1986b)** Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. *Soil Biology and Biochemistry*. **18**: 191-196.
- Miller, R.M. y Jastrow, J.D. (2000)** Mycorrhizal fungi influence soil structure. *En: Arbuscular mycorrhizas: Physiology and function. Editores: Kapulnik, Y. y Douds, D.D.* 3-18
- Minerdi, D., Fani, R., Gallo, R., y Bonfante, P. (1998)** Identification of nitrogen fixation genes in *Burkholderia* endosymbionts of arbuscular mycorrhizal fungi. *En: Second International Conference on Mycorrhiza. Editores: Ahonen-Jonnarth, U., Danell, E., Frasson, P., Karén, O., Lindahl, B., Rangel, I., y Finlay, R. SLU Service/repro, Uppsala, Uppsala, Sweden.* 120-121

- Mitra, R.M., Gleason, C.A., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, J.A., Oldroyd, G.E.D., y Long, S.R. (2004) A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **101**: 4701-4705.
- Mohr, P. y Cahill, D. (2007) Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in *Arabidopsis* infected with *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Functional and Integrative Genomics*. **7**: 181-191.
- Moore, S., Payton, P., Wright, M., Tanksley, S., y Giovannoni, J. (2005) Utilization of tomato microarrays for comparative gene expression analysis in the *Solanaceae*. *Journal of Experimental Botany*. **56**: 2885-2895.
- 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 mutants but not with its ethylene content in root. *Soil Biology and Biochemistry*. **39**: 786-792.
- Morandi, D. (1989) Effect of xenobiotics on endomycorrhizal infection and isoflavonoid accumulation in soybean roots. *Plant Physiology and Biochemistry*. **27**: 697-701.
- Morandi, D. (1996) Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control. *Plant and Soil*. **185**: 241-251.
- Morandi, D., Prado, E., Sagan, M., y Duc, G. (2005) Characterisation of new symbiotic *Medicago truncatula* (Gaertn.) mutants, and phenotypic or genotypic complementary information on previously described mutants. *Mycorrhiza*. **15**: 283-289.
- Morton, J.B. y Benny, G.L. (1990) Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Zygomycetes*): 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.
- Mosse, B. (1970) Honey-coloured, sessile Endogone spores: II. changes in fine structure during spore development. *Archiv für Mikrobiologie*. **74**: 129-145.
- 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
- Mur, L.A.J., Naylor, G., Warner, S.A.J., Sugars, J.M., White, R.F., y Draper, J. (1996) Salicylic acid potentiates defence gene expression in tissue exhibiting acquired resistance to pathogen attack. *The Plant Journal*. **9**: 559-571.
- Murillo, I., Cavallarin, L., y Segundo, B.S. (1997) The maize pathogenesis-related PRms protein localizes to plasmodesmata in maize radicles. *The Plant Cell*. **9**: 145-156.
- Murillo, I., Roca, R., Bortolotti, C., y Segundo, B.S. (2003) Engineering photoassimilate partitioning in tobacco plants improves growth and productivity and provides pathogen resistance. *The Plant Journal*. **36**: 330-341.
- Murphy, P.J., Langridge, P., y Smith, S.E. (1997) Cloning plant genes differentially expressed during colonization of roots of *Hordeum vulgare* by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist*. **135**: 291-301.
- Nagahashi, G. y Douds, D.D. (1997) Appressorium formation by AM fungi on isolated cell walls of carrot roots. *New Phytologist*. **136**: 299-304.
- 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.
- 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.
- Nagy, R., Karandashov, V., Chague, V., Kalinkevich, K., Tamasloukht, M.'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. *The Plant Journal*. **42**: 236-250.
- Nakatsuka, A., Murachi, S., Okunishi, H., Shiomi, S., Nakano, R., Kubo, Y., y Inaba, A. (1998)** Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiology*. **118**: 1295-1305.
- Nawrath, C. y Metraux, J.P. (1999)** Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *The Plant Cell*. **11**: 1393-1404.
- Nemec, S. (1987)** VA mycorrhizae in horticultural systems. *En: Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants. Editores: Gene y Safir. CRC Press. Boca de Raton, Florida.* 193-211
- Newman, E.I. (1966)** A method of estimating the total length of root in a sample. *Journal of Applied Ecology*. **3**: 139.
- Newsham, K., Fitter, A.H., y Watterson, A.R. (1995)** Arbuscular mycorrhiza protect an annual grass from root pathogenic fungi in the field. *Journal of Ecology*. **83**: 991-1000.
- Nicolson, T.H. y Johnston, C. (1979)** Mycorrhiza in the *Gramineae*. III. *Glomus fasciculatus* as the endophyte of pioneer grasses in a maritime sand dune. *Transactions of the British Mycological Society*. **72**: 261-268.
- Norman, J.R., Atkinson, D., y Hooker, J.E. (1996)** Arbuscular mycorrhizal fungal-induced alteration to root architecture in strawberry and induced resistance to the root pathogen *Phytophthora fragariae*. *Plant and Soil*. **185**: 191-198.
- Norman, J.R. y Hooker, J.E. (2000)** Sporulation of *Phytophthora fragariae* shows greater stimulation by exudates of non-mycorrhizal than by mycorrhizal strawberry roots. *Mycological Research*. **104**: 1069-1073.
- Norman-Setterblad, C., Vidal, S., y Palva, E.T. (2000)** Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **13**: 430-438.
- 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.
- Novikova, G.V., Moshkov, I.E., Smith, A.R., y Hall, M.A. (2000)** The effect of ethylene on MAPKinase-like activity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*. **474**: 29-32.
- Nukui, N., Ezura, H., Yuhashi, K.I., Yasuta, T., y Minamisawa, K. (2000)** Effects of ethylene precursor and inhibitors for ethylene biosynthesis and perception on nodulation in *Lotus japonicus* and *Macroptilium atropurpureum*. *Plant and Cell Physiology*. **41**: 893-897.
- O'Malley, R., Rodríguez, F.I., Esch, J.J., Binder, B.M., O'Donnell, P.J., Klee, H., y Bleecker, A.B. (2005)** Ethylene-binding activity, gene expression levels, and receptor system output for ethylene receptor family members from *Arabidopsis* and tomato. *The Plant Journal*. **41**: 651-659.
- Ocampo, J.A. (1980)** Effect of crop rotations involving host and non-host plants on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of host plants. *Plant and Soil*. **56**: 283-291.
- 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.
- Oetiker, J.H., Olson, D.C., Shiu, O.Y., y Yang, S.F. (1997)** Differential induction of seven 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes by elicitor in suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Molecular Biology*. **34**: 275-286.
- Ohme-Takagi, M. y Shinshi, H. (1995)** Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *The Plant Cell*. **7**: 173-182.
- Okamoto, M., Min, X., Seo, M., Nakabayashi, K., y Kamiya, Y. (2002)** Complementation of a tomato ABA-deficient *Sitiens* mutant by an *Arabidopsis* aldehyde oxidase gene, AAO3. *Plant and Cell Physiology*. **43**: S42.
- Okubara, P.A. y Paulitz, T.C. (2005)** Root defense responses to fungal pathogens: A molecular perspective. *Plant and Soil*. **274**: 215-226.
- 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 signalling in legumes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **5**: 566-576.
- Oldroyd, G.E.D., Engstrom, E.M., y Long, S.R. (2001)** Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*. **13**: 1835-1849.
- Olsson, P.A., Baath, E., y Jakobsen, I. (1997)** Phosphorus effects on the mycelium and storage structures of an arbuscular mycorrhizal fungus as studied in the soil and roots by analysis of fatty acid signatures. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**: 3531-3538.
- Olsson, P.A., Hansson, M.C., y Burleigh, S.H. (2006)** Effect of P availability on temporal dynamics of carbon allocation and *Glomus intraradices* high-affinity P transporter gene induction in arbuscular mycorrhiza. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**: 4115-4120.
- Olsson, P.A., Van Aarle, I.M., Allaway, W.G., Ashford, A.E., y Rouhier, H. (2002)** Phosphorus effects on metabolic processes in monoxenic arbuscular mycorrhiza cultures. *Plant Physiology*. **130**: 1162-1171.
- Ouaked, F., Rozhon, W., Lecourieux, D., y Hirt, H. (2003)** A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *The EMBO Journal*. **22**: 1282-1288.
- Parniske, M. (2004)** Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*. **7**: 414-421.
- Parthier, B. (1991)** Jasmonates, new regulators of plant growth and development: Many facts and few hypotheses on their actions. *Botanica Acta*. **104**: 446-454.
- Pasqualini, D., Uhlmann, A., y Sturmer, S.L. (2007)** Arbuscular mycorrhizal fungal communities influence growth and phosphorus concentration of woody plants species from the Atlantic rain forest in South Brazil. *Forest Ecology and Management*. **245**: 148-155.
- Paszkowski, U. (2006)** Mutualism and parasitism: the yin and yang of plant symbioses. *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.
- Paszkowski, U., Kroken, S., Roux, C., y Briggs, S.P. (2002)** Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **99**: 13324-13329.
- Paulitz, T.C. y Linderman, R.G. (1989)** Interactions between fluorescent pseudomonads and VA mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. **113**: 37-45.
- Pawlowska, T.E. y Taylor, J.W. (2004)** Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*. **427**: 733-737.
- Pearson, J.N. y Jakobsen, I. (1993)** The relative contribution of hyphae and roots to

- phosphorus uptake by arbuscular mycorrhizal plants, measured by dual labelling with ^{32}P and ^{33}P . *New Phytologist*. **124**: 489-494.
- Penmetza, R.V. y Cook, D.R. (1997)** A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science*. **275**: 527-530.
- Penninckx, I.A., Thomma, B.P.H.J., Buchala, A., Metraux, J.P., y Broekaert, W.F. (1998)** Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **10**: 2103-2114.
- Perotto, S., Bettini, V., Favaron, F., Alghisi, P., y Bonfante, P. (1995)** Polygalacturonase activity and location in arbuscular mycorrhizal roots of *Allium porrum* L. *Mycorrhiza*. **5**: 157-163.
- Perotto, S., Brewin, N.J., y Bonfante, P. (1994)** Colonization of pea roots by the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* and by *Rhizobium* bacteria: immunological comparison using monoclonal antibodies as probes for plant cell surface components. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **7**: 91-98.
- Peters, N.K. y Cristestes, D.K. (1989)** Nodule Formation Is Stimulated by the Ethylene Inhibitor Aminoethoxyvinylglycine. *Plant Physiology*. **91**: 690-693.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E., Sharma, S.B., Klessig, D.F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A.B., y Mundy, J. (2000)** Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell*. **103**: 1111-1120.
- Peterson, R., Massicotte, H.B., y Melville, L.H. (2004)** Mycorrhizas: anatomy and cell biology. NRC-CNRC. Ottawa
- Peterson, R., Uetake, Y., y Zelmer, C. (1998)** Fungal symbioses with orchid protocorms. *Symbiosis*. **25**: 29-55.
- Peterson, R.L. y Bradbury, S.M. (1995)** Use of plant mutants, intraspecific variants, and non-hosts in studying mycorrhiza formation and function. *En: Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Editores: Varma, A. y Hock, B. Springer-Verlag, Berlin. 157-180
- Peterson, R.L. y Guinel, F.C. (2000)** The use of plant mutants to study regulation of colonization by AM fungi. *En: Arbuscular mycorrhizas: Physiology and function*. Editores: Kapulnic, Y. y Douds, D.D. Kluwer Academic, Dordrech, Netherlands. 147-171
- Pfeffer, P.E., Douds, D.D., Becard, G., y Shachar-Hill, Y. (1999)** Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology*. **120**: 587-598.
- Phillips, D.A. (1971)** Abscisic acid inhibition of root nodule initiation in *Pisum sativum*. *Planta*. **100**: 181-190.
- Phillips, J.M. y Hayman, D.S. (1970)** Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*. **55**: 158-161.
- Pierik, R., Tholen, D., Poorter, H., Visser, E.J., y Voeselek, L.A. (2006)** The Janus face of ethylene: Growth inhibition and stimulation. *Trends in Plant Science*. **11**: 176-183.
- Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, N., Weisbeek, P.J., y Van Loon, L.C. (1998)** A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **10**: 1571-1580.
- Pieterse, C.M.J. y Van Loon, L.C. (2004)** NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*. **7**: 456-464.
- Pieterse, C.M.J., Van Pelt, J.A., Ton, J., Parchmann, S., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Metraux, 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.
- Pietikainen, A. y Kytoviita, 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 Vierheilig, 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.
- Pirozynski, K.A. y Malloch, D.W. (1975)** Origin of land plants: a matter of mycotrophism. *Biosystems*. **6**: 153-164.
- Porcel, R. y Ruiz-Lozano, J.M. (2004)** Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany*. **55**: 1743-1750.
- 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 Cell Physiology*. **40**: 850-858.
- Poulin, M.J., Simard, J., Catford, J.G., Labrie, F., y Piche, Y. (1997)** Response of symbiotic endomycorrhizal fungi to estrogens and antiestrogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **10**: 481-487.
- Pozo, M.J. y Azcón-Aguilar, C. (2007)** Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*. **10**: 393-398.
- Pozo, M.J., Azcón-Aguilar, C., Dumas-Gaudot, E., y Barea, J.M. (1998)** Chitosanase and chitinase activities in tomato roots during interactions with arbuscular mycorrhizal fungi or *Phytophthora parasitica*. *Journal of Experimental Botany*. **49**: 1729-1739.
- Pozo, M.J., Cordier, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi, S., Barea, J.M., y Azcón-Aguilar, C. (2002)** Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany*. **53**: 525-534.
- Pozo, M.J., Van Loon, L.C., y Pieterse, C.M.J. (2004)** Jasmonates - Signals in plant-microbe interactions. *Journal of Plant Growth Regulation*. **23**: 211-222.
- Press, C.M., Wilson, M., Tuzun, S., y Kloepper, J.W. (1997)** Salicylic acid produced by *Serratia marcescens* 90-166 is not the primary determinant of induced systemic resistance in cucumber or tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **10**: 761-768.
- Puppi, G., Azcón, R., y Höflich, G. (1994)** Management of positive interaction of arbuscular mycorrhizal fungi with essential groups of soil microorganisms. *En: Impact arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems. Editores: Gianinazzi, S. y Schuepp, H. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.* 201-215
- Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Felle, H.H., Umehara, Y., Gronlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., y Stougaard, J. (2003)** Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*. **425**: 585-592.
- Rains, K.C. y Bledsoe, C.S. (2007)** Rapid uptake of ¹⁵N-ammonium and glycine-¹³C, ¹⁵N by arbuscular and ericoid mycorrhizal plants native to a Northern California coastal pygmy forest. *Soil Biology and Biochemistry*. **39**: 1078-1086.
- Rambelli, A. (1973)** The Rhizosphere of mycorrhizae. *En: Ectomycorrhizae. Editores: Marks, G.L. y Koslowski, T.T. Academic Press, New York, New York.* 299-343
- Rao, M.V. y Davis, K.R. (2001)** The physiology of ozone induced cell death. *Planta*. **213**:

- 682-690.
- Raskin, I. (1992)** Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **43**: 439-463.
- Rasmussen, H.N. (2002)** Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil*. **244**: 149-163.
- Rasmussen, N., Lloyd, D., Ratcliffe, R., Hansen, P., y Jakobsen, I. (2000)** ³¹P NMR for the study of P metabolism and translocation in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*. **226**: 245-253.
- Rate, D.N., Cuenca, J.V., Bowman, G.R., Guttman, D.S., y Greenberg, J.T. (1999)** The gain-of-function *Arabidopsis* *acd6* mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signalling pathway in controlling cell death, defenses, and cell growth. *The Plant Cell*. **11**: 1695-1708.
- Rausch, C., Daram, P., Brunner, S., Jansa, J., Laloi, M., Leggewie, G., Amrhein, N., y Bucher, M. (2001)** A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature*. **414**: 462-466.
- Ravnskov, S., Nybroe, O., y Jakobsen, I. (1999)** Influence of an arbuscular mycorrhizal fungus on *Pseudomonas fluorescens* DF57 in rhizosphere and hyphosphere soil. *New Phytologist*. **142**: 113-122.
- Ravnskov, S., Wu, Y., y Graham, J.H. (2003)** Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect expression of genes coding for sucrose synthases in maize roots. *New Phytologist*. **157**: 539-545.
- Read, D.J., Duckett, J.G., Francis, R., Ligrone, R., y Russell, A. (2000)** Symbiotic fungal associations in 'lower' land plants. *Philosophical transactions of the Royal Society of London.B, Biological sciences*. **355**: 815-830.
- Redecker, D., Kodner, R., y Graham, L.E. (2000)** *Glomalean* fungi from the Ordovician. *Science*. **289**: 1920-1921.
- Regvar, M., Gogala, N.A.D.A., y Zalar, P. (1996)** Effects of jasmonic acid on mycorrhizal *Allium sativum*. *New Phytologist*. **134**: 703-707.
- 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., Breuninger, M., Franken, P., y Ocon, A. (2003)** Symbiotic status, phosphate, and sucrose regulate the expression of two plasma membrane H⁺-ATPase genes from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiology*. **132**: 1540-1549.
- Requena, N., Mann, P., y Franken, P. (2000)** A homologue of the cell cycle check point TOR2 from *Saccharomyces cerevisiae* exists in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Protoplasma*. **212**: 89-98.
- Resendes, C.M., Geil, R.D., y Guinel, F.C. (2001)** Mycorrhizal development in a low nodulating pea mutant. *New Phytologist*. **150**: 563-572.
- Reymond, P. y Farmer, E.E. (1998)** Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology*. **1**: 404-411.
- Rhodes, L.H. y Gerdemann, J.W. (1975)** Phosphate uptake zones of mycorrhizal and non-mycorrhizal onions. *New Phytologist*. **75**: 555-561.
- Riechmann, J.L. y Meyerowitz, E.M. (1998)** The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biological Chemistry*. **379**: 633-646.
- Rieu, I., Mariani, C., y Weterings, K. (2003)** Expression analysis of five tobacco EIN3 family members in relation to tissue-specific ethylene responses. *Journal of Experimental Botany*. **54**: 2239-2244.
- Rodríguez, R.L. y Tait, R.C. (1983)** Recombinant DNA techniques: an introduction.

Addison-Wesley.

- Rogers, E.E. y Ausubel, F.M. (1997)** *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants exhibit enhanced susceptibility to several bacterial pathogens and alterations in PR-1 gene expression. *The Plant Cell*. **9**: 305-316.
- Rojó, 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.
- Rollfinke, I.K. y Pfitzner, U.M. (1994)** Structure of a heptaubiquitin gene from tomato. *Plant Physiology*. **104**: 299-300.
- Rosendahl, S. (1985)** Interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and *Aphanomyces euteiches* root rot of peas. *Journal of Phytopathology*. **114**: 31-40.
- Rosewarne, G., Smith, F., Schachtman, D., y Smith, S. (2007)** Localization of proton-ATPase genes expressed in arbuscular mycorrhizal tomato plants. *Mycorrhiza*. **17**: 249-258.
- Ross, J. (1972)** Influence of endogone mycorrhiza on *Phytophthora* rot of soybean. *Phytopathology*. **62**: 896-897.
- Ruiz-Lozano, J.M., Roussel, H., Gianinazzi, S., y Gianinazzi-Pearson, V. (1999)** Defense genes are differentially induced by a mycorrhizal fungus and *Rhizobium* sp. in wild-type and symbiosis-defective pea genotypes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **12**: 976-984.
- Ruiz-Lozano, J.M. y Bonfante, P. (1999)** Identification of a putative P-transporter operon in the genome of a *Burkholderia* strain living inside the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *The Journal of Bacteriology*. **181**: 4106-4109.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y., y Hunt, M.D. (1996)** Systemic acquired resistance. *The Plant Cell*. **8**: 1809-1819.
- Ryu, C.M., Hu, C.H., Reddy, M.S., y Kloepper, J.W. (2003)** Different signaling pathways of induced resistance by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* against two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *New Phytologist*. **160**: 413-420.
- Ryu, C.M., Murphy, J.F., Mysore, K.S., y Kloepper, J.W. (2004)** Plant growth-promoting rhizobacteria systemically protect *Arabidopsis thaliana* against *Cucumber* mosaic virus by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. *Plant Journal*. **39**: 381-392.
- Sagan, M., Morandi, D., Tarengi, E., y Duc, G. (1995)** Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* (Gaertn.) after [gamma]-ray mutagenesis. *Plant Science*. **111**: 63-71.
- 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.
- Sakai, H., Hua, J., Chen, Q.H.G., Chang, C.R., Medrano, L.J., Bleecker, A.B., y Meyerowitz, E.M. (1998)** ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95**: 5812-5817.
- Salt, S.D., Tuzun, S., y Kuc, J. (1986)** Effects of beta-ionone and abscisic acid on the growth of tobacco and resistance to blue mold. Mimicry of effects of stem infection by *Peronospora tabacina* Adam. *Physiological Plant Pathology*. **28**: 287-289.
- Salzer, P., Bonanomi, A., Beyer, K., Vögeli-Lange, R., Aeschbacher, R., Lange, J., Wiemken, A., Kim, D., Cook, D., y Boller, T. (2000)** Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **13**: 763-777.
- Salzer, P., Corbière, H., y Boller, T. (1999)** Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago*

- truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. *Planta*. **208**: 319-325.
- Sambrook, J., Fritsch, 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.
- Sanders, I.R., Alt, M., Groppe, K., Boller, T., y Wiemken, A. (1995)** Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the *Glomales*: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytologist*. **130**: 419-427.
- Sanders, I.R., Clapp, J.P., y Wiemken, A. (1996)** The genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in natural ecosystems - a key to understanding the ecology and functioning of the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*. **133**: 123-134.
- Sasaki, Y., Asamizu, E., Shibata, D., Nakamura, Y., Kaneko, T., Awai, K., Amagai, M., Kuwata, C., Tsugane, T., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, X., Ohta, H., y Tabata, S. (2001)** Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis* by cDNA macroarray: Self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *Dna Research*. **8**: 153-161.
- Sato, D., Awad, A.A., Chae, S.H., Yokota, T., Sugimoto, Y., Takeuchi, Y., y Yoneyama, K. (2003)** Analysis of strigolactones, germination stimulants for *Striga* and *Orobanchae*, by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**: 1162-1168.
- Sbrana, C. y Giovannetti, M.A. (2005)** Chemotropism in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza*. **15**: 539-545.
- Scervino, J.M., Erra-Bassels, R., Vierheilig, H., Ocampo, J.A., y Godeas, A. (2005a)** Arbuscular mycorrhizal colonization of tomato by *Gigaspora* and *Glomus* species in the presence of root flavonoids. *Journal of Plant Physiology*. **162**: 625-633.
- Scervino, J.M., Ponce, M.A., Erra-Bassels, R., Vierheilig, H., Ocampo, J.A., y Godeas, A. (2005b)** Flavonoids exclusively present in mycorrhizal roots of white clover exhibit different effects on arbuscular mycorrhizal fungi than flavonoids exclusively present in non-mycorrhizal roots of white clover. *Journal Plant Interaction*. **15**: 22-30.
- Scervino, J.M., Ponce, M.A., Erra-Bassels, R., Vierheilig, H., Ocampo, J.A., y Godeas, A. (2005c)** Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth of *Gigaspora* and *Glomus*. *Mycological Research*. **109**: 789-794.
- Schaarschmidt, S., González, M.-C., Roitsch, T., Strack, D., Sonnwald, U., y Hause, B. (2007a)** Regulation of arbuscular mycorrhization by carbon: The symbiotic interaction cannot be improved by increased carbon availability accomplished by root-specifically enhanced invertase activity. *Plant Physiology*. **143**: 1827-1840.
- Schaarschmidt, S., Kopka, J., Ludwig-Muller, J., y Hause, B. (2007b)** Regulation of arbuscular mycorrhization by apoplastic invertases: Enhanced invertase activity in the leaf apoplast affects the symbiotic interaction. *The Plant Journal*. **51**: 390-405.
- Schaarschmidt, S., Roitsch, T., y Hause, B. (2006)** Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Journal of Experimental Botany*. **57**: 4015-4023.
- Schachtman, D.P., Reid, R.J., y Ayling, S.M. (1998)** Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. *Plant Physiology*. **116**: 447-453.
- Schaller, G.E. y Bleecker, A.B. (1995)** Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the *Arabidopsis* Etr1 gene. *Science*. **270**: 1809-1811.

- Schellenbaum, L., Berta, G., Ravolanirina, F., Tisserant, B., Gianinazzi, S., y Fitter, A.H. (1991) Influence of endomycorrhizal infection on root morphology in a micropropagated woody plant species (*Vitis vinifera* L.). *Annals of Botany*. **68**: 135-141.
- Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C., y Manners, J.M. (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**: 11655-11660.
- Schmitz, O., Danneberg, G., Hundeshagen, B., Klingner, A., y Bothe, H. (1991) Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhiza by biochemical parameters. *Journal of Plant Physiology*. **139**: 106-114.
- Schreiner, R. y Bethlenfalvay, G.J. (1995) Mycorrhizal interactions in sustainable agriculture. *Critical Reviews in Biotechnology*. **15**: 271-285.
- Schreiner, R.P., Mihara, K.L., McDaniel, H., y Bethlenfalvay, G.J. (1997) Mycorrhizal fungi influence plant and soil functions and interactions. *Plant and Soil*. **188**: 199-209.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., y Walker, C. (2001) A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research*. **105**: 1413-1421.
- Schweiger, P., Robson, A., Barrow, N., y Abbott, L. (2007) Arbuscular mycorrhizal fungi from three genera induce two-phase plant growth responses on a high P-fixing soil. *Plant and Soil*. **292**: 181-192.
- Schwob, I., Ducher, M., y Coudret, A. (1999) Effects of climatic factors on native arbuscular mycorrhizae and *Meloidogyne exigua* in a Brazilian rubber tree (*Hevea brasiliensis*) plantation. *Plant Pathology*. **48**: 19-25.
- Scofield, S.R., Tobias, C.M., Rathjen, J.P., Chang, J.H., Lavelle, D.T., Michelmore, R.W., y Staskawicz, B.J. (1996) Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science*. **274**: 2063-2065.
- Sengupta, A. y Chaudhuri, S. (2002) Arbuscular mycorrhizal relations of mangrove plant community at the Ganges river estuary in India. *Mycorrhiza*. **12**: 169-174.
- 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**: 4788-4793.
- 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.
- Shah, J., Kachroo, P., y Klessig, D.F. (1999) The *Arabidopsis* ssi1 mutation restores pathogenesis-related gene expression in npr1 plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *The Plant Cell*. **11**: 191-206.
- Shah, J., Tsui, F., y Klessig, D.F. (1997) Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (sai1) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the tms2 gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **10**: 69-78.
- Sharp, R.E., LeNoble, M.E., Else, M.A., Thorne, E.T., y Gherardi, F. (2000) Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene. *Journal of Experimental Botany*. **51**: 1575-1584.
- Shaul, O., Elad, Y., Chet, I., y Kapulnik, Y. (1998) *Glomus intraradices*-induced gene expression changes in tobacco leaves. *Enr: Second International Conference on Mycorrhiza*. *Editores*: Ahonen-Jonnarth, U., Danell, E., Frasson, P., Karén, O., Lindahl, B., Rangel, I., y Finlay, R. SLU Service/repro, Uppsala, Uppsala, Sweden.-121
- Shaul, O., Galili, S., Volpin, H., Ginzberg, I., Elad, Y., Chet, I., y Kapulnik, Y. (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., Grunzweig, J.M., Chet, I., Elad, Y., Wininger, S., Belausov, E., Eshed, Y., Arzmon, 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.
- Siame, B.A., Weerasuriya, Y., Wood, K., Ejeta, G., y Butler, L.G. (1993)** Isolation of strigol, a germination stimulant for *Striga asiatica*, from host plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **41**: 1486-1491.
- 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.
- Simoneau, P., Louisy-Louis, N., Plenchette, C., y Strullu, D.G. (1994)** Accumulation of new polypeptides in Ri T-DNA-transformed roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*) during the development of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**: 1810-1813.
- Siqueira, J.O. y Saggin-Júnior, O.J. (2001)** Dependency on arbuscular mycorrhizal fungi and responsiveness of some Brazilian native woody species. *Mycorrhiza*. **11**: 245-255.
- Sisler, E.C. y Serek, M. (2003)** Compounds interacting with the ethylene receptor in plants. *Plant Biology*. **5**: 473-480.
- Slezack, S., Dumas-Gaudot, E., Paynot, M., y Gianinazzi, S. (2000)** Is a fully established arbuscular mycorrhizal symbiosis required for bioprotection of *Pisum sativum* roots against *Aphanomyces euteiches*? *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **13**: 238-241.
- 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, G.S. (1988)** The role of phosphorus-nutrition in interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with soilborne nematodes and fungi. *Phytopathology*. **78**: 371-374.
- Smith, M.D., Hartnett, D.C., y Wilson, G.W.T. (1999)** Interacting influence of mycorrhizal symbiosis and competition on plant diversity in tallgrass prairie. *Oecologia*. **121**: 574-582.
- Smith, S.E., Dickson, S., y Smith, F.A. (2001)** Nutrient transfer in arbuscular mycorrhizas: how are fungal and plant processes integrated? *Australian Journal of Plant Physiology*. **28**: 683-694.
- Smith, S.E. y Read, D.J. (1997)** Mycorrhizal symbiosis. Academic Press. San Diego
- Smith, S.E. y Smith, F.A. (1990)** Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. *New Phytologist*. **114**: 1-38.
- Smith, S.E., Smith, F.A., y Jakobsen, I. (2003)** Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiology*. **133**: 16-20.
- 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.
- Smith-Becker, J., Marois, E., Huguet, E.J., Midland, S.L., Sims, J.J., y Keen, N.T. (1998)** Accumulation of salicylic acid and 4-hydroxybenzoic acid in phloem fluids of cucumber during systemic acquired resistance Is preceded by a transient increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in petioles and stems. *Plant Physiology*. **116**: 231-238.
- Söderberg, K.H., Olsson, P.A., y Baath, E. (2002)** Structure and activity of the bacterial community in the rhizosphere of different plant species and the effect of arbuscular mycorrhizal colonisation. *FEMS Microbiology Ecology*. **40**: 223-231.

- Solaiman, M.D.Z. y Saito, M. (1997) Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry. *New Phytologist*. **136**: 533-538.
- Solaiman, M.Z., Senoo, K., Kawaguchi, M., Imaizumi-Anraku, H., Akao, S., Tanaka, A., y Obata, H. (2000) Characterization of mycorrhizas formed by *Glomus* sp. on roots of hypernodulating mutants of *Lotus japonicus*. *Journal of Plant Research*. **113**: 443-448.
- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q., y Ecker, J.R. (1998) Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes & Development*. **12**: 3703-3714.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*. **98**: 503-517.
- Spanu, P., Boller, T., Ludwing, A., Wiemken, A., Faccio, A., y Bonfante-Fasolo, P. (1989) Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization. *Planta*. **177**: 447-455.
- Spanu, P. y Bonfante-Fasolo, P. (1988) Cell-wall-bound peroxidase activity in roots of mycorrhizal *Allium porrum*. *New Phytologist*. **109**: 119-124.
- Spanu, P., Grosskopf, D.G., Felix, G., y Boller, T. (1994) The apparent turnover of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato cells is regulated by protein-phosphorylation and dephosphorylation. *Plant Physiology*. **106**: 529-535.
- Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M.C., Korzelius, J.P., Van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Metraux, J.P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L.C., Dong, X., y Pieterse, C.M.J. (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell*. **15**: 760-770.
- Spollen, W.G., LeNoble, M.E., Samuels, T.D., Bernstein, N., y Sharp, R.E. (2000) Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiology*. **122**: 967-976.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M., y Fortin, J.A. (1996) Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an in vitro system in the absence of host roots. *Mycological Research*. **100**: 328-332.
- Stacey, G., McAllister, C.B., Kim, S.Y., Olivares, J., y Soto, M.J. (2006) Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*. **141**: 1473-1481.
- Staedelin, C., Granado, J., Muller, J., Wiemken, A., Mellor, R.B., Felix, G., Regenass, M., Broughton, W.J., y Boller, T. (1994) Perception of Rhizobium Nodulation Factors by Tomato Cells and Inactivation by Root Chitinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **91**: 2196-2200.
- Staedelin, C., Charon, C., Boller, T., Crespi, M., y Kondorosi, A. (2001) *Medicago truncatula* plants overexpressing the early nodulin gene enod40 exhibit accelerated mycorrhizal colonization and enhanced formation of arbuscules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **98**: 15366-15371.
- Staswick, P.E., Yuen, G.Y., y Lehman, C.C. (1998) Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant Journal*. **15**: 747-754.
- Steadman, J.R. y Sequeira, L. (1970) Abscisic acid in tobacco plants: tentative identification and its relation to stunting induced by *Pseudomonas solanaccarum*. *Plant Physiology*. **45**: 691-697.
- Stephenson, L.C., Bunker, T.W., Dubbs, W.E., y Grimes, H.D. (1998) Specific soybean lipoxygenases localize to discrete subcellular compartments and their mRNAs are differentially regulated by source-sink status. *Plant Physiology*. **116**: 923-933.

- Strack, D., Fester, T., Hause, B., Schliemann, W., y Walter, M.H. (2003)** Arbuscular mycorrhiza: Biological, chemical, and molecular aspects. *Journal of Chemical Ecology*. **29**: 1955-1979.
- Strittmatter, G., Gheysen, G., Gianinazzi-Pearson, V., Hahn, K., Rohde, W., y Tacke, E. (1996)** Infections with various types of organisms stimulate transcription from a short promoter fragment of the potato *gst1* gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **9**: 68-73.
- Stumpe, M., Carsjens, J.C., Stenzel, I., Göbel, C., Lang, I., Pawlowski, K., Hause, B., y Feussner, I. (2005)** Lipid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry*. **66**: 781-791.
- Subramanian, K.S., Charest, C., Dwyer, L.M., y Hamilton, R.I. (1995)** Arbuscular mycorrhizas and water relations in maize under drought stress at tasselling. *New Phytologist*. **129**: 643-650.
- Sun, J., Cardoza, V., Mitchell, D.M., Bright, L., Oldroyd, G., y Harris, J.M. (2006)** Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *The Plant Journal*. **46**: 961-970.
- Tahiri-Alaoui, A., Dumas-Gaudot, E., y Gianinazzi, S. (1993)** Immunocytochemical localization of pathogenesis-related PR-1 proteins in tobacco root tissues infected in vitro by the black root rot fungus *Chalara elegans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **42**: 69-82.
- Tamasloukht, M.'B., 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 Physiology*. **131**: 1468-1478.
- Tatsuki, M. y Mori, H. (2001)** Phosphorylation of tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, LE-ACS2, at the C-terminal region. *Journal of Biological Chemistry*. **276**: 28051-28057.
- Tawaraya, K., Hashimoto, K., y Wagatsuma, T. (1998)** Effect of root exudate fractions from P-deficient and P-sufficient onion plants on root colonisation by the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Mycorrhiza*. **8**: 67-70.
- Tawaraya, K., Naito, M., y Wagatsuma, T. (2006)** Solubilization of insoluble inorganic phosphate by hyphal exudates of arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Nutrition*. **29**: 657-665.
- 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 wilted 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., Bugg, T., y Thompson, A. (2005)** Regulation and manipulation of the biosynthesis of abscisic acid, including the supply of xanthophyll precursors. *Journal of Plant Growth Regulation*. **24**: 253-273.
- Tejeda-Sartorius, M. y Délano-Fier, J.P. (2006)** The systemin-jasmonic acid pathway modulates mycorrhizal colonization in tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) inoculated with *Glomus intraradices*. *En: Fifth International Conference on Mycorrhiza. Editores: Barea, J.M., Azcón, C., Gutiérrez, F., González, F., y Molina, A.J. Gráficas Zaidín, Granada, España.*
- Terajima, Y., Nukui, H., Kobayashi, A., Fujimoto, S., Hase, S., Yoshioka, T.,**

- Hashiba, T., y Satoh, S. (2001) Molecular cloning and characterization of a cDNA for a novel ethylene receptor, NT-ERS1, of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant and Cell Physiology*. **42**: 308-313.
- Thaler, J.S., Fidantsef, A.L., y Bostock, R.M. (2002) Antagonism between jasmonate- and salicylate-mediated induced plant resistance: Effects of concentration and timing of elicitation on defense-related proteins, herbivore, and pathogen performance in tomato. *Journal of Chemical Ecology*. **28**: 1131-1159.
- Thaler, J.S., Owen, B., y Higgins, V.J. (2004) The Role of the Jasmonate Response in Plant Susceptibility to Diverse Pathogens with a Range of Lifestyles. *Plant Physiology*. **135**: 530-538.
- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Broekaert, W.F., y Cammue, B.P.A. (2000) Disease development of several fungi on *Arabidopsis* can be reduced by treatment with methyl jasmonate. *Plant Physiology and Biochemistry*. **38**: 421-427.
- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Pennickx, I.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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95**: 15107-15111.
- Thomma, B.P.H.J., Pennickx, 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.
- Tieman, D.M., Ciardi, J.A., Taylor, M.G., y Klee, H.J. (2001) Members of the tomato LeEIL (EIN3-like) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. *Plant Journal*. **26**: 47-58.
- Tieman, D.M. y Klee, H.J. (1999) Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family. *Plant Physiology*. **120**: 165-172.
- Tieman, D.V., Taylor, M.G., Ciardi, J.A., y Klee, H.J. (2000) The tomato ethylene receptors NR and LeETR4 are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**: 5663-5668.
- Tisdall, J.M. y Oades, J.M. (1979) Stabilization of soil aggregates by the root systems of ryegrass. *Australian Journal of Soil Research*. **17**: 429-441.
- Tisserant, B., Gianinazzi, S., y Gianinazzi-Pearson, V. (1996) Relationships between lateral root order, arbuscular mycorrhiza development, and the physiological state of the symbiotic fungus in *Platanus acerifolia*. *Canadian Journal of Botany*. **74**: 1947-1955.
- Tisserant, B., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S., y Gollote, A. (1993) In planta histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycological Research*. **97**: 245-250.
- 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., Davison, S., Van Wees, S.C.M., Van Loon, L.C., y Pieterse, C.M.J. (2001) The *Arabidopsis* ISR1 locus controlling rhizobacteria-mediated induced systemic resistance is involved in ethylene signaling. *Plant Physiology*. **125**: 652-661.
- Ton, J., De Vos, M., Robben, C., Buchala, A., Metraux, J.P., Van Loon, L.C., y Pieterse, C.M.J. (2002a) 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. (2002b) Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **15**: 27-34.

- Ton, J. y Mauch-Mani, B. (2004)** β -amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *The Plant Journal*. **38**: 119-130.
- 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.
- Trappe, J.M. (1987)** Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in angiosperms from an evolutionary standpoint. *En: Ecophysiology of VA mycorrhizal plants. Editores: Safir, G.R.* Boca Raton, Florida : CRC Press, cop., Florida. 5-25
- Trotta, A., Varese, G., Gnani, E., Fusconi, A., Sampò, S., y Berta, G. (1996)** Interactions between the soilborne root pathogen *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* in tomato plants. *Plant and Soil*. **185**: 199-209.
- Trouvelot, A., Kough, J.L., y Gianinazzi-Pearson, V. (1986)** Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes 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
- Tsai, S.M. y Phillips, D.A. (1991)** Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**: 1485-1488.
- Turner, J.G., Ellis, C., y Devoto, A. (2002)** The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*. **14**: S153-S164.
- Ueno, O. (1998)** Induction of Kranz anatomy and C4-like biochemical characteristics in a submerged amphibious plant by abscisic acid. *The Plant Cell*. **10**: 571-584.
- Ultra, V., Tanaka, S., Sakurai, K., y Iwasaki, K. (2007)** Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on arsenic toxicity in sunflower (*Helianthus annuus* L.) and on the transformation of arsenic in the rhizosphere. *Plant and Soil*. **290**: 29-41.
- Vaast, P., Caswell-Chen, E.P., y Zasoski, R.J. (1998)** Influences of a root-lesion nematode, *Pratylenchus coffeae*, and two arbuscular mycorrhizal fungi, *Acaulospora mellea* and *Glomus clarum* on coffee (*Coffea arabica* L.). *Biology and Fertility of Soils*. **26**: 130-135.
- 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. y Van Strien, E.A. (1999)** The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **55**: 85-97.
- Van Rhijn, P., Fang, Y., Galili, S., Shaul, O., Atzmon, N., Winer, S., Eshed, Y., Lum, M., Li, Y., To, V., Fujishige, N., Kapulnik, Y., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **94**: 5467-5472.
- Van Spronsen, P.C., Tak, T., Rood, A.M.M., Van Brussel, A., Kijne, J.W., y Boot, K.J.M. (2003)** Salicylic acid inhibits indeterminate-type nodulation but not determinate-type nodulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **16**: 83-91.
- Van Wees, S.C.M., de Swart, E.A.M., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C., y Pieterse, C.M.J. (2000)** Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**: 8711-8716.
- 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.
- Vandenkoornhuysse, P., Husband, R., Daniell, T.J., Watson, I.J., Duck, J.M., Fitter, A.H., y Young, J.P.W. (2002)** Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Molecular Ecology*. **11**: 1555-1564.
- Vanworkum, W.A.T., Vanbrussel, A.A.N., Tak, T., Wijffelman, C.A., y Kijne, J.W. (1995)** Ethylene Prevents Nodulation of *Vicia-Sativa* Ssp *Nigra* by Exopolysaccharide-Deficient Mutants of *Rhizobium-Leguminosarum* Bv *Viciae*. *Molecular plant-microbe interactions*. **8**: 278-285.
- Vassilev, N., Vassileva, M., Azcón, R., y Medina, A. (2001)** Application of free and Calcium-entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in a soil-plant system. *Journal of Biotechnology*. **91**: 237-242.
- Vázquez, M., Cesar, S., Azcón, R., y Barea, J.M. (2000)** Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Applied Soil Ecology*. **15**: 261-272.
- Verberne, M.C., Verpoorte, R., Bol, J.F., Mercado-Blanco, J., y Linthorst, H.J.M. (2000)** Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nature Biotechnology*. **18**: 779-783.
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H., y Ryals, J. (1994)** Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *The Plant Cell*. **6**: 959-965.
- Vick, B.A. y Zimmerman, D.C. (1983)** The biosynthesis of jasmonic acid - a physiological-role for plant lipoxygenase. *Journal of the American Oil Chemists Society*. **60**: 706-706.
- 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., Lange, J., Gutrella, M., Wiemken, A., y Boller, T. (1995)** Colonization of transgenic tobacco constitutively expressing pathogenesis-related proteins by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**: 3031-3034.
- 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 the root pathogen *Rhizoctonia solani* and by the mycorrhizal symbiont *Glomus-mosseae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **6**: 261-264.

- Vierheilig, H., Alt-Hug, M., Engel-Streitwolf, R., Mäder, P., y Wiemken, A. (1998) Studies on the attractational effect of root exudates on hyphal growth of an arbuscular mycorrhizal fungus in a soil compartment-membrane system. *Plant and Soil*. **203**: 137-144.
- 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. *Journal Plant Nutrition Soil Science*. **165**: 21-25.
- Vierheilig, H., Bennett, R., Kiddle, G., Kaldorf, M., y Ludwig-Müller, J. (2000a) Differences in glucosinolate patterns and arbuscular mycorrhizal status of glucosinolate-containing plant species. *New Phytologist*. **146**: 343-352.
- Vierheilig, H., García-Garrido, J.M., Wyss, U., y Piche, Y. (2000b) Systemic suppression of mycorrhizal colonization of barley roots already colonized by AM fungi. *Soil Biology and Biochemistry*. **32**: 589-595.
- Vierheilig, H., Iseli, B., Alt, M., Raikhel, N., Wiemken, A., y Boller, T. (1996) Resistance of *Urtica dioica* to mycorrhizal colonization: A possible involvement of *Urtica dioica* agglutinin. *Plant and Soil*. **183**: 131-136.
- Vierheilig, H., Maier, W., Wyss, U., Samson, J., Strack, D., y Piche, Y. (2000c) Cyclohexenone derivative- and phosphate-levels in split-root systems and their role in the systemic suppression of mycorrhization in precolonized barley plants. *Journal of Plant Physiology*. **157**: 593-599.
- Vierheilig, H. y Piche, Y. (2002) Signalling in arbuscular mycorrhiza: Facts and hypotheses. *Flavonoids in Cell Function*. **505**: 23-39.
- Vigo, C., Norman, J.R., y Hooker, J.E. (2000) Biocontrol of the pathogen *Phytophthora parasitica* by arbuscular mycorrhizal fungi is a consequence of effects on infection loci. *Plant Pathology*. **49**: 509-514.
- Vijayan, P., Shockey, J., Levesque, C.A., Cook, R.J., y Browse, J. (1998) A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95**: 7209-7214.
- Volpin, H., Elkind, Y., Okon, Y., y Kapulnik, Y. (1994) A vesicular arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradix*) induces a defense response in alfalfa roots. *Plant Physiology*. **104**: 683-689.
- Volpin, H., Phillips, D.A., Okon, Y., y Kapulnik, Y. (1995) Suppression of an isoflavonoid phytoalexin defense response in mycorrhizal alfalfa roots. *Plant Physiologist*. **108**: 1449-1454.
- Walker, C., Blaszkowski, J., Schwarzott, D., y Schussler, A. (2004) *Gerdemannia* gen. nov., a genus separated from *Glomus*, and *Gerdemanniaceae* fam. nov., a new family in the *Glomeromycota*. *Mycological Research*. **108**: 707-718.
- Walker, S.A., Viprey, V., y Downie, J.A. (2000) Dissection of nodulation signaling using pea mutants defective for calcium spiking induced by Nod factors and chitin oligomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **97**: 13413-13418.
- Walter, M.H., Fester, T., y Strack, D. (2000) Arbuscular mycorrhizal fungi induce the non-mevalonate methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis correlated with accumulation of the 'yellow pigment' and other apocarotenoids. *The Plant Journal*. **21**: 571-578.
- Walter, M.H., Hans, J., y Strack, D. (2002) Two distantly related genes encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. *The Plant Journal*. **31**: 243-254.
- Walters, D., Cowley, T., y Mitchell, A. (2002) Methyl jasmonate alters polyamine metabolism and induces systemic protection against powdery mildew infection in barley

- seedlings. *Journal of Experimental Botany*. **53**: 747-756.
- Wamberg, C., Christensen, S., Jakobsen, I., Muller, A.K., y Sorensen, S.J. (2003)** The mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) affects microbial activity in the rhizosphere of pea plants (*Pisum sativum*). *Soil Biology and Biochemistry*. **35**: 1349-1357.
- Wang, F.Y., Lin, X.G., y Yin, R. (2007)** Role of microbial inoculation and chitosan in phytoextraction of Cu, Zn, Pb and Cd by *Elsholtzia splendens* - a field case. *Environmental Pollution*. **147**: 248-255.
- Wang, W., Hall, A.E., O'Malley, R., y Bleecker, A.B. (2003)** Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis* is not required for signal transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **100**: 352-357.
- Ward, E.W.B., Cahill, D.M., y Bhattacharyya, M.K. (1989)** Abscisic acid suppression of phenylalanine ammonia-lyase activity and mRNA, and resistance of soybeans to *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. *Plant Physiology*. **91**: 23-27.
- Waschkies, C., Schropp, A., y Marschener, H. (1994)** Relations between grapevine replant disease and root colonization of grapevine (*Vitis* sp) by fluorescent pseudomonads and endomycorrhizal fungi. *Plant and Soil*. **162**: 219-227.
- Wasternack, C. y Hause, B. (2002)** Jasmonates and octadecanoids: Signals in plant stress responses and development. *Er: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. Academic Press, 165-221
- Watts, S.H., Wheeler, C.T., Hillman, J.R., Berrie, A.M.M., Crozier, A., y Math, V.B. (1983)** Abscisic acid in the nodulated root system of *Alnus glutinosa*. *New Phytologist*. **95**: 203-208.
- Whenham, R.J., Fraser, R.S.S., Brown, L.P., y Payne, J.A. (1986)** Tobacco-mosaic-virus induced increase in abscisic-acid concentration in tobacco leaves. Intracellular location in light and dark-green areas, and relationship to symptom development. *Planta*. **168**: 592-598.
- Wilkinson, J.Q., Lanahan, M.B., Yen, H.C., Giovannoni, J.J., y Klee, H.J. (1995)** An ethylene-inducible component of signal-transduction encoded by Never-Ripe. *Science*. **270**: 1807-1809.
- Wisniewski, J.P., Gardner, C., y Brewin, N. (1999)** Isolation of lipoxygenase cDNA clones from pea nodule mRNA. *Plant Molecular Biology*. **39**: 775-783.
- Woeste, K.E. y Kieber, J.J. (2000)** A strong loss-of-function mutation in RAN1 results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. *Plant Cell*. **12**: 443-455.
- Wright, D.P., Read, D.J., y Scholes, J.D. (1998)** Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment*. **21**: 881-891.
- Wyss, P., Boller, T., y Wiemken, A. (1991)** Phytoalexin response is elicited by a pathogen (*Rhizoctonia solani*) but not by a mycorrhizal fungus (*Glomus mosseae*) in soybean roots. *Experientia*. **47**: 395-399.
- Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W.L., Ma, H., Peng, W., Huang, D., y Xie, D. (2002)** The SCFCO1 Ubiquitin-Ligase Complexes Are Required for Jasmonate Response in Arabidopsis. *THE PLANT CELL*. **14**: 1919-1935.
- Yalpani, N., Leon, J., Lawton, M.A., y Raskin, I. (1993a)** Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiology*. **103**: 315-321.
- Yalpani, N., Schulaev, V., y Raskin, I. (1993b)** Endogenous salicylic acid levels correlate with the accumulation of pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Phytopathology*. **83**: 702-708.
- Yamato, M. (2001)** Identification of a mycorrhizal fungus in the roots of achlorophyllous

- Sciaphila tosaensis* Makino (*Triuridaceae*). *Mycorrhiza*. **11**: 83-88.
- Yanagisawa, S., Yoo, S.D., y Sheen, J. (2003)** Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature*. **425**: 521-525.
- Yano, K., Yamauchi, A., y Kono, Y. (1996)** Localized alteration in lateral root development in roots colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycorrhiza*. **6**: 409-415.
- Yoneyama, K., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., y Sekimoto, H. (2007)** Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol, the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasites. *Planta*. **225**: 1031-1038.
- Yoneyama, K., Takeuchi, Y., y Yokota, T. (2001)** Production of clover broomrape seed germination stimulants by red clover root requires nitrate but is inhibited by phosphate and ammonium. *Physiologia Plantarum*. **112**: 25-30.
- Yu, T., Egger, K., y Peterson, L. (2001)** Ectendomycorrhizal associations - characteristics and functions. *Mycorrhiza*. **11**: 167-177.
- Yuhashi, K.I., Ichikawa, N., Ezura, H., Akao, S., Minakawa, Y., Nukui, N., Yasuta, T., y Minamisawa, K. (2000)** Rhizobitoxine production by *Bradyrhizobium elkanii* enhances nodulation and competitiveness on *Macroptilium atropurpureum*. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**: 2658-2663.
- Zaat, S.A.J., Vanbrussel, A.A.N., Tak, T., Lugtenberg, B.J.J., y Kijne, J.W. (1989)** The ethylene-inhibitor aminoethoxyvinylglycine restores normal nodulation by *Rhizobium-leguminosarum* biovar - *Viciae* on *Vicia-sativa* Subsp Nigra by suppressing the thick and short roots phenotype. *Planta*. **177**: 141-150.
- Zeevaart, J.A.D. y Creelman, R.A. (1988)** Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **39**: 439-473.
- Zegzouti, H., Jones, B., Frasse, P., Marty, C., Maitre, B., Latche, A., Pech, J.C., y Bouzayen, M. (1999)** Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by differential display. *The Plant Journal*. **18**: 589-600.
- Zeier, J. (2005)** Age-dependent variations of local and systemic defence responses in *Arabidopsis* leaves towards an avirulent strain of *Pseudomonas syringae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **66**: 30-39.
- Zhang, J., Jia, W., Yang, J., y Ismail, A.M. (2006)** Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research*. **97**: 111-119.
- Zhang, S.A., Moyne, A.L., Reddy, M.S., y Kloepper, J.W. (2002)** The role of salicylic acid in induced systemic resistance elicited by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. *Biological Control*. **25**: 288-296.
- Zhao, Y., Thilmony, R., Bender, C.L., Schaller, A., He, S.Y., y Howe, G.A. (2003)** Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. tomato promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *The Plant Journal*. **36**: 485-499.
- Zhao, Z.W. (2000)** The arbuscular mycorrhizas of pteridophytes in Yunnan, southwest China: evolutionary interpretations. *Mycorrhiza*. **10**: 145-149.
- Zhao, Z.W., Xia, Y.M., Qin, X.Z., Li, X.W., Cheng, L.Z., Sha, T., y Wang, G.H. (2001)** Arbuscular mycorrhizal status of plants and the spore density of arbuscular mycorrhizal fungi in the tropical rain forest of Xishuangbanna, southwest China. *Mycorrhiza*. **11**: 159-162.
- Zhou, D., Kalaitzis, P., Mattoo, A., y Tucker, M. (1996)** The mRNA for an ETR1 homologue in tomato is constitutively expressed in vegetative and reproductive tissues. *Plant Molecular Biology*. **30**: 1331-1338.