

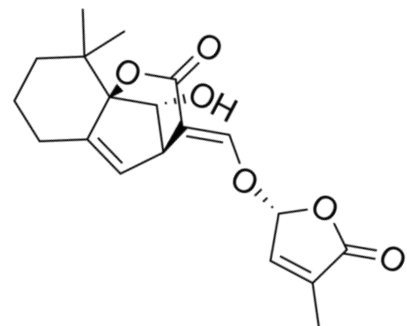
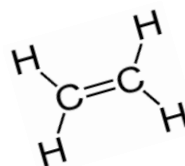
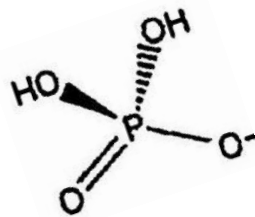


UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
TESIS DOCTORAL

PAPEL DE LA INTERACCIÓN DEL ETILENO Y EL FÓSFORO COMO  
AGENTES REGULADORES DE LA FORMACIÓN DE MICORRIZA  
ARBUSCULAR EN TOMATE

RODOLFO TORRES DE LOS SANTOS

2014



Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Rodolfo Torres de los Santos  
D.L.: GR 2235-2014  
ISBN: 978-84-9083-308-7

**UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

**TESIS DOCTORAL**

**PAPEL DE LA INTERACCIÓN DEL ETILENO Y EL FÓSFORO COMO AGENTES REGULADORES DE  
LA FORMACIÓN DE MICORRIZA ARBUSCULAR EN TOMATE**

**Memoria presentada por D. Rodolfo Torres de los Santos,  
Ingeniero Biotecnólogo, para optar al grado de Doctor**

**Fdo.: Rodolfo Torres de los Santos**

**VºBº de los directores de la Tesis Doctoral**

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

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

**Universidad de Granada**

**Octubre, 2014**

El doctorando D. Rodolfo Torres de los Santos y los directores de la tesis D. José Manuel García Garrido y D. Juan Antonio Ocampo Bote garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada a 13 de Octubre de 2014

Director/es de la Tesis

Doctorando

D. José Manuel García Garrido

D. Rodolfo Torres de los Santos

Fdo.:

Fdo.:

D. Juan Antonio Ocampo Bote

Fdo.:

## Financiación y Publicaciones

El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Grupo de Investigación “Biofertilización y Biorremediación por Hongos Rizosféricos” del “Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos” de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), con el apoyo de una beca financiada por el convenio entre la Fundación Carolina (España) y la Universidad Autónoma de Chiapas, México (UNACH-México) y el soporte académico del Centro de Biociencias-UNACH (México).



**Universidad de Granada**



**Experimental del Zaidín (EEZ) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**



**FUNDACIÓN  
CAROLINA**

**Fundación Carolina**



**Universidad Autónoma de Chiapas**



**Centro de Biociencias- UNACH**

Parte de los resultados presentados en esta Tesis doctoral se han publicado y presentado según la lista a continuación expuesta:

- Torres de los Santos, R., Ocampo J.A., García-Garrido, J.M. (2014). "Expresión de genes de micorrización y metabolismo del mutante ETR6AS de tomate inoculado con *Rhizophagus irregularis* en el Noveno Congreso de Biotecnología Chiapas 2014. Centro de Biociencias UNACH-Colegio de Biotecnólogos de Chiapas A.C. Palenque, Chiapas, México. Mayo de 2014.
- Rodolfo Torres de Los Santos, Horst Vierheilig, Juan A. Ocampo and José M. García Garrido (2011). "Altered pattern of Arbuscular Mycorrhizal formation in tomato ethylene mutants". *Plant Signaling & Behavior* 6:5, 755-758.
- Torres de los Santos, R., Ocampo J.A., García-Garrido, J.M. "Regulación génica por etileno del establecimiento de la relación simbiótica micorriza arbuscular" en el VI Symposium Nacional y Tercera Reunión Iberoamericana de la Simbiosis Micorrízica. Universidad Autónoma de Tlaxcala, México. 6 al 10 de septiembre de 2010.
- Torres de los Santos, R., Ocampo, J.A., García-Garrido, J.M. (2010). "Genes regulados por Etileno que participan en la micorrización en tomate" en el 3er congreso de investigación UNACH 2010. Universidad Autónoma de Chiapas (ed). pp.155-156. ISBN 978-607-8003-49-5.
- Torres De los Santos, R., Ocampo, J.A. and García Garrido, J.M. (2009). "Caracterización preliminar del efecto del etileno y las giberelinas en el establecimiento de la relación micorriza arbuscular-planta". 4º Congreso Estatal de Biotecnología. Palenque, Chiapas, México. pp. 101.

## DEDICATORIA

## **AGRADECIMIENTOS**



## ABREVIATURAS

%	por cada 100 partes
µg	microgramos
µl	microlitros
°C	grados centígrados
1X	por una vez
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
d	día
dpi	días posteriores a la inoculación con el hongo micorrízico
dpt	días posteriores a la aplicación del tratamiento
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
g	gramos
h	hora
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrógeno
H <sub>2</sub> O-DEPC	H <sub>2</sub> O miliQ tratada con dietilpirocarbonato
HCl	ácido clorhídrico
Kg	kilogramos
KOH	hidróxido de potasio
m	minutos
mL	mililitros
mM	concentración milimolar
mm	milímetros
NaCl	cloruro de sodio
NaClO	Hipoclorito de sodio
pb	pares de bases nucleotídicas
T <sup>a</sup>	temperatura ambiente
TBE	Tris-Borato-ácidoetilendiaminotetracético
TGRC	Tomato Genetics Resource Center
UV	luz ultravioleta
V	Voltios

Vis	luz visible
ETH	Etileno
GA	Giberelinas
IAA	ácido Indole-3-acético
AIB	ácido indolbutírico
JA	ácido Jasmónico
LR	raíz lateral
MeJA	Metil-jasmonato
SA	ácido salicílico

# C O N T E N I D O

<b>I.</b>	<b>INTERÉS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO</b>	<b>2</b>
<b>II.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>6</b>
II.1.	GENERALIDADES DE LA SIMBIOSIS MICORRIZA ARBUSCULAR	6
II.1.1.	Definición	6
II.1.2.	Clasificación	7
II.2.	CICLO DE VIDA DE LOS HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS ARBUSCULARES	12
II.2.1.	Etapas de precolonización (presimbiótica). Germinación de las esporas	14
II.2.2.	Crecimiento y desarrollo de las hifas en busca de la raíz de la planta huésped. Fase Simbiótica.	16
II.2.2.1.	Penetración en la raíz mediante la formación de un apesorio	19
II.2.2.2.	Micelio extrarradical	22
II.2.3.	<i>Rhizophagus irregularis</i> como organismo modelo de la simbiosis MA	23
II.3.	FISIOLOGÍA DE LA SIMBIOSIS MICORRIZA ARBUSCULAR	25
II.3.1.	Nutrición carbonada	26
II.3.2.	Nutrición nitrogenada	30
II.3.3.	Nutrición fosforada	34
II.3.3.1.	La vía de la absorción Pi/MA	36
II.3.3.1.1.	El transporte de fósforo en la simbiosis MA es mediado por transportadores de fosfato específicos.	38
II.3.3.1.2.	Transportadores de alta afinidad de fósforo de la planta	39
II.3.3.1.3.	Transportadores implicados en la absorción directa de fósforo	42
II.3.3.1.4.	Transportadores de fósforo regulados por la simbiosis MA	43
II.3.3.2.	Redes de señalización en la planta en respuesta a la ausencia de fósforo	45
II.4.	PARTICIPACIÓN DE LAS FITOHORMONAS EN LA FORMACIÓN Y REGULACIÓN DE LA SIMBIOSIS MA	47
II.4.1.	Función de los Jasmonatos en la regulación de la simbiosis MA	49
II.4.2.	Función de las Giberelinas (GA) en la regulación de la simbiosis MA	53
II.4.3.	Función del Ácido Abscísico (ABA) en la regulación de la simbiosis MA	55
II.4.4.	Función del Ácido Salicílico (SA) en la regulación de la simbiosis MA	57

II.4.5.	Función de las Auxinas (AUX) en la regulación de la simbiosis MA	59
II.4.6.	Función del Etileno (ETH) en la regulación de la simbiosis MA	61
II.4.6.1.	Fisiología de la acción de Etileno	63
II.4.6.2.	Ruta de biosíntesis del Etileno	65
II.4.6.3.	Percepción y señalización del Etileno	67
II.4.6.3.	Interacción entre el fósforo y el Etileno	73
II.4.6.4.	El etileno en la simbiosis micorrízica arbuscular	77
II.4.7.	Las estrigolactonas y su interacción con el etileno y el fósforo	78
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>86</b>
III.1.	MATERIAL BIOLÓGICO	87
III.1.1	Variedades y Mutantes de Tomate	87
III.1.2	Inóculo fúngico	87
III.2.	CONDICIONES DE CULTIVO	88
III.2.1.	Esterilización de semillas	88
III.2.2.	Sistema de cultivo de las plantas	88
III.2.3.	Tratamientos químicos	90
III.3.	DETERMINACIÓN HISTOQUÍMICA DE LOS PARÁMETROS DE MICORRIZACIÓN	91
III.3.1.	Tinción con azul de tripán	91
III.3.2.	Tinción de la actividad fosfatasa alcalina (ALP)	92
III.3.3.	Evaluación del grado de micorrización	93
III.4.	CUANTIFICACIÓN DE ETILENO EN RAÍZ	95
III.5.	CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	96
III.5.1.	Extracción de ARN total	96
III.5.2.	Tratamiento con la solución de H <sub>2</sub> O-DEPC	97
III.5.3.	Tratamiento con DNasa I libre de RNasa	97
III.5.4.	Cuantificación del ARN	98
III.5.5.	Retrotranscripción de ARNm (RT)	98
III.5.6.	PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	99
III.5.7.	Diseño y secuencia de los oligonucleótidos de la qRT-PCR	101
III.6.	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD BIOSINTÉTICA Y SECRETORA DE ESTRIGOLACTONAS	103
III.6.1.	Preparación de los exudados radiculares	103
III.6.2.	Preparación de las semillas de <i>Orobanche ramosa</i>	104
III.6.3.	Bioensayo de germinación_	105

III. 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	<b>105</b>
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>107</b>
<b>IV.1. PARTICIPACIÓN DEL ETILENO EN LA FORMACIÓN DE LA MICORRIZA ARBUSCULAR EN TOMATE</b>	<b>107</b>
IV.1.1. Alteración por aportación exógena de los niveles de etileno y su efecto en la micorrización de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas con <i>R. irregularis</i>	<b>108</b>
IV.1.1.1. Análisis de la expresión de genes marcadores de la micorrización en plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas con <i>R. irregularis</i> y tratadas con ethephon	<b>112</b>
IV.1.1.2. Expresión de genes vegetales de defensa y marcadores de metabolismo hormonal en plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas con <i>R. irregularis</i> y tratadas con ethephon	<b>114</b>
IV.1.2. Alteración por aportación exógena de los niveles de etileno y su efecto en la micorrización de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> de sensibilidad incrementada a etileno e inoculadas con <i>R. irregularis</i>	<b>116</b>
IV.1.2.1. Análisis de la expresión de genes marcadores de la micorrización en plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> de sensibilidad incrementada a etileno e inoculadas con <i>R. irregularis</i>	<b>120</b>
IV.1.2.2. Expresión de genes vegetales de defensa y marcadores de metabolismo hormonal en plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> de sensibilidad incrementada a etileno e inoculadas con <i>R. irregularis</i>	<b>122</b>
IV.1.3. Efectos sobre la micorrización debidos a la alteración de la percepción y biosíntesis de Etileno en la planta	<b>122</b>
IV.1.3.1. Micorrización en plantas mutantes deficientes en la percepción de etileno (mutante <i>Rin</i> )	<b>124</b>
IV.1.3.2. Micorrización en plantas mutantes de sensibilidad incrementada a etileno (mutante <i>Epi</i> )	<b>127</b>
IV.1.3.3. Expresión de genes vegetales marcadores de la funcionalidad de la simbiosis MA en plantas micorrizadas de distinta sensibilidad a etileno	<b>130</b>
IV.1.4. Comparación entre genotipos de plantas con distinta sensibilidad a Etileno inoculadas y no inoculadas con <i>R. irregularis</i>	<b>132</b>
IV.1.4.1. Expresión de genes marcadores de la simbiosis MA en genotipos de plantas con distinta sensibilidad a etileno inoculadas y no inoculadas con <i>R. irregularis</i>	<b>139</b>
IV.1.4.2. Expresión de genes vegetales de defensa y metabolismo hormonal en genotipos de plantas de tomate con distinta sensibilidad a etileno inoculadas y no inoculadas con	

<i>R. irregularis</i>	<b>141</b>
<b>IV.2. Efecto de la aplicación de Fósforo fácilmente asimilable sobre el establecimiento de la Micorrización de tomate</b>	<b>143</b>
IV.2.1. Parámetros indicadores de la micorrización en condiciones de alta disponibilidad de fósforo	<b>144</b>
IV.2.2. Análisis de la expresión de genes marcadores de la micorrización y fisiología de etileno en condiciones de alta disponibilidad de fósforo	<b>147</b>
IV.2.3. Expresión de genes vegetales de defensa y metabolismo hormonal durante el proceso de micorrización bajo condiciones de distinta disponibilidad de fósforo	<b>151</b>
<b>IV.3. Efecto de la interacción entre el Fósforo y el Etileno sobre la regulación de la micorrización de tomate</b>	<b>153</b>
IV.3.1. Efectos sobre la micorrización de plantas mutantes de tomate alteradas en su percepción a etileno ( <i>Rin</i> ) en respuesta a una dosis alta de fósforo	<b>154</b>
IV.3.1.1. Expresión de genes marcadores de la funcionalidad de la simbiosis MA, de respuesta a etileno y de transporte de Pi en plantas silvestres y mutantes de tomate alterados en su percepción a etileno ( <i>Rin</i> ) en respuesta a una dosis alta de fósforo	<b>157</b>
IV.3.1.2. Expresión de genes vegetales de defensa y metabolismo hormonal durante el proceso de micorrización en mutantes de tomate alterados en su percepción a etileno ( <i>Rin</i> ) en respuesta a una dosis alta de fósforo	<b>159</b>
IV.3.2. Efectos sobre la micorrización de plantas mutantes de tomate de sensibilidad incrementada a etileno ( <i>Epi</i> ) en respuesta a una dosis alta de fósforo	<b>162</b>
IV.3.2.1. Expresión de genes marcadores de la funcionalidad de la simbiosis MA, respuesta a etileno y transporte de Pi en mutantes de tomate con sensibilidad incrementada a etileno en respuesta a una dosis alta de fósforo	<b>165</b>
IV.3.2.2. Expresión de genes vegetales de defensa y metabolismo hormonal durante el proceso de micorrización de mutantes de tomate con sensibilidad incrementada a etileno ( <i>Epi</i> ) en respuesta a una dosis alta de fósforo	<b>168</b>
IV.3.3. Micorrización en plantas mutantes de tomate con sensibilidad reducida a etileno (mutante <i>NRO</i> ) cultivadas en condiciones de alta disponibilidad de fósforo y tratadas con etileno exógeno	<b>170</b>
IV.3.4. Análisis de la respuesta de interferencia entre el fósforo y etileno en el establecimiento de la micorrización	<b>175</b>

<b>IV.4. Las estrigolactonas como moléculas mediadoras en el antagonismo del Fósforo y el Etileno</b>	<b>185</b>
IV.4.1. Expresión de genes de biosíntesis de estrigolactonas en plantas micorrizadas de tomate con distinta sensibilidad a etileno bajo condiciones de fósforo fácilmente asimilable	<b>185</b>
IV.4.2. Expresión del ortólogo del transportador LsPDR1 en plantas micorrizadas de tomate con distinta sensibilidad a etileno bajo condiciones de fósforo fácilmente asimilable	<b>187</b>
IV.4.3. Determinación de la capacidad secretora de SLs de plántulas de tomate silvestres y mutantes alteradas en su capacidad de percepción y respuesta a etileno y cultivadas en condiciones de fósforo fácilmente asimilable	<b>188</b>
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>192</b>
V.1. Participación del Etileno en la formación de la Micorriza Arbuscular en tomate	<b>193</b>
V.2. La regulación del Fósforo durante el establecimiento de la Micorrización es dependiente del genotipo de la planta	<b>203</b>
V.3. El Fósforo y el Etileno son reguladores antagonistas del proceso de establecimiento de la Micorrización	<b>206</b>
V.4. Las estrigolactonas podrían ser moléculas mediadoras en el antagonismo del Fósforo y el Etileno	<b>209</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>214</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>216</b>

# **I. INTERESES Y OBJETIVO DEL TRABAJO**



## **I. INTERÉS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO**

Los hongos micorrízicos arbusculares son microorganismos ancestrales que han permanecido miles de años asociados a las raíces de las plantas, aún desde las primeras etapas de la evolución vegetal y se sugiere que participaron activamente en la adaptación de éstas al medio terrestre. Esta asociación micorrízica arbuscular se reconoce como una parte importante e integral de los ecosistemas naturales en todo el mundo. Los hongos micorrízicos arbusculares son simbioses estrictos que extraen la mayor parte de sus nutrientes carbonados de la raíz de la planta y necesitan colonizar la raíz de una planta susceptible de formar micorrizas para completar su ciclo de vida (fase presimbiótica y fase simbiótica). A cambio, el hongo micorrízico mejora la nutrición mineral de la planta hospedadora, principalmente fosforada, mejora las características fisicoquímicas del suelo, e incrementa la resistencia de las plantas a diversos estreses abióticos, como el hídrico, cambios de pH o temperatura, y bióticos, como la enfermedad causada por microorganismos. Basado en lo anterior, la micorriza arbuscular es una alternativa biotecnológica con gran potencial como sustituto agroecológico de numerosos compuestos agroquímicos, pesticidas, plaguicidas, y abonos, con el objetivo de desarrollar una agricultura sostenible y compatible con el mundo moderno.

Por otro lado, las plantas han desarrollado complejas estrategias evolutivas para lograr su supervivencia en un ambiente en constante cambio. Las interacciones entre desarrollo de la planta y adaptación y respuesta a las condiciones ambientales son censadas y transmitidas por una compleja red de diferentes receptores y proteínas de señalización. La mayoría de estos mecanismos de percepción de la planta ante los cambios ambientales y su regulación no son conocidos o no están suficientemente aclarados, si bien las vías de señalización que involucran una o varias hormonas están involucradas en estas adaptaciones.

Respecto a la compatibilidad, funcionamiento y regulación de la simbiosis micorrízica arbuscular se considera que las señales, mecanismos y procesos moleculares que tienen lugar durante el establecimiento de la interacción están mediados por las fitohormonas en una interacción compatible y mutualista entre el hongo y la planta. Posiblemente, la compatibilidad de la asociación reside en la capacidad de la planta para discriminar las características positivas del hongo, permitiendo su entrada en la raíz, aunque restringiendo su desarrollo y controlando la expansión de la infección. En este sentido, la combinación de estudios genéticos, moleculares y celulares ha puesto de manifiesto que la simbiosis micorriza arbuscular es el resultado de una serie de procesos de señalización y adaptación celular

regulados por la planta, y donde las diferentes clases de hormonas vegetales juegan un papel protagonista.

Algunas investigaciones sugieren una participación del etileno, una fitohormona gaseosa, como regulador negativo de la simbiosis micorrízica arbuscular, aunque otros estudios indican que dosis bajas promueven la germinación de las esporas de estos hongos. No obstante, no se conoce con exactitud cuál es la participación de esta fitohormona en la regulación del establecimiento de la micorriza arbuscular. Además de la regulación mediada por etileno, es conocida la participación del fósforo como regulador negativo de la micorrización. A concentraciones altas de fósforo disponible en el suelo, la micorrización no se establece en las raíces de las plantas, ya que la planta prefiere asimilar el fósforo inorgánico (Pi) a través de la ruta directa de absorción, mediada por los transportadores de fósforo en la raíz. Sin embargo, bajo condiciones de deficiencia de fósforo disponible para las plantas, estas activan la vía simbiótica de asimilación, permitiendo el desarrollo de la micorriza arbuscular. La deficiencia de Pi provoca respuestas adaptativas, entre ellas la micorrización, detrás de las cuales existe una red compleja de interacciones moleculares que relacionan el factor de la baja disponibilidad de Pi con vías de señalización hormonal. En particular, el etileno juega un papel importante en la modulación de los cambios adaptativos a nivel de la morfología de la raíz, si bien la interacción entre el fósforo y el etileno como agentes reguladores de la micorrización es bastante desconocida.

Recientemente, se han sugerido que las estrigolactonas podrían mediar diferentes procesos del desarrollo de la planta, algunos de los cuales son también dependientes de etileno. Además, las estrigolactonas son hormonas estimuladoras de la micorrización y responden a la deficiencia de Pi, por lo que a “*priori*” podrían participar como elementos moleculares de la interacción entre el etileno y el fósforo durante el establecimiento de la micorrización.

Bajo el marco de referencia anterior, el objetivo general de nuestro estudio fue analizar la participación del etileno como agente regulador de la micorrización y establecer si existe mediación de esta hormona en la regulación de la micorrización mediada por la disponibilidad de fósforo, así como su posible interacción con estrigolactonas.

Para ello, este objetivo general se desglosó en los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el papel regulador del etileno en la formación de micorriza arbuscular en tomate.
2. Establecer el efecto regulador negativo de la aplicación de fósforo sobre la micorrización de tomate.
3. Estudiar si el efecto regulador negativo de la aplicación de fósforo sobre la micorrización de tomate está mediado por la ruta de señalización de etileno.
4. Establecer la posible relación entre estrigolactonas, fósforo y etileno como reguladores de la micorrización en tomate.

## **II. INTRODUCCIÓN**

## II. INTRODUCCIÓN

### II.1. GENERALIDADES DE LA SIMBIOSIS MICORRIZA

El crecimiento y desarrollo de las plantas está influenciado por una diversidad de factores del medio en el que viven, que pueden ser de carácter biótico y/o abiótico. A su vez, la presencia de la planta, y específicamente de la raíz, influye en el desarrollo de los microorganismos que viven a su alrededor. Los microorganismos son importantes proveedores de nutrientes para las plantas, tanto por su capacidad para el ciclado de nutrientes, como por la capacidad de alguno de ellos de establecer asociaciones simbióticas mutualistas a nivel de raíces de las plantas especializadas en la captación y transferencia de nutrientes. La mayoría de estas interacciones planta-microorganismo se desarrollan en una zona denominada “Rizósfera”, que constituye un ambiente dinámico en donde las comunidades microbianas interactúan con las raíces de las plantas. Entre las relaciones beneficiosas establecidas entre plantas y microorganismos destacan: microorganismos antagonistas del desarrollo de patógenos, bacterias promotoras del crecimiento vegetal, microorganismos inductores de resistencia, rizobacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, microorganismos solubilizadores de fosfato insoluble y hongos formadores de micorrizas (Stürmer, 2012).

#### II.1.1. Definición de Simbiosis Micorrízica

En 1885, el botánico alemán, Albert Bernard Frank, introdujo la palabra micorriza, una palabra de origen griego que define la simbiosis entre un hongo (*mycos*) y la raíz (*rhizos*) (Harrison, 1997). Frank usó esta palabra para describir la relación de beneficio mutuo entre los hongos del suelo y las raíces de las plantas. El hongo proporciona nutrientes vitales, así como agua, mientras que la planta proporciona los carbohidratos producidos por la fotosíntesis. El hongo formador de micorriza es completamente dependiente de la planta para el carbono orgánico. A nivel de rizosfera, la mayoría de las plantas superiores forman simbiosis mutualista con hongos micorrízicos que dan lugar a relaciones benéficas para las plantas. Se tiene documentado que esta simbiosis afecta aproximadamente al 90% de las especies vegetales de la Tierra (Remy *et al.*, 1994). Los hongos micorrízicos son microorganismos ancestrales que han permanecido asociados a las raíces de las plantas desde las primeras etapas de la evolución de las mismas y se sugiere que ayudaron a estas en la conquista del medio terrestre (Redecker *et al.*, 2000). Cincuenta años antes de Frank, estas asociaciones ya eran conocidas y consideradas,

aunque se le atribuía una naturaleza parasítica, y fue en 1987 cuando se pudo demostrar que la colonización de las raíces tenía un carácter mutualista (Hayman, 1987). El origen de los hongos micorrícicos se remonta al periodo geológico del Ordovicio (hace 460 millones de años), tal y como sugieren tanto los registros fósiles, como los resultados de la datación molecular (Redecker *et al.*, 2000; Schüßler *et al.*, 2000). Es en este periodo cuando se produce la colonización del medio terrestre por las plantas a partir de un medio acuoso. Se ha sugerido que los hongos micorrícicos tuvieron un papel determinante en esta transición (Malloch *et al.*, 1980), ayudando a los antecesores de las plantas actuales en la absorción de nutrientes de baja movilidad en el suelo, como el fosfato, y de agua. Hoy día perduran evidencias de esta temprana asociación de hongos micorrícicos con plantas primitivas, como es el hecho de que existan asociaciones micorrícicas con los briófitos (Schüßler, 2000).

La asociación micorrícica es ampliamente reconocida como una parte importante e integral de los ecosistemas naturales en todo el mundo. Los hongos micorrícicos son simbioses, y muchos de ellos (los formadores de micorriza arbuscular) son simbioses estrictos que necesitan colonizar la raíz de una planta susceptible de formar micorrizas para completar su ciclo de vida (Redecker *et al.*, 2000).

### **II.1.2. Clasificación taxonómica para el Phylum Glomeromycota**

Stürmer (2012) reporta que desde 2010 hasta la fecha se han propuesto dos clasificaciones distintas para el Phylum Glomeromycota (**Cuadro II.1**), y ambas se caracterizan por una reordenación del género *Glomus*, el cuál ha sido ampliamente demostrado que tiene un carácter polifilético (Schwarzott *et al.*, 2001). Schüßler y Walker (2010) realizaron un análisis filogenético de hongos del phylum Glomeromycota, basado en secuencias SSU de genes ARNr y propuso una familia y tres géneros nuevos. La familia Glomeraceae se separó en los géneros *Glomus*, *Funneliformis*, *Sclerocystis* y *Rhizophagus*, en tanto que la familia Claroideoglomeraceae incluyó al género *Claroideoglomus*. Oehl *et al.*, (2011) propuso una reorganización de las especies del género *Glomus* en general y postula los géneros *Simiglomus* y *Septoglomus* en la familia Glomeraceae y los géneros *Viscospora* y *Claroideoglomus* en la familia Claroideoglomeraceae

**Cuadro II.1. Reciente clasificación propuesta para los hongos Glomeromycota dentro del reino Fungi (Stürmer, 2012)**

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género				
Walker and Schüßler (2010) Glomeromycota	Glomeromycetes	Glomerales	Glomeraceae	<i>Glomus</i> <i>Funneliformis</i> <i>Sclerocystis</i> <i>Rhizophagus</i>				
			Diversisporales	Claroideoglomeraceae	<i>Claroideoglomus</i>			
				Gigasporaceae	<i>Gigaspora</i> <i>Racocetra</i> <i>Scutellospora</i>			
				Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i>			
				Entrophosporaceae	<i>Entrophospora</i>			
			Paraglomerales Archaeosporales	Pacisporaceae	<i>Pacispora</i>			
				Diversisporaceae	<i>Diversispora</i> <i>Otospora</i> <i>Redeckera</i>			
				Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>			
				Archaeosporaceae	<i>Archaeospora</i>			
				Ambisporaceae	<i>Ambispora</i>			
		Geosiphonaceae		<i>Geosiphon</i>				
		Oehl et al. (2011a) Glomeromycota		Glomeromycetes	Glomerales	Glomeraceae	<i>Glomus</i> <i>Funneliformis</i> <i>Simiglomus</i> <i>Septoglomus</i>	
						Diversisporales	Claroideoglomeraceae	<i>Claroideoglomus</i> <i>Viscospora</i>
							Diversisporaceae	<i>Diversispora</i>
							Entrophosporaceae	<i>Entrophospora</i>
			Acaulosporaceae				<i>Acaulospora</i> <i>Kuklospora</i>	
			Gigasporales			Pacisporaceae	<i>Pacispora</i>	
						Gigasporaceae	<i>Gigaspora</i>	
							Scutellosporaceae	<i>Scutellospora</i> <i>Oubisporea</i>

El término micorriza engloba a muchos y muy diversos tipos de asociaciones entre hongos del suelo y plantas. En un principio se clasificaron a las micorrizas en ectomicorrizas y endomicorrizas (Smith y Read, 1997), y en la actualidad, y atendiendo a la diversidad estructural de micorrizas, estas se clasifican en siete tipos morfológicos distintos (Smith y Read, 2008) (Figura II.1.):

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



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

- e. Micorrizas orquideoides → En este caso, la micorriza la forman plantas de la familia *Orchidaceae*, que son parcial o completamente aclorófilas para alguna parte de su vida, y que se asocian con hongos *Basidiomycota*. Como característica morfológicas del hongo cabe resaltar que tras penetrar en las células de la raíz forma ovillos de hifas dentro de la célula hospedadora, previa invaginación de la membrana plasmática, así como agregados poco organizados de hifas que liberan los nutrientes cuando degeneran (Peterson *et al.*, 1998; Rasmussen, 2002). La división entre las orquídeas que son de color verde en una parte de su vida y las que son totalmente aclorófilas se refleja en las identidades de sus hongos asociados, ya que los hongos simbioses de orquídeas verdes son saprófitos que pertenecen al género *Rhizoctonia*, y los de orquídeas aclorófilas suelen ser hongos formadores de ectomicorrizas en las plantas autotróficas (Smith y Read, 2008).
  
- f. Micorrizas ericoides → En esta simbiosis participan muchos miembros de la familia *Ericaceae* (plantas de brezo) y familias relacionadas, todas ellas con la peculiaridad de formar pelos radicales que se caracterizan por la falta de crecimiento secundario y, la raíz está compuesta por tan solo el haz vascular, una o dos capas de células corticales y una capa más de células epidérmicas. Los hongos que forman este tipo de micorrizas son de la división *Ascomycota*, y envuelven a las raíces en una trama extensa de hifas extraradicales y también penetran intracelularmente, aunque solo en las células epidérmicas, formando un complejo de hifas ramificadas. Muchas de estas plantas crecen en hábitats donde la mayor parte de los nutrientes en el suelo están en forma orgánica y parece claro que los hongos tienen un papel considerable en la movilización de estos nutrientes para ponerlos a disposición de la planta (Smith y Read, 2008).
  
- g. Micorrizas arbusculares → Es la asociación de mayor distribución entre las plantas, encontrándose en angiospermas, gimnospermas, helechos y briofitos. La forman hongos de la división *Glomeromycota* (Schubler *et al.*, 2000). Tradicionalmente esta simbiosis se

conoce como micorrizas vesículo-arbusculares por la capacidad de ciertos hongos de formar tanto arbusculos como vesículas en el interior de la raíz (Sanders *et al.*, 1995; Kuhn *et al.*, 2001; Pawlowska y Taylor, 2004).

En el **Cuadro II.2** se muestra de forma general las características más importantes de cada tipo de micorriza:

**Cuadro II.2.** Características más importantes de los tipos de micorrizas

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

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

En cuanto a las estructuras formadas, al tipo de colonización y a la cantidad de especies vegetales y fúngicas implicadas, se puede decir que las micorrizas arbusculares son las de mayor importancia y las que más ampliamente se encuentran distribuidas en los ecosistemas naturales y agrícolas (tanto a nivel geográfico como dentro del Reino Vegetal). La principal característica de las micorrizas arbusculares es la formación de unas estructuras intraradicales denominadas arbusculos (Gallaud, 1905) que consisten en una ramificación

dicotómica de la hifa en el interior de las células vegetales, y cuya función es el intercambio de nutrientes entre planta y hongo. Además de las estructuras intraradicales se desarrolla un amplio micelio extraradical donde se forman las esporas, y encargado de la captación de nutrientes del suelo, ampliando así el volumen de suelo que puede ser explorado por la planta en asociación con el hongo. Francl (1993) menciona que los hongos formadores de micorrizas arbusculares pertenecen a la clase Zigomicetes y se caracterizan porque producen, a lo largo de su ciclo de vida, arbuscúlos (en todos los casos) y vesículas (en la mayoría de ellos). Los arbuscúlos son las estructuras responsables de la transferencia bidireccional de nutrientes entre los simbios, realizada en la interfase planta-hongo producida a este nivel. Las vesículas son estructuras globosas e irregulares que actúan como órganos de reserva de lípidos.

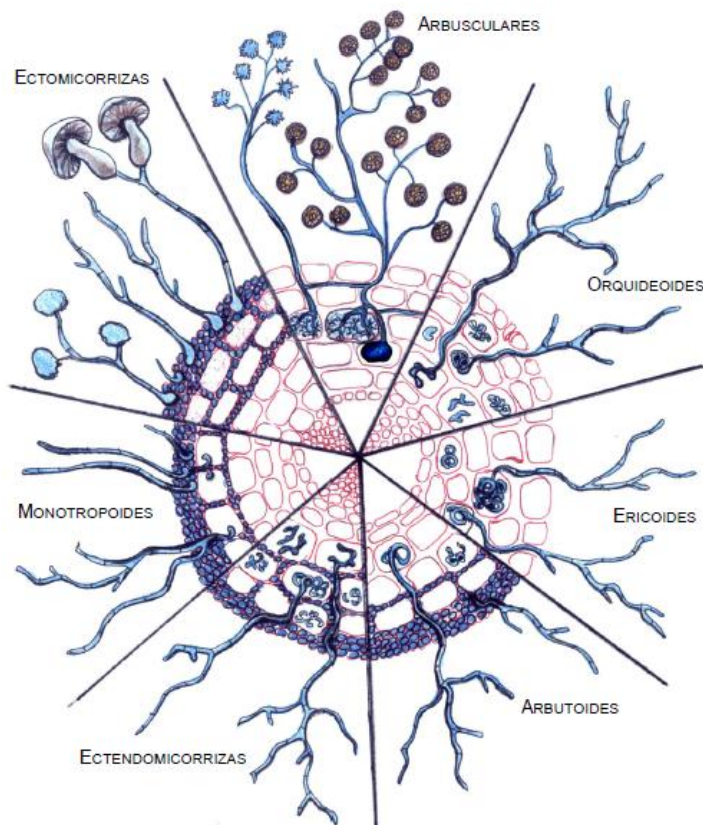


Figura II.1. Esquema de tipos de micorrizas (Herrera-medina, 2008)

## II.2. CICLO DE VIDA DE LOS HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS ARBUSCULARES

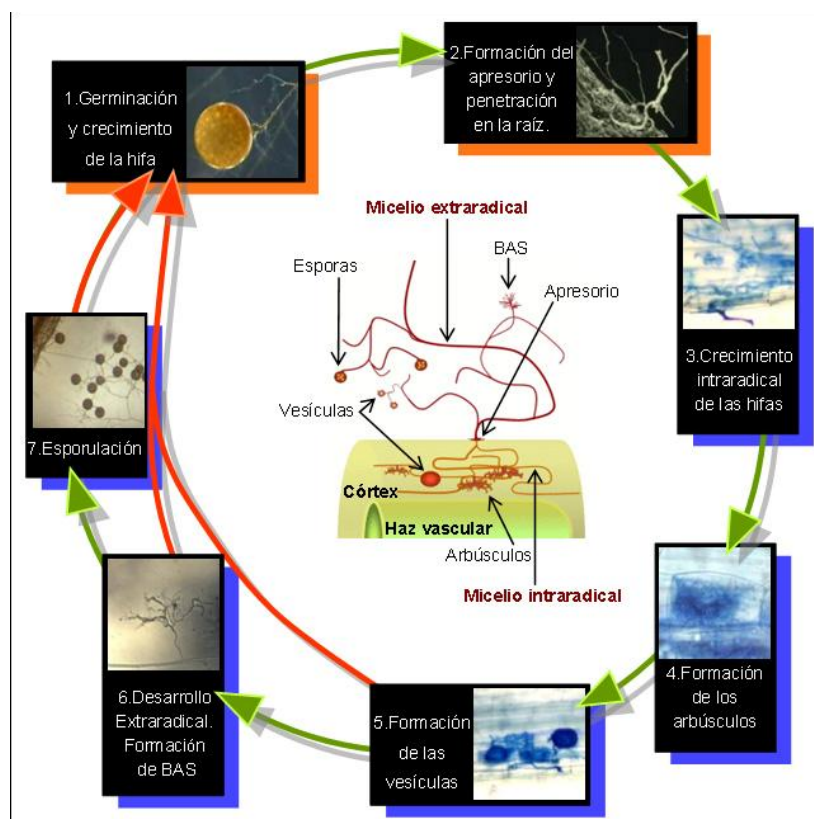
Como se ha señalado con anterioridad, los hongos micorrícicos son simbios estrictos que necesitan colonizar la raíz de una planta susceptible de formar micorrizas para completar su

ciclo de vida, y las micorrizas arbusculares son las de mayor importancia. El ciclo de vida de los HMA está dividido en dos fases:

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

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

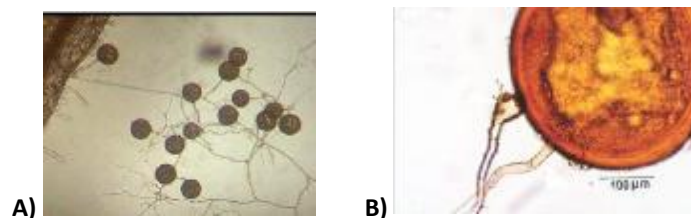
A continuación se describen las distintas etapas del ciclo de vida mencionado, que se resumen esquemáticamente en la **Figura II.2**.



**Figura II.2.** Ciclo de vida de los hongos micorrizcos 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 (Herrera-Medina, 2008).

### II.2.1. Etapa de precolonización (presimbiótica). Germinación de las esporas

Los hongos micorrícicos producen esporas de origen asexual que contienen un gran número de núcleos, hasta 2000 por espora y de glóbulos lipídicos. Las esporas de hongos formadores de MA son generalmente de forma redondeada y con una gruesa pared celular, y cuyo diámetro oscila entre 50-100µm (Bécard y Pfeffer, 1993). Se ha propuesto que el principal mecanismo responsable de la formación de las esporas multinucleadas es el flujo masivo de núcleos desde la hifa de sustentación hacia la nueva espora (Jany y Pawlowska, 2010). La germinación de las esporas es un proceso independiente de la presencia de la planta hospedadora, y no requiere más que de unas condiciones adecuadas de humedad y temperatura del suelo. No obstante, determinados factores físicos, como la vernalización previa de las esporas (Hepper, 1981), químicos, como concentraciones elevadas de CO<sub>2</sub> y presencia de exudados radicales (Becard y Piché, 1989) y biológicos, derivados de la presencia de una amplia variedad de hongos y bacterias del suelo (Hildebrandt *et al.*, 2002) aceleran el ritmo y tasa de germinación de las esporas (**Figura II.3**). La germinación se evidencia por la formación de uno o varios tubos de germinación y va acompañada de una activación del metabolismo de la espora (Bonfante-Fasolo, 1984). En los primeros días de su desarrollo, el tubo de germinación consume trehalosa (Bécard *et al.*, 1991) y posteriormente pasa a consumir triglicéridos (Beilby, 1980).



**Figura II.3.** Esporas de hongos micorrícicos: A) Esporas de *Rhizophagus irregularis* (de Tiwari); B), Espora germinando de *Glomus decipens* (Muthukumar) (Herrera-Medina, 2008).

Los hongos formadores de MA desarrollan esporas multinucleadas de resistencia sobre hifas vegetativas (Bécard y Pfeffer, 1993; Hosny *et al.*, 1998). Aunque se acepta que se reproducen asexualmente, análisis transcriptómicos recientes indican que estos hongos disponen de la información genética necesaria para llevar a cabo la meiosis y en consecuencia una reproducción sexual (Tisserant *et al.*, 2012). Existen, además, indicios de variabilidad genética dentro de una misma espora, lo que se manifiesta por la presencia de polimorfismos

a nivel de la secuencia de los genes que codifican el ARN ribosómico (Lanfranco *et al.*, 1999; Clapp *et al.*, 2001), así como el número de estos *loci* en un mismo núcleo (Trouvelot *et al.*, 1999). Además los hongos MA podrían aumentar su patrimonio genético mediante el intercambio de núcleos de unas colonias fúngicas con otras. Las hifas de los hongos MA son cenocíticas, con cientos de núcleos compartiendo un mismo citoplasma, al igual que en las esporas. En repetidas ocasiones se ha puesto de manifiesto la formación de anastomosis entre hifas de la misma especie e incluso entre aislados muy relacionados entre sí (Giovannetti *et al.*, 2001; De La Providencia *et al.*, 2005; Purin y Morton, 2011), permitiendo el intercambio de núcleos (Giovannetti *et al.*, 2001).

Existen una serie de factores medioambientales que afectan la germinación de las esporas, aunque probablemente, las complejas interacciones entre los diferentes factores sea el elemento clave para la germinación de las esporas en la naturaleza. Entre estos factores, hay que destacar:

- El pH. Dependiendo de la especie o género existe una mayor o menor dependencia del pH para la germinación de las esporas, así como también existe un rango óptimo de pH dependiendo de cada especie. Por ejemplo, la germinación de las esporas de la especie *Acaulospora laevis* está fuertemente regulada por el pH del suelo, siendo su pH óptimo entre 4 y 5 (Hepper, 1984). Por el contrario, la mayoría de especies del género *Glomus* germinan mejor a pH dentro del rango de 6 a 8 (Douds, 1997).
- La temperatura. Este factor ambiental afecta fuertemente a la germinación, y el rango óptimo de temperatura para la germinación depende mucho de las especies (Tommerup, 1983). La temperatura óptima para la germinación suele estar relacionada con el hábitat al que pertenece cada hongo formador de MA (Giovannetti *et al.*, 2010).
- La humedad del suelo tiene efectos variables sobre la germinación de esporas de diferentes especies, ya que por ejemplo *Gigaspora margarita* germina independientemente del contenido de humedad del suelo, mientras que esporas de otras especies tales como *G. mosseae*, *R. irregularis* y *A. longula* inhiben su germinación en potencial matricial entre -0.50 a -2.20 MPa (Douds y Schenck, 1991). Por otra parte, es probable que los ciclos de humedecimiento y secado del suelo sean los factores más importantes que afectan a la supervivencia de las esporas y a su

germinación y por tanto a la capacidad de formación de MA, en especial en los climas mediterráneos, donde las esporas de hongos *Glomeromycota* sobreviven los veranos calurosos y secos para colonizar nuevas plantas durante la siguiente estación más húmeda (Braunberger *et al.*, 1996).

- El contenido de nutrientes también es un factor ambiental que afecta la germinación de las esporas, y se ha observado que altos contenidos en fósforo reducen el porcentaje de germinación de esporas de varias especies MA (Giovannetti *et al.*, 2010).
- Los componentes moleculares de los exudados de raíces de plantas hospedadoras, como las estrigolactonas entre otros, afectan generalmente positivamente a la germinación de esporas, en función de la planta y especies de hongos MA (Scervino *et al.*, 2006; Parniske, 2008).

La microflora rizosférica también puede ser un factor regulador de la germinación de esporas de hongos formadores de MA. En este sentido, y aunque la mayoría de especies de hongos MA germinan en condiciones axénicas, otros aceleran el ritmo de germinación de sus esporas al contactar con algunos exudados de una amplia variedad de hongos y bacterias del suelo (Hildebrandt *et al.*, 2002; Scervino *et al.*, 2008; Pivato *et al.*, 2009).

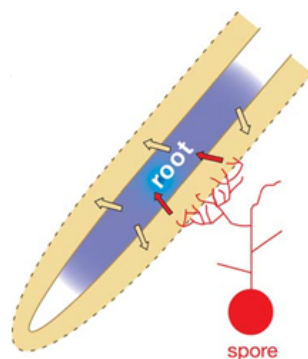
### **II.2.2. Crecimiento y desarrollo de las hifas en busca de la raíz de la planta huésped. Fase Simbiótica**

El tubo de germinación produce un micelio que, en ausencia de planta hospedadora, alcanza un desarrollo muy limitado. Sin embargo, en presencia de raíces de especies micotróficas, o de los exudados radicales que producen, el micelio alcanza un mayor desarrollo, aumentando especialmente su grado de ramificación (Tamasloukht *et al.*, 2003). Esta estimulación no se produce en las proximidades de las raíces de plantas no hospedadoras. Se desconoce la identidad de todos los componentes de los exudados radicales responsables de este efecto, pero sí se sabe que no tienen una naturaleza flavonoica (Buee *et al.*, 2000). De modo genérico se denominan “factores de ramificación” (branching factors) a estos productos exudados por la raíz y estimuladores de la ramificación de las hifas (**Figura II.1.4.**). Recientemente se ha caracterizado químicamente alguno de estos factores, en concreto uno exudado por raíces de

*Lotus* (Akiyama *et al.*, 2005), determinándose que el factor estimulador de la ramificación pertenece al grupo de las estrigolactonas.

Actualmente se conoce que las estrigolactonas son uno de los componentes exudados por la raíz con mayor capacidad de provocar ramificación y crecimiento de las hifas (Akiyama *et al.*, 2005; Besserer *et al.*, 2006). Las estrigolactonas se han propuesto como una nueva clase de hormona vegetal derivada del metabolismo de los carotenoides (Matusova *et al.*, 2005), que la raíz exporta al exterior mediante transportadores tipo ABC PDR1 (Kretschmar *et al.*, 2012). La percepción de las estrigolactonas por el hongo induce el llamado estado presimbiótico, el cual se caracteriza por un continuo crecimiento de las hifas, con abundante ramificación e incremento en la actividad metabólica (Akiyama *et al.*, 2005). Curiosamente las estrigolactonas son sesquiterpenos responsables de la inducción de la germinación de semillas de plantas parásitas de los géneros *Orobanche* (jopo) y *Striga*, poniéndose de manifiesto el papel ecológico tan importante de estos compuestos, que tanto estimulan la germinación de semillas de plantas parásitas de la raíz, como la ramificación del micelio de hongos mutualistas (Akiyama *et al.*, 2005; Tawarayama *et al.*, 2006; García Garrido *et al.*, 2009).

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



**Figura II.1.4.** Intercambio de señales entre la raíz y el hongo MA antes de su interacción física. Cuando el tubo de germinación del hongo entra en la zona de la raíz, una señal (s) presente en los exudados de raíz de la planta (beige) provoca un aumento en la actividad respiratoria en el hongo y favorece una intensa ramificación hifal. Una señal difusible de las hifas fúngicas (flechas rojas) activa la expresión génica en la raíz de la planta (sombreado azul). Tomado de Harrison, 2005.



Por otro lado, la planta hospedadora también se prepara para el establecimiento de la simbiosis. Así, en presencia del hongo se inicia el desarrollo de un programa genético que, en parte, es similar al desencadenado en leguminosas en presencia de su *Rhizobium* específico. Esto se ha puesto de manifiesto en leguminosas mutantes afectadas en la nodulación, que también tienen alterada la formación de micorrizas (Albrecht *et al.*, 1998). En este sentido se ha comprobado que factores difusibles producidos por hongos micorrícicos son capaces de activar genes de la nodulación, como ENOD11 (Kosuta *et al.*, 2003), activación que se restringe a la zona de la raíz en contacto con el hongo (Chabaud *et al.*, 2002). Sin embargo, pese a compartir vías comunes de señalización, las simbiosis con los hongos micorrícicos o con los rizobios presentan también distintas rutas de integración de la señal, lo que se refleja en que determinados mutantes que no responden a factores Nod, no pierden la capacidad de responder a los hongos micorrícicos (Chabaud *et al.*, 2002).

Se ha propuesto que un factor Myc, análogo al factor Nod de los rizobios y producido por el hongo es metabólicamente activo, induce respuestas moleculares en la raíz de la planta hospedadora requeridas para una exitosa colonización fúngica MA (Kosuta *et al.*, 2003; Bucher *et al.*, 2009). La naturaleza química del factor de Myc se desconoció durante mucho tiempo. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que tienen similitudes estructurales con los factores Nod rizobiales (Maillet *et al.*, 2011). En este sentido, recientemente se ha propuesto que los factores Myc son una mezcla de lipoquitooligosacáridos (LCOs) simples sulfatados y no sulfatados, que estimulan la formación de MA en especies de diferentes familias de plantas, y que son activados por señales secretadas por las plantas como las estrigolactonas (Maillet *et al.*, 2011). Otras moléculas, tales como el factor de transcripción con dominio GRAS, NSP2, también se han descrito como importantes para la señalización presimbiótica. La existencia de factores simbióticos similares en hongos formadores de MA y rizobios sugiere mecanismos similares en la percepción de la planta, de hecho un único receptor tipo quinasa con el motivo LysM media el reconocimiento de ambos, *Rhizobium* y hongos MA, en los pelos radicales de *Parasponia andersonii* (Op den Camp *et al.*, 2011). Entre las potencialidades de estos factores Myc se ha descrito que estas moléculas activan la expresión de genes simbióticos en la planta, tal y como ocurre con el gen *ENOD11*, el cual se ha visto que se activa en plantas de *M. truncatula* en experimentos usando una membrana artificial que evita el contacto directo entre el hongo y las raíces (Kosuta *et al.*, 2003).

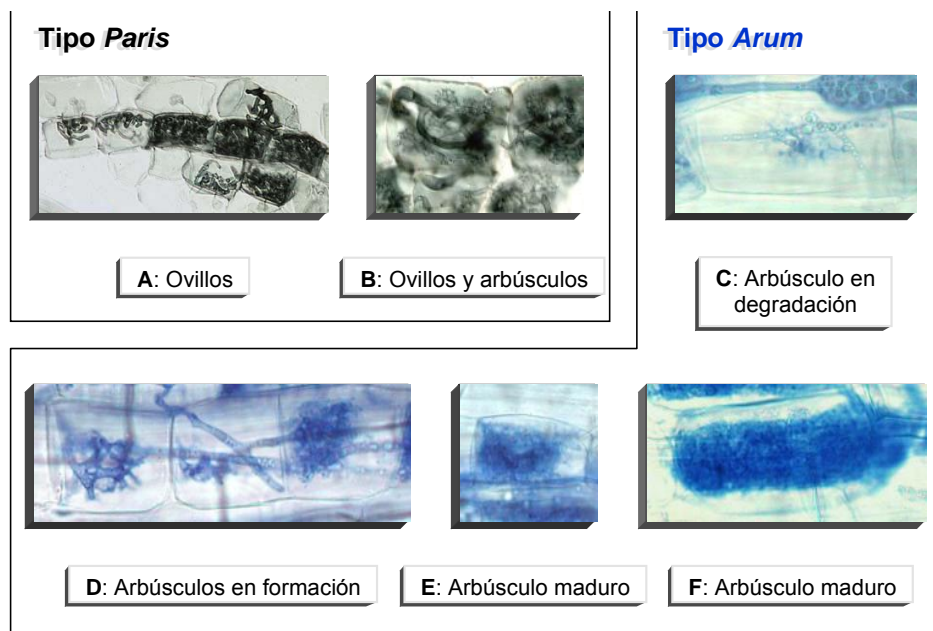
### II.2.2.1. Penetración en la raíz mediante la formación de un apresorio

Los mecanismos que permiten la penetración del hongo en la raíz aún no se conocen en su totalidad. Se considera que tanto la presión que ejercen los apresorios y las hifas de penetración en su avance como la producción y liberación de una limitada cantidad de enzimas hidrolíticas de componentes de pared celular vegetal son factores importantes para la penetración de la raíz. Aunado a lo anterior, los hongos micorrícicos son capaces de producir una limitada cantidad de pectinasas y celulasas (Bonfante-Fasolo *et al.*, 1992). Simultáneamente al avance de las hifas de penetración en la planta se activa un conjunto de genes, regulados por LjSYM4 y LjSYMRK4, que permiten el paso del hongo a zonas más profundas del córtex de la raíz (Demchenko *et al.*, 2004) en lo que se ha denominado activación del aparato de penetración (PPA). Cuando faltan estos genes, la entrada del hongo en la raíz ocurre, pero la interacción es abortada, lo cual se ha asociado con la muerte tanto de las células corticales, como del ápice de la hifa (Bonfante *et al.*, 2000).

El aparato de penetración (PPA) es una estructura subcelular que predetermina la trayectoria de crecimiento de los hongos a través de la célula de las raíces y que está formada 4-5 horas después de la formación de un apresorio fúngico, también llamado hyphopodium. La formación del PPA es precedida por una migración del núcleo de la célula vegetal hacia el punto de entrada previsto por hongos. El núcleo se desplaza delante del PPA en desarrollo, para orientar su dirección de crecimiento a través de la célula. El aparato de penetración es un puente citoplásmico de espesor a través de la vacuola de la célula huésped. Contiene los microtúbulos y microfilamentos del citoesqueleto, que junto con denso retículo endoplasmático forman un tubo hueco dentro del PPA que conecta el núcleo con el sitio de contacto del apresorio (Genre *et al.*, 2005; Siciliano *et al.*, 2007). Una vez que se haya completado este "túnel transcelular" la hifa fúngica puede penetrar en la célula huésped. Las membranas de retículo endoplasmático que decoran el túnel están en una posición ideal para la síntesis de la membrana perifungal. Sin embargo, las señales que activan la formación del PPA son desconocidos (Genre *et al.*, 2005).

El hongo micorrícico coloniza el córtex de la raíz siguiendo dos patrones de desarrollo diferentes, de acuerdo a la estructura de la raíz: Arum y Paris. En las micorrizas de tipo Arum, las hifas del hongo se extienden por los espacios intercelulares del córtex, formando a intervalos regulares pequeñas ramificaciones laterales que penetran las paredes celulares y se

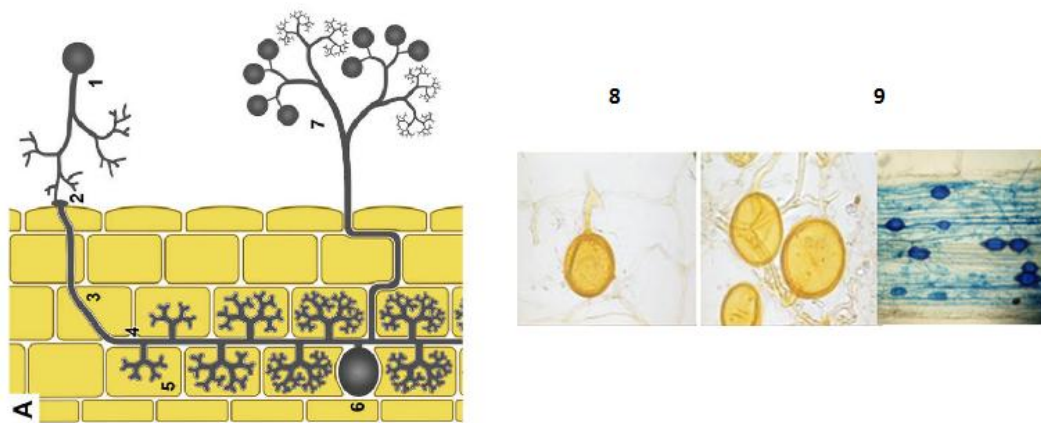
ramifican dicotómicamente, de forma repetida, dando lugar a los arbuscúlos. En las micorrizas tipo Paris, presentes en Ginkgo (Bonfante-Fasolo y Fontana, 1985), la formación de hifas intercelulares está muy limitada, por lo que la colonización se extiende de célula en célula formando bucles en los que se producen pequeñas ramificaciones a modo de arbuscúlos. La formación de los arbuscúlos supone una alteración profunda de la célula vegetal por la deformación del plasmalema y del protoplasto para acomodar al arbuscúlo, ya que el hongo nunca penetra al citoplasma (**Figura II.5.**). También se produce una fragmentación de la vacuola, los núcleos migran desde la periferia hacia el centro, y se modifican los plastidios (Fester *et al.*, 2001), formando una red en contacto físico con los arbuscúlos (Strack y Fester, 2006), ya que estos orgánulos están involucrados en numerosas actividades biosintéticas, incluyendo la producción de apocarotenoides que se acumulan en las raíces micorrizadas (Walter *et al.*, 2007), y de hormonas vegetales tales como el ácido abscísico, el cual tiene un papel importante en el desarrollo de estos arbuscúlos (Herrera-Medina *et al.*, 2007; Martín-Rodríguez *et al.*, 2010; Martín-Rodríguez *et al.*, 2011). Los arbuscúlos tienen una vida media de 8.5 días, ya que son una estructura temporal y transitoria que se degradan a los 2 - 4 días después de completar su desarrollo (Genre *et al.*, 2005; Genre *et al.*, 2009). Las hifas arbusculares en degradación se separan del citoplasma restante del hongo por tabicación (Javot *et al.*, 2007), dejando una célula cortical intacta que es capaz de acoger de nuevo otro arbuscúlo (Pumplin y Harrison, 2009).



**Figura II.5.** Arbuscúlos de micorrizas arbusculares tipo Paris y Arum (Herrera-Medina, 2008).

También el hongo experimenta cambios en su estructura en la zona del arbusculo, pues la hifa sufre una progresiva reducción del grosor de la pared celular a medida que se producen las ramificaciones más finas (Bonfante-Fasolo *et al.*, 1992), unido a una mayor actividad H<sup>+</sup>-ATPasa (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1991), lo que sugiere que es a nivel de los arbusculos donde se produce el intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo. La formación de arbusculos y la extensión de la colonización parecen estar estrictamente controlados por la planta, como indica el hecho de que mutantes en el gen *har1*, también asociado con el control de nódulos radicales en leguminosas (Nishimura *et al.*, 2002), presentan un número mayor de arbusculos que las plantas silvestres (Solaiman *et al.*, 2000). Los últimos estudios apuntan a un papel fundamental de hormonas vegetales, principalmente Giberelinas y ABA, en la regulación y formación de arbusculos en la raíz micorrizada (Foo *et al.*, 2013). Además, análisis a nivel molecular combinados con estudios de análisis morfológico han permitido establecer un patrón de desarrollo de arbusculos, diferenciando diversas fases o estadios de maduración y caracterizando genes vegetales marcadores de dicho desarrollo (Gutjahr y Parniske, 2013). En ciertas especies de hongos micorrízico arbusculares se observa también la formación de vesículas, estructuras ovoides repletas de glóbulos lipídicos cuya función parece ser el acúmulo de productos de reserva (Smith y Gianinazzi-Pearson 1988) (**Figura II.6.**). La mayoría de las especies de hongos formadores de MA, salvo los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora*, pueden formar estas vesículas. Estas se desarrollan bien en los espacios intercelulares de la raíz, o dentro de alguna célula cortical, ocupando la totalidad de esta y provocando un ensanchamiento de sus paredes. Su formación es posterior a la de los arbusculos, por lo que parece ser que necesitan la formación y funcionamiento previo de estos. Se forman a partir del hinchamiento de una hifa terminal, y para ello necesitan del aporte de carbohidratos procedentes de la planta (Smith y Read, 1997).

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



**Figura II.6.** Principales cambios morfológicos y las estructuras típicas fúngicas formadas durante el ciclo de vida de un hongo MA: (1) germinación de las esporas y la hifa ramificada, (2) apresorio, (3) hifa intracelular que infecta la raíz y crecienta en la raíz interna de la corteza, (4) hifa intercelular crecienta a lo largo de la corteza de las raíces, (5) arbusculos formada en células de la corteza interior, (6) de vesículas intercelulares, que puede estar formado como órgano de almacenamiento (7), con micelio extra ramificado para captación de nutrientes y agua del suelo, desarrollo de nuevas esporas (Hause y Schaarschmidt, 2009). 8) Esporas de *Glomus intraradices* (*R. irregularis*) al microscopio. 9) Estructura intraradical de *G. intraradices* (Tapia-Gone *et al.*, 2008).

### II.2.2.2. Micelio extrarradical

Tras el proceso de penetración del hongo en la raíz y formación de los primeros arbusculos comienza el desarrollo de la red micelial (fase extrarradical de la simbiosis), que permite la exploración de una mayor superficie de suelo y la absorción de los nutrientes minerales que serán cedidos a la planta posteriormente a nivel de los arbusculos. Inicialmente se producen hifas gruesas llamadas exploradoras, responsables del avance del micelio y de la extensión de la colonia fúngica. De manera regular se van formando estructuras muy ramificadas, que recuerdan en cierta medida a los arbusculos, conocidas como BAS (del inglés Branched Absorbing Structures-Estructuras ramificadas de absorción), cuya función sería la absorción de nutrientes del suelo (Bago *et al.*, 2000). El micelio extrarradical se encuentra mucho más expuesto a las condiciones ambientales y a la acción de otros microorganismos del suelo, estableciéndose diversas interacciones de gran importancia para el desarrollo de las plantas, el equilibrio de las poblaciones microbianas en el suelo y la formación de agregados estables en el mismo y el mantenimiento de su estructura (Jeffries y Barea, 2001). Al igual que en el micelio intraradical, en el micelio extrarradical aparecen unas estructuras globulares denominadas vesículas, que se han postulado ser estructuras de almacenamiento, aunque no se tiene certeza al respecto (Figura II.7.).

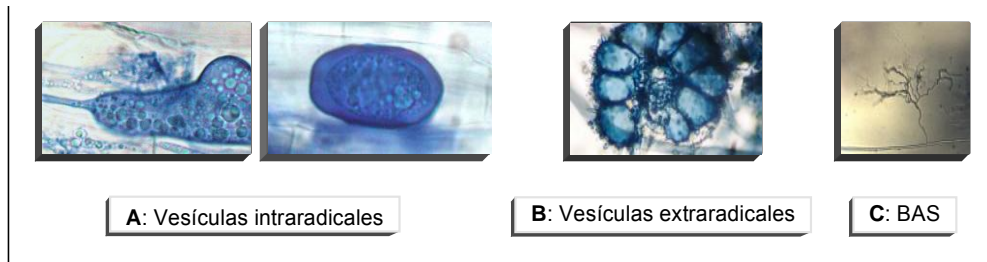


Figura II.7. Vesículas intra y extraradicales, y BAS (Herrera-Medina, 2008).

Gil (1995), sugiere que cuando la infección interna está bien establecida, las hifas del hongo pueden crecer externamente desde la raíz de la planta hacia el suelo (micelio externo) y explorar un volumen de suelo inaccesible a las raíces; con ello la planta aumenta considerablemente su superficie de absorción, de 100 a 1000 veces y por tanto su capacidad de captación de nutrientes y de agua. El micelio extrarradical de los diferentes hongos MA presenta patrones de crecimiento y frecuencias de anastomosis y ramificación que difieren de unas especies a otras (Giovannetti *et al.*, 1999). Posiblemente estas diferencias reflejen las diferentes estrategias de exploración y ocupación de los diferentes nichos del suelo (Figura II.8.).

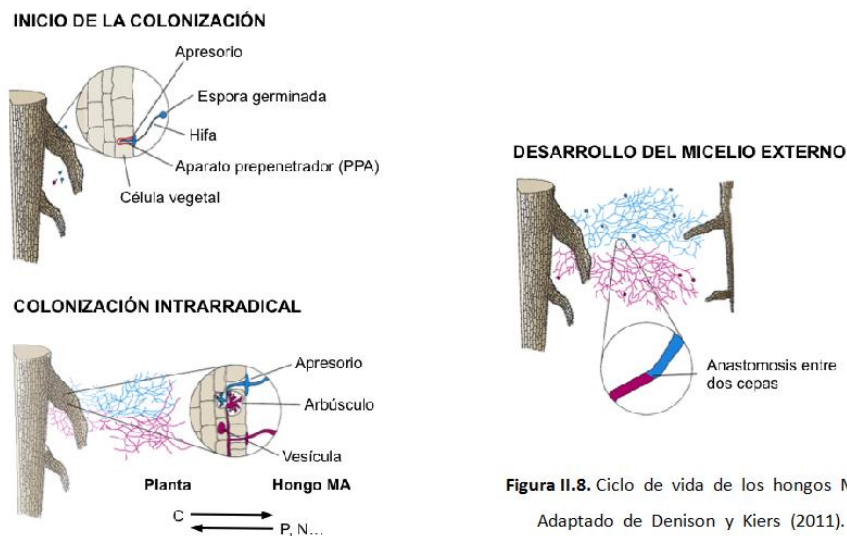


Figura II.8. Ciclo de vida de los hongos MA. Adaptado de Denison y Kiers (2011).

### II.2.3. *Rhizophagus irregularis* como organismo modelo de la simbiosis MA

*Glomus intraradices* Schenck y Smith DAOM 197198, recientemente reasignado como *G. irregulare* y posteriormente como *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198 (Stockinger *et al.*, 2009) es un hongo formador de micorriza arbuscular altamente eficaz en la movilización, la

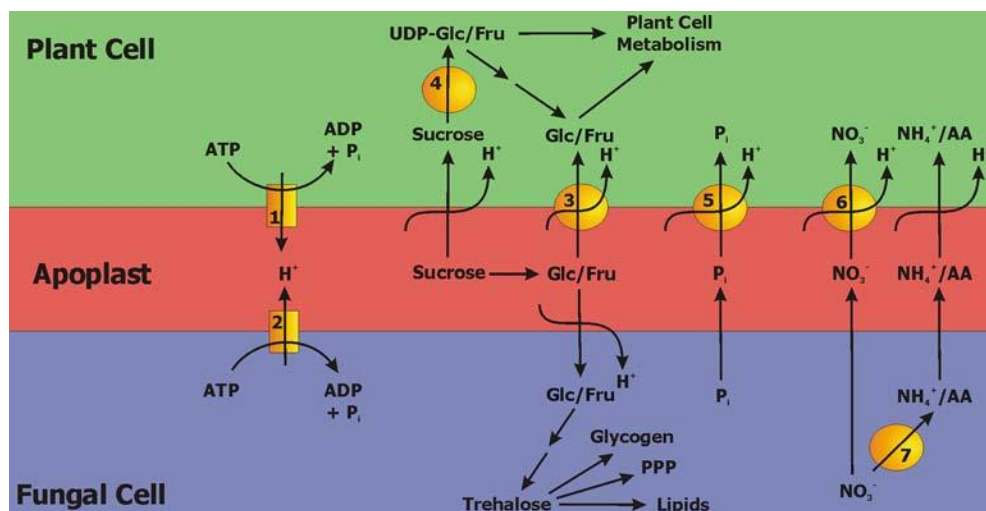
adquisición y la transferencia de nutrientes minerales, tales como iones ortofosfato inorgánico, nitrógeno y azufre, de los suelos donde crecen las plantas (Govindarajulu *et al.*, 2005; Allen y Shachar-Hill, 2009; Tian *et al.*, 2010; Smith y Smith, 2011). Coloniza fácilmente muchas plantas, incluyendo especies de cultivos agrícolas importantes (por ejemplo, alfalfa, álamo, arroz y trigo), así como plantas modelo como *Solanum lycopersicum* y *Lotus japonicus*. *G. intraradices* es uno de los hongos MA más estudiados, ya que es una especie modelo para disectar la biología molecular y celular del género *Glomeromycota* (Seddas *et al.*, 2009; Sanders y Croll, 2010). Es fácil de cultivar en un sistema in vitro monoxénico de raíces huésped transformadas (Chabot *et al.*, 1992) y es la única especie cuyas esporas están disponibles comercialmente en forma pura en grandes cantidades (Tisserant *et al.*, 2012).

A nivel mundial, las investigaciones enfocadas en el estudio de los hongos MA utilizan a *G. intraradices* como modelo y miembro de los *Glomeromycota*. Prueba de ello es que ha sido el primer hongo formador de MA cuyo genoma ha sido secuenciado por un consorcio internacional. A la fecha, más de 1200 publicaciones se refieren a esta especie. El amplio uso de este HMA como modelo se debe a que fue el primer sistema MA cultivado in vitro (ROC) (Chabot *et al.*, 1992) y derivados de este se denominaron como DAOM197198 (o DAOM181602, otro número de serie para el mismo hongo) (Martin *et al.*, 2008; Helber y Requena, 2008). La especie fue descrita por Schenck y Smith (1982) de un cultivo de cítricos en Florida y donada a la colección INVAM (<http://www.invam.caf.wvu.edu>) donde fue catalogada como FL208. Desde entonces, diversas especies descritas han sido referidas como *G. intraradices*. La cepa DAOM197198 ha sido identificada como *G. intraradices*, pero no existen evidencia científica en donde se compare con el original y se confirme que es el material tipo FL208 (Stockinger *et al.*, 2009).

Stockinger *et al.*, (2009) compararon el isotipo *G. intraradices* con especímenes derivados del cultivo FL208. Evaluaron la subunidad parcial pequeña nuclear (SSU), espaciadores internos transcribibles (ITS) (Nilsson *et al.*, 2008; <http://unite.ut.ee>, Kõljalg *et al.*, 2013) y la subunidad parcial grande nuclear del DNA que constituyen el “*Barcoding*” de los hongos (Barcoding of Life Database, BOLD, <http://www.barcodinglife.org>) para definir la especie dentro de *Glomeromycota*. Utilizando el alineamiento completo de las secuencias, incluyendo las regiones 3' SSU y 5' LSU rDNA, *R. irregularis* se separó en un clado distinto a *Glomus* (Börstler *et al.*, 2008; Stockinger *et al.*, 2009).

### II.3. FISIOLÓGÍA DE LA SIMBIOSIS MICORRIZA ARBUSCULAR

La formación de micorriza arbuscular supone una adaptación fisiológica de la planta, y entre otros mecanismos modifica la exudación radical, llegando incluso a redefinir la rizósfera de plantas micorrizadas como micorrizósfera, considerando ésta como la zona de influencia directa de la micorriza en la biología del suelo (Linderman, 1992). El micelio extraradical se extiende más allá de los 9 cm de la raíz, explorando un volumen de suelo más allá de la zona rizosférica (Bethlenfalvay, 1992), captando nutrientes poco móviles como P y Zn, y extendiéndose la red micelial fuera de la zona de depleción de las raíces. De esta manera, la micorriza contribuye a la nutrición de la planta, al explorar mayor volumen de suelo que la raíz (Leigh *et al.*, 2009; Hodge y Fitter, 2010), y también participa en la biología del suelo, aumentando la actividad microbiana (Sanders y Tinker, 1973; Bethlenfalvay y Linderman, 1992). La planta aporta carbohidratos al hongo a cambio de los nutrientes minerales proporcionados por el microsimbionte. Este intercambio de nutrientes se realiza a nivel de los arbusculos, a través de la membrana plasmática de la planta y del hongo (Linderman, 1992), mediante sistemas especializados de transporte, tal y como se describe de manera esquemática en el trabajo de Hause y Fester, 2005 (**Figura II.9.**). A continuación se describen de forma más detallada los procesos de adquisición e intercambio de carbono, nitrógeno y fósforo en plantas micorrizadas.



**Figura II.9.** Transferencia de nutrientes en las raíces micorrízicas arbusculares. Se indican las enzimas y los transportadores que se han descrito inducidos específicamente con la simbiosis. El transportador de membrana de muchos metabolitos es esperable que sea dependiente del pH, y de la actividad de las H<sup>+</sup>-ATPasas de la planta (1) y del hongo (2). Las H<sup>+</sup>-ATPasas fúngicas no están restringidas a los arbusculos, lo que sugiere un transporte activo también en las hifas intercelulares. La sacarosa que llega del floema puede ser hidrolizada por invertasas apoplásticas y las hexosas resultantes absorbidas por la planta (3) ó por los transportadores de hexosas fúngicos, o bien, importada al interior de las células corticales de la raíz e hidrolizada allí por una sacarosa sintasa



citoplasmática (4). El hongo transforma rápidamente las hexosas en trealosa que es utilizada en la ruta de las pentosas fosfato, ó se utiliza para la biosíntesis de glucógeno y lípidos. Las células de la planta toman fosfato del espacio periarbuscular usando transportadores específicos protón-dependientes (5). También se han encontrado transportadores de nitrato inducidos por la simbiosis (6), que sugiere un mecanismo de transporte similar al del fosfato. Por otro lado, el aumento de los niveles de transcripción de una nitrato reductasa de origen fúngico (7), sugiere la transferencia del nitrógeno en forma reducida. AA= aminoácidos (Hause y Fester, 2005).

### **II.3.1. Nutrición carbonada**

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

La principal contribución de las micorrizas arbusculares a la nutrición de la planta se basa en una mejora de la absorción de fosfato (García-Rodríguez, 2007). Por su parte, la planta aporta nutrientes carbonados para satisfacer las necesidades del hongo. Este hecho no tiene una repercusión negativa en el desarrollo de la planta, lo que se debe a que las micorrizas arbusculares ejercen la llamada compensación fotosintética. Esta compensación consiste, por un lado, en un incremento de la actividad fotosintética de la planta debido al efecto sumidero que ejerce el hongo y, de otro, por la mejora en la nutrición fosforada de la planta (Hause y Fester, 2005). El papel regulador que ejerce el fósforo sobre la actividad fotosintética *in vivo* es bien conocido y justifica la inversión de la planta en la simbiosis micorrícica. La relación entre el peso de parte aérea y raíz suele ser mayor en plantas micorrizadas que en sus correspondientes controles no micorrizados. Este efecto se ejerce disminuyendo el envío de nutrientes a la raíz derivado del incremento en el aporte de nutrientes a tallos y hojas; por tanto, la cantidad de carbono retenido en la parte aérea es relativamente mayor en las plantas micorrizadas. Bioenergéticamente, se favorece al sistema autótrofo (productor) de la planta en relación al heterótrofo (raíz, consumidora de carbono) (Hause y Fester, 2005; García-Rodríguez, 2007).

La primera evidencia experimental sobre la transferencia de compuestos carbonados desde la planta al hongo fue proporcionada por Ho y Trappe (1973), quienes usando  $^{14}\text{CO}_2$

demonstraron que, tras unas semanas, se detectaba C marcado en el micelio del hongo. El carácter de simbioses estrictos de los hongos MA, junto con la dificultad para aislar sus estructuras intrarradicales, ha complicado en gran medida el estudio de los mecanismos implicados en la transferencia de los compuestos carbonados desde la planta hacia el hongo.

Investigaciones realizadas utilizando sustratos marcados radioactivamente han mostrado que los hongos MA son capaces de metabolizar las hexosas, preferentemente glucosa (Shachar-Hill *et al.*, 1995; Solaiman y Saito, 1997). El mecanismo implicado y los sitios de entrada y metabolismo aún no se conocen. Helber *et al.*, (2011) reportan un sistema de transporte de monosacáridos en *Glomus* sp. (MST2) cuya expresión está ligada al establecimiento y funcionamiento de la simbiosis, aunque también detectaron que el micelio extraradical es capaz de captar monosacáridos a través de un transporte activo. Aunque emplearon un sistema de marcaje radiactivo en sustratos, no detectaron la señal en raíces, lo que indica que los azúcares absorbidos son metabolizados por el propio hongo. El transportador de monosacáridos MST2 es activo frente a diversos sustratos tales como glucosa, xilosa, manosa y fructosa, en orden de afinidad creciente (Helber *et al.*, 2011). MST2 se expresa en arbusculos y en hifas intercelulares y actúa como un transportador de alta afinidad para glucosa, dependiente de un transporte secundario de H<sup>+</sup> con un pH óptimo de 5, similar al pH de la matriz interfacial entre el hongo y la planta (Guttenberger, 2000). La expresión de este gen está fuertemente relacionada con la expresión de los genes de la planta que codifican para transportadores de fosfato específicos de la simbiosis (MtPT4 y StPT4), lo que sugiere que su expresión puede estar regulada por la homeostasis de fosfato en la raíz (Helber *et al.*, 2011). Los mismos autores indican que este transportador se induce fuertemente en el micelio extraradical en presencia de xilosa, lo que sugiere que este compuesto puede ser el desencadenante de la expresión de MST2. Además, encontraron que este gen es crítico para el correcto desarrollo de la simbiosis pues la pérdida de función del gen por RNAi ocasionó una deficiente micorrización con malformación de los arbusculos (Helber *et al.*, 2011).

La sacarosa es la principal forma bioquímica en que se transportan los fotoasimilados, y los hongos MA la metabolizan en forma de glucosa y fructosa, hidrolizados derivados de la sacarosa mediados por invertasas y sacarosa sintasas implicadas en el transporte de la misma a larga distancia (Sturm y Tang, 1999). En este sentido, se ha demostrado una alteración en la expresión de diversos genes que codifican estas enzimas en diferentes modelos vegetales como *Trifolium* spp. (Wright *et al.*, 1998), *Phaseolus vulgaris* (Blee y Anderson, 1998), *Zea mays*

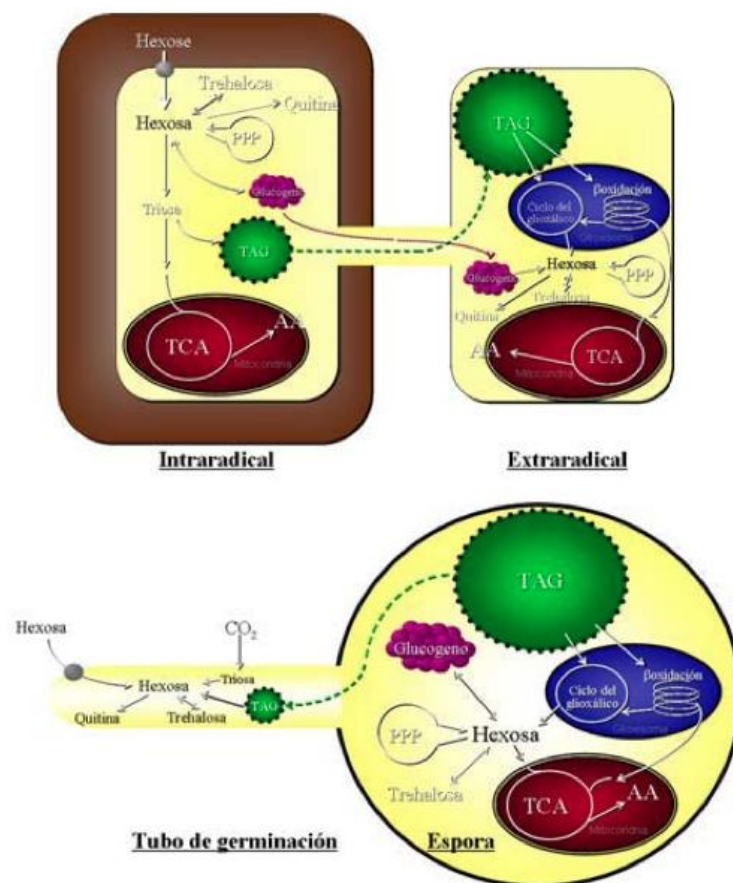
(Ravnskov *et al.*, 2003), *M. truncatula* (Hohnjec *et al.*, 2003) y *Lycopersicon esculentum* (Schaarschmidt *et al.*, 2006; García-Rodríguez *et al.*, 2007) durante el desarrollo de la micorrización. Baier, *et al.*, 2010, utilizando líneas mutantes de *M. truncatula* encontraron que el gen *MtSucS1*, que codifica una sacarosa sintasa específica de raíces micorrizadas (Hohnjec *et al.*, 2003), es necesario para la correcta maduración y mantenimiento de los arbusculos. *MtSucS1* está implicado en la absorción de hexosas mediante un sistema de simporte con protones (Harrison, 1996). Esto indica que tanto el hongo como la planta compiten por las hexosas presentes en las interfaces simbióticas, por lo que la planta debe ejercer algún mecanismo de control sobre la cantidad de C drenado hacia el hongo. También se ha observado la activación transcripcional de transportadores de hexosas en raíces micorrizadas de maíz (Wright *et al.*, 2005) y en hojas de plantas de tomate micorrizadas (García-Rodríguez *et al.*, 2005). La inducción de transportadores de azúcares en hojas sugiere que la micorrización regula el flujo de azúcares desde los tejidos fuente hacia los sumideros. Bago *et al.*, 2000, sugiere que dicha transferencia ocurre por difusión pasiva a través de las membranas celulares o bien siguiendo directamente la vía apoplástica.

El micelio intraradical capta fructosa y glucosa (Shachar-Hill *et al.*, 1995; Pfeffer *et al.*, 1999), que son rápidamente transformados en trehalosa y en glucógeno, con el fin de disminuir la osmolaridad. Se han aislado transportadores de carbohidratos regulados durante la simbiosis e implicados en la transferencia de carbono a las células corticales (Harrison, 1996), o en la salida de hexosas de las hojas (García-Rodríguez *et al.*, 2005), aunque aún se desconocen los implicados directamente en la transferencia de hexosas entre la planta y el hongo. Parte de estos carbohidratos son transformados en el micelio intraradical en compuestos lipídicos, que posteriormente serán transportados al micelio extraradical (Bago *et al.* 2002), en donde mediante gluconeogénesis se transformarán en carbohidratos. El micelio extraradical depende de este aporte de productos carbonados dada su incapacidad para absorber hexosas del medio (Bago *et al.*, 2000), si bien esta incapacidad se ha puesto en duda por los estudios anteriormente mencionados de Helber, *et al.*, (2011) que demuestran cierta capacidad del micelio extraradical de estos hongos de captar monosacáridos. Bago *et al.*, (2003) han demostrado que también se transfiere una pequeña cantidad de glucógeno desde el micelio intraradical al extraradical. Parece claro que en los hongos micorrícicos se produce una compartimentación del metabolismo, de forma que las capacidades de síntesis lipídica sólo residen en el micelio intraradical, mientras que las capacidades gluconeogénicas se localizan únicamente en el micelio extraradical. Esta marcada compartimentación del metabolismo del hongo, asociada a la diferenciación que experimenta el micelio al establecer

la simbiosis, podría estar en la base de la incapacidad del hongo para crecer independientemente de la planta.

Por su parte, la espora germinada es capaz de un cierto, aunque limitado, desarrollo en ausencia de raíz hospedadora. Este hecho está sustentado por las reservas lipídicas de la espora, dado que el micelio producido no es capaz de sintetizar ácidos grasos (Bago *et al.*, 1999). No obstante, en este micelio sí se han detectado otras rutas metabólicas activas como son: gluconeogénesis, glucólisis, ciclo de la urea, ruta de las pentosas fosfato, ciclo del glioxalato y vía de los ácidos tricarbóxicos (Macdonald y Lewis 1978; Saito, 1995; Harrier *et al.*, 1998; Bago *et al.*, 1999).

Aspectos más destacados del metabolismo del carbono en hongos formadores de MA se resumen en la **Figura II.10**.



**Figura II.10.** Compartimentalización del metabolismo del carbono en hongos formadores de micorrizas arbusculares. El carbono es transferido por la planta en forma de hexosas, que en el micelio intraradical se transforma en lípidos y glucógeno. Estos lípidos y parte del glucógeno viajan por el micelio hasta llegar a las hifas extraradicales, donde serán usados para la gluconeogénesis. En la espora, como en el micelio extraradical, no existe síntesis lipídica, por lo que la germinación se realiza a expensas de lípidos preexistentes (Bago, *et al.*, 2000).

### II.3.2. Nutrición nitrogenada

El N, tras el O, H y C, es el elemento más abundante en los seres vivos, siendo un nutriente mineral esencial, y a menudo limitante, para su crecimiento. Este elemento forma parte de compuestos esenciales tales como aminoácidos, amidas, proteínas, nucleótidos, coenzimas y numerosos metabolitos secundarios. Para las plantas, los iones  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  son las principales fuentes de N inorgánico disponibles para su nutrición. La forma de N absorbida va a depender de las condiciones del suelo y de las preferencias concretas de la especie vegetal (Marschner, 1995; Miller y Cramer, 2004).

El  $\text{NH}_4^+$  desempeña un papel clave en el metabolismo del N en la mayoría de los seres vivos. Muchos organismos, especialmente bacterias y microorganismos eucariotas, prefieren el  $\text{NH}_4^+$  como fuente de N. Esto es debido a que su absorción y asimilación requiere un menor gasto energético que otras fuentes de N, que deben transformarse en  $\text{NH}_4^+$  antes de poder ser utilizadas en las diferentes rutas metabólicas (Marzluf, 1996).

Los hongos micorrícicos son también capaces de transferir N a la planta, mediante la absorción de  $\text{NH}_4^+$  (Johansen *et al.*, 1992; Frey y Schüepp, 1993; Johansen *et al.*, 1993), o  $\text{NO}_3^-$  (George *et al.*, 1992; Tobar *et al.* 1994; Bago *et al.*, 1996) del suelo circundante, y su posterior transferencia. En el caso del nitrato, la incorporación esta asociada probablemente a un simporte de protones (Bago *et al.*, 1996) mientras que la de amonio está asociada a un antiporte protónico (Bago y Azcón-Aguilar, 1997). Asimismo, hay indicios de cierta capacidad de transporte de N orgánico (Hodge *et al.*, 2001), especialmente aminoácidos (Hawkins *et al.*, 2000), habiéndose aislado un gen que codifica una permeasa de aminoácidos de *G. mosseae* (Lanfranco, datos no publicados).

Parece ser que los hongos micorrícicos prefieren amonio, frente al nitrato, como fuente de N (Johansen *et al.* 1992), pese a que el crecimiento en medios ricos en amonio produce alteraciones en el desarrollo normal del hongo, induciendo una menor esporulación (Bago *et al.* 2004). La incorporación de amonio se lleva a cabo mediante transportadores específicos. En todos los genomas de hongos secuenciados hasta la fecha se han detectado transportadores de  $\text{NH}_4^+$  (AMT). Normalmente existen múltiples AMTs, como ocurre en *S. cerevisiae* (Marini *et al.*, 1994, 1997), *Schizosaccharomyces pombe* (Mitsuzawa, 2006) o *Hebeloma cylindrosporum* (Javelle, *et al.*, 2001, 2003a), organismos en los que se han identificado y caracterizado tres AMTs. En función de la afinidad que presentan por el  $\text{NH}_4^+$  se dividen en dos grupos:

transportadores de alta afinidad (p. ej., *ScMep1*, *ScMep2*, *HcAMT1* y *HcAMT2*) y de baja afinidad (p. ej., *ScMep3* y *HcAMT3*). Esta clasificación aparece reflejada en el análisis filogenético de los diferentes AMTs fúngicos, lo que sugiere que los transportadores agrupados dentro de un mismo grupo pueden compartir funciones comunes y desempeñar el mismo papel fisiológico (Javelle et al., 2003b; von Wirén y Merrick, 2004). En plantas, la familia AMT se divide en dos subfamilias: AMT1 y AMT2 (Loqué y von Wirén, 2004). El análisis filogenético de estos genes indica que la subfamilia AMT1 incluye un único grupo de transportadores (grupo I) mientras que la subfamilia AMT2 engloba tres grupos diferentes (los grupos II, III y IV) (Suenaga et al., 2003). Los miembros de la subfamilia AMT1 son capaces de transportar metilamonio, mientras que los miembros de la subfamilia AMT2 no pueden o lo hacen con muy baja afinidad.

Algunos AMTs de la raíz muestran cambios de expresión durante el día (Gazzarrini, et al., 1999), lo que parece estar relacionado con el aumento de la disponibilidad de sacarosa derivada de la fotosíntesis (Lejay et al., 2003). Por otro lado, mientras que algunos AMTs se expresan constitutivamente (Suenaga et al., 2003), otros modifican su patrón de expresión en función de la disponibilidad de  $\text{NH}_4^+$  (von Wirén et al., 2000b). En algunas especies como el arroz, que usan preferentemente  $\text{NH}_4^+$  como fuente de N, algunos AMTs se inducen por  $\text{NH}_4^+$ , mientras que en otras especies su expresión se ve reprimida en presencia de  $\text{NH}_4^+$ , incrementándose cuando hay menos  $\text{NH}_4^+$  disponible (Sonoda et al., 2003). También se ha observado que algunos AMTs se inhiben por glutamina (Rawat et al., 1999).

No obstante la absorción de una u otra forma de N inorgánico depende también de la humedad del suelo y de la movilidad de las especies de N inorgánico (Tobar et al., 1994; Tanaka y Yano, 2005). En este sentido se ha encontrado un transportador de  $\text{NH}_4^+$  en *G. intraradices* cultivado en sistema monoxénico, denominado *GintAMT1*, que se encuentra en las hifas extraradicales del hongo (López-Pedrosa et al., 2006). Además, recientemente se han identificado y caracterizado dos transportadores de  $\text{NH}_4^+$  más, *GintAMT2* (Pérez-Tienda et al., 2011) y *GintAMT3* (Tisserant et al., 2012). Por su parte, el  $\text{NO}_3^-$  es absorbido por una nitrato reductasa fúngica (Kaldorf et al., 1998; Jin et al., 2005), y se han detectado dos transportadores de  $\text{NO}_3^-$  de *G. irregulare*, *GintNRT1* (Tian et al., 2010) y *GintNRT2* (Tisserant et al., 2012). Se ha observado también cierta capacidad de hongos MA de utilizar N a partir de materia orgánica (Hodge et al., 2001; Leigh et al., 2009), que representa una alta proporción del N total en el suelo. En este sentido, los hongos MA contienen un transportador de aminoácidos, *GmosAA1*, inespecífico de aminoácidos sin carga (Cappellazzo et al., 2008),

observándose también en experimentos en cultivos en monoxénico que las hifas extraradicales pueden tomar Arginina (Arg), además de Glicina (Jin *et al.*, 2005). También se ha propuesto la posibilidad que hongos MA puedan contribuir a la descomposición y amonificación del suelo, liberando N desde la materia orgánica (Smith y Read, 2008).

La asimilación del nitrato parece estar facilitada por la enzima nitrato reductasa, cuya actividad se ha detectado en esporas (Ho y Trappe, 1975) y en extractos de raíces micorrizadas (Subramanian y Charest, 1998). Asimismo se ha aislado el gen de una nitrato reductasa que se expresa fundamentalmente en el arbusculo (Kaldorf *et al.*, 1998). Esta actividad nitrato reductasa permitiría la reducción del nitrato y su incorporación a la glutamina en forma de amonio. Otra actividad enzimática relacionada con el metabolismo del N en hongos micorrícicos es la actividad ureasa, puesta de manifiesto por la capacidad de usar urea marcada como fuente de N, detectándose este marcaje posteriormente tanto en la planta, como en el hongo (Shachar-Hill *et al.*, 1997).

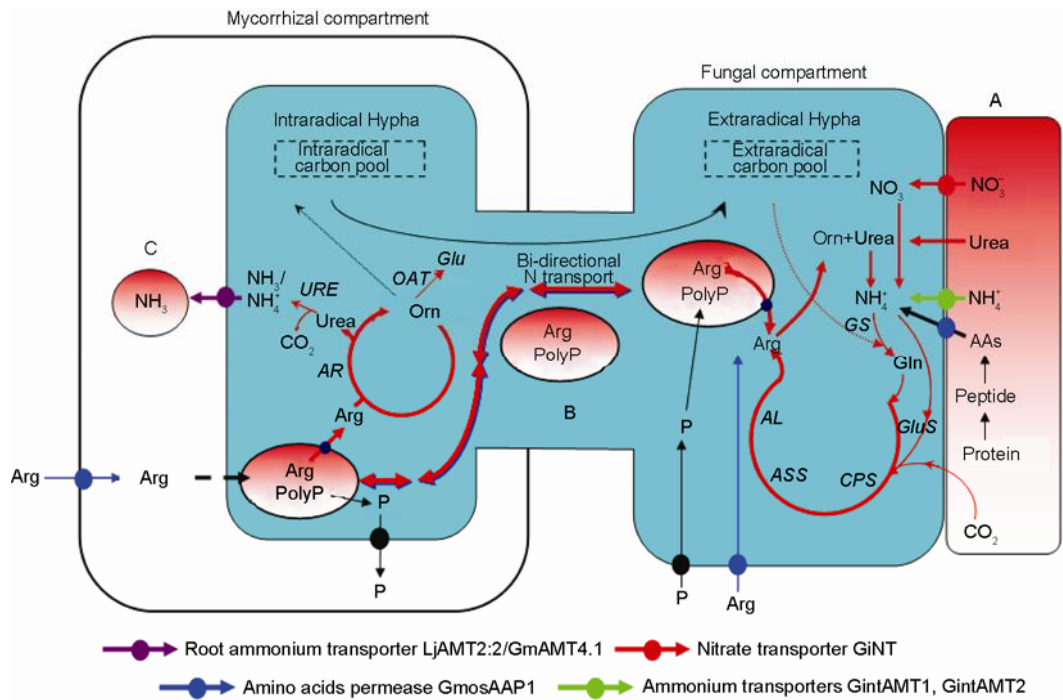
Una vez absorbido el N inorgánico del suelo por los hongos MA, rápidamente se incorpora a la Arg por la vía GS/GOGAT (Breuninger *et al.*, 2004). La Arg se acumula en altas concentraciones en el micelio extraradical y es transportado a las hifas intraradicales, se sugiere que su transporte es conjunto con las cadenas de Poli-P. Una vez en los arbusculos se hidrolizan esas cadenas de Poli-P, liberándose a su vez la Arg, que por acción de arginasas y ureasas liberan  $\text{NH}_4^+$  (Fellbaum *et al.*, 2012) y  $\text{CO}_2$ , que es transportado a las hifas extraradicales para sinterizar más Arg (Guttenberger, 2000; Jin *et al.*, 2005; Smith y Smith, 2011). También se ha observado que las hifas intraradicales aumenta su actividad glutamina sintetasa, utilizando  $\text{NH}_4^+$  y Glutamato (Glu) para forma Glutamina (Gln), y así es reasimilado por el hongo (Tian *et al.*, 2010).

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

eficaz a pH ácido, y esa acidez en el apoplasto interfacial es establecida por H<sup>+</sup>-ATPasas de la planta y del hongo, proporcionando así la energía para los procesos de transporte dependientes de H<sup>+</sup> (Balestrini *et al.*, 2007). Además, LjAMT2;2, transporta el amonio sin carga en forma de NH<sub>3</sub> a las células corticales de la planta (Guether *et al.*, 2009).

Dos hipótesis intentan explicar la transferencia de N a la planta durante la simbiosis MA. En la primera de ellas, basada en la detección de actividad nitrato reductasa en el arbúsculo, se propone que es nitrato lo que se transfiere (Kaldorf *et al.*, 1998). La otra, en cambio, sugiere que es amonio lo que se transfiere desde el micelio extraradical en un proceso asociado al ciclo GS/GOGAT y al transporte de polifosfato (Bago *et al.*, 2001). Esta última hipótesis propone que el N es incorporado a través del ciclo de la urea, pero el transporte hasta el arbúsculo tendría lugar en forma de arginina, asociada a los polifosfatos, neutralizando su carga. Una vez allí y de nuevo mediante el ciclo de la urea, se liberaría el amonio que sería transferido a la planta. Esta hipótesis está respaldada por diversas evidencias experimentales: i) la detección de actividad de enzimas involucradas en el ciclo de la urea en estos hongos (Bago *et al.*, 1999), ii) el elevado contenido de arginina libre en el micelio (Johansen *et al.* 1996), iii) el elevado contenido de arginina en las vacuolas (entre 50 y 1000 veces superior al del citoplasma) y iv) por el hecho de que en ectomicorrizas, la arginina se encuentra frecuentemente asociada a polifosfatos (Bücking *et al.* 1998). La posibilidad de una transferencia directa de arginina desde el hongo hacia la planta se ha descartado debido a que el marcaje del carbono (en la estructura de la arginina producida por el HMA) no se detecta en la estructura de la planta (Fitter *et al.* 1998). En la **Figura II.11.** se resumen los aspectos esenciales del modelo propuesto de captación y transferencia de N en la simbiosis MA.





**Figura II.11.** Modelo de circulación de nitrógeno en la simbiosis micorriza arbuscular. El nitrógeno inorgánico es absorbido por el micelio extraradical del hongo (ERM) y se asimila a través de la nitrato reductasa y el ciclo GS-GOGAT. Entonces se convierte en arginina, que se transloca a lo largo de las hifas fúngicas coenocíticas desde el micelio extraradical hasta el micelio intraradical (IRM). La arginina se descompone en el IRM, liberando urea y ornitina, por acción de la ureasa y la ornitina aminotransferasa (OAT). El amoníaco liberado de la ruptura de arginina pasa al huésped a través de los canales de amoníaco (AMT). Los aminoácidos de ornitina pueden ser catabolizados dentro del IRM o translocados al ERM. (Jin *et al.*, 2012).

Por último, destacar que los hongos MA tienen la capacidad de ajustar la transferencia de nutrientes, tanto de N como de Pi, en respuesta al C aportado por la planta. En estudios realizados en cultivo monoxénico se ha comprobado que aumentando la disponibilidad de C en forma de sacarosa en el micelio extraradical se incrementa la actividad de los genes de la ruta GS/GOGAT, implicada en la asimilación del N, y genes de biosíntesis de Arg, y en el micelio intraradical se aumenta la actividad arginasa y ureasa, implicadas en el catabolismo de la Arg y liberación de  $\text{NH}_4^+$  (Fellbaum *et al.*, 2012).

### II.3.3. Nutrición fosforada

El fósforo (P) es uno de los 14 nutrientes minerales esenciales para el crecimiento de las plantas superiores. Aunque representa un porcentaje relativamente pequeño de la biomasa total de la planta (0.2 % en pastizales y especies de cultivos y tan solo el 0.025 % de la biomasa forestal (Smil, 2000), desempeña un papel importante en procesos biológicos fundamentales para la función de todos los seres vivos. Está presente en los enlaces fosfodiéster a nivel

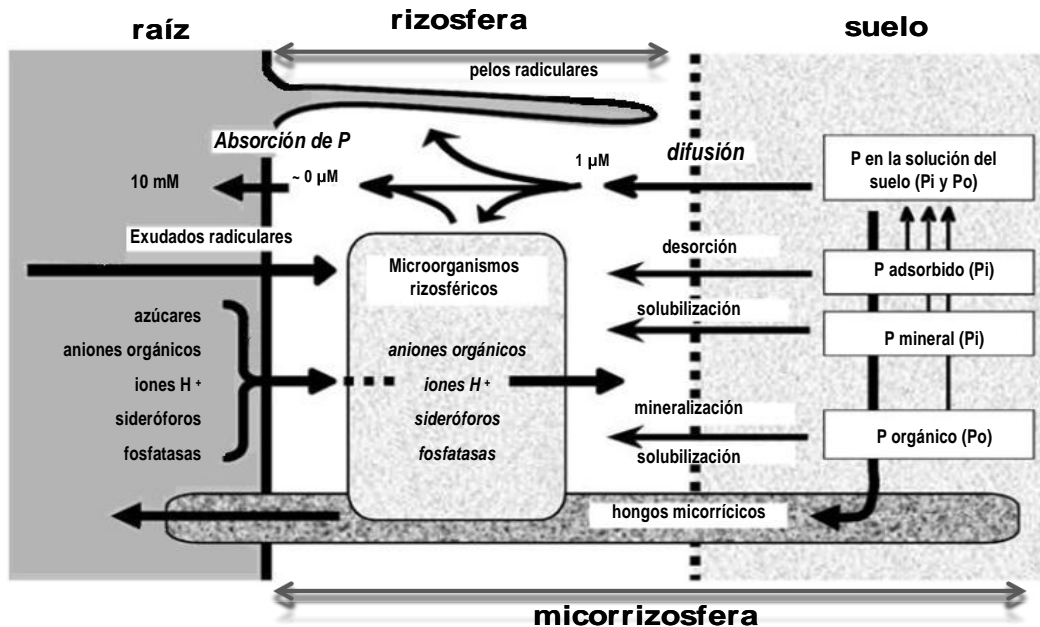
molecular en la columna vertebral de ADN y ARN, formando parte de los fosfolípidos en las membranas de las células y formando los enlaces fosfoanhídrido de fosfatos de adenosina (ATP, ADP) que son la moneda principal de energía de todos los organismos vivos, además de intervenir en las reacciones de fosforilación-defosforilación que regulan el metabolismo celular (Marschner, 1995).

En términos agronómicos, el suministro de P es importante para la producción de nuevo crecimiento, floración, fructificación y semilla. El fósforo ocupa el décimo primer lugar entre los elementos más abundantes de la corteza terrestre, y en el suelo se encuentra como fósforo inorgánico o formando parte de la materia orgánica, como fósforo orgánico. El fósforo inorgánico está contenido en los minerales derivados de la roca madre, fundamentalmente en apatitas, strengita y variscita, que son muy estables en cuanto a su solubilidad; y en minerales secundarios de fósforo que incluyen fosfatos de calcio, hierro y aluminio, cuyas tasas de disolución varían en función del pH y el tamaño de las partículas (Oelkers y Valsami-Jones, 2008). Por su parte, el fósforo orgánico se encuentra en formas estabilizadas como inositol fosfatos y fosfonatos; y en formas activas como monoésteres y diésteres de ortofosfato, y polifosfatos orgánicos (Condrón *et al.*, 2005; Turner *et al.*, 2002). Las plantas absorben el fósforo en forma de ión ortofosfato, bien como  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  o de  $\text{HPO}_4^{2-}$ .

Sólo una pequeña fracción del fósforo presente en el suelo es soluble en agua y, por tanto, está en forma asimilable por las plantas. El fósforo disuelto en la solución del suelo tiene que ser renovado permanentemente desde fases o fracciones químicas de desigual solubilidad. Las plantas han desarrollado diferentes mecanismos bioquímicos y fisiológicos para hacer frente a la escasez de fósforo disponible en el suelo, bien para forzar su solubilización o para mejorar su absorción (Vance *et al.*, 2003). Por su parte, los microorganismos rizosféricos son parte integral de ciclo del fósforo en el suelo y con su actividad colaboran eficientemente en la nutrición fosfórica de las plantas (**Figura II.12.**).

Para aumentar su eficiencia en la adquisición del fósforo, la planta puede modificar la arquitectura radicular, mediante cambios tanto en la morfología como en la topología y en los patrones de distribución de las raíces, con el fin de explorar un mayor volumen de suelo (Caradus, 1981; Föhse *et al.*, 1988; Lynch, 2011). Por su parte, los microorganismos rizosféricos incrementan la capacidad de la planta para adquirir el fósforo del suelo mediante diferentes mecanismos, y entre ellos el más eficaz es el que desarrollan los hongos micorrícicos, que

proporcionan fósforo a la planta captado desde lugares del suelo no accesibles para las raíces (Smith y Read, 1997; Smith y Smith, 2011).

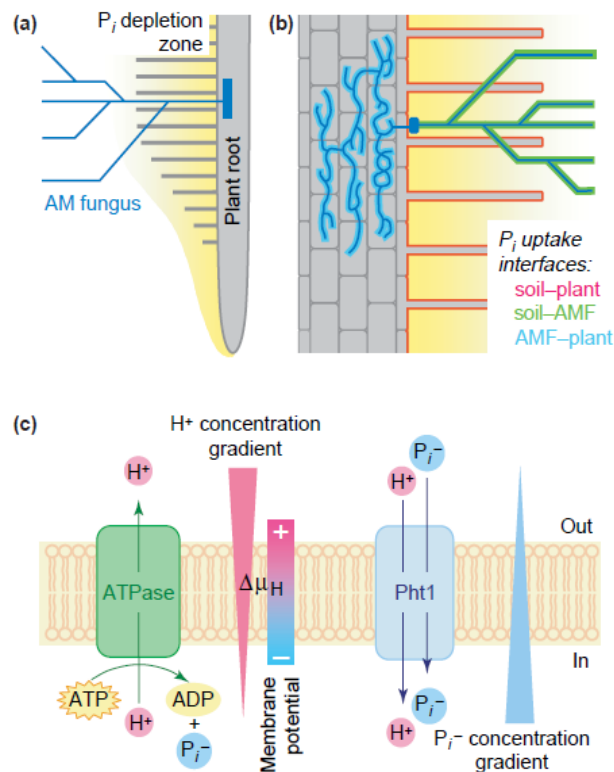


**Figura II.12.** Procesos fisiológicos y químicos que influyen en la disponibilidad y transformación del fósforo en la rizosfera. *P<sub>i</sub>*, fósforo inorgánico; *P<sub>o</sub>*, fósforo orgánico (adaptado de Richardson *et al.*, 2009).

### II.3.3.1. La vía de la absorción *P<sub>i</sub>* en MA

El micelio fúngico externo se extiende más allá de la zona de agotamiento de los nutrientes que rodea a la raíz. El menor diámetro de las hifas del hongo en comparación con las raíces de plantas les da una mayor área de superficie por unidad de volumen y permite el acceso a los poros del suelo más pequeñas que las raíces de las plantas. Además, las hifas de los hongos están mejor adaptadas para captar los nutrientes a través de una rápida proliferación y mayor capacidad competitiva con los microbios del suelo (Smith y Read, 1997). En plantas micorrizadas se superpone dos vías de captación de nutrientes en general y P en particular. La vía directa de absorción, en la cual están implicados los distintos transportadores de nutrientes expresados en las células epidérmicas de la raíz, y la vía indirecta o micorrízica que implica a los transportadores de nutrientes fúngicos expresados en el micelio externo y a los transportadores de nutrientes de la planta expresados en la interfase simbiótica establecida entre el hongo y la planta (Karyashov y Bucher, 2005).

La cantidad y el patrón de distribución del micelio externo es extremadamente variable y depende de las especies fúngicas MA. La longitud de las hifas va desde 1 a > 30 m.g-1 de suelo según mediciones de Smith, *et al.*, (2004). Sistemas compartimentados junto a experimentos de utilización de marcadores isotópicos han proporcionado pruebas de la translocación de  $P_i$ , Zn,  $NO_3^-$  y  $NH_4^+$  a partir de una distancia de hasta 25 cm desde las raíces de las plantas (Johansen *et al.*, 1993; Pearson y Jakobsen, 1993; Tobar *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 2000; Jansa *et al.*, 2003). Por lo tanto una planta dispone de dos mecanismos para la adquisición de nutrientes del suelo, la vía de absorción directa a través de la epidermis de la raíz y pelos radiculares, y la vía a externa a través de las hifas fúngicas MA que colonizan las células corticales. El contenido total de nutrientes de una planta resulta de la operación combinada de estas vías (**Figura II.13.**) (Karyashov y Bucher, 2005).



**Figura II.13.** Vías de absorción de nutrientes en plantas micorrizadas. a) El crecimiento de la raíz de la planta crea una zona de depleción causada por una alta adquisición de fósforo por parte de la planta y el bajo rango de difusión de fósforo en el suelo. El micelio extraradicular del hongo MA crece más allá de la zona de depleción, alcanzando una nueva zona de fósforo soluble (Marschner, 1995; Smith y Read, 1997). b) Interfaces involucradas en la adquisición de fósforo en la simbiosis MA. Las interfaces suelo-planta, suelo-HMA y HMA-planta son mostradas en rojo, verde y cyan, respectivamente. La translocación de fósforo transmembranal es mediada por los transportadores de fósforo que residen en la membrana celular del respectivo organismo en la correspondiente interface. c) Mecanismo del transporte de fósforo a través de la membrana plasmática de la planta. Una protón ATPasa integral de membrana expulsa protones unidireccionalmente ( $H^+$ ) con gasto de ATP (transporte primario). El gradiente de concentración de protones generado y el potencial de membrana constituyen un potencial de protón electroquímico a través de la membrana. El movimiento de protones a lo largo de los gradientes de concentración y eléctrico facilita la acumulación de  $P_i$  a través de los transportadores de fosfato en contra de un gradiente de concentración (transporte secundario) (Karyashov y Bucher, 2005).

### II.3.3.1.1. Transportadores de fosfato de hongos MA

La absorción de Pi en las plantas ha sido ampliamente estudiada en las raíces de las plantas superiores y en células cultivadas. Se ha propuesto que la absorción de Pi se produce como un proceso de cotransporte impulsado por la fuerza motriz de protones, generado por una H<sup>+</sup>-ATPasa en la membrana plasmática. Esta hipótesis está apoyada por la observación de una disminución transitoria del pH citoplásmico durante un corto plazo en la toma de Pi en raíces de *Limnobium stoloniferum* y células de *Catharanthus roseus* que es coherente con un cotransporte H<sup>+</sup>: H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> (Ullrich y Novacky, 1990; Sakano *et al.*, 1992). Además, los estudios en *Lemna gibba* y células de *C. roseus* indican que la absorción de Pi se produce con una estequiometría de 2 a 4H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> transportados, lo que resulta en la alcalinización de los medios de comunicación y la despolarización transitoria de la membrana (Ullrich-Eberius *et al.*, 1981; 1984; Sakano, 1990). En hifas fúngicas de hongos formadores de MA se ha calculado una estequiometría similar para un cotransporte H<sup>+</sup>: H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> (Ayling *et al.*, 2000).

Durante la última década, se han identificado las proteínas vegetales y fúngicas implicadas en la captación de Pi tanto en la vía directa como en la vía de absorción mediada por hongos MA. Estos transportadores comparten un alto grado de similitud de secuencia y todos pertenecen a la familia de simportadores Pi:H<sup>+</sup> (Pao *et al.*, 1998). Estos transportadores, de alta afinidad, desempeñan un papel fundamental en la planta y en los hongos MA por participar en la absorción de Pi. El primer transportador de Pi de hongos MA fue identificado en *Glomus versiforme* mediante hibridación cruzada con el transportador de Pi de alta afinidad PHO84 de *Saccharomyces cerevisiae* (Harrison y van Buuren, 1995). Dicho transportador, denominado GVPT, fue capaz de complementar un mutante de *S. cerevisiae* deficiente en la función de PHO84 con una Km aparente de 18 mM. El análisis de expresión reveló que GVPT se expresa predominantemente en el micelio externo, y proporciona la primera evidencia de la regulación diferencial de la expresión génica entre el micelio interno y externo del hongo MA. Análisis *in vitro* de un ortólogo de GVPT, GiPT de *G. intraradices* (*R. irregularis*), reveló que los genes que codifican para estos transportadores responden a las concentraciones de Pi en el ambiente y son sensibles a la condición global de Pi del hongo (Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001). Esto se confirmó con la identificación de *GmosPT* de *G. mosseae*, cuya expresión génica se vió en el micelio extraradical al aumentar la concentración externa de Pi (Benedetto *et al.*, 2005). Balestrini *et al.*, (2007), demostraron que la expresión intraradical de *GmosPT* se localiza también en arbusculos en las células corticales de tomate.

Después de la absorción de Pi por hifas extraradicales, las cantidades en exceso de los requerimientos metabólicos del hongo se transfieren a la vacuola, donde se almacenan como polifosfato (poli-P) (Rasmussen *et al.*, 2000). Una corriente citoplasmática y un sistema vacuolar tubular parecen estar implicados en el movimiento de poli-P en dirección a la raíz de la planta (Cox *et al.*, 1980; Shepherd *et al.*, 1993). Al ingresar el poli-P, la longitud de la hifa intraradical se acorta (Solaiman *et al.*, 1999) y posteriormente el poli-P se hidroliza a Pi que se libera a la interfase arbuscular. Curiosamente, la expresión de la H<sup>+</sup>-ATPasa de hongos MA, *GmHA5*, también fue identificada exclusivamente en arbusculos. La expresión co-localizada de un transportador de Pi fúngico y una H<sup>+</sup>-ATPasa fúngica en arbusculos proporciona la primera evidencia del potencial de transporte activo de P por estructuras fúngicas en las interfases intercelulares, y sugiere que el simbionte fúngico puede competir con la planta para la toma de Pi en el apoplasto interfacial. Si los hongos MA tienen diferentes habilidades para adquirir Pi desde el apoplasto interfacial esto puede tener consecuencias importantes para la eficiencia de la transferencia simbiótica de P y por lo tanto en el resultado global de las diferentes combinaciones planta-hongo.

#### **II.3.3.1.2. Transportadores de alta afinidad de fósforo de la planta**

La familia de transportadores de fósforo en la planta, responsables de la captación tanto desde el suelo como en las interfaces simbióticas, fue identificada por primera vez en *Arabidopsis* por similitud de secuencia con los transportadores de Pi en la levadura, hongos filamentosos y hongos MA (GVPT) (Muchhal *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1997). Posteriormente, se clonaron genes ortólogos a partir de raíces de patata (*StPT1*, *StPT2*, *StPT3*) (Leggewie *et al.*, 1997; Rausch *et al.*, 2001), tomate (*LePT1*, *LePT2*) (Daram *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998a; Rosewarne *et al.*, 1999) y *Medicago* (*MtPT1*, *MtPT2*, *MtPT4*) (Liu *et al.*, 1998b; Harrison *et al.*, 2002).

Una lista detallada de transportadores de fósforo en vegetales y hongos se muestra en la **Cuadro II.3**. El tejido de localización y la respuesta a la colonización MA de los diferentes transportadores también es reportado (Adaptado de Javot *et al.*, 2007).

**Cuadro II.3.** Transportadores de fósforo vegetales y fúngicos (Adaptado de Javot *et al.*, 2007).

Organism	Official nomenclature <sup>a</sup>	Other names <sup>b</sup>	Tissue localisation <sup>c</sup>	AM response <sup>d</sup>	Apparent K <sub>m</sub> <sup>e</sup>	Reference <sup>f</sup>
<b>Ascomycota</b>						
(Saccharomycetaceae)						
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		PHO84			8 µM	1
<b>Glomeromycota</b>						
<i>Glomus versiforme</i>		GvPT			18 µM (yeast)	2
<i>Glomus intraradices</i>		GIPT				3
<i>Glomus mosseae</i>		GmosPT				4
<b>Brassicaceae</b>						
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ARAtH;Pht1;1	Pht1:1	St; Rt		110 µM (yeast)	5, 6, 7, 8
	ARAtH;Pht1;2	Pht1:2	Rt		3.1 µM (tobacco)	5, 8
	ARAtH;Pht1;3	Pht1:3	St; Rt			5
	ARAtH;Pht1;4	Pht1:4	St; Rt		110 µM (yeast)	5, 7
	ARAtH;Pht1;5	Pht1:5	St; Rt			5
	ARAtH;Pht1;6	Pht1:6	St			5
	ARAtH;Pht1;7	Pht1:7	St; Rt			5
	ARAtH;Pht1;8	Pht1:8	Rt			5
	ARAtH;Pht1;9	Pht1:9	Rt			5
<b>Solanaceae</b>						
Tomato ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	LYCes;Pht1;1	LePT1	St; Rt		31 µM (yeast)	9,10,11,12, 10,12
	LYCes;Pht1;2	LePT2	Rt			12
	LYCes;Pht1;3	LePT3	nd	AM +		12
	LYCes;Pht1;4	LePT4	Rt	AM S		12
	LYCes;Pht1;5	LePT5	Rt	AM +		12
Potato ( <i>Solanum tuberosum</i> )	SOLtu;Pht1;1	StPT1	St; Rt	AM -	280 µM (yeast)	12,13,14
	SOLtu;Pht1;2	StPT2	Rt	AM -	130 µM (yeast)	12,14
	SOLtu;Pht1;3	StPT3	St; Rt	AM +	64 µM (yeast)	12, 14, 15
	SOLtu;Pht1;4	StPT4	Rt	AM S		12
	SOLtu;Pht1;5	StPT5	Rt	AM S		12
<b>Fabaceae</b>						
<i>Medicago truncatula</i>	MEDtr;Pht1;1	MtPT1	Rt	AM -	192 µM (yeast)	16,17, 18
	MEDtr;Pht1;2	MtPT2	Rt	AM -		16, 17
	MEDtr;Pht1;4	MtPT4	Rt	AM S	493–668 µM (yeast)	15, 18
<i>Lotus japonicus</i>	LOTja;Pht1;1	LjPT1	nd	AM -		19
	LOTja;Pht1;2	LjPT2	nd	AM -		19
	LOTja;Pht1;3	LjPT3	nd	AM +		19
<b>Poaceae</b>						
Barley ( <i>Hordeum vulgare</i> )	HORvu;Pht1;1	HvPT1	Rt	AM -	9 µM (rice)	20, 21, 22
	HORvu;Pht1;2	HvPT2	Rt	AM -		20, 22
	HORvu;Pht1;3	HvPT3	Rt	nr		20, 22
	HORvu;Pht1;4					22
	HORvu;Pht1;5					22
	HORvu;Pht1;6		St		385 µM (rice)	21, 22
	HORvu;Pht1;7					22
	HORvu;Pht1;8		Rt	AM +		22
<b>Poaceae</b>						
Rice ( <i>Oryza sativa</i> )	ORYsa;Pht1;1	OSPT1		AM -		23
	ORYsa;Pht1;2	OSPT2	St; Rt	AM -		23
	ORYsa;Pht1;3	OSPT3		AM -		23
	ORYsa;Pht1;4	OSPT4				23
	ORYsa;Pht1;5	OSPT5				23
	ORYsa;Pht1;6	OSPT6		AM -		23
	ORYsa;Pht1;7	OSPT7				23
	ORYsa;Pht1;8	OSPT8				23
	ORYsa;Pht1;9	OSPT9		AM -		23
	ORYsa;Pht1;10	OSPT10		AM -		23
	ORYsa;Pht1;11	OSPT11	Rt	AM S		15, 23, 24
	ORYsa;Pht1;12	OSPT12				23
	ORYsa;Pht1;13	OSPT13			AM +	23, 24
Wheat <i>Triticum aestivum</i>	TRlæ;Pht1;myc			AM S		22
<b>Poaceae</b>						
Maize ( <i>Zea mays</i> )	ZEAm;Pht1;1	ZmPT2	St; Rt	AM -	25, 26	
	ZEAm;Pht1;2		St; Rt		26	
	ZEAm;Pht1;3		St; Rt		26	
	ZEAm;Pht1;4	ZmPT1	St; Rt	AM -	25, 26	
	ZEAm;Pht1;5				26	
	ZEAm;Pht1;6		St; Rt	AM +	22, 26	
		ZmPT3		AM -	25	

<sup>a</sup> Nombre del transportador vegetal de fósforo de acuerdo a la nomenclatura oficial (Karandashov y Bucher, 2005). \* Nombre aún no asignado.

<sup>b</sup> Nombre del transportador vegetal de fósforo como está indicado en la referencia original.

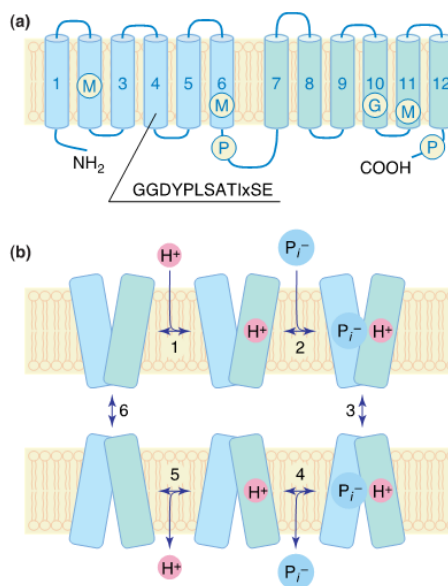
<sup>c</sup> Tejido de localización del transportador de fósforo: expresión en la parte aérea vegetal (St); expresión en las raíces (Rt). Los datos solo se muestran para los transportadores evaluados en ambos tejidos.

<sup>d</sup> Respuesta a la simbiosis MA: específico a la micorriza (AM S), regulado positivamente (AM +), regulado negativamente (AM -) o no responde (nr).

<sup>e</sup> El sistema de expresión usado para determinar la Km está indicado en paréntesis. La expresión heteróloga en levaduras (yeast), cultivos celulares de tabaco (tobacco) o cultivos celulares de arroz (rice) ha sido reportado.

Referencias: 1: (Bun-ya *et al.*, 1991); 2: (Harrison y van Buuren 1995); 3: (Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001); 4: (Benedetto *et al.*, 2005); 5: (Mudge *et al.*, 2002); 6: (Mitsukawa *et al.*, 1997); 7: (Muchhal *et al.*, 1996); 8: (Smith *et al.*, 1997); 9: (Daram *et al.*, 1998); 10: (Liu *et al.*, 1998a); 11: (Rosewarne *et al.*, 1999); 12: (Nagy *et al.*, 2005); 13: (Leggewie *et al.*, 1997); 14: (Rausch *et al.*, 2001); 15: (Karandashov *et al.*, 2004); 16: (Liu *et al.*, 1998b); 17: (Chiou *et al.*, 2001); 18: (Harrison *et al.*, 2002); 19: (Maeda *et al.*, 2006); 20: (Smith *et al.*, 1999); 21: (Rae *et al.*, 2003); 22: (Glassop *et al.*, 2005); 23: (Paszowski *et al.*, 2002); 24: Guimil *et al.*, 2005); 25: (Wright *et al.*, 2005); 26: (Nagy *et al.*, 2006).

Los modelos tridimensionales de la estructura proteica predicen que los transportadores de la familia Pht1 son proteínas integrales de membrana con 12 dominios transmembranales dispuestos en una configuración de 6+6, separados por un largo bucle hidrófilo orientado hacia la superficie interna de la membrana. Esta es una característica común compartida por una serie de proteínas vegetales implicadas en el transporte de ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares e iones inorgánicos (**Figura II.14.**; Smith *et al.*, 2003a).

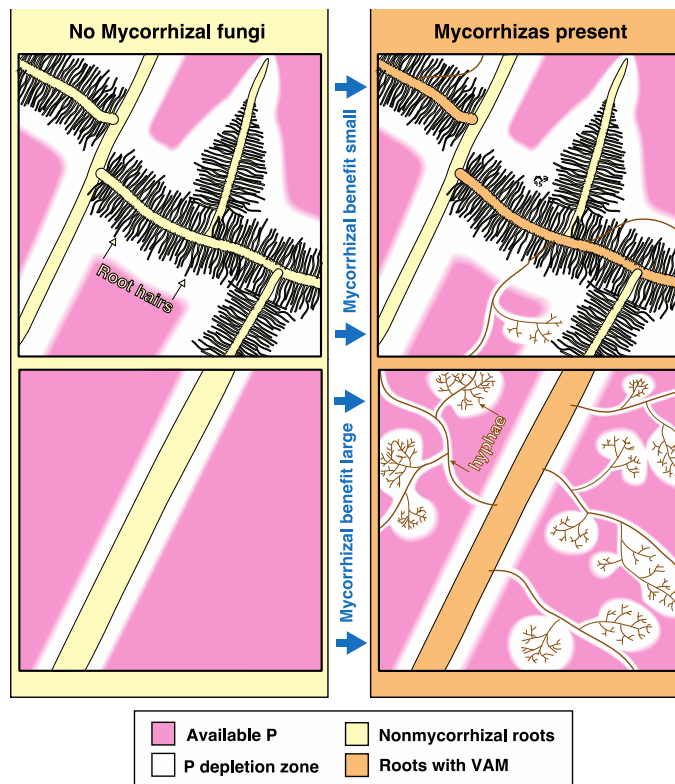


**Figura II.14.** Predicción de la topología transmembrana de los transportadores Pht1. a) Los doce dominios de membrana se disponen en dos (N- y C-terminal) mitades conectados con un bucle hidrófilo. Se muestran los sitios de miristoilación putativa (M), los sitios de fosforilación (P), los sitios de glicosilación (G), y la posición del dominio GGDYPLSATIxSE Pht1, conservado en todos los transportadores Pht1 (GGDYPLSxxIxSE en hongos). (b) Mecanismo putativo de acción de simporte protón/fosfato a través de un transportador Pht1: (1) protonación del transportador con un poro hidrófilo abierto fuera; (2) la unión del anión fosfato; (3) cambio conformacional que conduce a la apertura de los poros en el interior; (4) la liberación de fosfato; (5) desprotonación del transportador, y (6) volver a la conformación de la cara hacia el exterior. (Karandashov y Bucher, 2005).

Las plantas han desarrollado una serie de adaptaciones físicas, bioquímicas y simbióticas para aumentar la adquisición de P crecimiento bajo condiciones limitantes. Desde el punto de vista morfológico, estas adaptaciones incluyen aumentos de la longitud total de la raíz, e incrementos tanto del grado de ramificación de la raíz como de la abundancia y



distribución de los pelos radicales, todo ello para aumentar la superficie de absorción de las raíces y para extenderlas más allá de la zona de agotamiento (**Figura II.15.**; Marschner, 1998). En algunas especies de plantas, la deficiencia de P resulta en la formación de raíces especializadas (proteiformes o raíces de racimo) que concentran exudados de la raíz en parches localizados y aumentan la adquisición de P y otros nutrientes inmóviles (Dinkelaker *et al.*, 1995; Marschner, 1995; Neumann *et al.*, 2000 y Vance *et al.*, 2003). Las adaptaciones bioquímicas incluyen el aumento de la producción de fosfatasas extracelulares y ciertos exudados de raíz, tales como protones y/o aniones orgánicos, que ya sea directamente, o indirectamente a través de la estimulación de la actividad microbiana, aumentan la disponibilidad de Pi en la rizosfera (Miyasaka y Habte, 2001; Richardson, 2001).



**Figura II.15.** Adquisición de fósforo por los pelos radicales o por las hifas MA. a) Una planta con un sistema radical fino y pelos radicales largos; b) planta con raíces gruesas sin pelos radicales (Marschner, 1998).

### II.3.3.1.3. Transportadores implicados en la absorción directa de fósforo

Cuatro miembros de la familia Pht1 identificados en *Arabidopsis* están involucrados en la toma de Pi de la solución del suelo (Mudge *et al.*, 2002). Los genes *Pht1;1*, *Pht1;2*, *Pht1;3* y *Pht1;4* se expresan en la epidermis de la raíz y se observó la inducción de su expresión cuando las raíces

se cultivaron a baja concentración de fósforo. Además, *Pht1;1*, *Pht1;2* y *Pht1;3* se expresan preferentemente en las células de los tricoblastos de la epidermis de los pelos radicales. Este patrón de expresión también se observó en los transportadores HvPT1 y HvPT2 de la cebada (Schunmann *et al.*, 2004). Diversos autores han puesto de manifiesto la inducción de la expresión de estos genes bajo condiciones de deficiencia de fósforo (Muchhal *et al.*, 1996; Leggewie *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998a; Liu *et al.*, 1998b; Rae *et al.*, 2003). Schunmann *et al.*, (2004), reportaron una inducción de 2.5 a 3 veces mayor en *HvPT1* y *HvPT2* en plantas de cebada cultivadas en ausencia de fósforo en comparación con las plantas cultivadas bajo condiciones de 0.2 mM de solución de fósforo. En tomate, se ha demostrado una respuesta reversible de los transportadores LePT1 y LePT2, pues disminuyeron su transcripción dentro de las 24 h posteriores a la adición de fósforo a la planta (Liu *et al.*, 1998a). El análisis de la abundancia de las proteínas LePT1 y MtPT1 por transferencia tipo Western demostró un aumento en su transcripción cuando variaron las condiciones de ausencia de fósforo hacia un estado de suficiencia de fósforo (Muchhal y Raghothama, 1999; Chiou *et al.*, 2001).

#### **II.3.3.1.4. Transportadores de fósforo regulados por la simbiosis MA**

Además de la regulación en respuesta a la disponibilidad de fósforo, los transportadores de la epidermis de la raíz muestran una capacidad de respuesta y regulación por la presencia de la micorriza arbuscular. En el arroz, seis de los diez genes que codifican para transportadores de Pi expresados en las raíces redujeron su expresión durante la formación de MA en condiciones de bajo suministro de fósforo (Paszkowski *et al.*, 2002). En Medicago, una disminución constante en la expresión de los genes de los transportadores de la epidermis y MtPT1 y MtPT2 se observó con el aumento de la colonización de MA (Liu *et al.*, 1998b).

Por otro lado, y como ya hemos comentado, los patrones de expresión y la localización de ciertos transportadores de membrana de fósforo sugiere que estas proteínas desempeñan un papel en el transporte simbiótico de fósforo. Inicialmente, y para determinar la importancia de dichos transportadores, se analizaron plantas mutantes que carecían de estos transportadores. La primera evidencia de un fenotipo alterado de micorrización causado por la interrupción de un transportador de Pi se realizó en la proteína transportadora LjPT3 de *L. japonicus*, cuyo gen es inducido por la MA y se expresa fuertemente en células con arbusculos, pero no es un ortólogo de la subfamilia Pht1 (**Figura II.15.**). Plantas de *L. japonicus* bloqueadas

en el gen *LjPT3* mediante RNA de interferencia (RNAi) redujeron la expresión de este gen al 15 % del nivel nativo, observándose que la regulación negativa de *LjPT3* reduce la efectividad de la simbiosis. En este sentido, en las plantas controles de *L. japonicus* la colonización MA aumentó cinco veces la biomasa de las plantas, mientras que en las plantas RNAi-LjPT3 el incremento en la biomasa sólo fue alrededor de 2.5 veces tras la colonización. Además, después de la inoculación con hongos MA, las plantas RNAi-LjPT3 mostraron niveles reducidos de fósforo en relación con el control; además, el nivel reducido de radiomarcaje  $^{33}\text{P}$  acumulado alrededor de los arbusculos sugiere que la absorción de Pi en la interfaz de la planta-hongo se vió afectada. Este fenotipo fue acompañado por una pequeña pero significativa reducción en el número de arbusculos dentro de las raíces y un aumento en idioblastos, posiblemente una respuesta de defensa de la planta, y un aumento de los intentos de penetración de hongos en la superficie de la raíz. Por último, estas plantas RNAi fueron perjudicadas también en la formación de nódulos, pero sólo cuando estaban co-inoculadas por hongos MA, lo que sugiere que el deterioro causado sobre la simbiosis MA tuvo un efecto más amplio en la respuesta simbiótica general de la planta (Maeda *et al.*, 2006).

El uso de plantas mutantes deficientes en transportadores de fósforo ha mostrado que existen diferencias significativas en la inducción de transportadores de diferentes familias durante la simbiosis MA. En tomate, Nagy *et al.*, (2005) caracterizaron una línea mutante con una inserción de un transposón en el gen *LePT4*, un miembro de la subfamilia Pht1 (**Figura II.15.**) inducido específicamente durante la micorrización. La colonización micorrícica y el transporte de carbono no se vio significativamente alterada en estos mutantes sugiriendo que *LePT3* y *LePT5* compensan la pérdida de función de *LePT4* e indican un mecanismo de compensación funcional entre estos transportadores (Nagy *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2007).

La información más relevante de la función del transportador PT4 proviene de la interrupción de la expresión del gen *MtPT4*, que codifica para el transportador de Pi predominante expresado en las células de *M. truncatula* con arbusculos (Harrison *et al.*, 2002; Javot *et al.*, 2007a). Las plantas en donde MtPT4 se había bloqueado por la técnica de RNAi no mostraron un aumento en la biomasa en respuesta a la colonización por el hongo MA, mientras que en las plantas control la biomasa aumentó más del doble en respuesta a la colonización. Además, en las líneas RNAi-MtPT4, los niveles de colonización eran mucho más bajos que en los controles. El análisis detallado de los arbusculos indicó que su vida útil en los mutantes MtPT4 se redujo en relación a los controles. Los datos indicaron que el gen *MtPT4* se

requiere para un desarrollo adecuado de los arbusculos y por lo tanto para que el hongo se establezca adecuadamente dentro de la raíz (Javot *et al.*, 2007a).

En conclusión, los experimentos de análisis funcional de los transportadores de Pi expresados en la simbiosis MA sugieren que estos transportadores son esenciales en la simbiosis MA y que las consecuencias de la pérdida de su actividad tienen un impacto más allá del intercambio de nutrientes. Una interpretación de este resultado es que las plantas han desarrollado un mecanismo para detectar cuando un simbionte no está aportando los nutrientes necesarios y entonces tratan de eliminarlo. Una interpretación alternativa es que se requiere la entrega de fósforo por el simbionte fúngico para activar la liberación de carbono por la planta. En la ausencia de transporte de Pi simbiótico, el carbono no estaría disponible para sostener el simbionte fúngico, y el arbusculo degenerado puede ser simplemente la respuesta natural de los hongos a un ambiente que carece de carbono disponible.

### **II.3.3.2. Redes de señalización en la planta en respuesta a la ausencia de fósforo**

Si bien se tiene documentado un panorama completo de cómo las plantas detectan las concentraciones de Pi externa e interna, no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual se transduce esta información en una respuesta a nivel morfológico, fisiológico y bioquímico. En general, la red de señalización ante la deficiencia de Pi se puede subdividir en dos partes: (1) respuesta de tipo local y (2) respuestas de señalización sistémica o de larga distancia. La detección de las concentraciones de Pi externos probablemente está asociada al ápice de la raíz y esto a su vez, está relacionado con los cambios en la arquitectura de las raíces. No hay evidencia que apoye que el propio Pi actúa como una molécula de señalización (Ticconi, *et al.*, 2001; Varadarajan, *et al.*, 2002). El análisis del mutante *pdr2*, phosphate deficiency response 2, de *Arabidopsis*, que muestra un fenotipo exagerado a la deficiencia en fosfato en la raíz como consecuencia de una alteración en la P5-ATPasa, así como de mutantes con alteración de la sensibilidad a la deficiencia de fosfato (*low phosphorus insensitive*, *lpi*; *low phosphate root 1*, *lpr1*; *lpr2* y *Pi starvation-induced*, *psi*) revela una inhibición del crecimiento de la raíz primaria acompañada por la formación de raíces laterales en respuesta a bajas concentraciones de Pi externo. Dicha respuesta adaptativa probablemente está regulada a nivel de las células del ápice de la raíz (Linkohr *et al.*, 2002; Sanchez-Calderón *et al.*, 2006). Se ha identificado una interacción genética entre pDR2 y las multicobre-oxidasas LPR1/PSI y LPR2, donde pDR2 actúa corriente arriba y regula negativamente las respuestas de LPR1/PSI y LPR2. Por otra parte,

pDR2, situada en el retículo endoplásmico, está implicada en la regulación de la expresión de *SCARECROWN*, un factor de transcripción que regula el patrón de crecimiento de la raíz y el mantenimiento de las células madre. No existe un modelo detallado que represente la vía de señalización local que explique el proceso desde la detección de las concentraciones de Pi externos hasta las respuestas transcripcionales en la punta de la raíz, pero si se ha demostrado que este proceso es dependiente del receptor de auxina TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1), (Mayzlish-Gati *et al.*, 2012; Perez-Torres *et al.*, 2008) y de MAX2 (MORE AXILLARY GROWTH 2), un componente clave de la señalización de la vía de las estrigolactonas.

Se han propuesto varias vías de señalización sistémicas implicadas en la transmisión de la respuesta a la deficiencia de Pi a larga distancia y es probable que actúen de forma interconectada (Chiou *et al.*, 2011; Rouached *et al.*, 2010). Hay evidencias que apoyan el papel de las hormonas vegetales en la ruta de señalización por fósforo. Por ejemplo, tratamientos con auxina y etileno comparados con plantas crecidas en condiciones de deficiencia de Pi reproducen cambios fenotípicos similares en las raíces (Ma *et al.*, 2001; Gilbert *et al.*, 2000); la disminución tanto de los niveles endógenos de los receptores de citoquinina como de moléculas de citoquinina son un requisito previo para una respuesta adecuada a la deficiencia de Pi (Franco-Zorrilla *et al.*, 2005); las giberelinas pueden reprimir los cambios morfológicos de la raíz bajo condiciones de deficiencia de fósforo a través de mecanismos de señalización dependientes de la proteína DELLA (Jiang *et al.*, 2007). Debido a que la señalización de los azúcares está estrechamente relacionada con múltiples hormonas vegetales (Gibson *et al.*, 2004) no es sorprendente que también exista una coordinación entre las respuestas a distintas condiciones de fósforo y la señalización de los azúcares (Kircher *et al.*, 2012).

Uno de los modelos de señalización sistémica dependiente de fósforo mejor comprendido implica el micro-RNA miR399. PHO2 (PHOSPHATE 2) es una enzima ubiquitina-conjugada que probablemente participa en la selección de los transportadores PHT de fosfato para la degradación proteolítica. El micro-ARN miR399 no sólo dirige la escisión y la degradación del ARNm de *PHO2*, sino que también actúa como una señal sistémica en movimiento desde las hojas hasta las raíces a través del floema. En condiciones de deficiencia de Pi, la expresión de miR399 se induce fuertemente, resultando en la regulación negativa de los niveles de ARNm *PHO2*, así como en la disminución de la degradación proteolítica de proteínas PHT y por tanto en una mayor absorción de Pi (Aung *et al.*, 2006; Chiou *et al.*, 2006; Bari *et al.*, 2006; Pant *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008). En el caso de las estrigolactonas, se ha demostrado que actúan como señales de larga distancia, desplazándose desde las raíces hacia

las hojas (en dirección opuesta al movimiento de miR399) durante la deficiencia de Pi. Su función parece estar implicada con una inhibición de la ramificación, para ayudar a las plantas en su adaptación a las condiciones deficientes en Pi mediante la reducción de la utilización de Pi, así como para mejorar la adquisición del Pi a través de la estimulación de las interacciones simbióticas con hongos micorrícicos arbusculares.

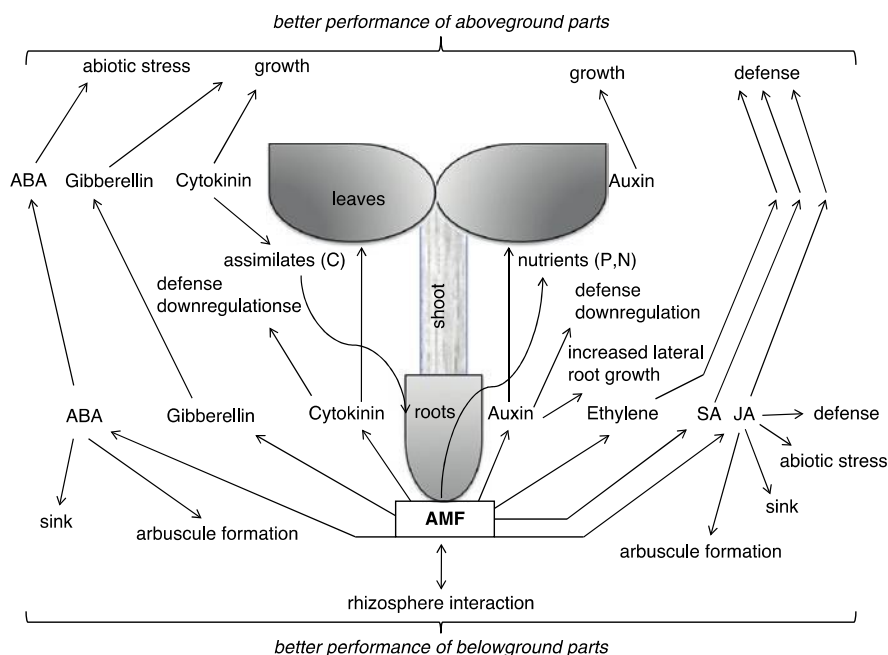
#### **II.4. PARTICIPACIÓN DE HORMONAS VEGETALES EN LA FORMACIÓN Y REGULACIÓN DE LA SIMBIOSIS MA**

Los reguladores del crecimiento en las plantas, o también denominadas hormonas vegetales o fitohormonas, son compuestos orgánicos que regulan el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las hormonas vegetales, cuya acción ocurre a muy bajas concentraciones, se producen en ciertas partes de las plantas y se transportan a otras partes donde provocan respuestas específicas a nivel bioquímico, fisiológico o morfológico, aunque también pueden ser activos en los tejidos donde se producen. El efecto regulador puede ser o bien estimulador o inhibidor. Cada hormona ejerce sus funciones específicas, aunque casi todas las respuestas medibles de plantas son controladas por la interacción entre dos o más hormonas. Dichas interacciones hormonales pueden ser cooperativas, antagónicas, o equilibradas, y pueden ocurrir a distintos niveles, incluyendo la síntesis de hormonas, la recepción y transducción de la señal, o la propia acción final de la hormona. Se han identificado alrededor de 400 genes que participan en aspectos relacionados con la función y regulación hormonal en plantas a nivel de la biosíntesis, transporte, transducción de señales, o mecanismo de acción. Algunos de estos genes comparten las mismas rutas de regulación o una parte de la misma (Davies, 2004).

El mecanismo de acción de una hormona se define como la reacción primaria capaz de iniciar una serie de eventos moleculares que en última instancia conducen a un efecto fisiológico medible. Por lo tanto, la célula debe de estar programada para responder a las señales hormonales (primeros mensajeros) mediante mecanismos específicos. De un modo general, el mecanismo de acción tiene lugar mediante un acoplamiento de estímulo-respuesta, que puede dividirse en tres fases (Segura, 2000): i) Percepción de la señal (primer mensajero) por la célula. ii) Generación de la transmisión de la señal (transducción). iii) Activación de un cambio bioquímico (respuesta). El conjunto de los tres procesos constituye la denominada cadena de percepción y transducción de la señal, que requiere el reconocimiento del primer

mensajero por un receptor y la utilización subsecuente de una serie de moléculas (segundos mensajeros o proteínas efectoras) capaces de transmitir la señal que activará la respuesta. Esta cadena es la vía que utilizan las plantas para responder a todos los estímulos, tanto externos (luz, temperatura, fuerzas mecánicas, agua, patógenos) como internos (hormonas, péptidos, oligosacáridos, fuerzas mecánicas generadas por la pared) que modulan su desarrollo. Las propiedades fundamentales de la cadena de transducción son: rapidez, sensibilidad y especificidad. Todas las propiedades están a su vez condicionadas por la interacción de una red de elementos que actúan de manera positiva o negativa. Por tanto, los sistemas de transducción de señales no pueden considerarse como meras cadenas lineales de causa y efecto (Schmelz *et al.*, 2003).

Aunque se tiene bien establecido el beneficio del establecimiento de la asociación micorriza arbuscular, no existe tanto conocimiento sobre la fisiología y funcionamiento de la simbiosis. Las señales, mecanismos y procesos moleculares que tienen lugar durante el establecimiento de la interacción son aún bastante desconocidos, y en este sentido se ha postulado que las hormonas vegetales son moléculas que median en el proceso de formación de la interacción, ya que son señales importantes que regulan el desarrollo y crecimiento de las plantas, así como su relación y adaptación al entorno. Se tiene documentado que las hormonas vegetales median las interacciones planta-planta y orquestan las respuestas en las interacciones planta-herbívoro y planta-microorganismo (Ruther y Kleier, 2005). Varios estudios han explorado el papel de las fitohormonas en las interacciones MA, pero los resultados son a veces contradictorios y no fáciles de interpretar (Hause *et al.*, 2007; Hause y Schaarschmidt, 2009). Entre las moléculas que participan en este flujo de señales se encuentran hormonas vegetales como el etileno, el ácido abscísico, el ácido jasmónico, el ácido salicílico, las auxinas, las giberelinas, las estrigolactonas o los esteroides. Ludwig-Müller, (2010) reporta un modelo de interacción y regulación fitohormonal en el desarrollo de la planta y el establecimiento de la simbiosis MA (**Figura II.16.**)



**Figura II.16.** Modelo de la interacción de las fitohormonas y sus implicaciones en el desarrollo de la parte aérea de la planta y su influencia en la rizósfera (Ludwig-Müller, 2010).

#### II.4.1. Función de los Jasmonatos en la regulación de la simbiosis MA

Los jasmonatos pertenecen a un grupo de fitohormonas lipídicas, derivadas principalmente de la oxigenación de los ácidos grasos linoleico y linolénico, denominadas oxilipinas, que actúan como moléculas señaladoras de la respuesta de las plantas a numerosas situaciones de estrés y participan en diversos procesos de desarrollo (Howe y Schilmiller, 2002; Lorenzo y Solano, 2005; Wasternack, 2007; Mosblech *et al.*, 2009). Se sabe que los jasmonatos (derivados del ácido jasmónico) juegan un papel central en las interacciones planta-herbívoro (Kessler *et al.*, 2004) y planta-microorganismo (Pozo *et al.*, 2004), pero existen aún pocos estudios sobre su función en el establecimiento de la simbiosis micorriza arbuscular. Diferentes autores han mostrado resultados contradictorios, observándose efectos positivos o negativos del ácido jasmónico sobre la micorrización en función de la dosis aplicada, el modo de aplicación o la especie vegetal empleada (Hause *et al.*, 2007) (**Cuadro II.4.**). Las raíces de cebada infectadas con hongos formadores de MA (Hause *et al.*, 2002) así como también las raíces de pepino infectadas (Ludwig-Muller *et al.*, 2002) tuvieron un incremento de niveles de ácido jasmónico (JA). En estudios de aplicación exógena de jasmonatos se ha podido demostrar que la aplicación externa de dosis altas de JA reduce los niveles de micorrización (Ludwig-Muller *et al.*, 2002), en tanto que la aplicación puntual y a dosis baja estimula la colonización por hongos arbusculares (Regvar *et al.*, 1996). Las determinaciones del contenido en JA endógeno en



ciertas especies de plantas micorrizadas han permitido demostrar que existe un incremento en JA y productos relacionados (en general, jasmonatos) en dichas plantas, poniéndose de manifiesto también que existe una correlación entre los incrementos en JA en las plantas micorrizadas y la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de dicho compuesto, sobre todo en la etapa de formación de arbusculos (Hause *et al.*, 2007).

Landgraf *et al.*, (2012) modificó los niveles endógenos de JA al inducir su acumulación por causar repetidas heridas y demostraron que las plantas tratadas aumentaron la colonización MA, lo que sugiere un papel positivo para los jasmonatos en el desarrollo de la simbiosis MA; Isayenkov *et al.*, (2005) reguló negativamente los niveles de JA utilizando una expresión antisentido del gen Aleno óxido ciclasa resultando en un retraso de la colonización MA. De acuerdo con este resultado, Tejeda-Sartorius *et al.*, (2008) demostraron que en el mutante *Spr2* de tomate (deficiente en JA) (Li *et al.*, 2003), se redujo la colonización MA y este fenotipo podría ser restaurado por la aplicación de metil-jasmonato (MeJA). Por otro lado, Herrera-Medina *et al.*, (2008) demostraron que el mutante de tomate insensible a JA, *jai-1*, es capaz de incrementar su colonización MA en comparación con el cultivar silvestre, y que la aplicación de metil-jasmonato no afectó al desarrollo de dicha colonización, en tanto que ocurrió una reducción de la colonización en el respectivo silvestre.

Si bien existen resultados contradictorios, la mayoría de los autores coinciden en que la señalización de la vía jasmonato es importante para colonización MA, así como para el desarrollo de una simbiosis efectiva (Gutjahr y Paszkowski, 2009), si bien puede haber diferencias según la especie vegetal (Riedel *et al.*, 2008). Los eventos involucrados en la colonización temprana pueden ser muy diferentes de los que ocurren en etapas tardías, y por tanto, el JA puede tener un efecto particular en cada una de esas etapas. Así, se ha propuesto diferentes funciones en las que los jasmonatos estarían implicados durante las distintas etapas de la simbiosis MA. Entre ellas se encuentran la inducción de la biosíntesis de flavonoides, la reorganización del citoesqueleto, el establecimiento y mantenimiento de las raíces micorrizadas, aunado a una mejora del estado general de salud de la planta. Pero quizás el efecto más importante de los jasmonatos en raíces micorrizadas podría ser el control de la regulación de la redistribución de los nutrientes (Hause *et al.*, 2007).

**Cuadro II.4.** Datos disponibles sobre el papel de los jasmonatos en la simbiosis MA

Planta	Incremento en de los niveles de JA (Factor)	Alteradas en biosíntesis		Afectadas en la percepción	Referencia
		Disminución	Incremento		
<i>Hordeum vulgare</i>	5	n.a.	n.a.	n.a.	Hause <i>et al.</i> , (2002)
<i>Cucumis sativus</i>	14	n.a.	n.a.	n.a.	Vierheilig and Piché, (2002)
<i>Glycine max</i>	10	n.a.	n.a.	n.a.	Meixner <i>et al.</i> , (2005)
<i>Medicago truncatula</i>	2-3	↓ (AOCantisense)	n.a.	n.a.	Stumpe <i>et al.</i> , (2005) Isayenkov <i>et al.</i> , (2005)
<i>Solanum lycopersicon</i>	n.a.	↓(spr-2), ↓Def-1	↑(prosistemina-sense)	↑(jai1)	Howe <i>et al.</i> , 1996; Li, <i>et al.</i> , 2001; Li, <i>et al.</i> , 2004; Herrera-Medina <i>et al.</i> , 2008; Tejeda-Sartorius <i>et al.</i> , 2008
<i>Nicotiana attenuata</i>	No incrementado	0 (LOX3antisense)	n.a.	0 (COI1-RNAi)	Riedel <i>et al.</i> , 2008

Acción de los jasmonatos en las raíces micorrizadas. Los niveles elevados de jasmonatos en las raíces MA se dan como x-veces en comparación con los niveles en plantas controles. Los signos ↑ y ↓ representan los cambios en la tasa de micorrización en raíces mutantes o transgénicas en comparación con plantas de tipo silvestre o transformaciones control, mientras que los ratios sin cambios " o ". n.d., no analizado.

Estudios recientes apoyan una relación entre jasmonatos y metabolismo de la sacarosa en plantas micorrizadas. En este sentido, se ha demostrado como *Lin6*, un gen que codifica para una invertasa extracelular de tomate, se induce por MeJA (Thoma *et al.*, 2003), y también se encuentra inducida en raíces micorrizadas en zonas cercanas a las estructuras de hongos y en las células del floema de la raíz (Schaarschmidt *et al.*, 2006). Por otra parte, se ha observado un deterioro de la micorrización en mutantes afectados en la biosíntesis de JA que está correlacionado con una disminución en la acumulación de transcritos que codifican enzimas que actúan en el transporte y la hidrólisis de la sacarosa, así como con una disminución de actividad de la invertasa extracelular (Tejeda-Sartorius *et al.*, 2008). Esto sugiere que uno de los mecanismos por los cuales el JA puede influir en la MA podría estar relacionado con la distribución del carbono en la planta.

Otra función de JA en la simbiosis MA puede ser a través del metabolismo secundario. Es bien conocido que los jasmonatos median la biosíntesis de compuestos secundarios en respuesta a elicitores (Memelink *et al.*, 2001; Vom Endt *et al.*, 2002; Broeckling *et al.*, 2005). La simbiosis MA implica el aumento de la producción de muchos aleloquímicos, tales como compuestos fenólicos, terpenos, alcaloides, aceites esenciales, isoflavonoides y otros compuestos secundarios (Bi *et al.*, 2007; Schliemann *et al.*, 2008). Entre estos compuestos, los isoflavonoides son señales que estimulan el crecimiento de los hongos MA (Harrison, 1999). Los genes que codifican enzimas de la biosíntesis de isoflavonoides, tales como fenilalanina

amonio liasa, son inducidos por el JA (Gunlach *et al.*, 1992; Thoma *et al.*, 2003). Tales genes se expresan específicamente en células que contienen arbusculos, de tal modo que existe una relación entre la expresión de estos genes y la acumulación de JA en células con arbusculos (Harrison y Dixon, 1994). Además, en suspensiones celulares de *M. truncatula*, el tratamiento con MeJA provocó la acumulación del isoflavonoide isomedicarpina, acompañado por la inducción de genes que codifican enzimas para la conversión de la isoflavona formononetina a medicarpina (Naoumkina *et al.*, 2007). En raíces micorrizadas de *M. truncatula* se promovió la disminución del contenido de JA suprimiendo el gen *MtAOC1* mediante RNAi lo dio lugar a un significativo aumento en los niveles de formononetina y daidzeina (Mrosk y Hause, no publicados). Esto sugiere un papel regulador de JA en la biosíntesis de isoflavonoides, lo que podría repercutir en la micorrización mediante la alteración de los niveles de estos compuestos que se requieren durante la fisiología de la simbiosis MA.

Por último, también se ha correlacionado el aumento de la resistencia a patógenos en plantas micorrizadas con el incremento de los niveles basales de JA (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007). Esto podría indicar que el JA puede mediar una resistencia sistémica inducida (ISR) en plantas micorrizadas. De la misma manera, en el caso de la resistencia de las plantas micorrizadas a la sequía, el JA podría ser mediador de la inducción de la expresión de genes que codifican para las proteínas de almacenamiento relacionados con la defensa y crecimiento vegetativo (Wasternack y Hause, 2002; Hause y Schaarschmidt, 2009).

El JA en plantas pertenecen a un grupo de compuestos biológicamente activos denominados Oxilipinas, con diversidad estructural y que se generan por la acción coordinada de lipasas, lipoxigenasas (LOXs) y un grupo de citocromos P450 (CYP74) especializados en el metabolismo de hidroperóxidos de ácidos grasos (Grechkin, 1998; Howe y Schillmiller, 2002; Mosblech *et al.*, 2009). Recientemente la vía de biosíntesis de Oxilipinas 9-LOX se ha identificado estar involucrada en diversos procesos fisiológicos vegetales, como el desarrollo de raíces laterales o la tuberización (Kolomiets *et al.*, 2001; Velosillo *et al.*, 2007), así como en la respuesta de defensa frente a diferentes patógenos microbianos (Rance *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 1999; Blee *et al.*, 2002; Fammartino *et al.*, 2010). Existen pocos estudios acerca de los cambios que se producen en la vía 9-LOX de oxilipinas durante la micorrización arbuscular, sin embargo, un reciente análisis de microarrays de raíces de tomate micorrizadas con diversos hongos MA ha mostrado la existencia de una regulación significativa de genes implicados en el metabolismo 9-LOX en el proceso de formación de la simbiosis (López-Ráez *et al.*, 2010; García-Garrido *et al.*, 2010). Por otra parte, se ha realizado un análisis del perfil de ácidos

grasos en plantas micorrizadas de *M. truncatula* inoculadas con *R. irregularis*, no observándose cambios en el metabolismo 9-LOX y sí en el metabolismo 13-LOX del que se deriva la síntesis del JA, que alcanzó altos niveles de inducción en raíces inoculadas (Stumpe *et al.*, 2005).

Recientemente, se reportó que la vía 9-LOX de oxilipinas desarrolla un papel importante en el control de la propagación de los hongos micorrícicos arbusculares en el interior de las raíces de Solanáceas durante las etapas avanzadas de la simbiosis MA. Su activación se encuentra restringida a la parte colonizada de las raíces y depende, en parte, de la vía de activación/señalización de ácido jasmónico. La alteración de la vía 9-LOX, derivada de la pérdida de función del gen *LeAOS3* implicado en la ruta 9-LOX, aumenta la susceptibilidad de las plantas de patata a la micorrización, afectando principalmente a la frecuencia de micorrización y no a la formación arbuscular (León-Morcillo *et al.*, 2012). Además, se encontró una estrecha relación en la regulación de las vías 9 y 13-LOX de oxilipinas durante el proceso de micorrización arbuscular en Solanáceas. La pérdida de función del gen *LeAOS3* produce una activación de la vía 13-LOX de oxilipinas en etapas avanzadas de la micorrización, la cual podría estar relacionada con el control de la propagación del hongo en el interior de las raíces (León-Morcillo, 2013).

#### **II.4.2. Función de las Giberelinas en la regulación de la simbiosis MA**

Las giberelinas (GA de las siglas de su nombre en inglés “Gibberellic Acid”) constituyen una familia de diterpenos tetracíclicos ácidos cuyo esqueleto básico está constituido por un anillo de *ent*-giberelano (Talón, 2000; Thomas *et al.*, 2005). Las GAs pueden actuar como reguladores endógenos del crecimiento, controlando diversos procesos del desarrollo de las plantas como la germinación, la elongación del tallo, la expansión de las hojas, el desarrollo de los tricomas, la inducción de flores y frutos, la inducción de la partenocarpia o la de la liberación de enzimas hidrolíticas (Pharis y King, 1985; Huttly y Phillips, 1995; Sponsel, 1995; Talón, 2000; Thomas *et al.*, 2005). Las GAs se identificaron en 1935 en el hongo *Gibberella fujikuroi*, que causa crecimiento excesivo de los tallos y brotes de la planta del arroz, provocando la enfermedad conocida como “bakanae”. A mediados de los años 50’s, el compuesto inductor del crecimiento del tallo se aisló a partir del filtrado secretado por el hongo y se le denominó ácido giberélico (giberelina A<sub>3</sub> o GA<sub>3</sub>). Posteriormente, se aislaron en plantas compuestos de estructura similar al ácido giberélico, y a partir de este momento es cuando las GAs adquieren mayor importancia para los fisiólogos vegetales (Hedden y Proebsting, 1999; Talón, 2000).

Actualmente se conocen diferentes tipos de GAs presentes en plantas, hongos y bacterias, asignándoles un número según el orden cronológico de su descubrimiento ( $GA_{1,2,3,\dots,n}$ ) (MacMillan y Takahashi, 1968). Pero generalmente se clasifican en dos grupos, atendiendo al número de átomos de carbono presentes en su estructura:

- Las GAs C-20, con 20 átomos de carbono en el esqueleto de *ent*-giberelano.
- Las GAs C-19, con 19 átomos de carbono en el esqueleto de *ent*-giberelano, y que proceden de las GAs C-20 que poseen un grupo aldehído en el C-20, tras perder ese carbono por descarboxilación oxidativa, formándose una  $\gamma$ -lactona (Talón, 2000).

La mayoría de las GAs son compuestos biológicamente inactivos, precursores o de degradación de las GAs activas, que son principalmente  $GA_1$ ,  $GA_4$ ,  $GA_3$  y  $GA_7$  (Kobayashi *et al.*, 2000). La GA activa  $GA_3$  se ha encontrado en un número reducido de plantas, de ahí que su función como fitohormona endógena no pueda generalizarse a todos los vegetales. En el caso de  $GA_4$  y  $GA_7$  es posible que su actividad se deba a la conversión en la planta a  $GA_1$  y  $GA_3$  respectivamente (Talón, 2000).

Aunque apenas existen estudios del efecto de las giberelinas sobre la micorrización, sí existen resultados muy interesantes. Se ha podido constatar un efecto negativo sobre la germinación de las esporas de los hongos formadores de MA (Barea, 1986), y sobre el desarrollo de la micorrización (El Ghachtouli *et al.*, 1996). En el estudio de El Ghachtouli *et al.*, se postuló que este efecto negativo sobre el desarrollo del hongo en la raíz pudiera estar mediado por la acción de GAs sobre la síntesis de poliaminas, ya que las poliaminas inhiben la micorrización a concentraciones elevadas (El Ghachtouli *et al.*, 1996). Sin embargo, con base en la evidencia que los GAs están involucrados en la nodulación (Ferguson *et al.*, 2005a, 2011), Ortu *et al.*, (2012) examinaron la expresión de una serie de genes relacionados con el metabolismo de GA en *M. trunclata* y reportaron la regulación positiva de algunos genes de la biosíntesis de GA en etapas iniciales del proceso infectivo, después del contacto con el hongo, como también lo observaron en tomate García-Garrido *et al.*, (2010), aunque en este último caso la mayor expresión de los genes se observó en etapas de micorrización bien establecida. Además, mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), Shaul-Keinan *et al.*, (2002) han encontrado niveles elevados de  $GA_1$  y su derivado  $GA_8$  en las raíces de las plantas de tabaco micorrizadas, en comparación con las plantas testigo no micorrizadas.

Recientemente, se ha determinado que la señalización GAs influyen en la formación de los arbusculos en las raíces micorrizadas de guisante. Las GAs parecen suprimir la formación de los arbusculos en guisante, así un mutante con la biosíntesis reducida de GAs mostró un elevado desarrollo arbuscular, en tanto que un mutante DELLA-deficiente que no es capaz de reprimir la respuesta de GA mostró un deterioro en su capacidad de formación de arbusculos (Foo *et al.*, 2013). Las proteínas DELLA son reguladores negativos de la señalización de GA y son degradadas en la presencia de GAs biológicamente activas (Harberd *et al.*, 2009). Estos resultados sugieren que el papel del GAs en la colonización MA se realiza de manera interna, localizada en las células de las raíces de las plantas (Foo *et al.*, 2013). De manera similar, estudios en *M. truncatula* (Floss *et al.*, 2013) y arroz (Yu *et al.*, 2014) usando mutantes nulos en la proteína DELLA han confirmado el papel regulador de dicha proteína sobre la formación de arbusculos.

#### **II.4.3. Función del Ácido Abscísico (ABA) en la regulación de la simbiosis MA**

El ácido abscísico (ABA de las siglas de su nombre en inglés “**A**bscisic **A**cid”) es un ácido débil de 15 carbonos, ópticamente activo, que fue identificado en la década de los 60’s como un inhibidor del crecimiento que se acumulaba en el fruto del algodón en el proceso de abscisión (recibiendo el nombre de abscisina II) y, en hojas de sicomoro inducidas por fotoperiodo que permanecían durmientes (denominado como dormina) (Finkelstein y Rock, 2002). El compuesto abscisina II tenía un efecto inhibitor del crecimiento del coleóptilo de avena, aunque posteriormente se identificó que el efecto del ABA como promotor de la abscisión era un efecto indirecto producido por la inducción de la biosíntesis de etileno (Cracker y Abeles, 1969). Otro grupo de investigación aisló un compuesto denominado dormina, que era un inhibidor de la germinación del embrión en maíz y que se encontraba en extractos de hoja del sicomoro. Los análisis químicos posteriores determinaron que la dormina y la abscisina II eran el mismo compuesto (Conforth *et al.*, 1965a). Desde ese momento este compuesto recibió el nombre de ácido abscísico. El ABA fue inmediatamente conocido como regulador del crecimiento en plantas, además de estar presente como compuesto endógeno en algunos hongos y animales (Nambara y Marion-Poll, 2005; Wasilewska *et al.*, 2008). El ABA es un sesquiterpeno apocarotenoide con un carbono asimétrico ópticamente activo C-1’. El ABA tiene por tanto dos isómeros, *cis* o (+) ABA y *trans* o (-) ABA, interconvertibles entre ellos en la planta y dos enantiómeros R y S que no son también interconvertibles. En la naturaleza se

encuentra la forma S(+)-ABA, donde la cadena lateral de cinco carbonos del ABA es por definición 2-*cis*,-4-*trans*. La forma *trans*-ABA es inactiva biológicamente.

El ABA participa en la regulación de muchos aspectos del desarrollo de las plantas, tales como la embriogénesis, la maduración, la dormición y la germinación de las semillas. Además, esta hormona ejerce un papel muy importante en el control de las respuestas frente a estreses ambientales, tanto bióticos (ataque de patógenos y heridas provocadas por insectos) como abióticos (sequía, estrés osmóticos, alta osmolaridad, alta radiación UV y tolerancia a bajas temperaturas) (McCarty, 1995; Ueno, 1998; Albinsky *et al.*, 1999; Nambara y Marion-Poll, 2005; Zhang *et al.*, 2006; Seki *et al.*, 2007).

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

El papel del ácido abscísico en la micorrización está tomando especial relevancia en los últimos años por tres razones fundamentales: primera, porque se ha detectado producción de ABA por hifas fúngicas con un contenido más alto comparado con el contenido en raíces (Esch *et al.*, 1994), y se especuló que el ABA en hongos MA podría controlar el flujo de sales minerales y agua desde el suelo a la hifa o de otras estructuras fúngicas como arbusculos a las células de la raíz (Esch *et al.*, 1994). Segundo, por su papel regulador de los mecanismos de protección frente al estrés hídrico y salino activados en plantas micorrizadas (Horton, 1999; Aroca *et al.*, 2008), y tercero, porque se ha demostrado su efecto directo sobre el establecimiento de la simbiosis (Herrera-Medina *et al.*, 2007). En este sentido, el ABA puede inducir la biosíntesis de algunas auxinas como el ácido indol-acético (IAA) o el ácido indol-

butírico (IBA) que favorecen el establecimiento de la simbiosis (Ludwig-Müller *et al.*, 1995), y puede regular negativamente los niveles de etileno, un regulador negativo de la simbiosis. Recientes estudios han demostrado la participación del ABA como elemento clave en la formación y función de los arbusculos durante el establecimiento de la simbiosis MA (Herrera-Medina *et al.*, 2007; Martín Rodríguez *et al.*, 2010; 2011), independiente de su posible papel como mediador en la regulación del estrés ambiental en plantas micorrizadas. El uso de los mutantes de tomate *sitiens*, deficientes en ABA, permitió a Herrera-Medina *et al.*, (2007) establecer la primera evidencia del papel del ABA en raíces colonizadas por *Rhizophagus irregularis*. Sus resultados mostraron una reducción en la frecuencia e intensidad de la colonización en las raíces de los mutantes deficientes. También demostraron que los mutantes deficientes desarrollaron arbusculos menos ramificados y activos, lo que se reflejó en una menor actividad fúngica fosfatasa alcalina y menor expresión del gen *LePt4* vegetal. La aplicación exógena de ABA a las plantas *sitiens* restauró la frecuencia y la intensidad de la colonización a los niveles del cultivar silvestre. Estos resultados apoyan la opinión de que el ABA es esencial para una efectiva colonización MA de las raíces y una correcta funcionalidad de los arbusculos. Sin embargo, parte de este efecto de la deficiencia de ABA sobre la infección fúngica puede deberse a un aumento en la producción de etileno en estos mutantes (Herrera-Medina *et al.*, 2007). Trabajos posteriores, utilizando diferentes mutantes deficientes en ABA, *sitiens* y *notabilis*, en combinación con plantas transgénicas y mutantes en la síntesis y percepción de etileno, así como compuestos inhibidores de la biosíntesis de ABA, apoyan la hipótesis de un doble papel del ABA sobre la micorrización. Por un lado, la deficiencia de ABA aumenta los niveles de etileno, un regulador negativo de la intensidad y colonización de la micorriza (Martín-Rodríguez *et al.*, 2010, 2011). Por otro lado, la deficiencia de ABA también parece regular negativamente la formación arbuscular por una vía directa, independiente de etileno (Martín-Rodríguez *et al.*, 2011), posiblemente debido a la regulación positiva de genes relacionados con la defensa y modificación de la pared celular (García-Garrido *et al.*, 2010).

#### **II.4.4. Función del Ácido Salicílico en la regulación de la simbiosis MA**

El ácido salicílico (SA de las siglas de su nombre en inglés “Salicylic Acid”) es un compuesto aromático, que si bien no se ha reconocido tradicionalmente como hormona vegetal, su modo de acción es similar al de este tipo de moléculas tradicionales, y además afecta a la síntesis o señalización de las mismas, por lo que actualmente se incluye dentro del grupo de moléculas con acción hormonal en plantas. El ácido salicílico (SA) es una hormona vegetal relacionada



principalmente con la activación de respuestas defensivas frente a patógenos biótrofos, así como con la regulación de la Respuesta Sistémica Adquirida (SAR, “Systemic Acquired Resistance”) en plantas frente a patógenos. Durante el desarrollo de la planta, el SA actúa como inhibidor de la germinación y del crecimiento de raíz y coleoptilo, actúa como inductor de la floración (Saxena y Rashid, 1980), provoca cierre de estomas y reducción de la transpiración, mantiene turgente los estomas (Hao *et al.*, 2011), altera la permeabilidad de los tilacoides e influye sobre la capacidad fotosintética de la planta (Arfan *et al.*, 2007), y además es un inhibidor del crecimiento y germinación de las semillas (Dolatabadian *et al.*, 2009).

Se ha determinado que durante las etapas de penetración del hongo micorrízico en la raíz de la planta se produce un incremento en los niveles de SA que puede estar relacionado con la activación de respuesta defensiva en la planta. Sin embargo, esta activación es transitoria y queda suprimida rápidamente, posiblemente para favorecer el establecimiento de la simbiosis (Blilou *et al.*, 2000). Al contrario que sucede con el JA, la aplicación foliar de SA en plantas micorrizadas de *Carica papaya*, *Tropeolum majus*, y en *Cucumis sativus* no tiene ningún efecto sobre la micorrización de la raíz (Ludwig-Müller *et al.*, 2002). Por tanto, la respuesta defensiva activada por el SA ante la micorrización parece tener una acción local, y no sistémica. En este sentido, se ha demostrado que plantas transgénicas impedidas en su capacidad de acumulación de SA muestran una alteración de la dinámica de la micorrización, incrementando la tasa de micorrización en etapas iniciales. Por el contrario, plantas transgénicas capaces de producir constitutivamente mayores niveles de SA en la raíz, mostraron una menor tasa de micorrización (Herrera-Medina *et al.*, 2003). Recientemente se ha sugerido que el SA participa como regulador de etapas tempranas de la infección de la raíz tanto por *Rhizobium* como por hongos arbusculares, activando una respuesta defensiva inicial que queda suprimida en etapas posteriores de la colonización, para lo cual se necesita de la activación de genes simbióticos esenciales en la planta (Gutjahr y Paszkowski, 2009). Además, mediante experimentos con sistema “splits-roots”, se observó que ese aumento de SA es solo a nivel local en las zonas micorrizadas, y no sistémico (Khaosaad *et al.*, 2007). A diferencia de la respuesta de defensa frente a patógenos, la respuesta de defensa generada durante la micorrización parece ser transitoria y menos intensa, ya que una de las claves de la micorrización de la raíz es el control del desarrollo de la respuesta de defensa (García-Garrido y Ocampo, 2002). En plantas de guisante mutantes Myc-, incapaces de micorrizarse y alterados en la capacidad de regular su respuesta defensiva frente a hongos MA si se observó un incremento de la concentración de SA en respuesta a la inoculación con hongos MA (Blilou *et al.*, 1999), lo que sugiere el papel regulador del SA durante la micorrización.

El ácido salicílico actúa para coordinar la defensa de la planta frente a patógenos biótrofos (Lu, 2009), y por tanto se puede esperar que se active durante la colonización MA. De hecho, este parece ser el caso, detectándose un aumento de corta duración de los niveles de SA durante las primeras etapas de la colonización MA (Blilou *et al.*, 1999). Herrera-Medina *et al.* (2003) mostraron que el contenido de SA de la planta afectada la tasa de colonización de MA. Compararon las plantas de tipo salvaje con plantas transgénicas nahG que poseían niveles reducidos de SA debido a una mayor desactivación de SA y plantas transgénicas CSA con biosíntesis constitutiva de SA. En experimentos a lo largo del tiempo, se encontraron que las plantas NahG poseían una colonización más rápida, mientras que en las plantas de CSA se retrasaba su dinámica de colonización, aunque el nivel final de colonización no fue alterado. Se demostró que existe una relación inversa entre la cantidad de SA endógeno en la raíz, y la velocidad de dispersión del hongo en la raíz, sin afectación de la capacidad máxima de micorrización de las plantas. Por tanto, el papel del SA durante la micorrización estaría más relacionado con la regulación del número de puntos de infección y la resistencia de la planta a la penetración por el hongo, provocando un retraso en su colonización, y no afectando la formación de los arbusculos (Herrera Medina *et al.*, 2003; Gutjahr y Paszkowski, 2009). Apoyando esta hipótesis se han obtenido resultados que indican que en los pelos radicales en *M. truncatula* se incrementan los niveles de expresión de un gen codificante de una proteína relacionada con la patogénesis, PR10. Este gen responde positivamente a SA, y su expresión se activa específicamente en células cercanas del apesorio fúngico durante las etapas iniciales de la infección, ya que después su expresión disminuye durante la formación y acceso del hongo a la planta a través del aparato de penetración (Siciliano *et al.*, 2007).

#### **II.4.5. Función de las Auxinas en la regulación de la simbiosis MA**

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

Varios estudios han mostrado que las auxinas, sobre todo el ácido indol-butírico (IBA, indole-3-butyric acid), incrementa la formación de raíces laterales en varias especies de

plantas (Kaldorf y Ludwig-Müller, 2000; Overvoorde *et al.*, 2010). De igual manera, la inoculación con hongos formadores de micorrizas en algunas especies de plantas también produce un incremento de raíces laterales (Yano *et al.*, 1996; Oláh *et al.*, 2005), y parece ser que esas modificaciones en la arquitectura radicular debido a la micorrización es dependiente de auxinas (Hanlon y Coenen, 2011). Además, esas raíces laterales son las que preferentemente utiliza el hongo para colonizar la planta (Kaldorf y Ludwig-Müller, 2000; Gutjahr *et al.*, 2009).

Las auxinas pueden ser producidas por diversos hongos que forman asociaciones con las raíces de diversas plantas huésped (Ludwig-Müller, 2010) y por lo tanto influir en la fisiología de la planta huésped para aumentar el sistema radicular (Splivallo *et al.*, 2009). Este es el caso del hongo promotor del crecimiento vegetal *Piriformospora indica* (Sebacinaceae), cuya interacción con las raíces huésped se asemeja en algunos aspectos a la simbiosis MA, y que produce ácido indol-3-acético (IAA) (Sirrenberg *et al.*, 2007; Vadassery *et al.*, 2008). Las esporas del hongo MA *Rhizophagus irregularis* producen pequeñas cantidades de IAA, pero no de ácido indol-3-butírico (IBA), otra auxina natural (Ludwig-Müller *et al.*, 1997). Aunque ninguna auxina ha sido detectada en las hifas en creciendo en zonas de suelo alrededor de una planta huésped (Jentschel *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que las auxinas presentan un papel importante en el proceso de micorrización, detectándose cambios en los niveles de su producción en función de la etapa analizada en el proceso de colonización (Jentschel *et al.*, 2007). Así, se ha propuesto que las auxinas favorecen la micorrización de tres formas: activando la germinación de las esporas, induciendo el desarrollo extraradical de las hifas y promoviendo la formación de raíces secundarias que favorecen la infección del hongo (Ludwig-Müller, 2000).

Se ha discutido ampliamente el papel de las auxinas en la formación de la simbiosis MA, especialmente teniendo en cuenta el aumento de la ramificación de la raíz posterior a la infección fúngica (Gianiniazzi-Pearson *et al.*, 1996), pero hay poca evidencia directa de su posible función. En este sentido existen diversos trabajos con resultados contradictorios que han estudiado tanto el contenido de diferentes auxinas en las raíces micorrizadas de distintas plantas, como el efecto sobre la micorrización de la aplicación de auxinas y/o inhibidores de su síntesis o transporte. Así, se han detectado incrementos o no variaciones en los niveles de auxina después de la infección dependientes de la especie vegetal y la etapa de colonización (Jentschel *et al.*, 2007; Campanella *et al.*, 2008), y además, las mediciones en las hifas de los

hongos mostraron que el hongo no podría ser la fuente de los cambios observados (Jentschel *et al.*, 2007). Zsögön *et al.*, (2008) fueron los primeros en utilizar plantas mutantes en el metabolismo de auxinas para examinar el efecto de auxinas percibidas por la raíz de la planta sobre la micorrización. En sus experimentos, las plantas de tomate mutante *diageotropica*, insensible a las auxinas, no mostraron diferencias en la colonización fúngica intrarradical en comparación con el genotipo silvestre.

Un estudio más reciente realizado por Hanlon y Coenen (2011) mostró que las hifas del hongo MA colonizaron en menor medida las raíces de *diageotropica*, lo que sugiere que la presencia de auxinas para que las hifas fúngicas se dirijan a la raíz. En mutantes *cpt*, que tienen incrementado el transporte hiperactivo polar de auxinas se acelera la micorrización en las primeras etapas. El desarrollo de estructuras fúngicas en las raíces, incluyendo arbusculos, era normal en ambos mutantes, lo que sugiere que, mientras que la auxina se requiere para la infección normal de HMA, no se requiere para el desarrollo posterior a la infección (Hanlon y Coenen, 2011).

Por otro lado, Foo (2013) mostró que las raíces de las plantas del mutante de guisante *bsh* (*bushy*), deficiente en auxinas (Symons *et al.*, 2002) tenían una reducción en la colonización micorrízica respecto al genotipo silvestre, aunque con la formación normal de los arbusculos en las raíces. Este mutante también exuda una menor cantidad de estrigolactonas por las raíces, probablemente debido a la regulación negativa del gen *PsCCD8*, clave en la síntesis de estrigolactonas. En este sentido, se ha establecido que las auxinas regulan la expresión de este gen (Foo *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006). La aplicación de la estrigolactona sintética GR24 revierte parcialmente el efecto del mutante *bsh* en la colonización MA (Foo, 2013). Por tanto y en conclusión, estos resultados sugieren que las auxinas pueden regular la formación MA, al menos parcialmente, mediante el control de los niveles de estrigolactonas.

#### **II.4.6. Función del Etileno en la regulación de la simbiosis MA**

El etileno es un compuesto gaseoso que se ha documentado como molécula con una acción hormonal en las plantas, siendo un regulador involucrado en una variedad de procesos celulares, de desarrollo y relacionados con el estrés en las plantas. La producción de etileno en las plantas es inducida por eventos fisiológicos, patológicos y ambientales, tales como la germinación, la maduración, la polinización, el estrés hídrico, las heridas, y el ataque de patógenos (Ju y Chang, 2012). El etileno tiene un papel importante en la inducción floral, la

determinación del sexo, el alargamiento de los brotes, la maduración, la senescencia y la abscisión foliar.

El etileno es el hidrocarburo insaturado más simple. La historia de su descubrimiento como una molécula señal o de acción hormonal fue descrita por Abeles *et al* (1992). En el siglo XIX, se publicaron varios artículos con informes de que las fugas en gas de alumbrado causaron senescencia prematura y la defoliación de las plantas en invernaderos y árboles cerca de las líneas de gas. El fisiólogo vegetal ruso Neljubov (1879-1926) (Abeles *et al.*, 1992) observó que las plántulas de guisante etioladas crecieron horizontalmente en su laboratorio, pero crecieron en posición vertical en el cultivo en el exterior, y mostró que el crecimiento anormal en el laboratorio fue causado por la contaminación del gas de alumbrado. En 1901, demostró que el principio activo del gas de alumbrado era el gas etileno. Así, a Neljubov se le atribuye el descubrimiento de que el etileno es un gas biológicamente activo. Gane (1934) demostró que las plantas producen etileno, y analizó los gases liberados por 60 libras de manzanas en etapa de maduración. A partir de este momento, el escenario estaba listo para investigar la función de etileno como una molécula de señal endógena en las plantas.

Gran parte de los primeros trabajos sobre la acción del etileno se realizaron en el Instituto Boyce Thompson, en ese momento ubicado en Yonkers, New York (Crocker, 1932). La principal aportación de este grupo de investigación fue proporcionar un bioensayo de respuesta a etileno. Este ensayo se basa en la denominada Triple Respuesta de las plántulas de guisante etioladas, que consiste en el crecimiento agravitrópico (horizontal), la inhibición de la elongación del tallo, y el engrosamiento del tallo. Es complicado medir los niveles fisiológicos de etileno cuando se presenta la triple respuesta, pero la observación de las alteraciones de esta respuesta ha servido para la identificación de mutantes de *Arabidopsis* con alteración de la biosíntesis de etileno y/o la sensibilidad al mismo (Bleecker *et al.*, 1988; Guzmán y Ecker, 1990). La investigación moderna sobre la producción de etileno en tejidos vegetales y en la actividad biológica de etileno se inició con la introducción de la cromatografía de gases (Burg y Stolwijk, 1959). Esta nueva técnica analítica permite la determinación precisa y rápida de pequeñas cantidades de etileno. En el campo de la Biología molecular, se han logrado también avances significativos en la comprensión de cómo perciben las plantas este compuesto y la transducción de la señal de etileno (Bleecker y Kende, 2000; Stepanova y Alonso, 2009). Los componentes genéticos de la vía de señalización se identificaron por primera vez mediante la disección genética molecular de la respuesta de etileno en *Arabidopsis*. Esto implicaba el aislamiento de mutantes de respuesta de etileno, tales como mutantes alterados en el

metabolismo o respuesta (mutantes con respuesta constitutiva o mutantes insensibles), seguido por la clonación molecular de los genes correspondientes y la determinación de su orden de acción. Se ha descubierto una vía que comienza con los receptores de etileno y termina con factores de transcripción que controlan la expresión génica. La ruta contiene una combinación de componentes de señalización que no se conocía anteriormente y que interactúan entre ellos.

#### **II.4.6.1. Fisiología de la acción de Etileno**

Abeles *et al.*, (1992) y Mattoo y Suttle (1991) han descrito una amplia gama de respuestas fisiológicas reguladas por el etileno. En los términos más amplios, el etileno provoca la senescencia de los órganos de la planta, influye en el crecimiento de la planta, actúa como una hormona del estrés durante condiciones de estrés biótico y abiótico, y regula diversos efectos morfogénicos. Entre los procesos de senescencia, el etileno induce la maduración de los llamados frutos climatéricos (Abeles *et al.*, 1992). Los frutos climatéricos, que incluyen muchos de nuestros frutos comunes como manzanas, plátanos, melones y tomates, se caracterizan por un fuerte aumento en la síntesis de etileno en la etapa verde-maduro y de un aumento correspondiente en la respiración. La maduración de la fruta es una secuencia de eventos bioquímicos que resultan en la pérdida de la clorofila, la formación de pigmentos, sabores, y aromas, ablandamiento de la carne, y la eventual abscisión de la fruta. Actualmente, la maduración del fruto se puede controlar mediante la manipulación de la síntesis/sensibilidad a etileno mediante técnicas moleculares. Otros procesos de senescencia regulados por etileno están relacionados con abscisión de flores, hojas y pétalos, que también comparten rutas de señalización con la maduración de los frutos climatéricos (Abeles *et al.*, 1992; Bleecker y Kende, 2000; Argueso *et al.*, 2007). Un efecto bien conocido de etileno en el crecimiento de la planta es el llamado 'triple respuesta' de plantas dicotiledóneas etioladas. Esta respuesta se caracteriza por la inhibición del hipocotilo y de la elongación de la raíz, hinchazón radial del hipocotilo, y la curvatura exagerada del gancho apical. Esta respuesta de etileno altamente específica se produce en una etapa temprana de desarrollo (3 días postgerminación) (Guo y Ecker, 2004).

Casi todas las condiciones de estrés biótico y abiótico provocan la síntesis de etileno en plantas (Johnson y Ecker, 1998; Kende, 1993). En algunos casos, el etileno parece estar implicado en la mediación de la respuesta al estrés (Moeder *et al.*, 2002; Vahala *et al.*, 1998). En otros casos, la

función fisiológica del etileno en el estrés no se comprende. El papel de etileno en plantas infectadas por patógenos es complejo de comprender, pues, dependiendo del patógeno, los síntomas de la enfermedad parecen ser reducidos o aumentados por el etileno, o no se ven afectados (Hoffman *et al.*, 1999). En otras palabras, el etileno parece mediar las respuestas de defensa a algunos agentes patógenos, y se ha sugerido que el etileno ayuda a restringir la propagación de un agente patógeno causando abscisión de la hoja en los casos en que exacerba los síntomas de enfermedad (Guo y Ecker, 2004).

Por otra parte, el JA está estrechamente relacionado con el etileno en la activación de la respuesta defensiva de las plantas, llegando a solaparse ambas vías de señalización en muchas ocasiones (Penninckx *et al.*, 1998; Pieterse *et al.*, 1998; Van Wees *et al.*, 1999; Thomma *et al.*, 2001; Ellis y Turner, 2001, Rojo *et al.*, 2003). La selección de la ruta bioquímica/molecular más adecuada a cada respuesta concreta viene determinada por el tipo de interacción que se establezca. En el caso de los patógenos necrótrofos ambas hormonas actúan de manera sinérgica activando la expresión de diferentes genes de defensa (Xu *et al.*, 1994; Penninckx *et al.*, 1998), de ahí que los mutantes afectados en alguna de las dos vías de señalización son incapaces de inducir la respuesta defensiva y son más susceptibles al ataque de los patógenos (Knoester *et al.*, 1998; Vijayan *et al.*, 1998; Staswick *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 1998, 1999). Sin embargo, en la respuesta a daño mecánico o herida, ambas rutas de señalización antagonizan en la activación de los genes de defensa (Rojo *et al.*, 1999, 2003). Tanto el etileno como JA son necesarias para la inducción del factor de transcripción *ERF1* (*Ethylene-Response-Factor1*; Lorenzo *et al.*, 2003), clave en la activación de los mecanismos de defensa de la planta frente a patógenos necrótrofos. La expresión de *ERF1* se induce tras la infección por patógenos necrótrofos y regula la expresión de genes de defensa como la defensina *PDF1.2* (Kauss *et al.*, 1992, 1994). Esta respuesta de defensa mediada por ambas hormonas se produce tanto a nivel local como sistémico (Clarke *et al.*, 2000). Por otro lado, también existen evidencias de un comportamiento sinérgico de ambas fitohormonas en la respuesta defensiva a patógenos, como lo demuestra la implicación de ambas rutas de señalización en la resistencia de *Arabidopsis* a *Plectosphaerella cucumerina* (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002), *Pseudomonas syringae* y *Peronospora parasitica* (Clarke *et al.*, 2000).

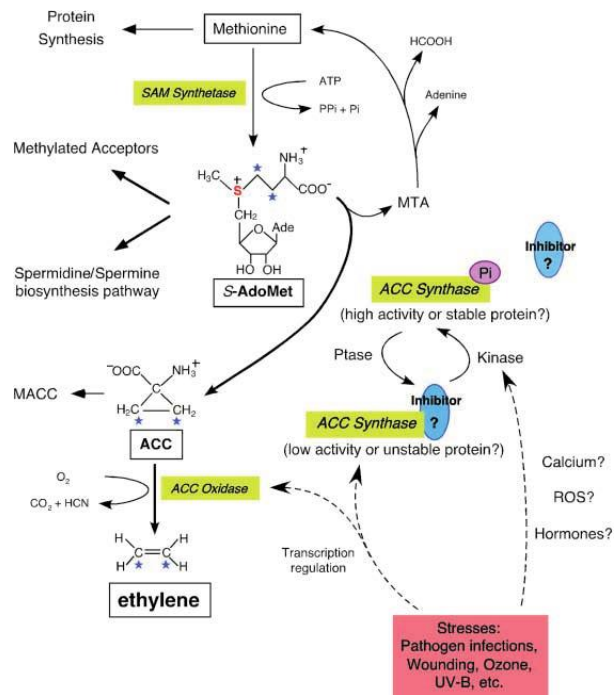
Aunado a lo anterior, el etileno exhibe varios efectos morfogénicos en el desarrollo de las plantas (Abeles *et al.*, 1992). En numerosas plantas, el etileno promueve la formación de raíces adventicias, es decir, el desarrollo de raíces en tejidos diferentes a la raíz, y también puede mediar el efecto hormonal de las auxinas en el desarrollo de la raíz (Koltai y Kapulnik,

2010). En las bromelias, el etileno induce el desarrollo floral, una actividad que ha sido explotada para sincronizar la floración en las plantaciones de la piña. Para tales aplicaciones agrícolas, las plantas se pulverizan con un compuesto que libera etileno, el ácido 2-cloroetanofosfónico (Bleecker y Kende, 2000).

#### **II.4.6.2. Ruta de biosíntesis del Etileno**

La molécula origen de la ruta de biosíntesis de etileno es el aminoácido metionina (Met), que se convierte en S-adenosil-L-metionina (SAM) por la acción de la enzima S-adenosil-L-metionina sintetasa (SAM sintetasa). El precursor directo de etileno, 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), se produce a partir de SAM por la acción de la enzima ACC sintetasa (ACS). El paso final de conversión de ACC en etileno está bajo el control de la ACC oxidasa (ACO) (Adams y Yang, 1979) (**Figura II.17.**). ACS es la enzima clave que cataliza la etapa limitante de la biosíntesis de etileno (Kende, 1993). Los estímulos externos, tales como la impedancia mecánica (Botella *et al.*, 1995; He *et al.*, 1996), el estrés hídrico (Tudela y Primo-Millo, 1992; Zarembinski y Theologis, 1997), hipoxia (He *et al.*, 1996), ataque de patógenos (Knoester *et al.*, 1995), ozono (Schlagnhauser *et al.*, 1997; Tuomainen *et al.*, 1997) y heridas (Imaseki, 1989; Botella *et al.*, 1992), pueden potenciar la expresión del gen ACS, y por lo tanto la concentración de la enzima (Kende, 1993). La biosíntesis del etileno se puede inducir por el etileno endógeno o exógeno. La síntesis del ACC aumenta con los altos niveles de las auxinas, especialmente el ácido indolacético (IAA), y de citoquininas, y por el contrario la síntesis del ACC es inhibida por el ácido abscísico.





**Figura II.17.** Ruta de biosíntesis de etileno y su regulación. La formación de SAM es catalizada por la SAM sintetasa a partir de la metionina a expensas de una molécula de ATP por molécula de SAM sintetizado. ACC es el precursor inmediato de etileno. El paso limitante de la velocidad de la síntesis de etileno es la conversión de SAM en ACC por la ACC sintasa. MTA es el subproducto generado junto con la producción de ACC por la ACC sintasa. El reciclaje de MTA de nuevo a metionina conserva el grupo thio-metil y es capaz de mantener una concentración constante de metionina celular incluso cuando el etileno se sintetiza rápidamente. La malonilación de ACC a malonil-ACC (MACC) reduce la cantidad de ACC y reduce la producción de etileno. La ACC oxidasa cataliza el último paso de la síntesis de etileno usando ACC como sustrato y genera dióxido de carbono y cianuro (Wang *et al.*, 2002).

La ACS está codificada por una familia multigénica, que comprende al menos 5 genes en *Arabidopsis* (Liang *et al.*, 1992), y al menos 7 genes en tomate (Lincoln *et al.*, 1993; Oetiker *et al.*, 1997; Olson *et al.*, 1995). En todos los casos estudiados existe una regulación espacio-temporal de la expresión diferencial de estos genes. Por ejemplo, en *Arabidopsis*, *ACS1* se expresa en los tejidos jóvenes y la expresión se correlaciona fuertemente con la formación de raíces laterales (Rodrigues-Pousada *et al.*, 1993). *ACS4* es sensible a la regulación por la auxina IAA (Abel *et al.*, 1995). En el tomate, *LE-ACS4* responde a la maduración y heridas (Lincoln *et al.*, 1993). En las hojas de patata (*Solanum tuberosum L.*), *ST-ACS5* y *ACS4* se expresan secuencialmente en respuesta a estrés bióticos y abióticos (Schlaghaufer *et al.*, 1997). En arroz (*Oryza sativa L. cv. Habiganj Aman II*), la inmersión parcial en agua induce la expresión de *OS-ACS1* en todas las zonas de la elongación del entrenudo, pero suprime la expresión de *OS-ACS2*, en tanto que *OS-ACS3* y *OS ACS5* no están expresados en todas las zonas de la planta (Zarembinski y Theologis, 1997).

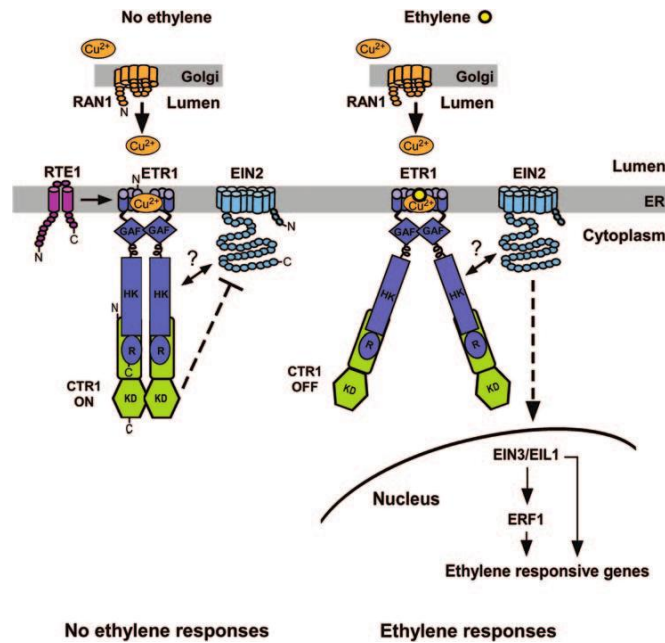
### II.4.6.3. Percepción y señalización del Etileno

El primer paso en la transducción de la señal en respuesta a etileno comienza con la percepción de dicho compuesto. En este sentido, en plantas de *Arabidopsis* se han caracterizado cinco genes que codifican receptores de etileno con funciones redundantes: *ETR1*, *ETR2*, *EIN4*, *ERS1* y *ERS2* (Chang y Shockey, 1999, Urao *et al.*, 2000). Estos genes codifican para receptores proteicos que requieren un cofactor de cobre que depende del transportador de cobre ATPasa tipo-P, RAN1 (Urao *et al.*, 2000). Estos genes son redundantes en el sentido que la pérdida de función de alguno de ellos puede ser compensada por otro que puede actuar en su lugar (Hua y Meyerowitz, 1998), si bien también se han descrito algunas funciones distintas y específicas para alguno (Binder *et al.*, 2012). Los cinco receptores se dividen en dos subfamilias en función de la secuencia génica y la estructura proteica: a) el complejo *ETR1/ERS1* y b) el complejo *EIN4/ETR2/ERS2* (Chang y Shockey, 1999). Los receptores de etileno regulan negativamente la señalización de etileno, lo que significa que los receptores reprimen las respuestas del etileno en ausencia de etileno. Este hecho ha sido demostrado realizando diversas mutaciones anulando la función de múltiples genes de receptores de etileno, resultando en fenotipos de respuesta constitutivos a etileno, incluso en ausencia de etileno (Hua y Meyerowitz, 1998; Wang *et al.*, 2003; Qu *et al.*, 2007). El receptor de etileno *ERS1* identificado en *Arabidopsis* que regula negativamente las respuestas de etileno, también se ha encontrado que promueve las respuestas de etileno en presencia del receptor *ETR1* en el genotipo silvestre (Liu *et al.*, 2010).

Como ya se ha mencionado, los receptores se clasifican en dos subfamilias según sus relaciones filogenéticas y similitudes estructurales. Los receptores de la Subfamilia I poseen actividad histidina-autoquinasa, como en el sistema del receptor histidin quinasa de dos componentes procarionta, mientras que los receptores de la Subfamilia II tienen actividad serina/treonina quinasa y un dominio N-terminal hidrófobo adicional, que es una secuencia señal putativa (Gamble *et al.*, 1998; Moussatche y Klee, 2004, Chen *et al.*, 2009).

En *Arabidopsis*, la subfamilia de receptores tipo I (*ETR1* y *ERS1*) tienen un papel predominante en el control de las respuestas de etileno, si bien su mecanismo de señalización no está claro (Hua y Meyerowitz, 1998; Qu *et al.*, 2007). Estudios recientes sugieren que la unión del etileno al receptor de etileno *AtETR1* estimula su actividad histidin autoquinasa (Hall *et al.*, 2012), sin embargo en estudios *in vitro* el análisis de *AtETR1* indica lo opuesto- que la unión de etileno inhibe la actividad histidin autoquinasa (Voet-van-Vormizeele y Groth, 2008).

En este sentido, la relación entre la unión del etileno y la histidin autofosforilación no está resuelta y por lo tanto no podemos comprender el mecanismo bioquímico primario de la señalización del receptor de etileno (Ju y Chang, 2012). No obstante, si se conocen determinados actores moleculares en dicha señalización, y en este sentido la **Figura II.18.** resume brevemente estos los componentes de la señalización de etileno y su acción en la vía.



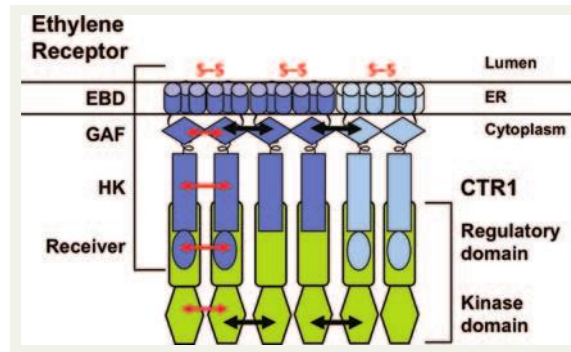
**Figura II.18.** Un modelo de señalización de la respuesta a etileno en *Arabidopsis*. Los pasos iniciales en la vía de señalización de etileno se producen en la membrana del RE e implican receptores de etileno (ETR1; Chang *et al.*, 1993) que interactúan con la proteína serina/treonina quinasa CTR1 (Kieber *et al.*, 1993) y la N-rampa homóloga EIN2 (Alonso *et al.*, 1999). *Izquierda:* el dominio regulador N-terminal de las proteínas quinasa CTR1 asociadas con el receptor de etileno histidina-quinasa (HK) y dominios del receptor (R). En la ausencia de etileno, los receptores de etileno activan el dominio CTR1 quinasa (KD) por un mecanismo desconocido. Una vez activa, CTR1 de alguna manera reprime a EIN2. *Derecha:* la unión del etileno apaga la señalización del receptor, de tal manera que el dominio quinasa CTR1 ya no está activo, lo que permite el funcionamiento de señalización de EIN2. Es posible que la dimerización/monomerización de CTR1 podría desempeñar un papel en la activación/inactivación del CTR1-KD, respectivamente (Ju y Chang, 2012).

*CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE (CTR1, Triple respuesta constitutiva)* es un importante regulador negativo de la señalización de etileno que se identificó por primera vez por el aislamiento de un mutante con respuesta constitutiva a de etileno en *Arabidopsis*. En la ausencia de etileno, los mutantes *CTR1* exhiben los mismos fenotipos que plantas silvestres de *Arabidopsis* tratadas con etileno. *Arabidopsis* sólo tiene un gen *CTR1* en la señalización de etileno, en tanto que en el tomate (*Solanum lycopersicum*), tres homólogos *CTR1* están involucrados en la señalización de etileno y muestran patrones de expresión génica diferencial que pudieran reflejar funciones específicas (Zhong y Chang, 2012). *CTR1* codifica una proteína

serina/treonina (Ser/Thr) quinasa tipo Raf con un dominio regulador N-terminal y un dominio C-terminal quinasa. CTR1 actúa corriente abajo de los receptores de etileno (Clark *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 2003; Zhong *et al.*, 2008) y corriente arriba de EIN2 (Alonso *et al.*, 1999). Cuando los receptores perciben etileno, la actividad quinasa CTR1 se apaga, lo que conduce a las respuestas a etileno (Kieber *et al.*, 1993). CTR1 se ha demostrado asociarse físicamente con los receptores de etileno en la membrana del retículo endoplásmico, pero los mecanismos bioquímicos de la regulación CTR1 son poco claro en este punto. El sustrato corriente abajo (s) de CTR1 son desconocidos también. CTR1 tiene la más alta similitud de secuencia con las proteínas quinasas Raf, por lo que se han asumido las funciones de CTR1 según un modelo de una proteína quinasa (MAPK) activada por mitógeno en cascada (Kieber *et al.*, 1993). La existencia de una cascada de MAPK en la señalización de etileno ha sido controvertida; sin embargo, se especulan similitudes funcionales entre CTR1 y las MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKKs) (Ecker, 2004; Hahn y Harter, 2009; Zhao y Guo, 2011).

La **Figura II.19.** muestra un modelo del complejo heteromérico CTR1 activo en la membrana del retículo endoplasmático (RE) (Ju y Chang, 2012). Los receptores de etileno están acoplados a la membrana del RE (Chen *et al.*, 2002, 2007; Dong *et al.*, 2008; Grefen *et al.*, 2008; Ju y Chang, 2012) mediante el dominio de unión N-terminal- Etileno (EBD). Los receptores de etileno representativos de la subfamilia I y la subfamilia II son homodímeros (Schaller y Bleecker 1995; Gao *et al.*, 2008), cada uno estabilizado por un par de enlaces disulfuro intermoleculares N-terminales (S-S) en la zona del receptor que se asoma al lumen del retículo endoplasmático (Schaller *et al.*, 1995), así como posibles interacciones no covalentes (flechas rojas, que se muestran sólo en el homodímero a la izquierda) entre los dominios de los dos componentes de histidina quinasa (HK), dominios de receptor y dominios GAF. Los homodímeros del receptor forman un complejo de orden superior con los receptores dímeros vecinos, mediada en parte por el dominio GAF (fosfodiesterasas cGMP-específicas, adenylciclasas, activador transcripcional formato hidrógeno liasa) (flechas negras) (Schaller *et al.*, 1995; Hall *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2008; Grefen *et al.*, 2008). El dominio regulador N-terminal de la proteína quinasa CTR1 (verde) se asocia físicamente con los dominios HK y los dominios de detección de los receptores (Clark *et al.*, 1998; Cancel y Larsen 2002; Gao *et al.*, 2003; Zhong *et al.*, 2008.). Ju y Chang, (2012) especulan que es posible que cada dominio HK del receptor se asocie con una molécula de CTR1. El dominio quinasa de CTR1 se cree que es activo cuando está en su forma dimerizada (Mayerhofer *et al.*, 2012). Los receptores también han sido encontrados en complejos de alta masa molecular que contienen proteínas no identificadas (Chen *et al.*, 2010) (no se muestra en la figura). Este tipo de complejos del

receptor de etileno de orden superior pueden servir para amplificar la señal del mismo (Ju y Chang, 2012).



**Figura II.19.** Modelo del complejo heteromérico CTR1- receptor de etileno activo en la membrana del RE. Receptores de etileno representativos de subfamilia I (en azul oscuro) y la subfamilia II (en azul claro) (Schaller y Bleecker 1995; Gao *et al.*, 2008; Ju y Chang, 2012).

El próximo componente caracterizado corriente abajo de CTR1 es la proteína EIN2, un regulador central de las respuestas de etileno, cuya pérdida de función confiere completa insensibilidad a etileno (Alonso *et al.*, 1999.). Al igual que los receptores de etileno, EIN2 reside en la membrana del RE (Bisson *et al.*, 2009). El extremo N-terminal de EIN2, que consiste en 12 hélices transmembranales putativas, tiene similitud con los transportadores N-rampa de iones metálicos. Tanto la relación de EIN2 con el transporte de metales y su relación con la señalización de etileno son desconocidos. El dominio C-terminal de EIN2 es predominantemente hidrófilo y se predice ser citosólico (Alonso *et al.*, 1999). Aunque EIN2 juega un papel indispensable en la respuesta de etileno, no se sabe cómo EIN2 se activa a nivel bioquímico, ni cómo EIN2 transmite la señal de etileno a los otros componentes de la ruta ubicados corriente abajo. Los niveles de EIN2 se controlan en respuesta a la presencia de etileno. En ausencia de etileno, dos proteínas F-box (ETP 1/2) marcan a la proteína EIN2 para la degradación por el proteasoma 26S. Dicha degradación es inhibida en presencia de etileno, lo que resulta en la acumulación de EIN2 (Qiao *et al.*, 2009). Curiosamente, EIN2 se ha encontrado que interactúa con los cinco receptores de etileno encontrados en *Arabidopsis* (Bisson y Groth, 2010), sugiriendo la posibilidad de que los receptores de etileno juegan un papel en la regulación de la actividad EIN2. En ensayos de asociación *in vitro* de EIN2 con el receptor ETR1 se ha observado que dicha interacción es potenciada cuando se interrumpe la actividad histidina quinasa de ETR1 (Bisson y Groth, 2010).

Las funciones bioquímicas de EIN2 aún no se han determinado, pero corriente abajo de EIN2 tiene lugar la activación de los factores de transcripción nucleares EIN3/EIL1 y ERF1, que inducen la expresión genética de la respuesta a etileno (Chao *et al.*, 1997). Tanto EIN3 y EIN3-like1 son degradados por el proteasoma 26S en ausencia de etileno (Guo y Ecker, 2003; Potuschak *et al.*, 2003; Gagne *et al.*, 2004; An *et al.*, 2010). EIN3 activa directamente la expresión del factor de transcripción ERF1, que a su vez activa la expresión de otros genes de respuesta a etileno (Solano *et al.*, 1998). EIN3 y EIL1 se unen a los EREBP (de las siglas de su nombre en inglés 'Ethylene Response Element Binding proteins'), y esa unión posibilita la adhesión 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, por lo que es probable que necesite de la unión de algún factor de transcripción regulado por JA para su transcripción (Solano *et al.*, 1998; Turner *et al.*, 2002). Muchas proteínas EREBP regulan la expresión de genes a través de la interacción con la caja-GCC, que se encuentra en el promotor de numerosos genes de respuesta a etileno como el ERF1 (Ohme-Takagi y Shinshi, 1995). ERF1 activa el receptor de ETR1 por un mecanismo desconocido (Resnick *et al.* 2006, 2008).

Únicamente ETR1, y ninguno de los otros receptores, es dependiente de RTE1 (Resnick *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2008). La topología de RTE1 en la membrana es desconocido (**Figura II.18.**), identificado como el gen *Green-ripe* en tomate (Barry y Giovannoni, 2006), se ha propuesto estar involucrada en la promoción del plegamiento de ETR1 o la estabilización de la conformación activa de ETR1 (Resnick *et al.*, 2006, 2008). La pérdida de *rte1* resulta en un fenotipo similar al del mutante nulo *etr1* (Zhou *et al.*, 2007). *RTE1* codifica una nueva proteína de membrana que se colocaliza con ETR1 en el ER y en el aparato de Golgi (Dong *et al.*, 2008) y puede estar físicamente asociado con ETR1 (Dong *et al.*, 2010). El transportador de cobre ATPasa de tipo P, RAN1, proporciona el cofactor de cobre requerido para la unión de etileno (Rodríguez *et al.*, 1999), y es importante en la biogénesis de los receptores (Hirayama *et al.*, 1999; Woeste y Kieber, 2000; Binder *et al.*, 2010). *AtRAN1* ha sido encontrado en el aparato de Golgi (Dunkley *et al.*, 2006). Todos estos genes codifican proteínas efectoras necesarias para la ejecución de la gran variedad de respuestas a etileno.

Además de las proteínas descubiertas en *Arabidopsis*, se han encontrado análogos funcionales de varios de estos participantes en esta ruta de señalización en otras especies, como receptores de etileno en melón, mango, y tabaco (Gutierrez-Martínez *et al.*, 2001; Terajima *et al.*, 2001; Tejeda-Sartorius y Délano-Fier, 2006), o análogos de EIN3 en tabaco (Kosugi y Ohashi, 2000; Rieu *et al.*, 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, por ser caracterizado en el mutante insensible a etileno *Never ripens* (Wilkinson *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1996; Lashbrook *et al.*, 1998; Tieman y Klee, 1999; Klee y Tieman, 2002). Estructuralmente los receptores de etileno de tomate 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 LeETR3 (O'Malley *et al.*, 2005). El patrón de expresión de *LeETR1-5* se ha analizado durante el desarrollo de la planta y en los distintos tejidos (**Cuadro II.3.**) (Lashbrook *et al.*, 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).

La vida media del etileno una vez unido a sus receptores es de unas 12 h (Schaller y Bleecker, 1995), lo cual implica una activación a la respuesta a etileno de demasiado tiempo, por lo que la planta debe 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 observación de la inducción de etileno y posteriormente la de *LeETR4* durante la respuesta de hipersensibilidad del tomate frente a *Xanthomonas* (Ciardi *et al.*, 2001). Inhibiendo la síntesis de novo de *LeETR4* en el transgénico LeETR4-AS, y por tanto limitando la producción de nuevos receptores durante la respuesta a etileno, se ha observado que la respuesta a etileno es mayor y 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 otro receptor, concretamente *LeETR4*. Así, los niveles de expresión de *LeETR4* aumentan hasta compensar la ausencia de LeETR3 (Tieman *et al.*, 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. Además de los receptores, también en tomate se han encontrado otros

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

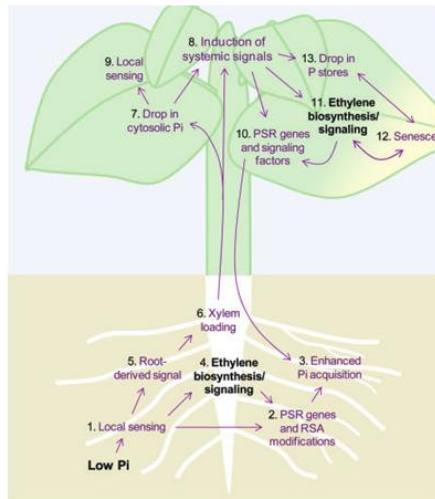
#### **II.4.6.3. Interacción entre el fósforo y el Etileno**

La disponibilidad de fósforo (Pi) en la mayoría de los suelos es rara vez suficiente para el crecimiento óptimo de las plantas. Por lo tanto, las plantas han desarrollado adaptaciones moleculares, fisiológicas y morfológicas para incrementar la tolerancia a la limitación de Pi en el suelo. Estas adaptaciones a la deficiencia de Pi se modulan a través de las vías de señalización, tanto locales como sistémicas (Liu *et al.*, 1998a; Burleigh y Harrison, 1999; Linkohr *et al.*, 2002; Franco-Zorrilla *et al.*, 2005; Sánchez-Calderón *et al.*, 2006; Thibaud *et al.*, 2010). Así, la detección local de baja concentración de Pi en el suelo activa un proceso de cambios morfológicos en la raíz. Estas alteraciones en la raíz involucran el cese del crecimiento radicular primario y el aumento de la proliferación de pelos radiculares y raíces laterales (Vance *et al.*, 2003; Lynch 2011; Peret *et al.*, 2011). La transducción de señal de una concentración de Pi baja se inicia en la raíz y va hasta los brotes vía señalización sistémica, con múltiples factores involucrados (por ejemplo, factores de transcripción y microRNAs) para controlar la expresión de los diversos genes implicados en la respuesta a la deficiencia de Pi (genes *PSR*, *Phosphate Starvation Responses*; Yang y Finnegan 2010; Chiou y Lin, 2011). La mayor parte de estos genes *PSR* facilitan la adquisición, la movilización y redistribución de Pi (Thibaud *et al.*, 2010).

Los cambios fundamentales iniciados como resultado de la detección de baja disponibilidad de Pi activan una red de interacciones complejas que relacionan el factor la disponibilidad de Pi, con flujos de fitohormonas y la señalización de azúcares, así como la disponibilidad de otros nutrientes (Franco-Zorrilla *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005; Jain *et al.*, 2007; Karthikeyan *et al.*, 2007; Svistoonoff *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2008; Jain *et al.*, 2009). Las



fitohormonas, tales como las auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico, estrigolactonas y etileno, han sido implicadas en la modulación de la arquitectura del sistema de la raíz en respuesta a cambios en la disponibilidad de fósforo en el suelo (Chiou y Lin, 2011). En particular, las auxinas y el etileno juegan un papel bien estudiado en la modulación de los cambios de la arquitectura del sistema radicular durante la deficiencia de Pi. Las auxinas parecen favorecer la formación de raíces laterales (López-Bucio *et al.*, 2002; Pérez-Torres *et al.*, 2008), mientras que el etileno regula el crecimiento de los pelos radiculares y la elongación de las raíces (Borch *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2003). Basado en lo anterior, se ha propuesto un modelo en el que el etileno juega un papel importante en la modulación de las respuestas locales y sistémicas en condiciones de baja disponibilidad de Pi (**Figura II.20**) (Nagarajan y Smith, 2012). Cuando la baja disponibilidad de Pi es detectada localmente, probablemente tanto extracelularmente, a nivel de las membranas plasmáticas de las células de la raíz, como intracelularmente, la absorción de Pi se ve incrementada. Esto ocurre porque la detección de bajos niveles de fósforo deriva en cambios en la expresión genética de los genes que regulan la respuesta a la deficiencia de fósforo (PSR) y en modificaciones en la arquitectura del sistema radicular, que ayuda en la mejora de la adquisición de Pi (Thibaud *et al.*, 2010; Chiou y Lin, 2011). Estas respuestas son moduladas, en parte, por un aumento de la biosíntesis de etileno y su capacidad de respuesta (Thibaud *et al.*, 2010). La señal de Pi bajo derivada de la raíz debe ser enviada a través del xilema y se transporta hacia la parte aérea de la planta. Esta señal, o una disminución de la concentración de Pi, puede llevar a una caída en los niveles citosólicos de Pi en la parte aérea, lo que provoca la liberación de factores locales de señalización en la parte aérea (Bustos *et al.*, 2010; Thibaud *et al.*, 2010; Rouached *et al.*, 2011). Además, estas señales inducen la señalización de factores sistémicos tales como PHR1 para favorecer la expresión de diversos genes PSR corriente abajo (Vance, 2010; Chiou y Lin 2011; Nagarajan y Smith, 2012).



**Figura II.20.** La señalización del etileno integrada a la red de respuestas de la planta en condiciones de baja disponibilidad de Pi (Nagarajan y Smith, 2012).

La expresión de algunos genes *PSR* está regulada, en parte, a través de cambios en la biosíntesis de etileno y la capacidad de respuesta (Bustos *et al.*, 2010). La iniciación de las señales sistémicas también conduce a una caída en los almacenamientos de Pi en las hojas. Las fluctuaciones en la señalización de etileno y el contenido de fósforo en la parte aérea están interconectadas con la señalización programada de la senescencia (Nagarajan y Smith, 2012). Este mecanismo activado como consecuencia de la regulación de una serie de respuestas en la parte aérea, origina una serie de factores de señalización sistémicos, incluidos los microRNAs (por ejemplo, miR399), que se transportan desde la parte aérea hasta la raíz a través del floema para modular la expresión de *PSR* en la raíz, muchos de los cuales actúan para favorecer la adquisición de Pi (**Figura II.20**) (Fujii *et al.*, 2005; Aung *et al.*, 2006; Bari *et al.*, 2006; Chiou *et al.*, 2006; Nagarajan y Smith, 2012).

Gran parte de los genes *PSR* regulados localmente incluyen los relacionados con las respuestas al estrés y el metabolismo hormonal, incluyendo la biosíntesis de etileno. La regulación de estos genes *PSR* parece estar estrechamente ligada a cambios en el desarrollo de la raíz (Thibaud *et al.*, 2010), que incluyen aumentos en la densidad y longitud de los pelos radiculares (Bates y Lynch, 1996; Ma *et al.*, 2001), reducción de la actividad meristemática de la raíz primaria (Ticconi *et al.*, 2004; Sánchez-Calderón *et al.*, 2005; Svistoonoff *et al.*, 2007; Ticconi *et al.*, 2009) y aumento de la proliferación de raíces laterales en las regiones de alta disponibilidad de fósforo (Linkohr *et al.*, 2002; López-Bucio *et al.*, 2002; Reymond *et al.*, 2006). El etileno aumenta la densidad de los pelos de la raíz por el acortamiento de las células del tricoblasto para aumentar el número de células H por unidad de longitud, una adaptación que puede implicar también a las auxinas (Zhang *et al.*, 2003). Aunque el desarrollo de pelos

radicales adicionales en respuesta a la deficiencia de Pi no parece requerir de todo el mecanismo de señalización de etileno, una señal de baja disponibilidad de Pi puede activar directamente los genes primarios de respuesta a etileno implicados en la diferenciación de células epidérmicas (Schmidt y Schikora, 2001). López-Bucio *et al.*, (2002) encontraron que en un número de mutantes de *Arabidopsis* insensibles a etileno tuvieron mayor cantidad de raíces laterales respecto a sus respectivas silvestres durante la deficiencia de Pi, si bien el papel de etileno en la iniciación de raíces laterales no está claro. Recientemente se ha demostrado que la sobreexpresión constitutiva del transportador *Pht1; 5* en *Arabidopsis* dio lugar a un fenotipo de raíz primaria más corta y aumento de la proliferación de pelos radiculares en condiciones de suficiencia de Pi (Nagarajan *et al.*, 2011). Curiosamente, tanto los tratamientos con inhibidores de la biosíntesis de etileno (AVG) como de la percepción ( $Ag^+$ ) revirtieron estos fenotipos, lo que sugiere modulación de señalización de etileno en estos genotipos (Nagarajan *et al.*, 2011). Recientemente, Lei *et al.*, (2011) aislaron un mutante hipersensible a la baja disponibilidad de Pi en *Arabidopsis*, *HPS2* (*hypersensitive to Pi starvation 2*), que resultó ser un nuevo alelo mutante de *CTR1* (*CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1*), un regulador negativo clave de la señalización de etileno (Kieber *et al.*, 1993). Los análisis mediante qRT-PCR revelaron que los niveles de transcripción de *Pht1; 1* y *Pht1; 4*, fueron elevados en *HPS2* tanto en condiciones de baja y alta disponibilidad de Pi en comparación con el tipo silvestre (Lei *et al.*, 2011). Además, la expresión de *Pht1; 1* y *Pht1; 4* disminuyó en el mutante insensible a etileno, *EIN2-5*, en condiciones de bajo Pi (Lei *et al.*, 2011). El tratamiento con el precursor de etileno ACC favoreció la expresión de *Pht1; 4*, mientras que la adición de  $Ag^+$  reprimió la expresión de *Pht1; 4*. En particular, una concentración más baja de ACC fue capaz de provocar una respuesta en condiciones de baja disponibilidad de Pi, lo que indica mayor capacidad de respuesta de etileno durante la deficiencia de Pi. En un estudio reciente utilizando *Medicago falcata*, la aplicación del precursor de la biosíntesis de etileno ACC favoreció la expresión de dos genes *Pht1*, *MfPT1* y *MfPT5*, en condiciones de suficiencia de Pi, mientras que el AVG y cationes  $Co^{2+}$ , dos inhibidores de la síntesis de etileno, bloquearon la expresión de estos genes en condiciones de baja disponibilidad de Pi (Lei *et al.*, 2011; Nagarajan y Smith, 2012). En conjunto, estos estudios indican que el etileno está implicado en la regulación de la expresión de transportadores de Pi de alta afinidad. Aunado a lo anterior, la observación de que la sobreexpresión de *Pht1;5* disminuye la acumulación de Pi en los brotes y la aumenta en las raíces en relación con el silvestre puede indicar que una interrupción de la relación Pi-raíz provoca alteraciones en la biosíntesis de etileno y/o de señalización.

#### II.4.6.4. El etileno en la simbiosis micorriza arbuscular

El etileno, una fitohormona gaseosa, es conocido por su participación en procesos de crecimiento y senescencia, o maduración de frutos, y también como mediador de resistencia a enfermedades de las plantas (von Dahl *et al.*, 2007). Se han determinado incrementos en la producción de etileno en algunas plantas durante la infección con patógenos (Cristescu *et al.*, 2002), aunque su implicación real se ha determinado en gran parte con el uso de plantas mutantes en la percepción o biosíntesis. 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 *et al.*, 1999; Asai *et al.*, 2000; Greenberg *et al.*, 2000), mientras que en otros, la insensibilidad a etileno provoca un aumento de sensibilidad al patógeno (Hoffman *et al.*, 1999).

Existen datos un tanto contradictorios sobre la participación del etileno en la simbiosis MA (Guinel y Geil, 2002), si bien fundamentalmente se han puesto de manifiesto efectos relacionados con la inhibición de la formación de MA. Aplicaciones exógenas de etileno producen una reducción del desarrollo de la micorrización (Azcón-Aguilar *et al.*, 1981; Morandi, 1989), sin embargo, su efecto parece depender de la dosis aplicada. Así, Ishii *et al.*, 1996 comprobaron que dosis bajas promueven la germinación de las esporas, mientras que concentraciones altas dan lugar a una inhibición del crecimiento de las hifas. En este sentido, todos los estudios realizados sobre la participación del etileno en la regulación de la micorrización estaban basados en la aplicación exógena o en la medida de su concentración en raíz, y quizás por ello los resultados obtenidos a veces resultan contradictorios. No obstante, la posibilidad de utilización de mutantes y plantas transgénicas alteradas en los procesos de síntesis y respuesta a etileno abre una vía de experimentación que posibilita determinar con mayor exactitud las consecuencias de la alteración a nivel genético de la ruta de síntesis y/o señalización de etileno sobre el proceso de micorrización. Zsogön *et al.*, (2008) utilizaron el mutante sobreproductor de etileno *epinastic*, y el mutante insensible a etileno *Never ripe* de tomate para analizar la interacción del etileno y la simbiosis AM. Los resultados muestran que paradójicamente en ambos mutantes se inhibió la formación de la MA. En otro estudio con el guisante *Pisum sativum* var. Sparkle y el mutante E107, con alteraciones en genes simbióticos y respuesta a etileno, se observó que los mutantes mostraban mayor nivel de etileno en raíz y tenían reducida la intensidad de la colonización en las raíces micorrizadas (Morales-Vela *et al.*, 2007).

Martín-Rodríguez *et al.*, (2010) investigaron la relación entre el ácido abscísico (ABA) y etileno en la regulación de la formación de la simbiosis micorriza arbuscular en plantas de tomate (*Solanun lycopersicum*) y trataron de definir las funciones específicas desempeñadas por cada una de estas fitohormonas en el proceso de micorrización. La aplicación de AVG (clorhidrato de aminoetoxyvinilglicina), inhibidor de la biosíntesis de etileno, aplicado solo o en combinación con ABA, redujo la producción de etileno en las plantas mutantes *sitiens* (mutantes deficientes en la biosíntesis de ABA), mientras que la aplicación de solo ABA no fue lo suficientemente eficaz en la disminución significativa de la cantidad de etileno en plantas *sitiens*. Curiosamente, cuando el ABA se aplica exógenamente a plantas *sitiens*, se observó una completa recuperación de la abundancia arbuscular, mientras que la aplicación de AVG produjo una recuperación total en la intensidad de micorrización. Ellos sugieren un doble mecanismo dependiente e independiente de etileno asociado con la regulación de ABA en la formación de MA. Por otro lado, Khatabi *et al.*, (2012) demostraron que el etileno favorece la colonización de las raíces de la cebada y de *Arabidopsis* por *Piriformospora indica*, un hongo mutualista de plantas.

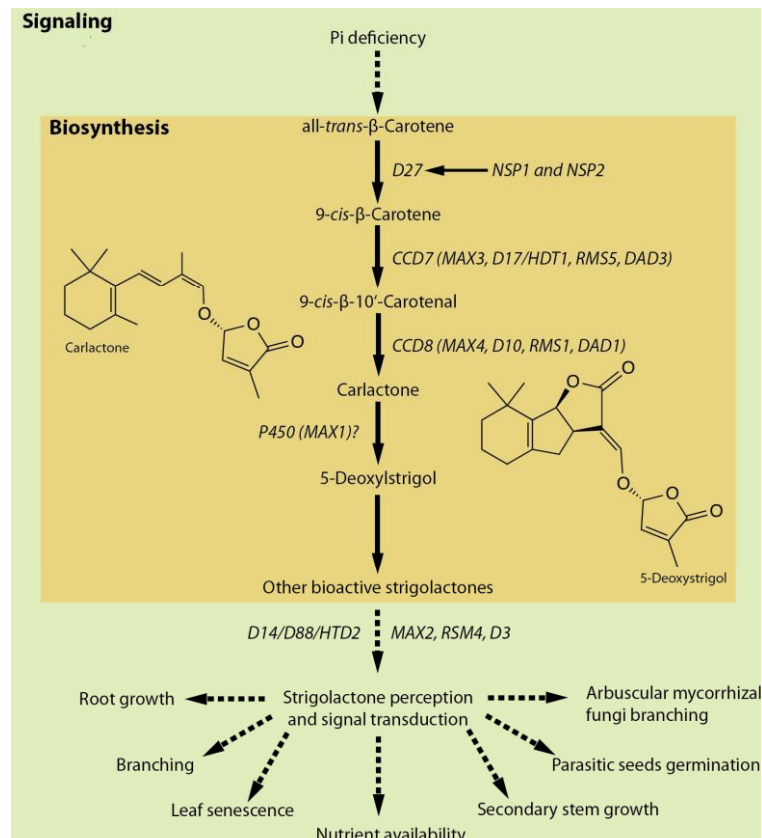
#### **II.4.7. Las estrigolactonas y su interacción con el etileno y el fósforo**

Diversas señales moleculares se intercambian entre los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y sus plantas huésped durante la etapa pre-simbiótica, y ayudan al reconocimiento mutuo, antes de cualquier contacto entre los dos simbioses (Akiyama *et al.*, 2005). En particular, los exudados de las raíces de las plantas hospedadoras activan el desarrollo de hongos y su metabolismo para favorecer que las hifas fúngicas alcancen una raíz susceptible para el establecimiento de la simbiosis (Xie *et al.*, 2010). En este sentido, las estrigolactonas (SLs), un grupo de metabolitos derivado del metabolismo de terpenos y exudados por las raíces de las plantas, son los principales contribuyentes a este efecto. Su importancia en el desarrollo normal de las MA se ha establecido mediante el análisis de la micorrización en mutantes deficientes en estrigolactonas, identificándolas como estimulantes de la ramificación de las hifas y de la colonización de la raíz (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008). Curiosamente, las estrigolactonas se conocían anteriormente como estimulantes de germinación de plantas parásitas de la familia Orobanchaceae, incluyendo *Striga* spp., *Orobanche*, *Phelipanche* spp. y *Alectra* spp., (Cook *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 2010). Además, recientemente se ha propuesto que las estrigolactonas o compuestos relacionados son nuevas

hormonas que regulan la ramificación de la parte aérea de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Koltai y Kapulnik, 2010; Xie *et al.*, 2010). Estudios recientes demuestran que las SLs también pueden estar implicadas en los otros procesos de crecimiento y desarrollo, como el crecimiento primario de la raíz, la formación de raíces laterales, la formación de raíces adventicias, el desarrollo de los pelos de la raíz, la germinación de las semillas, la fotomorfogénesis, la respuesta al estrés, la nodulación o la ramificación del protonema de musgos (Koltai *et al.*, 2010; Kapulnik *et al.*, 2011; Ruyter-Spira *et al.*, 2011; Koltai, 2011). Las SLs se sintetizan principalmente en las raíces, y posteriormente son transportadas a través del xilema hacia la parte aérea (Kohlen *et al.*, 2011), donde controlan la ramificación inhibiendo el desarrollo de yemas laterales (Dun *et al.*, 2009).

Se conocen más de 15 SLs de origen natural aisladas de los exudados de las raíces de varias especies de plantas. Todas las moléculas de SLs activas identificadas presentan un sistema de anillos tricíclicos (anillo ABC) vinculado a un anillo butenólido (anillo D) a través de un enlace éter-enol (Xie *et al.*, 2010).

Se han identificado mutantes con deficiencia en su respuesta a SLs en varias especies de plantas, incluyendo *Arabidopsis thaliana* (Stirnberg *et al.*, 2002), *Pisum sativum* (Beveridge *et al.*, 1996), *Oriza sativa* (Ishikawa *et al.*, 2005) y *Solanum lycopersicum* (Vogel *et al.*, 2010), lo que ha facilitado la identificación de diversos genes relacionados con la biosíntesis y señalización. **En la Figura II.21** se describen brevemente los componentes clave que participan en la biosíntesis de las SLs y su señalización.



**Figura II.21.** Ruta biosintética y vías de señalización de las estrigolactonas. La biosíntesis implica dos dioxygenasas que escinden los carotenoides, CCD7 (MAX3, RMS5, D17/HTD1, DAD3) y CCD8 (MAX4, RMS1, D10, DAD1), una monooxigenasa citocromo P450 (MAX1) y una nueva proteína que contiene hierro (D27) (Alder *et al.*, 2012; Beveridge y Kyojuka, 2010; Booker *et al.*, 2004; Sorefan *et al.*, 2003; Booker *et al.*, 2005; Snowden *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2009; Waters *et al.*, 2012). En *Medicago*, la biosíntesis de SLs requiere también factores de transcripción de tipo GRAS, NODULATION SIGNALING PATHWAY1 (NSP1) y NSP2 (Lin *et al.*, 2009). La señalización implica a MAX2/RMS4/D3 (Stirnberg *et al.*, 2002), una proteína F-box rica en leucina y DWARF14 (D14)/ DAD2/D88/HTD2 (Arite *et al.*, 2009; Waters *et al.*, 2012; Hamiaux *et al.*, 2012), un miembro de la superfamilia  $\alpha/\beta$ -hidrolasa.

La exudación y el transporte de SLs requiere de una proteína denominada PhPDR1, un transportador tipo ABC (cassete de unión a ATP) que se ha identificado recientemente como un exportador celular de SLs en *Petunia hybrida*. PhPDR1 está localizada predominantemente en la membrana plasmática de las células sub-epidérmicas individuales de las raíces laterales (Kretschmar *et al.*, 2012). Los mutantes PDR1 son defectuosos en la exudación de SLs en las raíces, además muestran una reducción en la colonización por hongos MA. Kretschmar *et al.*, (2012) reportan que la expresión de *PhPDR1* en las raíces fue inducida por la deficiencia de fósforo, la colonización MA y el tratamiento con GR24, una estrigolactona sintética. La sobreexpresión de *PhPDR1* en *Arabidopsis* resultó en un aumento de la tolerancia a altas concentraciones de GR24, en consonancia con un aumento de la exportación de SLs de las raíces. Curiosamente, el homólogo más cercano de PhPDR1 en *Arabidopsis* es ABCG40 que transporta el ácido abscísico (Kang *et al.*, 2010), una hormona vegetal que también se deriva

de carotenoides. Los análisis de microarrays ponen de manifiesto cambios transcripcionales asociados con el suministro elevado de Pi en *Petunia*, mostrando que los genes que codifican las enzimas implicadas en la biosíntesis de carotenoides y apocarotenoides fueron inhibidos y que la expresión del gen *DAD1* que codifica para la enzima CCD8, que participa en la biosíntesis de SLs, fue suprimida (Breuillin *et al.*, 2010; Kretschmar *et al.*, 2012; Czarnecki *et al.*, 2013).

Bajo condiciones de deficiencia de Pi, las plantas necesitan reducir al mínimo la producción de nuevas ramas de la parte aérea y dirigir los limitados recursos de Pi hacia los brotes ya existentes, al mismo tiempo que deben maximizar la adquisición de Pi del suelo. En este contexto, la deficiencia de Pi estimula la biosíntesis de SLs en las raíces y su exudación al suelo (Czarnecki *et al.*, 2013). Una alta concentración de SLs a nivel local de la raíz actúa modificando el sistema de raíces para aumentar la cobertura de la raíz, lo que proporciona una mayor superficie para explorar más volumen de suelo y permitir mayores captaciones de Pi. Las SLs también se transportan a través del xilema para suprimir la ramificación de la parte aérea (Kohlen *et al.*, 2011), una estrategia para reducir el consumo de Pi por la planta. La exudación de SLs al suelo sirve como señal rizosférica para favorecer la interacción simbiótica entre las plantas hospederas y hongos micorrízicos arbusculares, un medio para aumentar la adquisición de Pi (Czarnecki *et al.*, 2013).

En relación con la simbiosis micorrízica arbuscular, se han realizado experimentos en los cuales las hifas de germinación de esporas de hongos MA tratadas con exudados de las raíces de las plantas cultivadas bajo condiciones de baja disponibilidad de Pi sufren una mayor actividad de ramificación de las hifas de esporas tratadas con exudados de plantas en suficiencia de Pi (Nagahashi y Douds, 2000). Por otra parte, el aumento de los niveles de Pi del suelo resultaron en una disminución de la colonización de las raíces por los hongos MA (Smith y Read, 2008). Por tanto, existe una relación directa entre disponibilidad de Pi, exudación de SLs por la raíz y efectos presimbióticos sobre hongos MA (Czarnecki *et al.*, 2013). Las SLs de los exudados de las raíces son percibidos por los hongos MA e inducen la ramificación de las hifas, un paso necesario para establecer simbiosis micorriza (Akiyama *et al.*, 2005). La simbiosis micorrízica arbuscular es una asociación que ayuda a las plantas a adquirir el Pi del suelo, por tanto, la exudación de niveles más altos de SLs en condiciones de baja disponibilidad de Pi es una estrategia beneficiosa para la adaptación de las plantas a condiciones de deficiencia de Pi y su supervivencia (Yoneyama *et al.*, 2007). Poco se sabe acerca de cómo son percibidas las SLs por los hongos MA, pero si se sabe que su percepción implica la activación de la actividad mitocondrial de hongos (Besserer *et al.*, 2006). Se demostró que las SLs estimulan la



proliferación de células del hongo MA *Gigaspora*, aumentan la densidad y el movimiento de la mitocondria (Besserer *et al.*, 2006) y rápidamente activan el metabolismo oxidativo (Besserer *et al.*, 2008).

Diversas hormonas vegetales son reguladores del desarrollo de las raíces (Osmont *et al.*, 2007), además de regular las respuestas de las plantas a las condiciones nutricionales, incluyendo la deficiencia de Pi (López-Bucio *et al.*, 2002; Chiou y Lin, 2011). Por lo tanto, es probable que las SLs ejerzan su función a través de una red cuidadosamente controlada de interacción con otras hormonas vegetales. Así, se ha demostrado que el transporte polar de auxinas es modulado por las SLs durante el control del desarrollo de la parte aérea. En este sentido, las SLs reducen el transporte basipétalo de auxinas y en presencia de las auxinas, las SLs aumentan la competencia entre dos brotes en ramificación en una misma rama de la planta. Se considera que las SLs aumentan la competencia entre los brotes al reducir la capacidad de la parte aérea en el transporte polar de auxinas (Crawford *et al.*, 2010). La aplicación exógena de SLs en *Arabidopsis* fue capaz de reducir la ramificación de la parte aérea en mutantes en la respuesta a auxinas. Por otra parte, se ha demostrado que las auxinas incrementan la síntesis de SLs en la raíz a través de la inducción de la expresión de *CCD7* y *CCD8*, lo que indica un bucle de retroalimentación entre la auxina y SLs (Beveridge y Kyoizuka, 2010). El conocimiento de que las auxinas están ubicadas corriente abajo en la vía de transducción de la señalización de las SLs proviene de diversos estudios en plantas mutantes en la respuesta hormonal en las raíces. La señalización de SLs se demostró no ser necesaria para el alargamiento de los pelos radiculares inducido por auxinas, ya que el mutante insensible a SLs, *max2*, era sensible a las auxinas. Sin embargo, en este mismo caso el mutante en el receptor de auxinas, *tir1-1* (Dharmasiri *et al.*, 2005), mostró una reducción en la sensibilidad a SLs respecto al silvestre, lo que indica que la señalización de auxinas es requerida en parte, al menos, en el desarrollo de los pelos radiculares en respuesta a SLs (López-Bucio *et al.*, 2003; Kapulnik *et al.*, 2011).

Por otro lado, el desarrollo de las raíces, incluyendo un efecto positivo en elongación de los pelos radiculares y un efecto negativo en la formación de las raíces laterales, se ha demostrado estar regulada por la fitohormona etileno (López-Bucio *et al.*, 2002). Por consiguiente, la participación de la señalización de etileno en la respuesta a SLs se ha sugerido en condiciones de crecimiento con insuficiencia de Pi. Esta sugerencia se basa en varias evidencias: una respuesta de SLs marcadamente reducida en los mutantes de señalización de etileno *etr* y *ein*, el efecto negativo de la aminoetoxivinilglicina (AVG, un inhibidor de la síntesis

de etileno) en la respuesta de los pelos radiculares a las SLs, y la capacidad de las SLs para inducir la transcripción de las ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasas (ACC), que participan en la biosíntesis de etileno (Kapulnik *et al.*, 2011). Además, se ha identificado que las SLs inducen la biosíntesis de etileno en las semillas de la planta parásita *Striga*, lo que favorece su germinación (Sugimoto *et al.*, 2003). En otros estudios, se encontró que la baja disponibilidad de Pi no actúa a través del etileno en la regulación del desarrollo de los pelos radiculares (Ma *et al.*, 2001), y se demostró que el etileno no media en la respuesta de las SLs bajo condiciones de baja disponibilidad de Pi, ya que el etileno no fue capaz de compensar la deficiencia en la respuesta de mutantes *max2* en condiciones de baja disponibilidad de Pi (Ma *et al.*, 2001). Por lo tanto, la respuesta en la densidad los pelos radiculares regulada vía MAX2 en condiciones de baja disponibilidad de Pi se sugiere estar corriente abajo o ser independiente de la vía de etileno (Mayzlish-Gati *et al.*, 2012) (**Figura II.22.**).

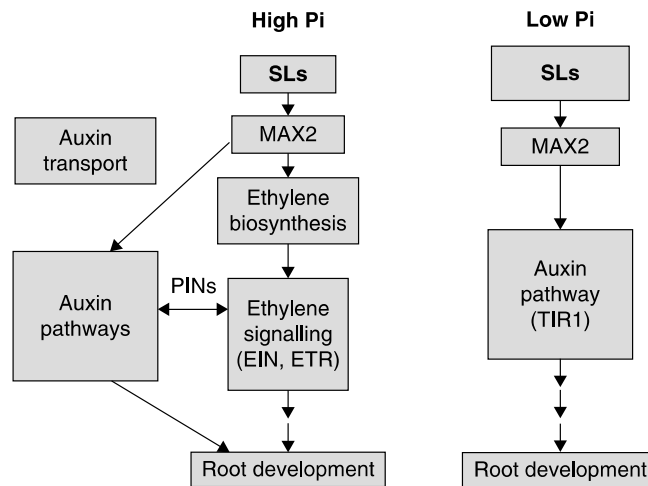
Por otra parte, en condiciones de deficiencia de Pi, la adición de ácido indol-3-acético (IAA) a las raíces de mutantes insensibles a SLs y de la biosíntesis de SLs condujeron a la complementación del fenotipo del mutante y fue similar al del silvestre, sugiriendo que las auxinas son parte de la ruta de respuesta de las SLs a condiciones de baja disponibilidad de fósforo. En tanto que el mutante *max2* también muestra una reducción de la transcripción de *TIR1* que no pudo ser restaurada por la aplicación de GR24 (Mayzlish-Gati *et al.*, 2012). Sin embargo, debido a los relativamente altos niveles de auxina en las mutantes *max2* (Bennett *et al.*, 2006), esta falta de inducción no está directamente asociado con la reducción de la actividad de la vía de auxinas. Por lo tanto, la deficiencia en la respuesta de *TIR1* en condiciones de baja disponibilidad de Pi se encuentra probablemente corriente abajo en la vía de señalización de SLs (Mayzlish-Gati *et al.*, 2012).

Tomados en conjunto, estos datos sugieren que diferentes vías hormonales relacionadas con las SLs se activan en diferentes condiciones de Pi. En condiciones de suficiencia de Pi, la vía de señalización de las SLs, a través de MAX2, podría activar la biosíntesis de etileno, así como la vía de auxinas para regular el desarrollo de la raíz (Koltai, 2011). En condiciones de baja disponibilidad de Pi, la vía de señalización de SLs, a través de MAX2, podría activar principalmente la vía de señalización de las auxinas, y por lo tanto regular el desarrollo de la raíz de tal manera que se adapta a las condiciones de crecimiento.

En consecuencia, las vías de señalización de las auxinas y el etileno se han sugerido ser diferencialmente activadas bajo diversas condiciones de disponibilidad de Pi para regular

diferentes aspectos de la respuesta de la raíz a estas condiciones. Es probable que la aclimatación del sistema de la raíz a la deficiencia de Pi se logra mediante la variación de la respuesta al etileno (Ma *et al.*, 2003). Las SLs pueden ser una de las señales de estrés a la baja disponibilidad de Pi, y la activación de su vía de señalización podría ser un componente importante de la respuesta de la raíz a las condiciones de crecimiento en condiciones de bajo fósforo, cuando actúa principalmente a través de vía de señalización de las auxinas y etileno (Figura II.22.).

No existe conocimiento documentado que relacione las vías de señalización del etileno, auxinas y SLs bajo diversas condiciones de alta disponibilidad de fósforo y el establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular.



**Figura II.22.** Ruta de señalización hormonal activada por las SLs en respuesta a diferentes condiciones de disponibilidad de fósforo. En condiciones de alta disponibilidad de Pi (High Pi), la vía de las SLs, a través de MAX2, se sugiere actuar principalmente a través de la vía de etileno (Kapulnik *et al.*, 2011). Esta respuesta se sugiere ser mediada por las proteínas EIN (insensible a etileno) y ETR (resistente a etileno) (Kapulnik *et al.*, 2011; Koltai, 2011). La síntesis de auxinas, el transporte (incluyendo la expresión de PIN) y la señalización se ven afectados positivamente por la señalización de etileno (Stepanova y Alonso, 2009). Además, las SLs se han sugerido que regulan el transporte de auxinas (Crawford *et al.*, 2010). Por lo tanto, la vía de la auxina puede ser activada ya sea por la vía de etileno o directamente por las SLs, para regular el desarrollo radicular en condiciones de crecimiento con suficiencia de Pi. Sin embargo, en condiciones de deficiencia de Pi (Low Pi), durante las primeras horas de desarrollo de las plántulas, la vía de SLs, a través de MAX2, se sugiere que activa principalmente la vía de señalización TIR1 dependiente de auxina (Mayzlish-Gati *et al.*, 2012), regulando de este modo el desarrollo de la raíz para adaptarse a las condiciones de crecimiento.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1. MATERIAL BIOLÓGICO

##### III.1.1 Variedades y Mutantes de Tomate

Para la determinación de la participación del etileno en el proceso de micorrización se usaron las líneas silvestres de tomate (*Solanum lycopersicum*) Ailsa Craig (cod. LA2838A del Tomato Genetics Resource Center, TGRC), VFN8 (cod. TGRC LA1022), Floradade (cod. TGRC LA3242) y UC82B (cod. LA1706 del TGRC).

En cuanto a las líneas mutantes, las variedades empleadas han sido:

**Rin:** *Ripening inhibitor*, es un mutante homocigoto recesivo derivado de la variedad silvestre Ailsa-Craig que presenta un fenotipo de maduración incompleta del fruto. Posee otros efectos pleiotrópicos negativos del proceso de maduración, como son la afectación negativa sobre la síntesis de licopeno (carotenoide rojo), y la falta de ablandamiento del fruto. Los homocigotos para este alelo producen frutos que permanecen firmes y verdes durante semanas, mientras que el tipo silvestre madura y es senescente (Herner y Sink, 1973). La expresión de ciertos genes necesarios para la maduración del fruto está reprimida en este mutante, lo que sugiere que su acción es necesaria para la regulación transcripcional de la expresión génica del proceso de maduración. De hecho se ha demostrado que el gen *Rin* codifica para un factor de transcripción tipo MADs box que controla el proceso de maduración del fruto (Ito, *et al.*, 2008).

**Epi:** *Epinastic* es mutante natural, homocigoto recesivo, de la variedad silvestre de tomate VFN8 (Ursin, 1987). Es un mutante natural de tomate que presenta de manera constitutiva la típica triple respuesta a etileno, incluso en ausencia de etileno. Es un mutante de sensibilidad incrementada a etileno que presenta un fenotipo característico con un fuerte crecimiento epinástico (curvatura) del peciolo, y acortamiento y engrosamiento del tallo de las plantas. Además produce varias veces más etileno que su variedad silvestre VFN8 (Wang y Ying, 2004), aunque no está afectado en la maduración del fruto y formación de semillas. El tratamiento con inhibidores de la síntesis y vía de acción del etileno no revierten el fenotipo del crecimiento vegetativo (Fujino, *et al.*, 1989) lo que sugiere que la mutación pueda ser el resultado de un bloqueo de la ruta de señalización y respuesta constitutiva del etileno.

**NRO:** Este mutante de la variedad silvestre Floradade sobre-expresa el gen *LeETR3* que codifica para el receptor NR. Por lo tanto, estas plantas muestran un descenso en su sensibilidad al etileno, y también en diversos procesos de su desarrollo como la elongación del hipocotilo, senescencia de la flor y maduración de frutos (Lanahan *et al.*, 1994; Ciardi *et al.*, 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, aunque presenta un fenotipo de sensibilidad incrementada al etileno (Kevany *et al.*, 2008).

**ACCD:** Línea transgénica de la variedad UC82B en la que se ha introducido la secuencia completa del gen que codifica para la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa (ACD) de *Pseudomonas*, cuya actividad rompe a la molécula precursora del etileno ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) impidiendo así la formación del etileno. La baja producción de etileno no afecta al crecimiento vegetativo de la planta, pero sí a ciertas funciones fisiológicas del etileno como la maduración del fruto y su senescencia (Klee *et al.*, 1991).

Las semillas de tomate variedad Floradade con sus respectivas líneas mutantes y transgénicas han sido cedidas por el Dr. Harry Klee (Horticultural Sciences, Universidad de Florida, Gainesville, USA).

### III.1.2 Inóculo fúngico

Para todos los experimentos se inoculó con una cepa de *Glomus intraradices* (DAOM 197198), reclasificado recientemente como *Rhizophagus irregularis* – syn. *Glomus irregulare* (Stockinger, *et al.*, 2009), perteneciente al grupo A de la familia *Glomeraceae*, y procedente de la colección de Glomales de la EEZ. El hongo se mantuvo en un sistema de cultivo monoxénico con raíces de zanahorias transformadas (medio de cultivo MM, **Cuadro III.1**) (Chabot, *et al.*, 1992). La aplicación del inóculo a las macetas se llevó a cabo colocando un trozo de aproximadamente 3 cm<sup>2</sup> de medio MM-agar, donde crecía el hongo junto a la raíz de zanahoria, en cada maceta que contenía la mezcla arena:suelo:vermiculita 3:2:1, procurando colocar dicho agar en contacto directo con las raíces de la plántula de tomate con el objeto de garantizar la germinación de las esporas cerca de la raíz y favorecer el crecimiento del micelio

fúngico hacia la misma. Este trozo de medio MM-agar contenía aproximadamente 50 esporas, micelio extraradical y trozos de raíz de zanahoria infectada por *R. irregularis*.

**Cuadro III.1 Composición de los medios de cultivo MM y MW**

Concentración	MM (g/l)	MW (g/l)	Soluciones 1000X (g/l)
<b>Macronutrientes</b>			
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.731	0.731	
KNO <sub>3</sub>	80·10 <sup>-3</sup>	80·10 <sup>-3</sup>	
KCl	65·10 <sup>-3</sup>	65·10 <sup>-3</sup>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.8·10 <sup>-3</sup>	-	
NaSO <sub>4</sub> ·anhidro	-	0.199	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	19·10 <sup>-3</sup>	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.288	0.288	
EDTA-NaFe	8·10 <sup>-3</sup>	8·10 <sup>-3</sup>	8
KI	0.75·10 <sup>-3</sup>	0.75·10 <sup>-3</sup>	0.75
<b>Microelementos</b>			
MnCl <sub>2</sub>	6·10 <sup>-3</sup>	6·10 <sup>-3</sup>	6
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.65·10 <sup>-3</sup>	2.65·10 <sup>-3</sup>	2.65
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.50·10 <sup>-3</sup>	1.50·10 <sup>-3</sup>	1.5

### III.2. CONDICIONES DE CULTIVO

#### III.2.1. Esterilización de semillas

Las semillas de tomate fueron esterilizadas en superficie, sumergiéndolas en una solución de NaOCl 10% durante 15 m, tras lo cual se realizaron dos lavados con agua estéril y se sumergieron en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 7% durante 15 m. Se enjuagaron nuevamente con agua y se mantuvieron en imbibición en agua estéril durante 1.5 h. Finalmente se incubaron en una placa petri estéril sobre papel filtro humedecido en condiciones asépticas durante 3 o 4 d a 28°C para facilitar su germinación. Con posterioridad se trasladaron a semillero con vermiculita estéril durante 7 u 8 d y se seleccionaron plántulas de igual tamaño para el trasplante a maceta.

#### III.2.2. Sistema de cultivo de las plantas

Las plántulas se cultivaron en macetas de 330 ml, conteniendo el inóculo fúngico y una mezcla de arena de cuarzo:suelo:vermiculita 3:2:1 (v:v:v) que fue previamente esterilizada en

autoclave durante 20 m a 120 °C. El suelo utilizado proveniente de la finca “Cortijo Peinado” perteneciente a la Diputación de Granada, y cuya composición química se detalla en la **Cuadro III.2.** se sometió al siguiente tratamiento: se tamizó en 2 pasos, con una malla de 1 cm de tamaño de poro para eliminar las partes más gruesas y después con otra de 4 mm, y a continuación se esterilizó mediante un sistema de tindalización bajo vapor fluente durante 3 días consecutivos, 1 hora a 100 °C cada 24 h, para eliminar todos los propágulos de microorganismos del suelo que pudieran interferir en los ensayos, pero sin degradar sus propiedades fisicoquímicas.

pH en agua	8.1
Proporción de materia orgánica	1.81%
Concentración de nutrientes (mg/kg)	
Fósforo (extraíble con NaHCO <sub>3</sub> )	6.2
Nitrógeno	2.5
Potasi	132
Textura del suelo	
Arena	35.8%
Limo	43.6%
Arcilla	20.5%

Para el abonado de las plantas se empleó un abono comercial de liberación lenta (Osmocote Exact Mini, longevidad 3-4 meses a 21 °C, temperatura media del suelo), usando 1 g/kg de mezcla suelo:arena:vermiculita (**Cuadro III.3**). La periodicidad del riego dependió de las necesidades hídricas de las plantas, empleando agua del grifo y aplicado por capilaridad para no afectar a las propiedades físico-químicas del suelo. Las plantas se cultivaron en invernadero en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad. Con periodo luz/oscuridad de 16/8 h, alternando la temperatura de 25°C/19 °C respectivamente. La humedad relativa fue del 50 % y la intensidad de la luz de 450µmol de fotones·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, con una longitud de onda de 400-700 nm. Las plantas se regaron aproximadamente unas tres veces por semana.



Cuadro III.3. Abono comercial Osmocote Exact Mini
16 % N total
8.4 % nitrógeno nítrico
7,6 % nitrógeno amoniacal
8 % Anhídrido fosfórico (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ), soluble en citrato neutro y 5.7 % soluble en agua
11 % Óxido de Magnesio (MgO), 1.4% soluble en agua
0.02 % B soluble en agua
0.05 % Cu, 0.038% soluble en agua
0.4 % Fe, 0.2% quelatado EDTA
0.06 % Mn
0.02 % Mo, 0.014 % soluble en agua
0.15 % Zn, 0.008 % soluble en agua

### III.2.3. Tratamientos químicos

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

- **Tratamientos con ethephon (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>ClO<sub>3</sub>P, ácido 2-cloroetilfosfónico o CEPA):** La dilución de ethephon (Sigma-Aldrich, CAS-16672-87-0) se preparó en agua destilada y posteriormente se llevó a pH 7 según las concentraciones en cada experimento. Este compuesto al encontrarse en un pH superior a 3.5 sufre una reacción fisicoquímica que libera etileno (León-Morcillo, *et al.*, 2012). Las aplicaciones de ethephon consistieron de 20 mL de la solución por maceta 2 veces por semana.
- **Tratamiento con fósforo.** Se prepararon soluciones de fosfato disódico (Sigma-Aldrich, CAS-10039-32-4) en agua destilada en dosis según el tratamiento en particular: 150 ppm (1.73 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O/kg de sustrato) y 300 ppm (3.46 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O/kg de sustrato). Se aplicaron 20 mL de cada dilución por maceta solo en una ocasión según el experimento en curso (Herrera-Medina, MJ, 2008, Tesis de doctorado).
- **Tratamientos con ácido α-amino-isobutírico (AIB):** El ácido α-amino-isobutírico (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>, sigma-Aldrich, CAS-62-57-7), es un análogo estructural del ACC que ha mostrado inhibir competitivamente la formación de etileno en plantas al inhibir a la ACC oxidasa (Sato y Esashi, 1980; Guzman y Ecker, 1990; Jung, *et al.*, 2009). Inicialmente, determinamos la concentración de AIB óptima a la cual la cantidad de

etileno desprendido por las raíces se reducía a valores menores de 50 % respecto al testigo sin tratar. Se probaron diferentes concentraciones de AIB en la variedad Floradade: 0.5 mM, 1 mM ,2 mM y 5 mM. Las concentraciones de 2 mM y 5 mM no mostraron diferencias significativas entre ellas al reducir en más del 50 % la producción de etileno por las raíces. Se prepararon soluciones de AIB a 2 mM en agua destilada y se aplicaron 20 mL por maceta solo una ocasión según el experimento en curso.

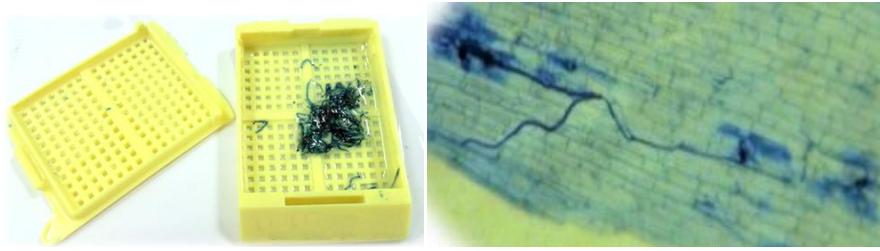
### **III.3. DETERMINACIÓN HISTOQUÍMICA DE LOS PARÁMETROS DE MICORRIZACIÓN**

La evaluación del grado de micorrización de las plantas se realizó de forma secuencial en el tiempo, incluyendo 3 tiempos de cosecha, lo que permite establecer una curva de micorrización que refleja la dinámica de la colonización. Para la determinación de los parámetros de micorrización se procedió a la tinción histoquímica de las estructuras fúngicas del hongo con azul de tripán según Phillips y Hayman (1979). Los parámetros determinados fueron: porcentaje de longitud de raíz micorrizada, frecuencia de micorrización (% F), intensidad de micorrización (% M), intensidad arbuscular de la zona micorrizada (% a) e intensidad arbuscular total en la raíz (% A), según la metodología descrita por Trouvelot, *et al.*, (1986). También se midió la eficiencia de la micorrización mediante la tinción de la actividad fosfatasa alcalina (ALP), la cual se localiza principalmente en las vacuolas y arbusculos del micelio intraradical (Gianinazzi, *et al.*, 1979), como fue descrito por Tisserant, *et al.*, (1993).

#### **III.3.1. Tinción con azul de tripán**

El fundamento de esta tinción consiste en la tinción de la quitina de las paredes del hongo por la interacción con el colorante azul tripán, según la metodología de Phillips y Hayman (1979). Se observan las estructuras fúngicas de color azul oscuro y el resto más claro (Bartnicki-García, 1968).

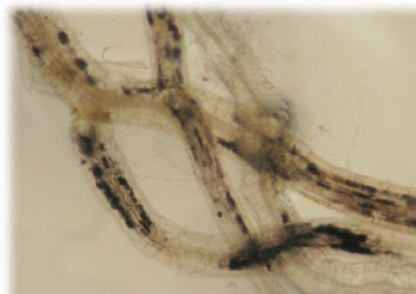
Tras cosechar la planta y lavar las raíces en agua, se cortaron en fragmentos de aproximadamente un 1 cm de longitud (eliminándose 1 cm de raíz a partir de la base del tallo y 1 cm del extremo final) y se sumergieron en una solución de KOH 10 % que se mantuvo en ebullición (a baño maría) durante 15 m. Posteriormente, se enjuagaron con agua corriente varias veces y se incubaron en una solución de HCl 0.1 N durante 3 m a T<sup>º</sup> ambiente. Después se eliminó el HCl y se cubrió con azul de tripán al 0.05 % en ácido láctico, durante 15 m en baño maría. Finalmente se eliminó el colorante y se adicionó ácido láctico para su conservación hasta la observación al microscopio (**Figura III.1.**). Es recomendable eliminar los desechos del colorante y del ácido láctico en recipientes marcados para desechos tóxicos.



**Figura III.1.** Muestras de raíz micorrizada teñida con azul tripán.

### **III.3.2. Tinción de la actividad fosfatasa alcalina (ALP)**

Esta técnica está definida para teñir las fosfatasas alcalinas localizadas en las vacuolas fúngicas y se ha propuesto como medida de la eficiencia fúngica en la captación y acumulación de fósforo (Tisserant, *et al.*, 1993). Las raíces de tomate se cortaron en fragmentos de aproximadamente 1 cm de longitud al momento de ser cosechadas (eliminándose 1 cm de raíz a partir de la base del tallo y 1 cm del extremo final) y se sumergieron en una solución de hidrólisis durante 1 h (Tisserant, *et al.*, 1993), se lavaron y se cubrieron con la solución específica para la tinción de la ALP (**Cuadro III.4.**), manteniendo la oscuridad durante todo el proceso. Las raíces se sometieron a vacío entre 5 y 10 m para facilitar la penetración de la solución y se mantuvieron a 37 °C durante 24 h. Tras el periodo de incubación, se enjuagaron con agua corriente y se añadió NaOCl 3 %, incubándose a temperatura ambiente 15-20 m. Por último, se lavaron con agua corriente y se cubrieron con ácido láctico para su conservación (**Figura III.2.**).



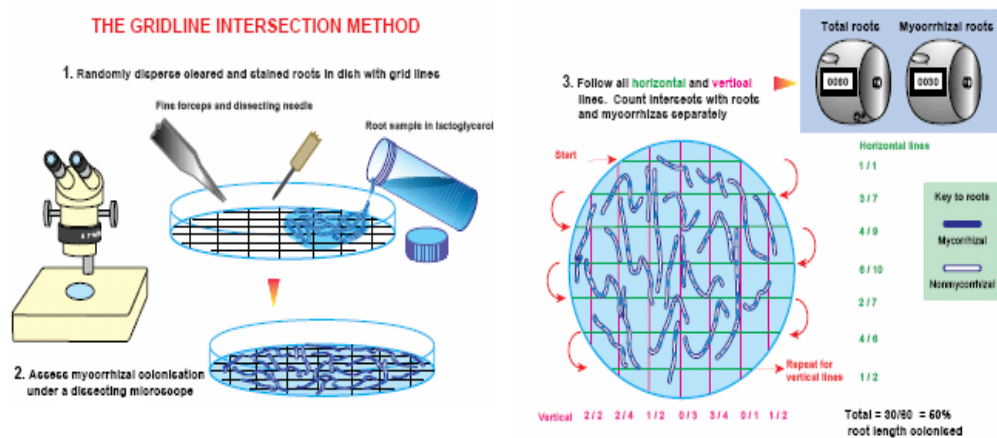
**Figura III.2.** Muestras de raíz micorrizadas con tinción fosfatasa alcalina.

**Cuadro III.4. Composición de la soluciones de hidrólisis y ALP**  
(Tisserant, et al., 1993)

Solución de hidrólisis	Para 50 mL
Buffer 0.05M Tris/Cítrico pH 9.2	50 mL
Sorbitol	2.5 g
Celulasa (150 U)	0.016 g
Pectinasa de <i>Aspergillus niger</i> (150 U)	380 µL
Preparación y filtrado en el momento de la tinción	
Solución ALP	Para 50 mL
Buffer 0.05M Tris/Cítrico pH 9.2	50 mL
Ácido α-naftil fosfato	50 mg
Sal de Fast blue RR	50 mg
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	50 mg
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	40 mg
Preparación y filtrado en el momento de la tinción	

### III.3.3. Evaluación del grado de micorrización

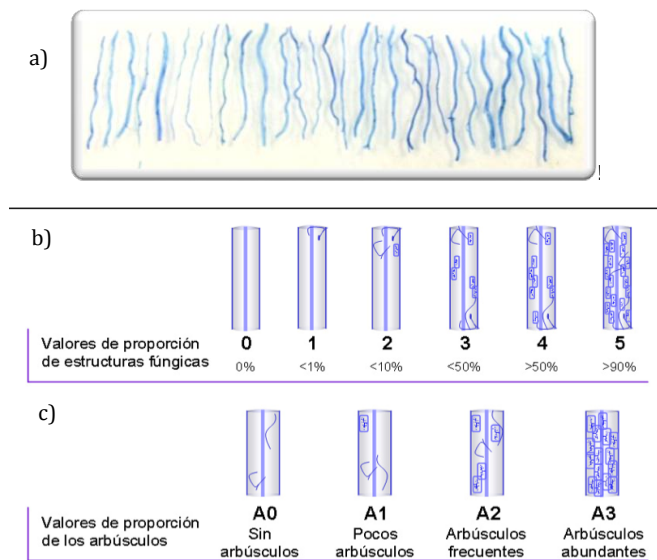
La evaluación del grado de micorrización se realizó por técnicas microscópicas clásicas. Para la determinación del porcentaje de longitud de raíz micorrizada se empleó el método descrito por Giovannetti y Mosse (1980). Las raíces teñidas se extendieron en placas de 10x10 cm<sup>2</sup> divididas en cuadrículas de 1.2 cm de lado. El número de cruces de la raíz con las cuadrículas es directamente proporcional al porcentaje de longitud de la raíz en la placa (Newman, 1966), siendo el número de cruces de raíz micorrizada con las líneas de las cuadrículas proporcional al porcentaje de longitud de raíz micorrizada (**Figura III.3**).



**Figura**

**III.3.** Cuantificación de las micorizas con la tinción azul tripán en una placa dividida en cuadrículas de 1.2 cm con ácido láctico y observado a la lupa.

En el caso de la determinación de la frecuencia de micorrización (% F), la intensidad de micorrización (% M), la intensidad arbuscular de la zona micorrizada (% a) y la intensidad arbuscular total (% A), se utilizó la metodología descrita por Trouvelot *et al.*, (1986).



**Figura III.4.** Valoración de diversos parámetros de micorrización. a) disposición de las raíces en el portaobjetos; b) Puntuación dada a la frecuencia de micorrización y (c) a la abundancia de arbusculos en recuento al microscopio.

Dicha técnica consiste en la observación al microscopio de 30 fragmentos de raíces teñidas con azul de tripán de aprox. 1 cm de longitud situadas sobre un portaobjetos. En cada fragmento de raíz se cuantifica la proporción de estructuras fúngicas (otorgando valores enteros de 0 a 5 según el grado de ocupación del hongo en la raíz) y la proporción de arbusculos (asignando valores enteros de 0 a 3 bajo el mismo criterio anterior) (**Figura III.4.**).

Los datos resultantes fueron analizados mediante las fórmulas estadísticas de la **Cuadro III.5**, según el programa MYCOCAL (<http://www.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocal-pgr/download.html>), obteniendo los valores de los diferentes parámetros de micorrización. También se realizó la determinación de parámetros fisiológicos habituales como peso fresco de raíz y parte aérea.

**Cuadro III.5. Fórmulas matemáticas según el programa MYCOCAL para obtener los valores de micorrización de la raíz**

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

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

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

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

$$m_{A3} = (95 \cdot n_5 \cdot A_3 + 70 \cdot n_4 \cdot A_3 + 30 \cdot n_3 \cdot A_3 + 5 \cdot n_2 \cdot A_3 + n_1 \cdot A_3) \cdot 100 / \text{fragmentos micorrizados}$$

$$m_{A2} = (95 \cdot n_5 \cdot A_2 + 70 \cdot n_4 \cdot A_2 + 30 \cdot n_3 \cdot A_2 + 5 \cdot n_2 \cdot A_2 + n_1 \cdot A_2) \cdot 100 / \text{fragmentos micorrizados}$$

$$m_{A1} = (95 \cdot n_5 \cdot A_1 + 70 \cdot n_4 \cdot A_1 + 30 \cdot n_3 \cdot A_1 + 5 \cdot n_2 \cdot A_1 + n_1 \cdot A_1) \cdot 100 / \text{fragmentos micorrizados}$$

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

En las fórmulas  $n_5, 4, 3, 2$  y  $1$  corresponden al número de fragmentos con valor  $5, 4, 3, 2$  y  $1$  respectivamente de ocupación por el hongo.  $A_3, 2$  y  $1$  corresponden al número de fragmentos con valor  $3, 2$  y  $1$  respectivamente de ocupación de arbusculos.  $m_{A3}, 2$  y  $1$  representan la intensidad media por fragmento con una abundancia de arbusculos  $3, 2$  y  $1$  respectivamente.

#### III.4. CUANTIFICACIÓN DE ETILENO EN RAÍZ

La cuantificación de etileno liberado por la raíz se realizó siguiendo la metodología de Lund *et al.*, (1998). Una vez cosechada la planta, lavada la raíz y cortada la parte aérea, se dejó la raíz en un tubo abierto de 50 mL durante 30 m (para liberar etileno acumulado en la raíz). Una vez transcurrido ese tiempo, el tubo se cierra con tapón perforable y se incuba durante 1 h a temperatura ambiente. Tras incubación se toman 4 muestras de 1 mL del aire contenido en dicho tubo, utilizando para ello jeringas calibradas.

La concentración de etileno por mL de aire se obtuvo por cromatografía de gases, con detección por ionización de llama. Se utilizó el cromatógrafo de gases P 5890 (Hewlett packard), con una columna R de Porapak y el integrador HP3396. La llama del detector de ionización se mantuvo con un flujo de aire de  $H_2$  con una presión de  $2$  y  $1$  bares, respectivamente. La fase móvil se basó en un flujo de  $N_2$  a una presión de  $2$  bares. La columna se mantuvo a  $70$  °C, el inyector a  $120$  °C, y el detector a  $105$  °C. La cantidad de etileno por mL de aire contenido en cada jeringa se determinó por la integración del área del pico correspondiente a etileno de cada cromatograma, calculando dicha cantidad por extrapolación a una curva patrón de etileno. La concentración final se refirió a cantidad de etileno producido por h y por g de raíz ( $nM \cdot (g \cdot h)^{-1}$ ) (Figura III.5).

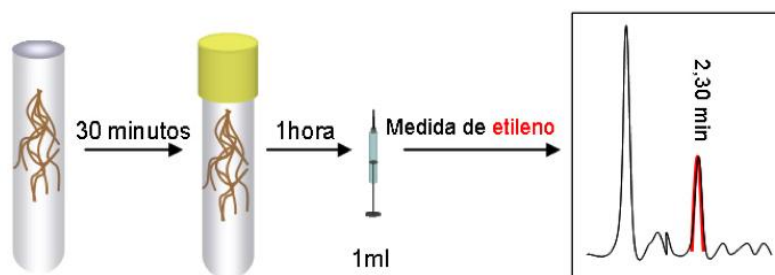


Figura III.5. Extracción y medida del etileno producido en raíces.

### III.5. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Una vez establecidas las alteraciones espacio temporales, así como morfológicas en la micorrización y relacionadas con el contenido en etileno de los distintos tratamientos y fenotipos, se cuantificó la expresión génica tanto de genes vegetales marcadores de la acción de etileno y del fósforo en la simbiosis MA, así como de genes fúngicos relacionados con la capacidad de colonización y/o actividad fúngica en la raíz.

#### III.5.1. Extracción de ARN total

Se muestrearon 0.5 g de cada unidad experimental y se almacenó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Se analizaron al menos 3 réplicas independientes por tratamiento. Las muestras de raíz, se maceraron y homogenizaron en nitrógeno líquido hasta obtener una textura de polvo fino.

La extracción de ARN total de raíces de tomate micorrizada se realizó utilizando el RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante que se detallan a continuación:

1. Añadir  $450\text{ }\mu\text{L}$  de tampón RLT (tampón de lisis que contiene tiocianato de guanidina) a la muestra y agitar con vórtex vigorosamente. Al tampón RLT antes de usar hay que añadirle  $10\text{ }\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol  $14.5\text{ M}/1\text{ mL}$  RLT.
2. Incubar a  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 m.
3. Transferir el lisado a una columna de centrifugación QIAshredder (color lila) colocado en un tubo eppendorf de 2 mL, y centrifugar durante 2 m a máxima velocidad. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 2 mL con cuidado de no resuspender el precipitado celular.

4. Añadir 0.5 V de etanol (96-100 %) al lisado anterior, e inmediatamente mezclar pipeteando sucesivamente. En este paso se deshidratan las moléculas de ácido nucleicos, apelmazándose y no pasando así por el filtro de la columna.
5. Transferir la muestra a la columna RNeasy mini Spin (color rosa) colocada en un tubo eppendorf de 2 mL y centrifugar 15 s a 8000 g. Si el volumen de la mezcla es mayor a 700  $\mu$ L cargar las alícuotas sucesivamente en la columna hasta agotar el volumen total. Tirar el líquido sobrante del tubo.
6. Añadir sobre la columna de centrifugación RNeasy mini Spin 700 $\mu$ l de tampón RW1 (contiene etanol) y centrifugar 15 s a 8000 g para lavar la columna. Tirar el líquido sobrante del tubo.
7. Añadir 500  $\mu$ L de tampón RPE (preparado a razón de 800  $\mu$ L de etanol 100 % por cada 200  $\mu$ L de tampón RPE concentrado) a la columna de centrifugación RNeasy mini Spin para rehidratar la muestra y centrifugar 15 s a 8000 g. Tirar el líquido sobrante
8. Volver a añadir 500  $\mu$ L de tampón RPE a la columna de centrifugación RNeasy mini Spin y centrifugar 2 m a 8000 g. Tirar el líquido sobrante del tubo y centrifugar de nuevo la muestra 1 min a máxima velocidad para secar bien la muestra. Transferir la columna a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL estéril, y añadir sobre ésta 30 – 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O-DEPC (o libre de RNasa) y centrifugar 1 m a  $\geq$  8000 g para eluir el ARN.

### **III.5.2. Tratamiento con la solución de H<sub>2</sub>O-DEPC**

Para evitar la contaminación por RNAsas, todos los reactivos de la extracción se prepararon con H<sub>2</sub>O miliQ tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) (H<sub>2</sub>O-DEPC), el cual inhibe a la enzima RNasa. La solución de agua milliQ- DEPC 0.2 % se preparó a temperatura ambiente y se dejó en agitación durante 12 h sin el tapón en 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 m. El material de vidrio y porcelana se esterilizó previamente en horno a 180 °C durante al menos 4 h, mientras que el material de plástico se trató con NaOH 5 mM durante 2 h, pasadas las cuales el material se enjuagó con abundante H<sub>2</sub>O-DEPC.

### **III.5.3. Tratamiento con DNasa I libre de RNasa**

Para eliminar la presencia de ADN que se encuentran en la muestra naturalmente y que pueden interferir en los posteriores análisis de expresión genética, el ARN total extraído se trató con enzimas DNasa libre de RNasa (TurboDNasa I, QIAGEN) según la mezcla de reacción presentada en la **Cuadro III.6.**, incubando 30 m a 37 °C.



<b>Cuadro III.6. Tratamiento con Turbo DNAsa (QIAGEN)</b>	
ARN (20µg)	X µL
Tampón 10X de DNAsa	5.7 µL
DNase inactivation Reagent (50u/µL)	7.5 µL
Turbo DNAsa (10u/µL)	1.5 µL
H <sub>2</sub> O-DEPC	(50-X) µL

#### **III.5.4. Cuantificación del ARN**

La cuantificación del ARN se llevó a cabo mediante espectrofotometría a 260 nm, usando el NanoDrop-1000 Spectrophotometer UV/Vis (Thermo Scientific) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para hacerlo es necesario valorar antes la pureza de la muestra, mediante las absorbancias a las longitudes de onda de 260 y 280 nm:

- Si la relación  $DO_{260} / DO_{280} < 2$ , ello indica que la muestra está contaminada con proteínas o fenol, por lo que la cuantificación no será exacta.
- Si la relación  $DO_{260} / DO_{280} = 2$ , la muestra es pura y se puede calcular la concentración del ARN teniendo en cuenta que:

$$1 \text{ Unidad de } DO_{260} = 40 \text{ } \mu\text{g ARN/mL}$$

Como cuantificación adicional y como medida de la integridad del ARN se realizó una separación por electroforesis horizontal en gel de agarosa 0.8 %, 80 V durante 30 m. Mediante electroforesis, las moléculas de ARN se separaron en función de su tamaño y la concentración de ARN se estimó comparando la intensidad de las bandas pertenecientes a los ARN ribosomales con la intensidad de las bandas de ADN de concentración conocida del patrón electroforético de un marcador de peso molecular estándar. Para visualizar las bandas de ARN y ADN se utilizó la tinción con Gel-Red (Biotium) y la visualización de la fluorescencia emitida al someter las moléculas teñidas a luz UV (260 nm), (Sambrook *et al.*, 1989).

#### **III.5.5. Retrotranscripción de ARNm (RT)**

El ADN complementario (ADNc) fue obtenido a partir de 1 µg de ARN total usando el i-script cDNA Synthesis Kit (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante. El protocolo de retrotranscripción consistió según las siguientes etapas: 5 m a 25 °C, 30 m a 42 °C y 5 m a 85

°C empleando el termociclador Eppendorf MasterCycler™ Personal. La mezcla de reacción se presenta en la **Cuadro III.7.**

<b>Cuadro III.7. Mezcla de reacción empleada para la síntesis del ADNc</b>	
5X i-Script reaction mix	4 µL
i-Script reverse transcriptase	1 µL
H2O-DEPC	15-x µL
ARN (1 ug)	x

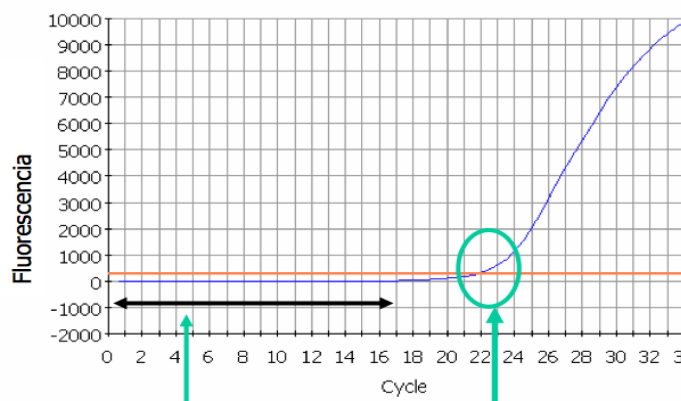
### **III.5.6. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)**

Esta metodología se empleó para cuantificar la expresión génica midiendo la acumulación de amplicones en la reacción en “tiempo real” utilizando marcadores fluorescentes (fluoróforo) que se unen específicamente al ADN amplificado que se intercala en el surco menor de la doble cadena de ADN (en este caso se utilizó el iQ-SYBR Green, Bio-Rad). Esto permite conocer la cantidad de fluorescencia emitida durante la fase exponencial de la reacción, donde un aumento significativo del producto de la PCR de doble cadena se correlaciona con la cantidad inicial de ADN o cADN en estudio (Walker, 2002). Para la transcripción inversa-PCR cuantitativa (qRT-PCR) experimentos, el ARN total fue aislado de una muestra de 0.5 g tomados de la raíz, que era una parte representativa del sistema radicular de cada planta y fue tratado como una réplica biológica. La reacción PCR en tiempo real se llevó a cabo en el sistema “iQ5 Real-Time PCR Detection System” (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Cada 20 µL de reacción contenía 1 µL de la dilución 1/10 del cDNA, 10 µL 2x SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hércules, CA, USA), y 200 nM de cada primer. El programa de PCR consistió en: un primer ciclo de desnaturalización durante 3 m a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 58-63 °C (dependiendo de la pareja de primers), y 30 s a 72 °C. La especificidad de la amplificación se detectó mediante una curva de fusión (70 ciclos de 30 s desde 60 a 95 °C con un intervalo de 0.5 °C).

La tecnología qRT-PCR se fundamenta en la determinación del valor del ciclo umbral ( $C_T$  por sus siglas en inglés = threshold cycle), que es el ciclo de la PCR en el cual se comienza a detectar la fluorescencia a partir de un punto significativamente por encima de la línea base en el cual la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido (Bustin, 2002). En la **Figura III.6.**, el eje vertical representa la cantidad de fluorescencia normalizada, y el eje horizontal el número de ciclos. La Baseline o línea base (naranja) se refiere a los ciclos iniciales en los que no hay cambios detectables en la cantidad de fluorescencia, y sólo se detecta la fluorescencia basal. Threshold es el umbral en el que se produce un cambio significativo en la fluorescencia

(círculo verde), y el corte entre el Threshold y la curva de amplificación determina el Ct o ciclo umbral que se emplea para la cuantificación. El cálculo del Ct siempre se realiza en la fase exponencial de la curva.

Si hay mayor cantidad de cierto ARN significará un valor alto de ADNc y por tanto un valor  $C_T$  bajo, mientras que si hay poca cantidad de ARN, el valor del  $C_T$  para la el gen analizado será más alto, ya que se requiere más ciclos de amplificación para que la señal de fluorescencia llegue a ser detectada. Aunado a lo anterior, un valor Ct superior a 40 ciclos indica que no hay amplificación y por consiguiente no deben incluirse en los cálculos.



**Figura III.6.** Determinación del valor del ciclo umbral ( $C_T$ )

Los experimentos se realizaron por triplicado y el valor de expresión génica se calculó usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001). Este método expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores  $C_t$  de la muestra y los valores  $C_t$  del control. Los valores de  $C_T$  de todos los genes se normalizaron según el valor  $C_T$  del gen de expresión constitutiva que codifica para el factor de elongación de tomate-*LeEF-1* (X14449) según las siguientes ecuaciones:

1. Primero se normaliza el  $C_T$  tanto del gen “problema” como el gen “constitutivo” con respecto a la situación control elegida:

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

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

2. Posteriormente, se normalizan los incrementos en la expresión del gen problema respecto a la expresión del gen constitutivo, y para ello, y usando los incrementos

calculados anteriormente, se calcula el incremento del gen problema respecto al gen constitutivo:

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

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

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

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

#### **III.5.7. Diseño y secuencia de los oligonucleótidos de la QRT-PCR**

Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de qRT-PCR fueron obtenidos de fuentes bibliográficas principalmente; o bien, fueron diseñados según las secuencias flanqueantes de los genes respectivos utilizando el programa NetPrimer. Los cebadores de genes de tomate (*S. lycopersicum*) utilizados en esta investigación se listan en el **Cuadro III.8**.

Cuadro III.8. Secuencia nucleotídica de los primers utilizados en la qRT-PCR

Cebador	Tª (°C)	Función	Secuencia (5'-3')
qEFαR	60	Factor de elongación, Tomate	AGC TTC GTG GTG CAT CTC
qEFαF	60	PCR cuantitativa (problemas en amplificación)	GAT TGG TGG TAT TGG AAC TGT C
qLePT <sub>4</sub> -F	65	Transportador de fósforo en tomate inducido por micorrización	GAA GGG GAG CCA TTT AAT GTG G
qLePT <sub>4</sub> -R	65	Transportador de fósforo en tomate inducido por micorrización	ATC GCG GCT TGT TTA GCA TTT CC
qGinEF-F	58	Factor de elongación de <i>G. intraradices</i>	GCT ATT TTG ATC ATT GCC GCC
qGinEF-R	58	Factor de elongación de <i>G. intraradices</i>	TCA TTA AAA CGT TCT TCC GAC C
qEF-F	60	Factor elongación tomate	GGT GGC GAG CAT GAT TTT GA
qEF-R	60	Factor elongación tomate	CGA GCC ACC ATG GAA AAC AA
qExt-F	58	Extensina	GAC AAA TCA TTC AAA ATA TGG CAA
qExt-R	58	Metabolismo pared celular. Tomate	CAC GTC CAC AAC GAC TTC TC
qβ-Exp-F	58	β-Expansina	TGG CAG CCT GGA AAA ACT TA
qβ-Exp-R	58	Metabolismo pared celular. Tomate	GAC ATC AAC AAA GTC AAC CA
qenchi-F	58	Endoquitinasa	ATT TGA ATG TGG GAT GGG TC
qenchi-R	58	Respuesta defensiva. Tomate	GGG CGA AGT TCT TTT GAT TG
qRieske-F	65	Rieske [2Fe.2S]	CGT TGG ATA TTT CAC CTG GG
qRieske-R	65	Proteína con motivo oxidoreductosa. Tomate	TTT GTT GGC ACA TAG CAA GC
qa-bHydr-F	60	β hydrolase de	GGG AGT TGA AAT TGC ATT ACC T
qa-bHydr-R	60	Tomate	CAT GTA GGT GGG AAC CGA GT
qGinGS-F	58	Glutamina sintetasa	CCT CAA GGT CCC TAT TAT TGT TCT G
qGinGS-R	58	<i>Glomus intraradices</i> expresado en arbusculos	ACG ATA ATG AGC TTC CAC AAC GT
qETR4- F	60	Receptores de etileno. Tomate	GGT AAT CCC AAA TCC AGA AGG TTT
qETR4- R	60	Receptores de etileno. Tomate	CAA TTG ATG GCC GCA GTT G
qETR6- F	60	Receptores de etileno. Tomate	ATT CCA AAG GCA GCC GTT AA
qETR6- R	60	Receptores de etileno. Tomate	GGA TGT GGA TAT GTG GGA TTA GAA G
qGAST1-F	60	gen de respuesta a Giberelinas	CAG GTC GAC ATG GCT GGG AAA ATG AGC ATT G
qGAST1-R	60	gen de respuesta a Giberelinas	CCA GAC TCG AGT CAT GGG CAC TTT GGG CCA C
qDELLA-F	60	inactivación de giberelinas	TGA TGC GAC TAT ACT TGA TAT AAG
qDELLA-R	60	inactivación de giberelinas	GGG TTA ATC TGT TTA ATA GAG TTC
qIAA14-F	60	de respuesta a auxinas	AGA TGT TTA GCT CCT TTA CTA ATG
qIAA14-R	60	de respuesta a auxinas	GTT GGT ACA TAT TCA GAA CTG TTA
qRIN-F	60	Factor de Transcripción tipo MADs BOX	ATG GCA TTG TGG TGA GCA AAG
qRIN-R	60	Ft tipo MADs BOX	GTT GAT GGT GCT GCA TTT TCG
qGA2Ox <sub>3</sub> -F	60	Metabolismo de giberelinas	GCT AAC AAT CCT TCG ATC AAA TGA CG

<i>qGA2OX<sub>3</sub>-R</i>	60	Metabolismo de giberelinas	GCA TAA TGC ATA CAC CTC CAA GGC C
<i>qGA3OX<sub>1</sub>-F</i>	60	Metabolismo de giberelinas	TCA CTG TCC CTC CAA TAC CC
<i>qGA3OX<sub>1</sub>-R</i>	60	Metabolismo de giberelinas	ATC GTG TTC GGT TTA CGA CC
<i>qSIPDR1-F</i>	60	Gen putativo transportador de estrigolactonas	GAT GGT ATT GGA TTG GAG CA
<i>qSIPDR1-R</i>	60	Gen putativo transportador de estrigolactonas	CCT GAG GTT TAC CAA ATG GG
<i>qCCD7-F</i>	60	síntesis estrigolactonas, tomate	AGC CAA GAA TTC GAG ATC CC
<i>qCCD7-R</i>	60	síntesis estrigolactonas, tomate	GGA GAA AGC CCA CAT ACT GC
<i>qCCD8-F</i>	60	síntesis estrigolactonas, tomate	CAG GAC AAT GGC ACA TAG GT
<i>qCCD8-R</i>	60	síntesis estrigolactonas, tomate	GCG TCC GAT TCG ATT TG

### III.6. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD BIOSINTÉTICA Y SECRETORA DE ESTRIGOLACTONAS

Esta estrategia se diseñó para encontrar una relación entre los procesos de biosíntesis y percepción del etileno, y la capacidad de la planta para producir y secretar estrigolactonas en condiciones de disponibilidad de fósforo. Para ello, se realizó una evaluación indirecta de la secreción de SIs en mutantes de tomate alterados en la biosíntesis y percepción de Etileno en presencia de fósforo asimilable.

#### III.6.1. Preparación de los Exudados

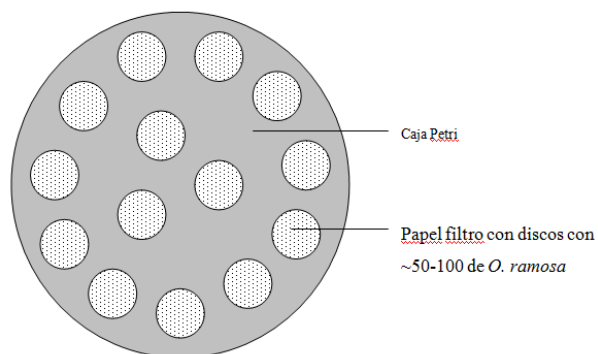
Se germinaron plantas de tomate de los genotipos mutantes Ailsa Craig, VFN8, Floradade y UC82b y sus respectivos mutantes *Rin*, *Epi*, *ETR6AS*, *NRO* y *ACCD*. Una vez germinadas, se trasladaron a tubos Falcon de 15 mL rellenos de vermiculita como soporte para su crecimiento. Se adicionó 1 mL de solución nutritiva Hewitt completa durante 3 días por semana. Transcurridas dos semanas, la solución nutritiva completa se sustituyó por solución nutritiva Hewitt sin fósforo. Se incluyó un lavado previo con un volumen alto de solución sin Pi para lavar totalmente el fósforo presente en el sustrato, ya que la intención es generar a las plantas carencias en este nutriente. Un segundo grupo de plantas continuó con la solución completa por el resto del ensayo como grupo testigo. Transcurridas 48 h desde la aplicación de la solución sin Pi, se procedió a la recogida de los exudados radicales producidos por las plantas. Un volumen de 45 ml de agua destilada se hizo pasar a través del sustrato, eluyendo todos los compuestos exudados por las raíces. La solución eluyente se recogió en tubos Falcon de 45 mL de capacidad, y a continuación se procesó en columnas C-18 mediante el sistema Many-fold, a fin de concentrar los compuestos presentes en los exudados. Del volumen final

de exudados procesados (aproximadamente 4 mL), se tomó una alícuota de unos 200  $\mu$ L, tras evaporar la acetona, se empleó en la germinación de las semillas de jopo (*Orobancha ramosa* López-Raéz *et al.*, 2011).

### III.6.2. Preparación de las semillas de *Orobancha ramosa*

Antes del emplear las semillas en el bioensayo de germinación, las semillas de *Orobancha* fueron esterilizadas y pre-acondionadas:

- Las semillas se esterilizaron en una solución de NaOCl 2% (25 mL de cloro comercial al 4% mas 25 mL de agua semidestilada estéril) y 100  $\mu$ L Tween20 (100) en un tubo de 50 mL durante 5 min.
- Después de 5 min, se lavaron con agua estéril para remover el cloro commercial usando un equipo de vacío (con un matraz kitasato) y lavados con agua estéril durante 3 x 5 min en una cámara de flujo laminar.
- Finalmente, se secaron las semillas dentro de la cámara de flujo laminar durante 30-60 min.
- Una vez secas, las semillas se colocaron en pequeños discos de fibra de vidrio.
- A cada disco se colocó en una placa petri de 90 mm de diámetro y se le añadió 3 mL de agua estéril.
- Se colocaron aproximadamente 100 semillas en cada disco según la **Figura III.7**.
- Las placas se sellaron con parafilm, y se cubrieron con papel aluminio.
- Las semillas se pre-acondionaron a 21 °C en oscuridad durante 10-12 días.



**Figura III.7.** Distribución de los discos de fibra de vidrio con semillas de *Orobancha ramosa* pre-acondionadas.

### III.6.3. Bioensayo de germinación

A partir del stock (no exponer a la luz) se añadió 10 uL de cada muestra en un tubo eppendorf y se secó durante 5-10 min en una speed vacuum sin temperatura para eliminar la acetona. Se añadieron 500 uL de agua esteril no miliQ y se aplicaron 25 uL por cada disco (dilución 50x) aplicados en las orillas. Se emplearon 2 discos por cada planta y 3 plantas por cada tratamiento. Como testigo negativo, se aplicaron 50uL de agua esteril no mQ en 3 discos con semillas de *O. ramosa*. Como testigo positivo se aplicó la estrigolactona sintética GR24 a una concentración de  $10^{-9}$  M en 6 discos conteniendo semillas de *O. ramosa*. Cada disco se selló con parafilm y se incubó a 24 °C durante una semana. Todos los discos se incubaron durante 11-14 días en ausencia de luz. Se cuantificó el porcentaje de semillas germinadas usando un estereoscopio binocular.

### III.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cada ensayo se repitió al menos 2 veces, obteniendo resultados similares. Los resultados fueron analizados según un análisis de ANOVA de una vía. La media de los valores de al menos 5 réplicas de muestras biológicas para los parámetros de micorrización y al menos 3 réplicas para los ensayos de qRT-PCR fueron comparados según la prueba de Rango Múltiple de Duncan con un nivel de significancia al  $p \leq 0.05$ .



## **IV. RESULTADOS**

#### **IV. RESULTADOS**

El beneficio para las plantas de la simbiosis micorrízica arbuscular es un hecho bien caracterizado desde hace décadas. Si bien el proceso de intercambio de señales, y la naturaleza química de éstas, que permiten la comunicación entre las raíces de las plantas y el hongo formador de micorriza arbuscular no está completamente dilucidado, cada vez son más los estudios que aportan evidencias sobre los eventos morfológicos, bioquímicos, fisiológicos y moleculares que intervienen durante este proceso. Aunado a lo anterior, una de las áreas de mayor interés en el estudio de la simbiosis MA es la comprensión de la cascada de transducción de señales que se activa/reprime en las raíces de las plantas tras el reconocimiento del hongo micorrízico, y las consiguientes adaptaciones biológicas de la raíz y de la planta misma (Parniske, 2004; 2008). Diversos estudios postulan a las fitohormonas como candidatas que podrían mediar el proceso de reconocimiento hongo-planta, con el consiguiente establecimiento y desarrollo de la simbiosis micorrízica arbuscular (Beyrle, 1995; Ludwig-Müller, 2000; Herrera Medina *et al.*, 2003; Hause *et al.*, 2007; Gutjahr, 2014).

##### **IV.1 PARTICIPACIÓN DEL ETILENO EN LA FORMACIÓN DE LA MICORRIZA ARBUSCULAR EN TOMATE**

El etileno es una hormona vegetal con una amplia diversidad de funciones fisiológicas en las plantas. En referencia a su participación en las relaciones planta-microorganismo, su función como señal inductora de la respuesta defensiva de la planta frente a patógenos ha sido estudiada, y menos claro es su papel durante el establecimiento de relaciones de tipo simbiótico mutualista entre plantas y microorganismos. No se ha documentado una participación específica para el etileno en el establecimiento de la simbiosis micorrízica, aunque resultados recientes sugieren su participación en la regulación de la misma (Varma Penmetsa *et al.*, 2008; Riedel *et al.*, 2008; Zsögön *et al.*, 2008). En este apartado de la tesis doctoral se exponen los resultados de diversos análisis del efecto del etileno sobre los parámetros de micorrización de plantas sometidas a la acción exógena de etileno, así como se muestra el perfil de diversos parámetros relacionados con la percepción del etileno en plantas micorrizadas de *Solanum lycopersicum* (tomate) de genotipo silvestre como plantas de genotipo mutante para la síntesis o percepción de etileno.

#### IV.1.1. Alteración por aportación exógena de los niveles de etileno y su efecto en la micorrización de plantas de *Solanum lycopersicum* inoculadas con *R. irregularis*

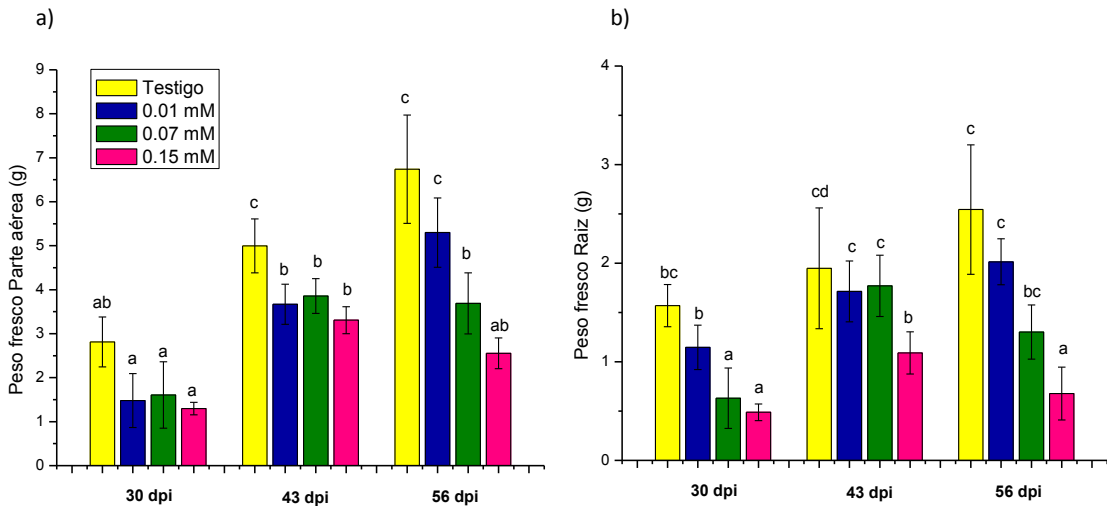
Varios estudios recientes han mostrado la importancia del etileno en el establecimiento y desarrollo de las interacciones planta-microorganismo (Khatibi y Schäfer, 2012). En este trabajo y como punto inicial de nuestra investigación sobre el papel del etileno durante la micorrización, se examinó la respuesta de la planta de tomate a la adición de etileno exógeno, añadido en forma de ethephon (ácido 2- cloroetilfosfónico o CEPA a pH 7), el cual se aplicó directamente al suelo. Se determinaron las dosis de ethephon necesarias para inducir efectos en la micorrización de las plantas sin afectar drásticamente los parámetros de crecimiento de las mismas. La **Figura IV.1.1** muestra de forma visual el efecto de la aplicación exógena excesiva de etileno en el fenotipo de plantas de tomate silvestre Ailsa Craig.



**Figura IV.1.1.** Fenotipo de las plantas de tomate silvestre variedad Ailsa Craig tratadas con 0.3 mM ethephon. a) Testigo (izquierda) y planta tratada con ethephon (derecha) en maceta. b) Desarrollo de raíces adventicias (triple respuesta, epinastia) en plantas tratadas con ethephon. c) Desarrollo de plantas silvestres sin tratar (izquierda) y tratadas con ethephon (derecha).

En nuestros experimentos se evaluaron tres concentraciones distintas de ethephon y se comprobó cual fue su efecto en el crecimiento de plantas de tomate de la variedad Ailsa Craig inoculadas con *R. irregularis*. Las dosis utilizadas fueron 0.01, 0.07, y 0.15 mM de ethephon, realizando dos aplicaciones semanales de 20 mL/maceta (el volumen de maceta utilizado fue de 330 mL). Se evaluaron parámetros morfológicos de la planta, producción de etileno en raíz, así como diversos parámetros de la dinámica en el tiempo y eficiencia de la micorrización, tanto a nivel fisiológico y molecular. El peso fresco de la parte aérea y el peso

fresco de la raíz mostraron un comportamiento similar. Así, la aplicación de la dosis 0.15 mM disminuyó de forma significativa ambos parámetros, mientras que la dosis 0.01 mM redujo ligeramente los valores de ambos parámetros sin un efecto drástico. La dosis de 0.07 mM afectó ligeramente ambos parámetros (**Figura IV.1.2**). Por esta razón fue la dosis utilizada en experimentos posteriores.

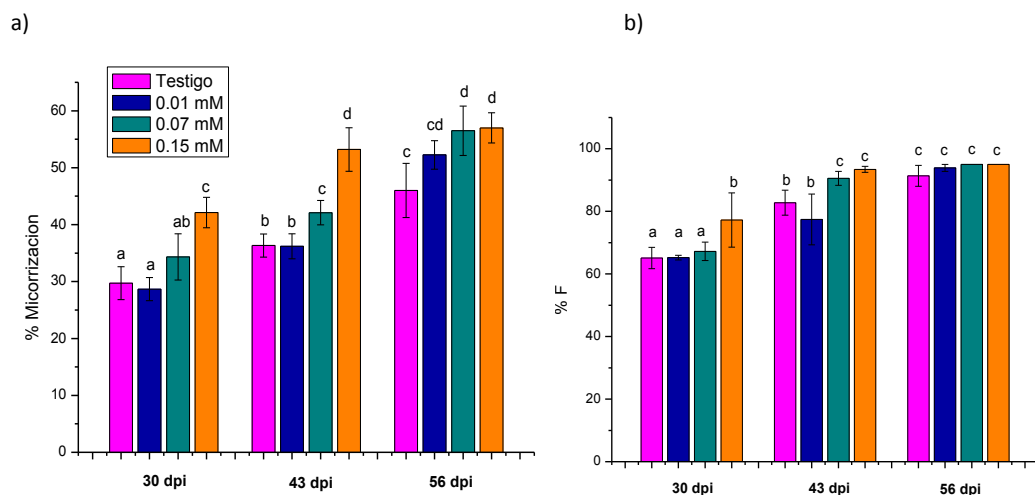


**Figura IV.1.2.** Peso fresco de la planta como respuesta a la adición de etileno exógeno (ethephon) en plantas silvestres Ailsa Craig tratadas con ethephon (Testigo, 0.01 mM, 0.07 mM y 0.15 mM) colonizadas con *R. irregularis* y cosechadas a distinto tiempo tras la inoculación (dpi). a) Peso fresco de la parte aérea; b) Peso fresco de la raíz. Los valores representan las medias de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

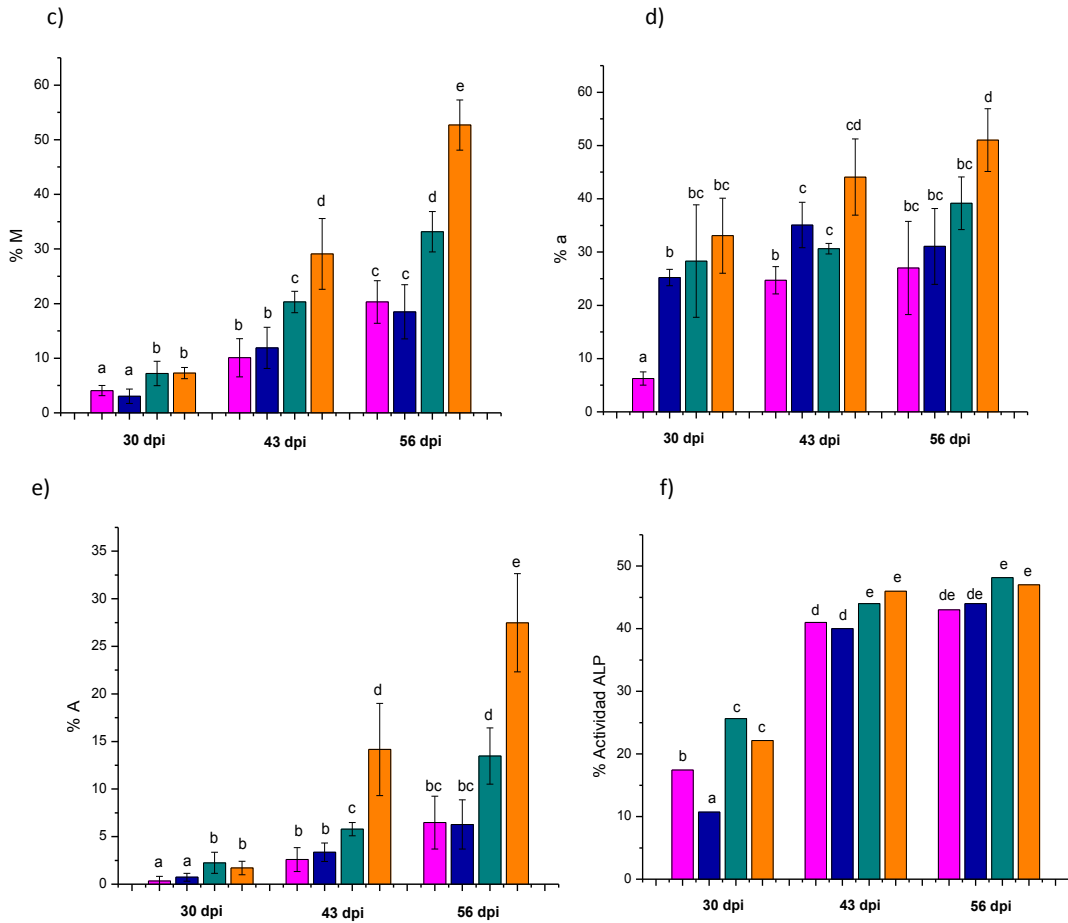
Se realizó un seguimiento de la dinámica de la micorrización durante tres cosechas consecutivas, hasta los 56 días después de la inoculación (dpi). En nuestro experimento, la aplicación de ethephon en plantas de tomate de la variedad Ailsa Craig inoculadas con *R. irregularis* provocó un incremento de la micorrización en las raíces directamente relacionado con el aumento en la concentración del ethephon aplicado, pues las dosis de 0.07 y 0.15 mM incrementaron significativamente la micorrización (**Figura IV.1.3.a**). Este aumento en la micorrización se relaciona inversamente con la disminución del peso fresco de la raíz (**Figura IV.1.2.b**). Evidentemente, al reducir la zona de la raíz factible de ser colonizada en un modo indirecto se aumenta el porcentaje de micorrización total. Este efecto positivo se ve reflejado en los parámetros de micorrización: frecuencia de micorrización (% F), intensidad de micorrización (% M), intensidad arbuscular en la zona micorrizada (% a) y la intensidad arbuscular en el sistema radical (% A). Todos los anteriores parámetros incrementaron directamente con la concentración de ethephon aplicado, aunque con matices (**Figura IV.1.3.b, c, d y e**). La frecuencia de micorrización (% F) solo se ve afectada ligeramente a tiempo de

cosecha intermedio por las dosis altas de ethephon aplicadas. Por su parte, el parámetro de % M, al igual que el porcentaje de micorrización, aumentó proporcionalmente con las dosis de 0.07 y 0.15 mM a los 43 y 56 días tras la inoculación. En cambio, la frecuencia arbuscular (% a) se incrementa de manera significativa y por igual en la primera cosecha en todos los tratamientos con ethephon, siendo el incremento posterior solo con la dosis más alta. Por último, el parámetro de % A depende de los otros anteriores, tanto de la % M como de la % a. Según estos resultados, el etileno tiene un efecto positivo indirecto, mediado por la longitud y tamaño de la raíz y un efecto directo sobre los parámetros de micorrización. De igual modo, la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) aumentó ligeramente sus valores por encima del testigo (Figura IV.1.3.f).

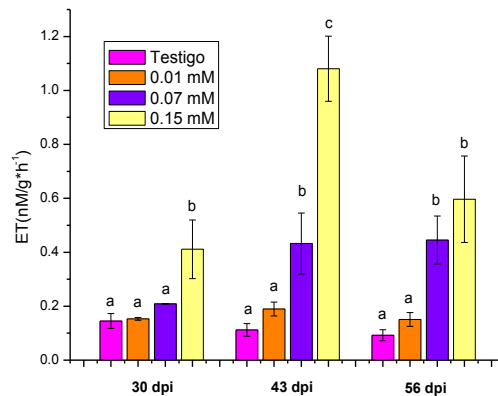
Para establecer una posible relación entre la aplicación del ethephon exógeno, la capacidad de micorrización de la raíz y la concentración de etileno desprendido, se cuantificó la concentración de dicho compuesto desprendido por las raíces (Figura IV.1.4). El tratamiento con etileno exógeno a 0.01 mM no mostró diferencias significativas respecto al testigo en las tres cosechas realizadas durante el experimento. El tratamiento de 0.07 mM mostró incrementos significativos a los 43 y 56 dpi, y significativamente similares al tratamiento a 0.15 mM. El tratamiento 0.15 mM mostró los mayores valores significativos durante todo el experimento con un pico máximo de etileno desprendido a los 43 dpi (Figura IV.1.4).



**Figura IV.1.3.** Parámetros de micorrización en la raíz de plantas de tomate de la variedad silvestre Ailsa Craig tratadas con ethephon (Testigo, 0.01 mM, 0.07 mM y 0.15 mM) colonizadas con *R. irregularis* y cosechadas a distinto tiempo tras la inoculación (dpi). a) Porcentaje de raíz micorrizada; b) Frecuencia de micorrización (% F); c) Intensidad de micorrización (% M); d) Intensidad arbuscular en la zona micorrizada (% a); e) Intensidad arbuscular en el sistema radical (% A); f) Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP). Los datos representados son media de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).



**Figura IV.1.3. Continuación.** Parámetros de micorrización en la raíz de plantas de tomate de la variedad silvestre Ailsa Craig tratadas con ethephon (Testigo, 0.01 mM, 0.07 mM y 0.15 mM) colonizadas con *R. irregularis* y cosechadas a distinto tiempo tras la inoculación (dpi). a) Porcentaje de raíz micorrizada; b) Frecuencia de micorrización (% F); c) Intensidad de micorrización (% M); d) Intensidad arbuscular en la zona micorrizada (% a); e) Intensidad arbuscular en el sistema radical (% A); f) Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP). Los datos representados son media de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).



**Figura IV.1.4.** Etileno desprendido de raíces de plantas silvestres Ailsa Craig colonizadas por *R. irregularis* tratadas con ethephon (Testigo, 0.01 mM, 0.07 mM y 0.15 mM) colonizadas con *R. irregularis* y cosechadas a distinto tiempo tras la inoculación (dpi). Los valores representan las medias de 4 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

#### **IV.1.1.1. Análisis de la expresión de genes marcadores de la micorrización en plantas de *Solanum lycopersicum* inoculadas con *R. irregularis* y tratadas con ethephon**

Diversos estudios sugieren que la señalización molecular de etileno regula diversos factores que permiten el establecimiento de la micorrización. Además de evaluar la dinámica de micorrización tras la aplicación de etileno mediante el análisis de parámetros de micorrización (epígrafe anterior), decidimos evaluar el efecto de la adición exógena de etileno sobre el patrón de expresión de genes marcadores de la micorrización, en la búsqueda de una interacción entre aplicación de etileno, parámetros de micorrización y expresión de genes marcadores. Se evaluó a nivel molecular el desarrollo de la micorrización, analizando el patrón de expresión de genes fúngicos y vegetales marcadores del desarrollo del hongo y de la actividad arbuscular (**Figura IV.1.5**). Para examinar tanto la presencia, como la funcionalidad de los arbusculos en las raíces micorrizadas, se cuantificó la cantidad de transcrito de los genes glutamina sintasa de *G. intraradices* (*G. irregularis*) (gen *GinGS*) y del transportador de fosfato específico de arbusculos de plantas de tomate, *LePT4*. Ambos genes han sido descritos por otros investigadores como de expresión asociada a las células con arbusculos (Nagy *et al.*, 2005; Gomez *et al.*, 2009) (**Gráfica IV.1.5.b y c**). También se analizó la expresión de dos genes que codifican para receptores de etileno, los genes *LeETR4* y *LeETR6*, para estudiar la dinámica de la percepción del etileno durante el experimento. El nivel de expresión se normalizó respecto a la cantidad de ARNm del gen de tomate factor de elongación  $1\alpha$ , *LeEFA1*. El cambio inducido en la expresión génica se calculó usando el método de  $2^{\Delta\Delta Ct}$ , mostrándose el valor de expresión relativa entre tratamientos.

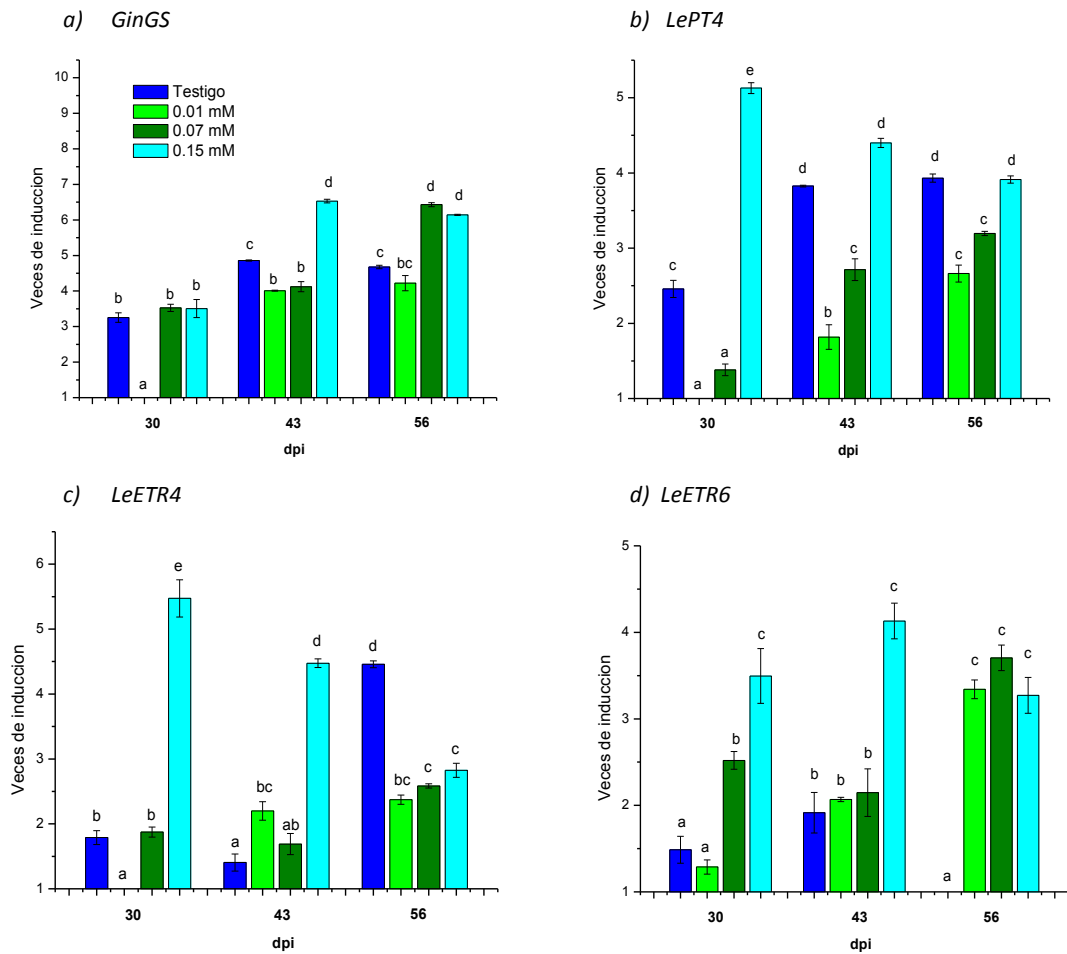
El patrón de expresión del gen de la glutamina sintetasa fúngica (*GinGS*) no varió significativamente en ninguno de los tratamientos a los 30 dpi, salvo una bajada en la expresión en el tratamiento de 0.01 mM de ethephon. A los 43 dpi, únicamente el tratamiento de 0.15 mM de ethephon aumentó la expresión del gen respecto al tratamiento testigo (1.5 veces más). El nivel de expresión del gen *GinGS* en el tratamiento a 0.07 mM y 0.15 mM fue similar a los 56 dpi, y en ambos casos la expresión fue casi dos veces superior que la expresión en el tratamiento testigo. A 0.01 mM, el gen se expresó hasta 4 veces más a los 43 y 56 dpi comparado con su expresión a los 30 dpi, aunque en ningún caso se diferenció drásticamente del testigo en esos dos tiempos de cosecha (**Figura IV.1.5.a**). En el caso del gen *LePT4*, se repite un patrón de expresión de tal forma que los tratamientos con ethephon a 0.01 y 0.7mM siempre reprimieron la expresión del gen hasta 2.5 veces respecto al testigo, independientemente del tiempo de cosecha. Sin embargo, el tratamiento de 0.15 mM induce

la expresión de *LePT4* hasta 2.5 veces más respecto al testigo en los tiempos 30 y 43 dpi, e iguala su expresión a valores similares al testigo a los 56 dpi. Al parecer, el gen *LePT4* se sobreexpresa a una concentración exógena de 0.15 mM de ethephon en etapas tempranas de la micorrización (30 dpi) y su expresión disminuye en el transcurso de los días post-inoculación (43-56 dpi) (**Figura IV.1.5.b**).

La expresión de los genes que codifican para los receptores de etileno en tomate *LeETR4* y *6* mostraron patrones de expresión particulares. El gen *LeETR4* se sobreexpresó casi 4 veces más con el tratamiento 0.15 mM a los 30 dpi respecto al testigo, pero su expresión disminuyó con el desarrollo del cultivo, alcanzando valores de hasta 3 veces más que el testigo a los 43 dpi y hasta de 2 veces menos que el testigo a los 56 dpi. El resto de los tratamientos no varió significativamente la expresión del gen durante todo el experimento respecto a la expresión mostrada por las plantas testigo. En el caso del testigo, el gen *LeETR4* mostró su valor máximo de expresión a los 56 dpi siendo de hasta 4.5 veces más respecto a sí mismo a los 30 dpi (**Figura IV.1.5.c**). El patrón de expresión del gen *LeETR6* estuvo más relacionado con la aplicación de ethephon y los niveles de etileno cuantificados en las plantas. A los 30 dpi el gen *LeETR6* mostró valores de expresión de hasta 1.5 y 2.5 veces más respecto al testigo en los tratamientos 0.07 y 0.15 mM. A los 56 dpi, los valores de expresión en todos los tratamientos no mostraron diferencias significativas entre ellos pero fueron casi 4 veces mayores que en el testigo (**Figura IV.1.5.d**).

Al parecer, la expresión del gen *LeETR4* es estimulada por la adición del etileno exógeno aunque su respuesta parece estar saturada en el tiempo. En el caso del gen *LeETR6*, su expresión parece ser estimulada por el etileno exógeno, incluso en periodos prolongados de aplicación (hasta 56 dpi en nuestro estudio).





**Figura IV.1.6.** Patrón de expresión de genes marcadores del desarrollo de la micorrización, transporte de fósforo y percepción de etileno en plantas de tomate silvestres de la variedad Ailsa Craig tratadas con etileno exógeno (ethephon 0, 0.01, 0.07 y 0.15 mM) inoculadas con *R. irregularis*. a) *GinGS*, b) *LePT4*, c) *LeETR4*, d) *LeETR6*. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ). El valor de expresión génica está representado como veces de inducción/represión de cada gen respecto al tratamiento con menor nivel de expresión, al cual se le atribuye un nivel de expresión igual a 1.

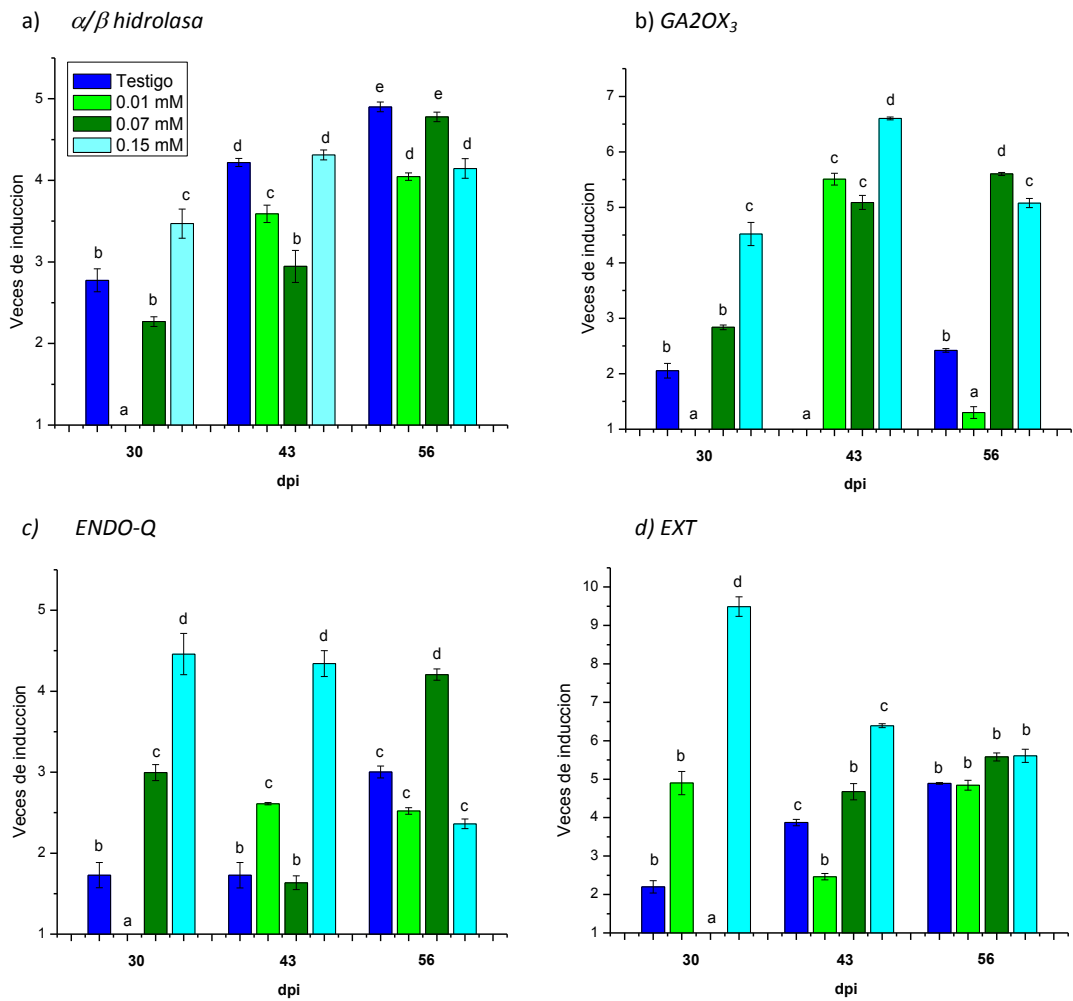
#### IV.1.1.2. Expresión de genes vegetales de defensa y marcadores de metabolismo hormonal en plantas de *Solanum lycopersicum* inoculadas con *R. irregularis* y tratadas con ethephon

En este apartado de la tesis decidimos analizar la expresión de un grupo de genes vegetales marcadores de respuesta defensiva y metabolismo hormonal cuya expresión está asociada al proceso de micorrización y evaluar su expresión en plantas tratadas con etileno exógeno. Analizamos el patrón de expresión del gen que codifica para una proteína de la familia  $\alpha/\beta$  hidrolasa, probablemente relacionada con la percepción de señales hormonales, y cuya expresión que ha sido descrita asociada al proceso de micorrización en tomate (García-Garrido *et al.*, 2010); un gen relacionado con el catabolismo (desactivación) de giberelinas (GAs)

(*GA2OX<sub>3</sub>* (Serrani *et al.*, 2010); un gen relacionado con la respuesta defensiva en tomate (*ENDO-Q*, endoquitinasa-Q) y un gen relacionado con respuesta defensiva y metabolismo de la pared celular, *Ext*, extensina (García-Garrido *et al.*, 2010).

El gen  $\alpha/\beta$  hidrolasa mostró una curva de expresión similar al testigo en todos los tratamientos durante todo el experimento. En resumen, su expresión no parece responder a la presencia de etileno exógeno (**Figura IV.1.6.a**). En el caso del gen *GA2OX<sub>3</sub>* mostró valores de expresión que variaron dependiendo de la concentración del etileno exógeno añadido. En el tratamiento de 0.01 mM de ethephon, la expresión del gen fue menor respecto al testigo a los 30 dpi pero fue casi 5.5 veces mayor que en el testigo a los 46 dpi y nuevamente disminuyó por debajo de la expresión de las plantas testigo a los 56 dpi. En tanto que a 0.07 y 0.15 mM de etileno exógeno los valores de expresión del gen se mantuvieron por encima del testigo en todo el experimento, manteniéndose iguales a los 46 y 56 dpi, y alcanzando hasta 5.5 veces más nivel de expresión que en el testigo (**Figura IV.1.6.b**). Los genes *Endo-Q* y *Ext* mostraron comportamientos similares, ya que el etileno exógeno estimuló la expresión en función de la concentración aplicada. La expresión del gen *Endo-Q* aumentó hasta 1.5 y 2 veces más que en el testigo a 0.07 y 0.15 mM, respectivamente a los 30 dpi. La concentración de 0.15 mM favoreció en mayor grado la expresión del gen (30 y 46 dpi), aunque a los 56 dpi la expresión del gen a esta concentración fue menor respecto al testigo. A 0.07 mM la expresión del gen aumentó gradualmente hasta ser casi 1.5 mayor que en el testigo a los 56 dpi (**Figura IV.1.6.c**). El gen que codifica para la Extensina mostró un comportamiento similar al gen *Endo-Q*, pues la concentración de 0.15 mM de ethephon aumentó la expresión hasta casi 8 veces mas que en el testigo a los 30 dpi, y el nivel de expresión fue disminuyendo en el transcurso del experimento hasta ser similar al testigo a los 56 dpi. Las concentraciones de 0.01 y 0.07 mM no afectaron drásticamente la expresión del gen en durante las cosechas a los 30 y 46 dpi, pero la expresión de todos los tratamientos se igualó al testigo a los 56 dpi (**Figura IV.1.6.d**).

Ambos genes están relacionados con los mecanismos de defensa de la planta y con modificaciones de la pared celular. Estos mecanismos están regulados por la vía de etileno, lo que concuerda con el aumento de su expresión al añadir etileno exógeno.



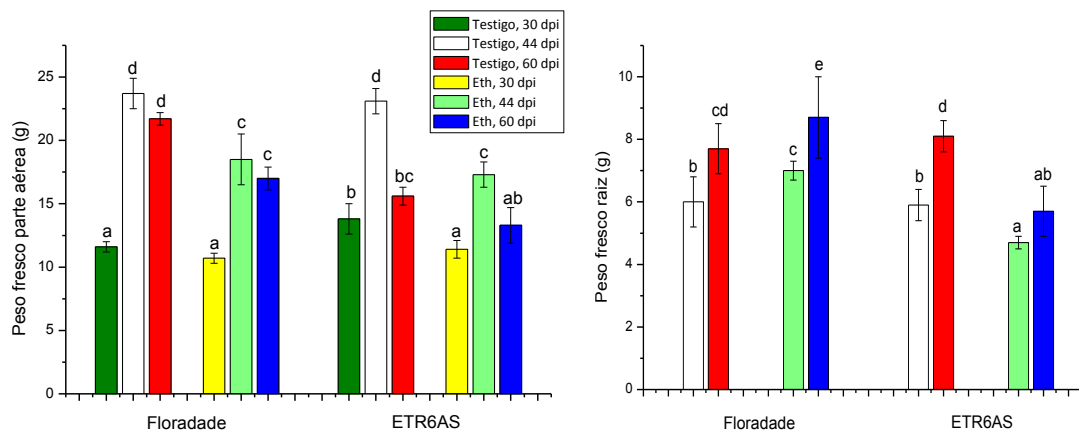
**Figura IV.1.6.** Patrón de expresión de genes marcadores de defensa y metabolismo hormonal en respuesta a la aplicación de etileno exógeno (ethephon 0, 0.01, 0.07 y 0.15 mM) en plantas de tomate silvestres de la variedad Ailsa Craig inoculadas con *R. irregularis*. a)  $\alpha/\beta$  hidrolasa (hipotético receptor hormonal); b)  $GA_2OX_3$ , metabolismo de giberelinas; c) ENDO-Q, respuesta defensiva, d) Ext, extensina. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ). El valor de expresión génica está representado como veces de inducción/represión de cada gen respecto al tratamiento con menor nivel de expresión, al cual se le atribuye un nivel de expresión igual a 1.

#### IV.1.2. Alteración por aportación exógena de los niveles de etileno y su efecto en la micorrización de plantas de *Solanum lycopersicum* de sensibilidad incrementada a etileno e inoculadas con *R. irregularis*

Para profundizar en el efecto del etileno sobre la micorrización se diseñó un experimento de micorrización empleando la línea transgénica ETR6AS de la variedad Floradade de tomate (Tieman *et al.*, 2000). Este transgénico tienen insertada la secuencia anti-sentido del gen codificante para el receptor de etileno LeETR6, con lo cual se produce un silenciamiento génico

y se produce un descenso en la cantidad de receptor funcional. El resultado final es un fenotipo deficiente en este receptor. 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. Dada la mayor sensibilidad a etileno de las plantas ETR6AS, se realizaron experimentos de aplicación exógena de etileno y se compararon los efectos causados sobre la micorrización de plantas de fenotipo silvestre Floradade y transgénica más sensible ETR6AS. El objetivo de estos experimentos fue identificar más claramente las alteraciones sobre la micorrización debidas a una mayor respuesta al etileno, además de caracterizar la posible influencia que tiene sobre la micorrización el receptor LeETR6. Se realizaron aplicaciones de ethephon 0.07 mM a pH7 en suelo (20 mL/maceta) dos veces por semana.

La solución de ethephon no causó grandes cambios en el crecimiento de las plantas, aunque sí un descenso en el peso de la parte aérea de las plantas en la segunda cosecha, tanto en el cultivar silvestre, como en el transgénico ETR6AS (**Figura IV.1.7**). Las plantas ETR6AS sin tratar mostraron niveles inferiores de peso fresco de parte aérea comparado con las silvestres a los 56 dpi.

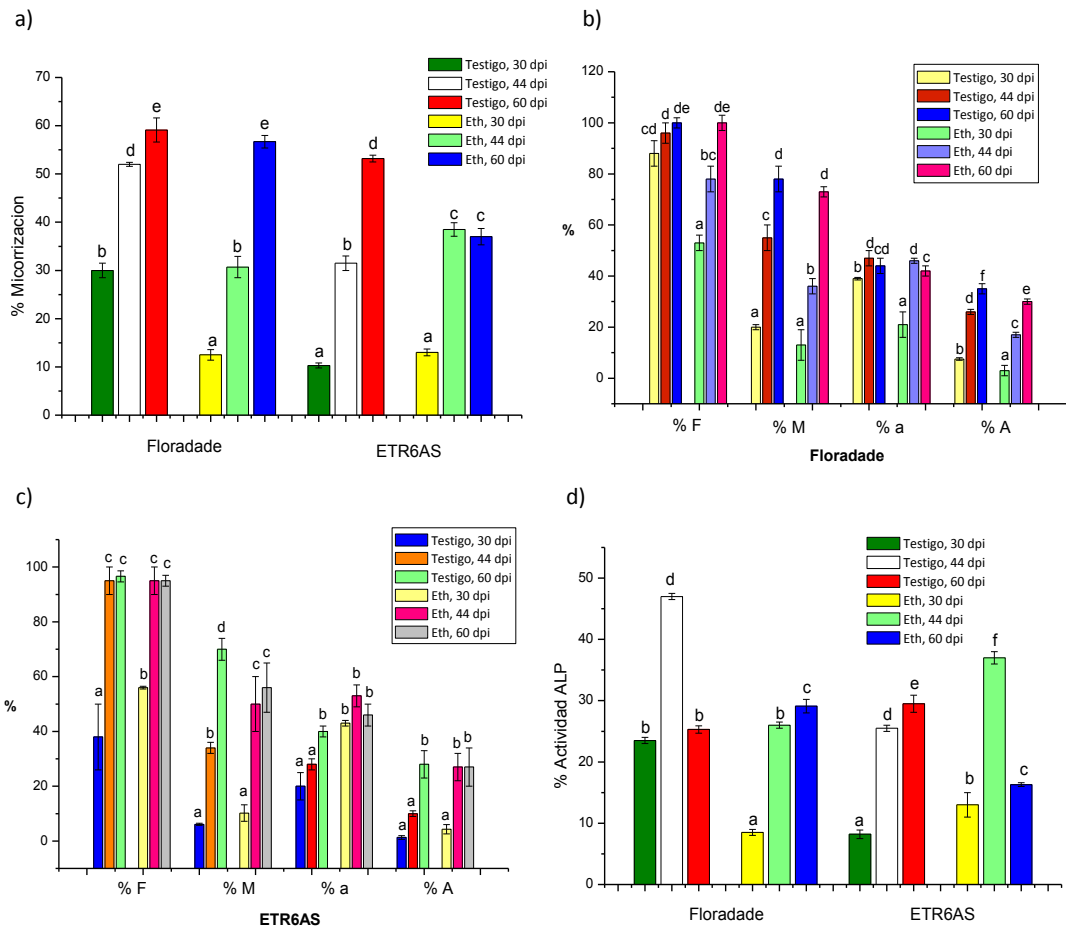


**Figura IV.1.7.** Peso fresco de plantas silvestres y sensibles a etileno (ETR6AS) como respuesta a la adición de etileno exógeno (ethephon 0.07uM) colonizadas con *R. irregularis* y cosechadas a distinto tiempo tras la inoculación (dpi). a) Peso fresco de la parte aérea; b) Peso fresco de la raíz. Los valores representan las medias de 4 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

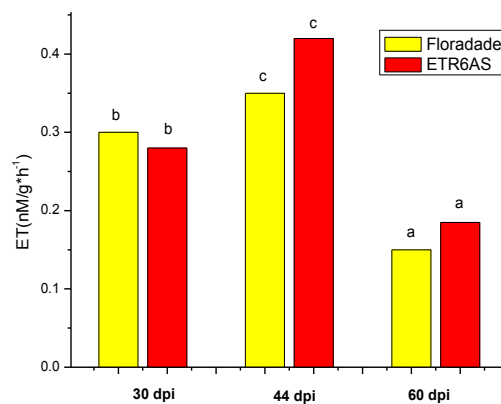
Por otro lado, el patrón de colonización por el hongo micorrícico *R. irregularis* se vio alterado (**Figura IV.1.8.a**). A continuación se muestran los resultados de los parámetros de

micorrización determinados en plantas silvestres Floradade y en mutantes ETR6AS tratadas y no tratadas con ethephon 0.07 mM (**Figura IV.1.8**). El ethephon afectó al porcentaje de raíz micorrizada de Floradade en la primera cosecha, aunque posteriormente no hubo efecto. A los 30 dpi, ETR6AS no mostró diferencias en micorrización total de la raíz. A partir de los 44 dpi, el etileno exógeno provocó un descenso de la micorrización en el mutante en ETR6AS que se mantuvo hasta los 60 dpi (**Figura IV.1.8.a**). En plantas silvestres, la aplicación de ethephon causó un descenso tanto de la frecuencia de micorrización (% F) como de la intensidad (% M) en la primera y segunda cosecha, y solo afectó a la intensidad arbuscular en las zonas micorrizadas (% a) a los 30 dpi. En consecuencia, la frecuencia arbuscular en el total de la raíz (% A) se afectó negativamente en la primera y segunda cosecha (**Figura IV.1.8.b**). Por el contrario, tanto la frecuencia, intensidad y frecuencia arbuscular se incrementaron en plantas ETR6AS tratadas con ethephon al inicio de la colonización (30 dpi), e incluso en la cosecha intermedia, aunque a partir de esta segunda cosecha (44 dpi) los niveles tienden a igualarse entre el testigo y las plantas tratadas con ethephon (**Figura IV.1.8.c**). En general, los parámetros de frecuencia, intensidad y frecuencia arbuscular fueron más bajos en las plantas ETR6AS no tratadas que en las plantas silvestres durante las primeras cosechas, lo que indica menor capacidad de micorrización de los mutantes sensibles a etileno. La eficiencia de la funcionalidad de la simbiosis indicada por la actividad de la fosfatasa alcalina fúngica (ALP) en plantas ETR6AS tratadas con ethephon aumentó a los 30 dpi por encima del testigo tratado y a los 44 dpi alcanzó valores significativos de casi 1.5 veces más que el testigo respectivo. A los 60 dpi, los valores en plantas ETR6AS tratadas disminuyeron por debajo de los valores del testigo (**Figura IV.1.8.d**).

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 el mutante ETR6AS, se tomaron medidas de la acumulación de etileno, no encontrándose diferencias significativas entre los genotipos durante la duración de todo el experimento (**Figura IV.1.9**).



**Figura IV.1.8.** Parámetros de micorrización en la raíz de plantas de tomate de la variedad silvestre Floradade y mutantes sensibles a etileno ETR6AS, tratadas con ethephon 0.07 mM (ETH) colonizadas con *R. irregularis*. a) Porcentaje de raíz micorrizada; b) Parámetros de micorrización en la variedad Floradade: frecuencia de micorrización (% F); Intensidad de micorrización (% M); Intensidad arbuscular en la zona micorrizada (% a); Intensidad arbuscular en el sistema radical (% A); c) Parámetros de micorrización en el mutante ETR6AS, (% F), (% M), (% a) y (% A); d) Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP). Los datos representados son media de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).



**Figura IV.1.9.** Etileno desprendido de raíces de plantas silvestres Floradade y mutantes ETR6AS colonizadas por *R. irregularis* no tratadas con ethephon y cosechadas a distinto tiempo tras la inoculación (dpi). Los valores representan las medias de 4 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

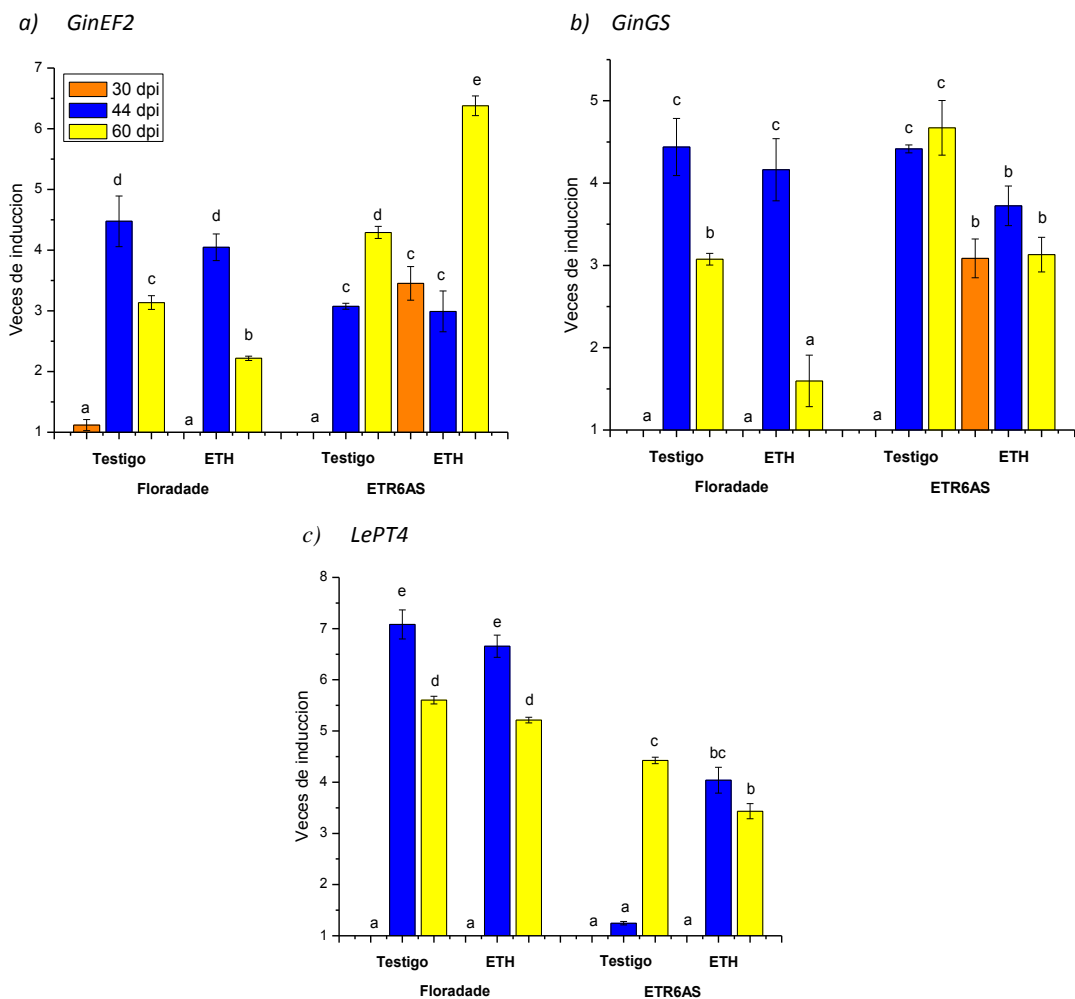
#### **IV.1.2.1. Análisis de la expresión de genes marcadores de la micorrización en plantas de *Solanum lycopersicum* de sensibilidad incrementada a etileno e inoculadas con *R. irregularis***

Para complementar el estudio sobre el efecto del etileno en plantas con sensibilidad incrementada a dicho compuesto, evaluamos a nivel molecular el desarrollo de la micorrización. Para ello, analizamos la variación en el patrón de expresión de genes fúngicos y vegetales marcadores del desarrollo del hongo y de la actividad arbuscular en plantas mutantes muy sensibles a etileno de *Solanum lycopersicum* inoculadas con *R. irregularis* y tratadas con ethephon (**Figura IV.1.10**). La tasa de colonización por el hongo se determinó a nivel molecular cuantificando la acumulación de ARNm para el gen codificante del factor de elongación 1 $\alpha$  de *G. intraradices* (*R. irregularis*) (gen *GinEF2*) (**Gráfica IV.1.10.a**). Para examinar tanto la presencia como la funcionalidad de los arbusculos en las raíces micorrizadas, se cuantificó la cantidad de transcrito de los genes glutamina sintetasa de *G. intraradices* (*G. irregularis*) (gen *GinGS*) y del transportador de fosfato específico de arbusculos de plantas de tomate, *LePT4*. Ambos genes han sido descritos por otros investigadores como de expresión asociada a las células con arbusculos (Nagy *et al.*, 2005; Gomez *et al.*, 2009) (**Gráfica IV.1.10.b y c**). El nivel de expresión se normalizó respecto a la cantidad de ARNm del gen del factor de elongación de tomate 1 $\alpha$ , *LeEF $\alpha$ 1*. El cambio inducido en la expresión génica se calculó usando el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , mostrándose el valor de expresión relativa entre tratamientos.

El patrón de expresión del gen *GinEF2* no se alteró drásticamente con la adición de etileno exógeno en el silvestre Floradade. En los tratamientos testigo sin tratar, el gen muestra una expresión basal a los 30 dpi que aumenta casi 5 veces a los 44 dpi para después descender a los 60 dpi, lo que indica menor actividad biológica del hongo a los 60 que a los 44 dpi. En los tratamientos con ethephon, solo ocurrió un descenso de la expresión a los 60 dpi. En el mutante ETR6AS, la expresión *GinEF2* en los tratamientos sin tratar fue menor que en la variedad silvestre, aunque el patrón de expresión fue similar: incremento a 44 dpi respecto a 30 dpi y menor expresión a los 60 que a los 44 dpi. La aplicación de ethephon afectó de manera muy significativa y positiva la expresión del gen en el mutante ETR6AS a los 60 dpi, con un incremento de hasta 6.5 veces más que el testigo correspondiente (**Figura IV.1.10.a**).

La expresión del gen *GinGS*, relacionado con la funcionalidad de los arbusculos, mostró un comportamiento similar al del gen *GinEF2* en el genotipo silvestre Floradade, donde la adición de etileno exógeno redujo su expresión únicamente a los 60 dpi. En el caso del mutante ETR6AS, la expresión fue menor que en el silvestre Floradade a todos los tiempos, y la

aplicación de ethephon disminuyó levemente la acumulación de transcritos en todas las cosechas. (**Figura IV.1.10.b**). Por su parte, el gen *LePT4* mostró un comportamiento similar a los genes anteriores en el genotipo silvestre Floradade, ya que a los 44 dpi se encontraron los niveles más altos de expresión en plantas sin tratar, y la aplicación de ethephon solo afectó de manera muy leve a la expresión del gen. En el caso del mutante ETR6AS, los niveles de expresión del gen *LePT4* fueron más bajos que en el cultivar silvestre, y la adición de etileno exógeno favoreció la expresión del gen *LePT4* a los 44 dpi (**Figura IV.1.10.c**).



**Figura IV.1.10.** Patrón de expresión de genes marcadores del desarrollo de la micorrización y el transporte de fósforo en plantas de tomate silvestres de la variedad Floradade y ETR6AS tratadas con ethephon 0.07 mM (ETH) colonizadas con *R. irregularis*. a) *GinEF2*, b) *GinGS* y c) *LePT4*. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ). El valor de expresión génica está representado como veces de inducción/represión de cada gen respecto al tratamiento con menor nivel de expresión, al cual se le atribuye un nivel de expresión igual a 1.

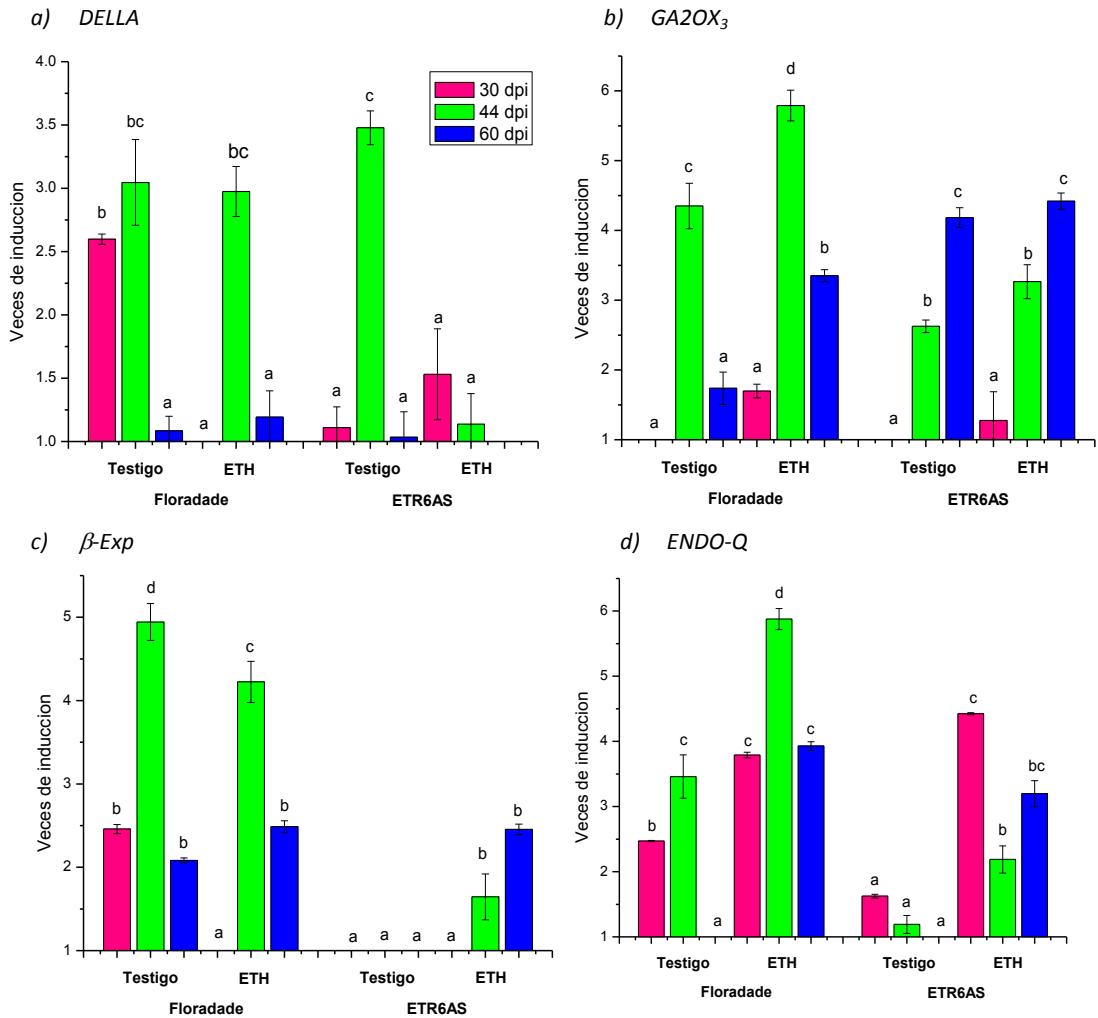


#### IV.1.2.2. Expresión de genes vegetales de defensa y marcadores de metabolismo hormonal en plantas de *Solanum lycopersicum* de sensibilidad incrementada a etileno e inoculadas con *R. irregularis*

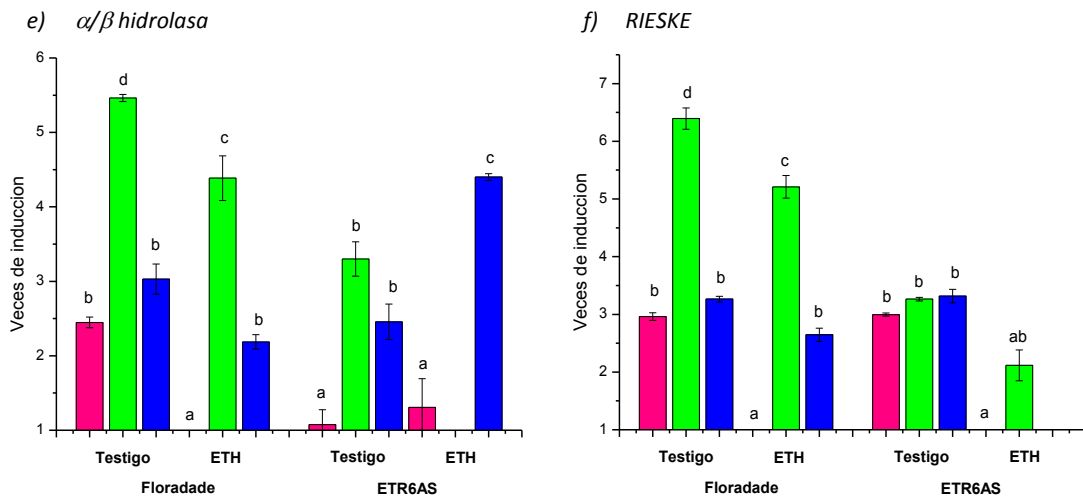
Es bien conocida la relación entre la activación de ciertos mecanismos de defensa en las plantas y la señalización mediada por el etileno, por lo que decidimos evaluar la expresión de un grupo de genes vegetales marcadores de respuesta defensiva y metabolismo hormonal cuya expresión está asociada al proceso de micorrización y evaluar su expresión en plantas tratadas con etileno exógeno y plantas mutantes con genotipo de alta sensibilidad a etileno. Analizamos el patrón de expresión de los genes relacionados con la ruta de biosíntesis y catabolismo (degradación) de giberelinas (*DELLA* y *GA2OX<sub>3</sub>* (Serrani *et al.*, 2010); un gen relacionado con respuesta defensiva y metabolismo de la pared celular *β-Exp* (beta-expansina (García-Garrido *et al.*, 2010); un gen relacionado con la respuesta defensiva en tomate (*ENDO-Q*, endoquitinasa-Q); un gen que codifica para una proteína de la familia  $\alpha/\beta$  hidrolasa, probablemente relacionada con la percepción de señales fitohormonales, y cuya expresión que ha sido descrita asociada al proceso de micorrización en tomate, además de un gen que codifica para una proteína con actividad oxidoreductasa de la familia de proteínas Rieske y cuya expresión está asociada al proceso de micorrización en tomate (García-Garrido *et al.*, 2010).

El patrón de expresión de los genes analizados en el genotipo Floradade se puede clasificar en dos categorías: genes que disminuyeron su expresión (o no varió respecto al testigo) cuando Floradade se trató con etileno exógeno: *DELLA*, *β-Exp*, *α/β hidrolasa* y *Rieske* (**Figura IV.1.11.a, c, e y f**); y genes que aumentaron su expresión cuando Floradade se trató con etileno exógeno: *GA2OX<sub>3</sub>* y *ENDO-Q* (**Figura IV.1.11.b y d**). En el primer grupo (*DELLA*, *β-Exp*, *α/β hidrolasa* y *Rieske*) los valores más altos de expresión se presentaron a los 44 dpi, tanto en el tratamiento con ethephon como en el testigo, aunque *DELLA* y *β-Exp* no variaron su expresión respecto al testigo, mientras que *α/β hidrolasa* y *Rieske* disminuyeron ligeramente los valores de expresión. A los 60 dpi, no se encontró variación entre el tratamiento y el testigo. En todos los genes de este grupo, la aplicación de etileno a Floradade inhibió la expresión a los 30 dpi (**Figura IV.1.11.a, c, e y f**). El segundo grupo, constituido por *GA2OX<sub>3</sub>* y *ENDO-Q* respondió positivamente a la adición de etileno exógeno y aumentó su expresión (entre 2 y 3 veces más) en Floradade en los tres tiempos de cosecha, 30, 44 y 60 dpi respecto al testigo (**Figura IV.1.11.b y d**). En el mutante ETR6AS, en términos generales, el genotipo y la

adición de etileno exógeno reprimieron la expresión de los genes, y únicamente los genes  *$\beta$ -Exp* (casi 2.5 veces a partir de 44 dpi) y *ENDO-Q* (casi 5.5 veces a los 30 dpi y 3 veces a 44 y 60 dpi) se regularon positivamente al añadir etileno exógeno.



**Figura IV.1.11.** Patrón de expresión de genes marcadores de defensa y metabolismo hormonal en plantas de tomate de la variedad Floradade y ETR6AS tratadas con ethephon 0.07 mM (ETH) y colonizadas con *R. irregularis*. a) *DELLA*, inactivación de giberelinas; b) *GA2OX<sub>3</sub>*, metabolismo de giberelinas, c)  *$\beta$ -Exp*, beta-expansina; d) *ENDO-Q*, respuesta defensiva, e)  *$\alpha/\beta$  hidrolasa* (hipotético receptor hormonal) y f) *Rieske*, proteína Rieske. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ). El valor de expresión génica está representado como veces de inducción/represión de cada gen respecto al tratamiento con menor nivel de expresión, al cual se le atribuye un nivel de expresión igual a 1.



**Figura IV.1.11. Continuación.** Patrón de expresión de genes marcadores de defensa y metabolismo hormonal en plantas de tomate de la variedad Floradade y ETR6AS tratadas con ethephon 0.07 mM (ETH) y colonizadas con *R. irregularis*. a) *DELLA*, inactivación de giberelinas; b) *GA2OX<sub>3</sub>*, metabolismo de giberelinas; c)  *$\beta$ -Exp*, *beta-expansina*; d) *ENDO-Q*, respuesta defensiva, e)  *$\alpha/\beta$  hidrolasa* (hipotético receptor hormonal) y f) *Rieske*, proteína Rieske. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ). El valor de expresión génica está representado como veces de inducción/represión de cada gen respecto al tratamiento con menor nivel de expresión, al cual se le atribuye un nivel de expresión igual a 1.

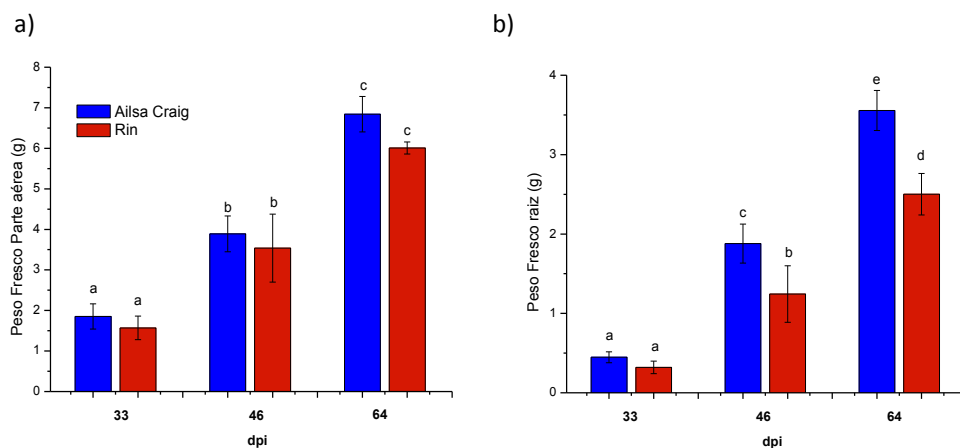
### IV.1.3. Efectos sobre la micorrización debidos a la alteración de la percepción de etileno en la planta

Para determinar la posible participación del etileno en la regulación de la micorrización, en la presente tesis doctoral se ha estudiado la evolución de la micorrización en plantas mutantes de tomate afectadas en su capacidad de percepción y respuesta a etileno, con lo que se pudo relacionar dicha alteración con su capacidad de micorrización, y aunado a lo anterior, relacionarlos con la regulación en la expresión de algunos genes relacionados con el establecimiento de la simbiosis.

#### IV.1.3.1 Micorrización en plantas mutantes deficientes en la percepción de etileno (mutante *Rin*)

La existencia del mutante natural *Rin* (*ripening-inhibitor*) de la variedad Ailsa Craig de tomate, deficiente en la percepción de etileno, permitió estudiar como la alteración en la ruta de señalización de etileno afectaba a la micorrización. El mutante *Rin* es consecuencia de una mutación recesiva que bloquea el proceso de maduración del fruto, impidiendo la acumulación

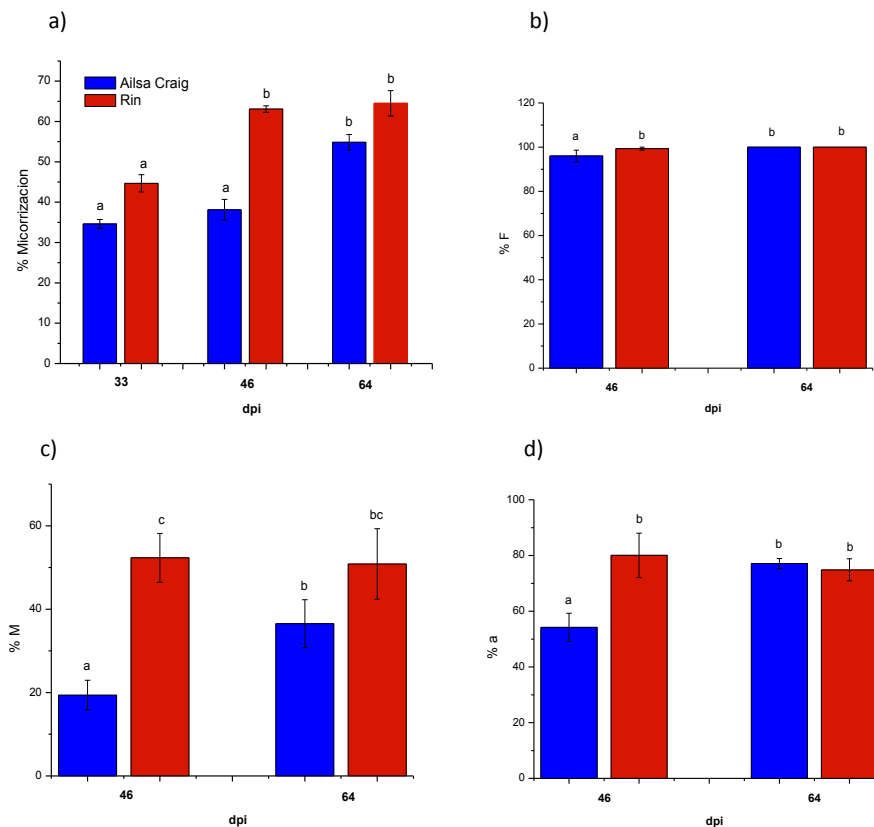
de etileno durante dicho proceso, además de impedir la respuesta de maduración ante el aporte exógeno de etileno (Vrebalov *et al.*, 2002). Se determinó la curva de micorrización para cada genotipo, silvestre y mutante *Rin*, para lo cual se contabilizó el porcentaje de raíz micorrizada por el hongo *R. irregularis* en tres cosechas consecutivas (33, 46 y 64 dpi). Se evaluó el peso fresco de las plantas silvestres y mutantes y no se encontraron diferencias significativas durante todo el experimento, excepto a los 46 y 64 dpi, donde los valores de peso fresco de raíz del mutante *Rin* fueron ligeramente menores al silvestre (**Figura IV.1.12.**).



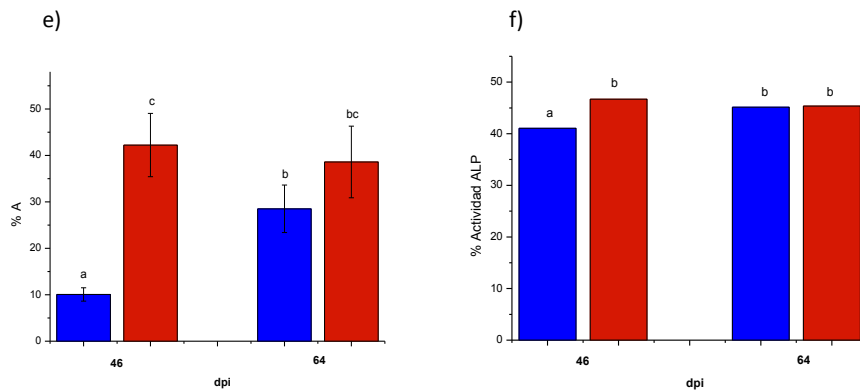
**Figura IV.1.12.** Peso fresco de plantas de tomate de la variedad silvestre Ailsa-craig y mutante *Rin* deficiente en percepción de etileno. Las plantas fueron colonizadas con *R. irregularis* y cosechadas a distinto tiempo tras la inoculación (dpi). a) Peso fresco de la parte aérea. b) Peso fresco de la raíz. Los datos representados son media de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

Si analizamos la evolución de la micorrización, se observa un aumento sustancial en el porcentaje de raíz micorrizada del genotipo mutante *Rin* respecto a la variedad silvestre Ailsa Craig, con un mayor porcentaje de micorrización de la raíz a los 33 dpi, y 46 dpi. Al final del experimento, los valores de micorrización tienden a igualarse en ambos tipos de plantas (**Figura IV.1.13.a**). Se determinaron otros parámetros de micorrización en plantas cosechadas a 46 y 64 dpi, al objeto de definir mejor el tipo de micorrización en cada variedad. La frecuencia de micorrización (% F) en raíces *Rin* fue ligeramente mayor que en raíces Ailsa Craig a los 46 dpi, pero a los 64 dpi no hubo variación entre ambas (**Figura IV.1.13.b**). Un comportamiento similar se observó en el caso de la intensidad arbuscular en la zona micorrizada (% a) (**Figura IV.1.13.d**). La intensidad de micorrización (% M) y la intensidad arbuscular en el sistema radicular (% A) muestran el mismo patrón, ya que las raíces *Rin* presentaron mayores niveles a los 46 dpi respecto a las silvestres, igualándose los niveles a los

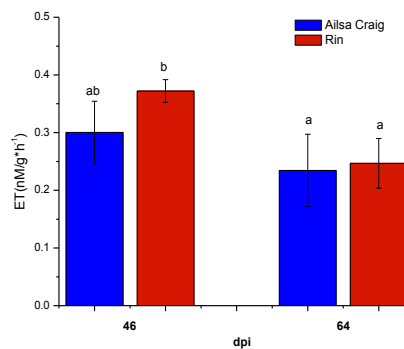
64 dpi (**Figura IV.1.13.c. y e.**, respectivamente). Las diferencias en micorrización se observaron en el estadio exponencial de colonización (**Figura IV.1.13.a**). Al final de la fase exponencial se alcanzaron niveles similares de colonización en plantas de genotipo silvestre y mutante (**Figura IV.1.13.a**). La colonización de la raíz de plantas *Rin* fue más rápida que la de Ailsa Craig, aunque los valores finales de colonización no variaron. En cuanto a la actividad fosfatasa alcalina fúngica (ALP) se observó un comportamiento similar al de los parámetros de % M, % a y % A, siendo significativamente mayor la actividad en raíces de plantas mutantes *Rin* a los 46 dpi, para después, a los 64 dpi, alcanzar valores similares en ambos tipos de plantas (**Figura IV.1.13.f**). La medida de etileno desprendido por las raíces y realizada en plantas de 46 dpi, mostró que las plantas mutantes *Rin* presentan valores de desprendimiento de etileno en raíces similares a los valores de las plantas de genotipo silvestre (**Figura IV.1.14**).



**Figura IV.1.13.** Parámetros de micorrización en la raíz de plantas de tomate de la variedad silvestre Ailsa Craig y mutante *Rin* deficiente en percepción de etileno. Las plantas fueron colonizadas con *R. irregularis* y cosechadas a distinto tiempo tras la inoculación (dpi). a) Porcentaje de longitud de raíz micorrizada; b) Frecuencia de micorrización (% F); c) Intensidad de micorrización (% M); d) Intensidad arbuscular en la zona micorrizada (% a); e) Intensidad arbuscular en el sistema radical (% A); f) Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP). Los datos representados son media de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  error estándar, y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).



**Figura IV.1.13. Continuación.** Parámetros de micorrización en la raíz de plantas de tomate de la variedad silvestre Ailsa Craig y mutante *Rin* deficiente en percepción de etileno. Las plantas fueron colonizadas con *R. irregularis* y cosechadas a distinto tiempo tras la inoculación (dpi). a) Porcentaje de longitud de raíz micorrizada; b) Frecuencia de micorrización (% F); c) Intensidad de micorrización (% M); d) Intensidad arbuscular en la zona micorrizada (% a); e) Intensidad arbuscular en el sistema radical (% A); f) Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP). Los datos representados son media de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  error estándar, y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

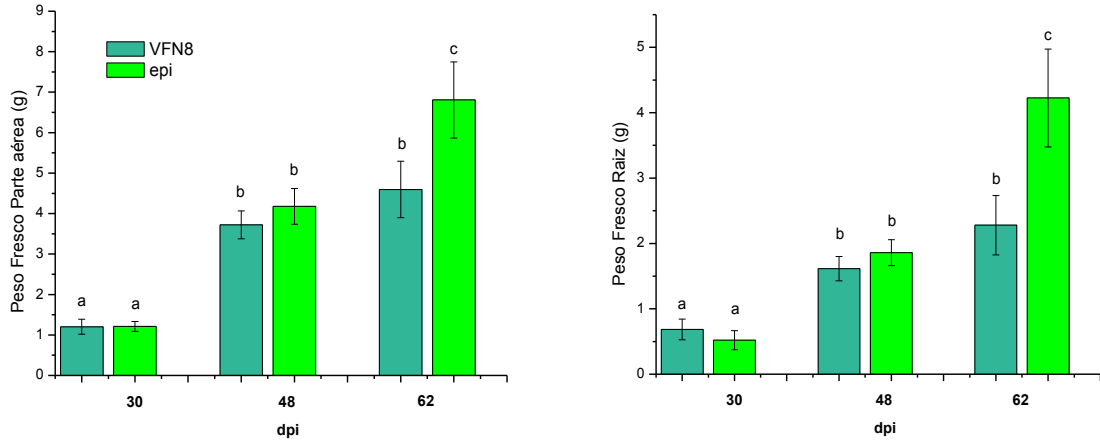


**Figura IV.1.14.** Etileno desprendido de raíces de plantas silvestres Ailsa Craig y mutantes *Rin* colonizadas por *R. irregularis* y cosechadas a distinto tiempo tras la inoculación (dpi). Los datos representados son media de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  error estándar, y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

#### IV.1.3.2 Micorrización en plantas mutantes de sensibilidad incrementada a etileno (mutante *Epi*)

El estudio del efecto sobre la micorrización debido a una sensibilidad incrementada a etileno se estudió en experimentos de micorrización con la línea mutante natural *Epi*, caracterizada por mostrar una respuesta constitutiva a etileno (Ursin, 1987). Se realizó un seguimiento de la micorrización en la variedad silvestre VFN8 y el mutante *Epi*, realizando tres cosechas consecutivas en el tiempo, a los 30, 48 y 62 días después de la inoculación con *R. irregularis*. La **Figura IV.1.15** muestra los resultados del peso fresco de los genotipos silvestre y mutante.

No se observaron diferencias entre ellos hasta los 64 dpi, donde el peso fresco de la parte aérea y de la raíz fue ligeramente mayor en *Epi* respecto a su silvestre.



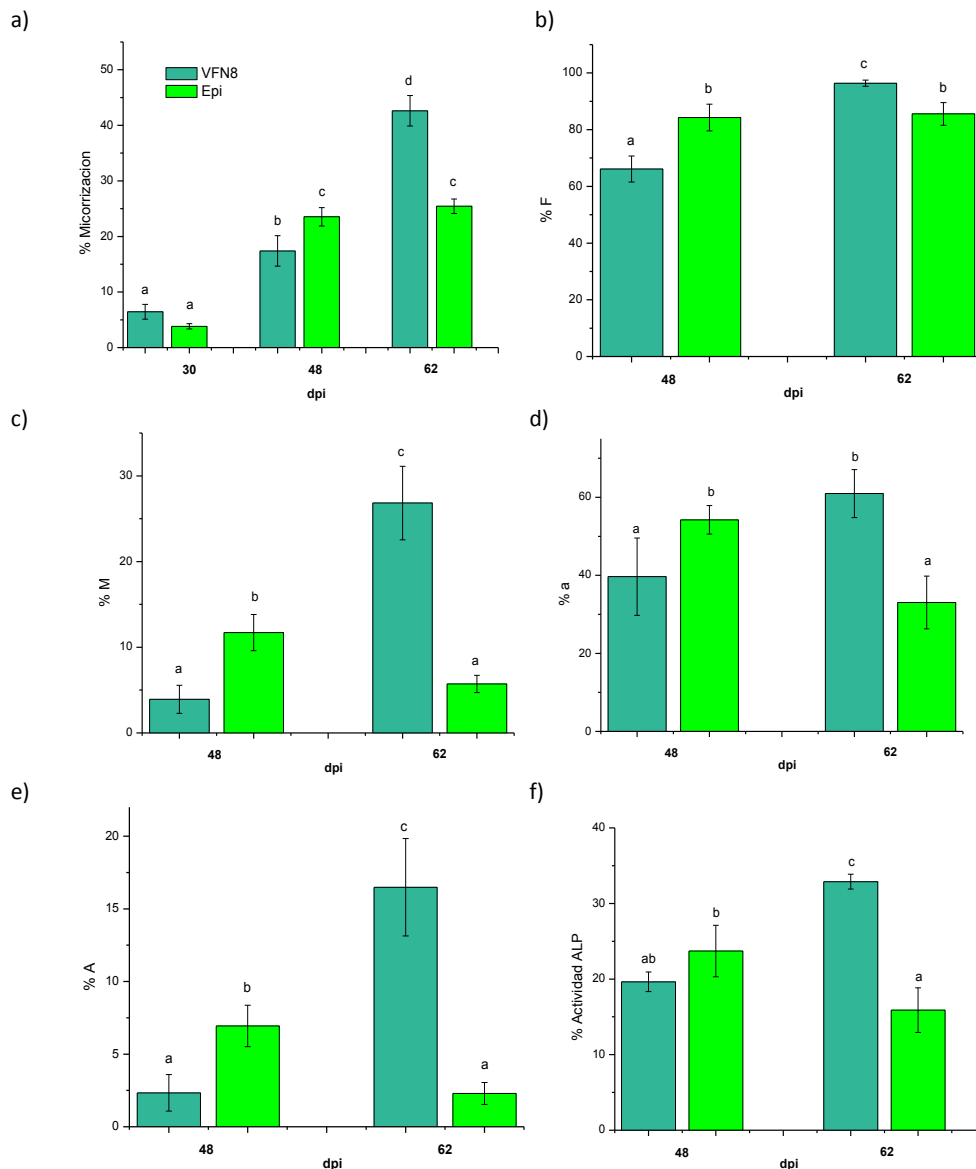
**Figura IV.1.15.** Peso fresco de plantas de tomate de la variedad silvestre VFN8 y mutante *Epi*, hipersensible a la acción de etileno. Las plantas fueron colonizadas con *R. irregularis* y cosechadas a distinto tiempo tras la inoculación (dpi). a) Peso fresco de la parte aérea, b) Peso fresco de la raíz. Los datos representados son media de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  error estándar, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

Los resultados del análisis de la micorrización se muestran en la **Figura IV.1.16**. El porcentaje de raíz micorrizada fue ligeramente inferior en plantas *Epi* respecto al genotipo silvestre a los 30 dpi, para después, a los 48 dpi, invertirse la tendencia, siendo ligeramente mayor en raíces *Epi*. A los 62 dpi, el porcentaje de micorrización en raíces *Epi* se mantiene estable respecto al valor alcanzado a los 48 dpi, mientras que en raíces silvestres se alcanzan valores mayores que en el mutante (**Figura IV.1.16.a**).

En el caso de los parámetros de frecuencia (% F), arbusculos en la zona micorrizada (% a), arbusculos totales en la raíz (% A) e intensidad de micorrización (% M), se observa una misma tendencia, pues a los 48 dpi, las raíces *Epi* muestran valores ligeramente mayores que las raíces silvestres para todos los parámetros estudiados, y posteriormente a los 62 dpi se invierte la situación, siendo las raíces silvestres las que poseen los valores mayores en todos los casos (**Figura IV.1.16.b, c, d y e**).

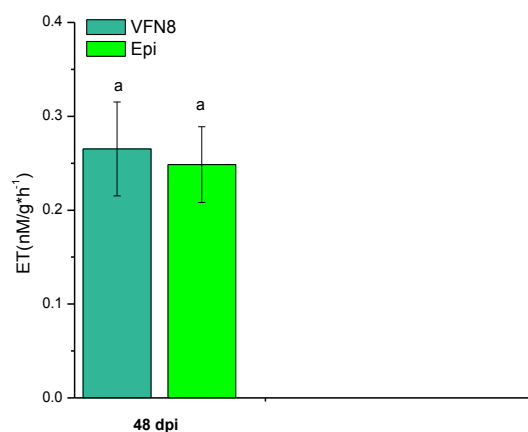
Los resultados muestran que en plantas *Epi* se produce un estancamiento en los valores de todos los parámetros de micorrización a partir de la segunda cosecha (48 dpi), hecho que no ocurre en plantas silvestres, de ahí que las diferencias se aprecien en la última

cosecha. El comportamiento de la actividad ALP fúngica fue similar al del parámetro de porcentaje de arbusculos en la zona micorrizada (% a), pues a 48 dpi se observa una actividad ligeramente mayor en la raíz de plantas mutantes *Epi*, para después (62 dpi) caer por debajo del valor observado en el genotipo silvestre (**Figura IV.1.16.f**). La medida de etileno en raíz en plantas cosechadas a los 48 días tras la inoculación con *R. irregularis* mostró que las plantas mutantes *Epi* presentaron valores similares de desprendimiento de etileno en raíz que las plantas silvestres (**Figura IV.1.17**).



**Figura IV.1.16.** Parámetros de micorrización en la raíz de plantas de tomate de la variedad silvestre VFN8 y mutantes *Epi*, hipersensible a la acción de etileno. Las plantas fueron colonizadas con *R. irregularis* y cosechadas a distinto tiempo tras la inoculación (dpi). a) Porcentaje de longitud de raíz micorrizada; b) Frecuencia de micorrización (% F); c) Intensidad de micorrización (% M); d) Intensidad arbuscular en la zona micorrizada (% a); e) Intensidad arbuscular en el sistema radical (% A); f) Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP). Los datos representados son media de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  error estándar, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).





**Figura IV.1.17.** Etileno desprendido de raíces de la planta silvestre VFN8 y su mutante isogénico *Epi*. Las plantas fueron colonizadas por *R. irregularis* y cosechadas a 48 días tras la inoculación (dpi). Los datos representados son media de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

#### IV.1.3.3. Expresión de genes vegetales marcadores de la funcionalidad de la simbiosis MA en plantas micorrizadas de distinta sensibilidad a etileno

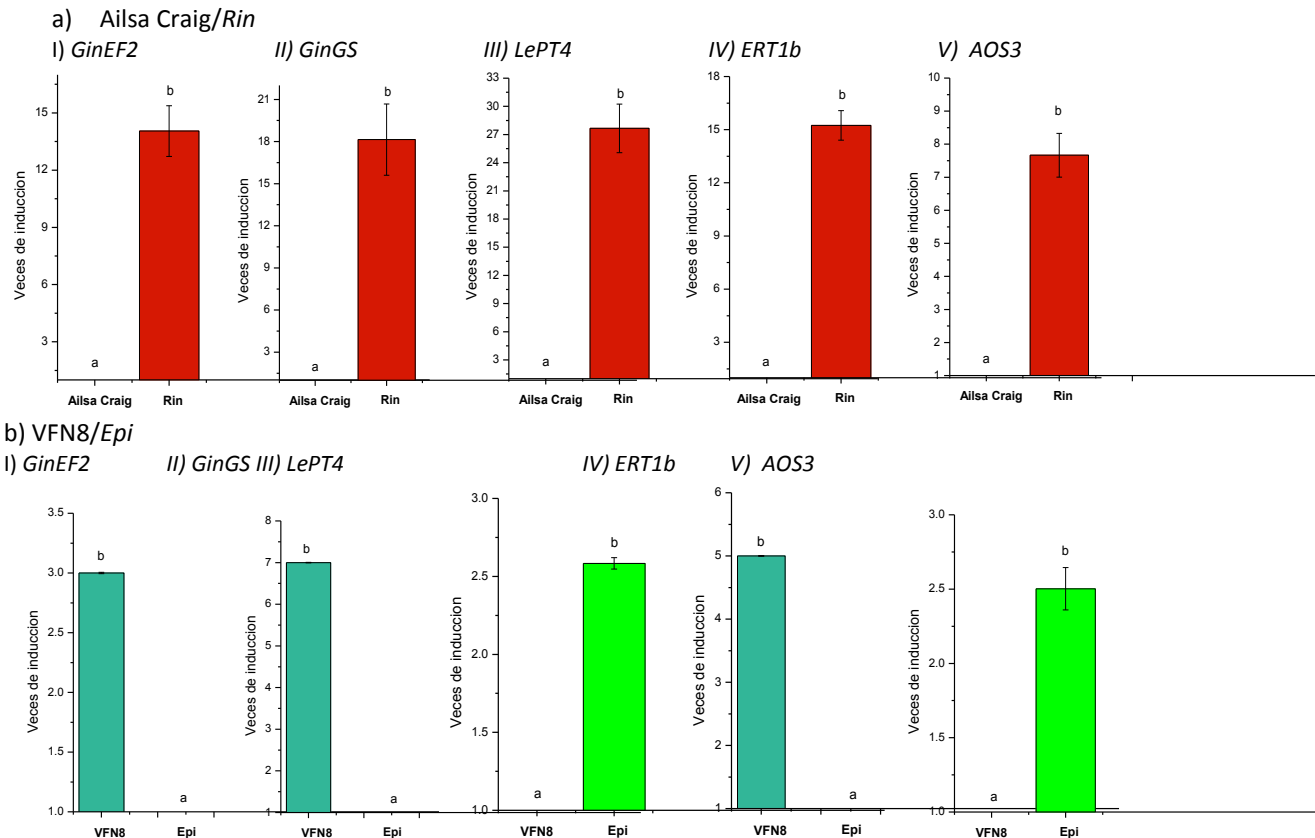
Los experimentos de cuantificación histoquímica de la micorrización se complementaron con experimentos de cuantificación de la expresión génica tanto de genes vegetales marcadores de la funcionalidad de la simbiosis MA, así como de genes fúngicos relacionados con el grado de colonización y/o actividad fúngica en la raíz. Para el estudio de la expresión de los genes *GinEF2*, *GinGS*, *LePT4*, *ERT1b* y *AOS3* se utilizó la técnica de la PCR en tiempo real (qRT-PCR). Como marcador interno de la cantidad de ARN de la raíz se cuantificó la expresión del gen constitutivo que codifica para el factor de elongación de tomate, *LeEF $\alpha$ -1* (X14449). Los experimentos de cuantificación de la expresión génica se realizaron en aquellos tiempos de cosecha en los que se observó mayor diferencia en los parámetros de micorrización entre los genotipos mutantes y su correspondiente genotipo silvestre (**Figura IV.1.13 y .16**). Así, en el experimento con plantas Ailsa Craig y mutantes *Rin*, se midió la expresión génica a los 46 días tras la inoculación con *R. irregularis*, y en el experimento con plantas VNF8 y mutantes *Epi* la determinación se realizó a los 62 días tras la inoculación (**Figura IV.1.18**).

Los resultados mostraron mayores niveles de expresión de los genes relacionados con la presencia del hongo en la raíz (*GinEF2* y *GinGS*) en las plantas mutantes deficientes en la percepción de etileno (*Rin*) comparado con su testigo silvestre Ailsa Craig. En concreto el gen

*GinEF2*, que codifica un factor de elongación del hongo se expresó alrededor de 13 veces más respecto a la raíz micorrizada de plantas silvestres Ailsa Craig (**Figura IV.1.18.a.I**). El mismo comportamiento se observó en el caso del gen *GinGS*, que codifica una glutamina sintetasa del hongo expresada en células con arbusculos. En mutantes *Rin*, dicho gen se expresó 17.2 veces más que en el genotipo silvestre (**Figura IV.1.18.a.II**).

Se analizaron los genes *LePT4*, *ERT1b* y *AOS3*, pertenecientes a la planta y relacionados con la funcionalidad de la simbiosis. La expresión del gen *LePT4* que codifica para una proteína transportadora de fósforo en tomate, inducida en plantas micorrizadas y cuya actividad está relacionada con un correcto funcionamiento de los arbusculos mostró mayores niveles de expresión en las plantas mutantes *Rin* (expresado 26.7 veces más) respecto a las silvestres Ailsa Craig (**Figura IV.1.18.a.III**). El gen *ERT1b* de tomate codifica para una proteína con actividad glucosiltransferasa cuya expresión está asociada al proceso de micorrización (García Garrido *et al.*, 2010). Este gen se expresó 14 veces más en plantas *Rin* que en las silvestres Ailsa Craig (**Figura IV.1.18.a.IV**). El gen *AOS3*, que codifica para la Allene oxido sintasa que participa en la ruta de la síntesis de 9-oxilipinas (lípidos) activada durante la micorrización (León-Morcillo *et al.*, 2012), se expresó 6.6 veces más en mutantes *Rin* respecto a las silvestres (**Figura IV.1.18.a.V**).

En plantas hipersensibles a etileno, *Epi*, se observó una represión del gen *GinEF2* de alrededor de 2 veces respecto a las plantas silvestres correspondientes (**Figura IV.1.18.b.I**). En el caso del gen *GinGS*, la represión alcanzó un nivel de 6 veces respecto a las silvestres correspondientes (**Figura IV.1.18.b.II**). Por otra parte, la expresión del gen *LePT4* no disminuyó respecto a plantas silvestres VFN8, sino que incluso se observó un leve incremento de 1.5 veces (**Figura IV.1.18.b.III**). El gen *ERT1b* se reprimió 4 veces en mutantes *Epi* respecto a las silvestres VFN8 (**Figura IV.1.18.b.IV**). El gen *AOS3* se expresó 1.5 veces más en mutantes *Epi* respecto a las silvestres VFN8 (**Figura IV.1.18.b.V**).



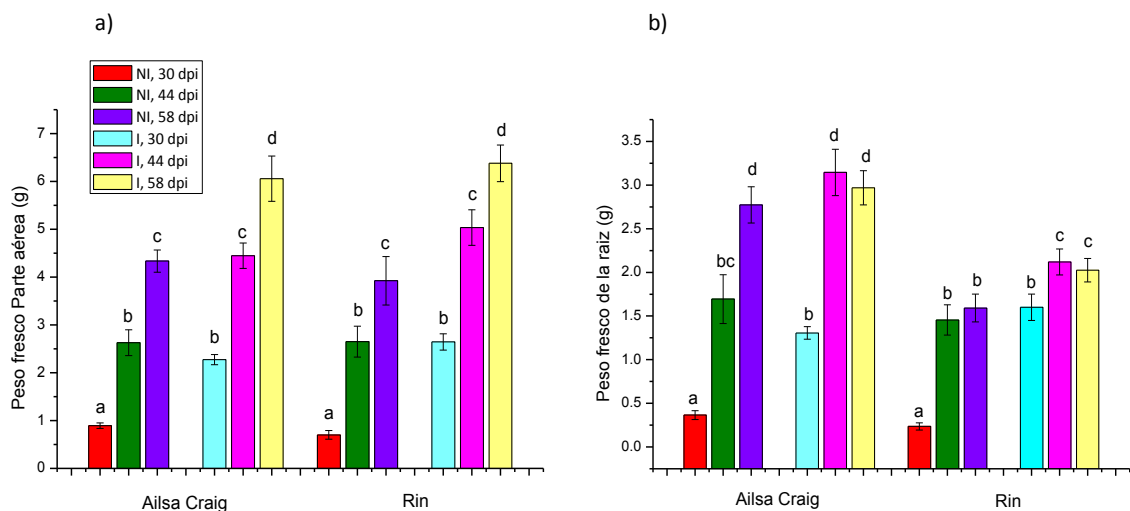
**Figura IV.1.18.** Cuantificación de la expresión génica en plantas silvestres y mutantes todas inoculadas con *R. irregularis*, de genes vegetales relacionados con la funcionalidad de la simbiosis MA, así como de genes fúngicos relacionados con la capacidad de colonización y/o actividad fúngica en la raíz. a) Ailsa Craig/Rin cosechadas a los 46 dpi. b) VFN8/Epi cosechadas a los 62 dpi. Genes analizados: I) *GinEF2*, II) *GinGS*, III) *LePT4*, IV) *ERT1b* y V) *AOS3*. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ). El valor de expresión génica está representado como veces de inducción/represión de cada gen respecto al genotipo con menor nivel de expresión, al cual se le atribuye un nivel de expresión igual a 1.

#### IV.1.4. Comparación entre genotipos de plantas con distinta sensibilidad a etileno inoculadas y no inoculadas con *R. irregularis*

El siguiente paso en nuestra investigación fue averiguar si la presencia del hongo en la planta provocaba algún cambio en la biosíntesis o señalización del etileno, y por tanto determinar el sentido de las alteraciones en el metabolismo del etileno debidas a la presencia del hongo. Para ello se estudió la evolución de la micorrización en plantas silvestres y mutantes de tomate afectadas en su capacidad de percepción y respuesta a etileno inoculadas y no inoculadas con el hongo micorrícico arbuscular *R. irregularis*, para diferenciar así respuestas inducidas por la micorrización de la raíz de respuestas constitutivas debidas a la alteración de la sensibilidad a etileno en los distintos mutantes. Se analizaron diversos parámetros de micorrización, y se

complementó con el análisis molecular de genes marcadores de la acción de etileno y marcadores de la funcionalidad de la simbiosis.

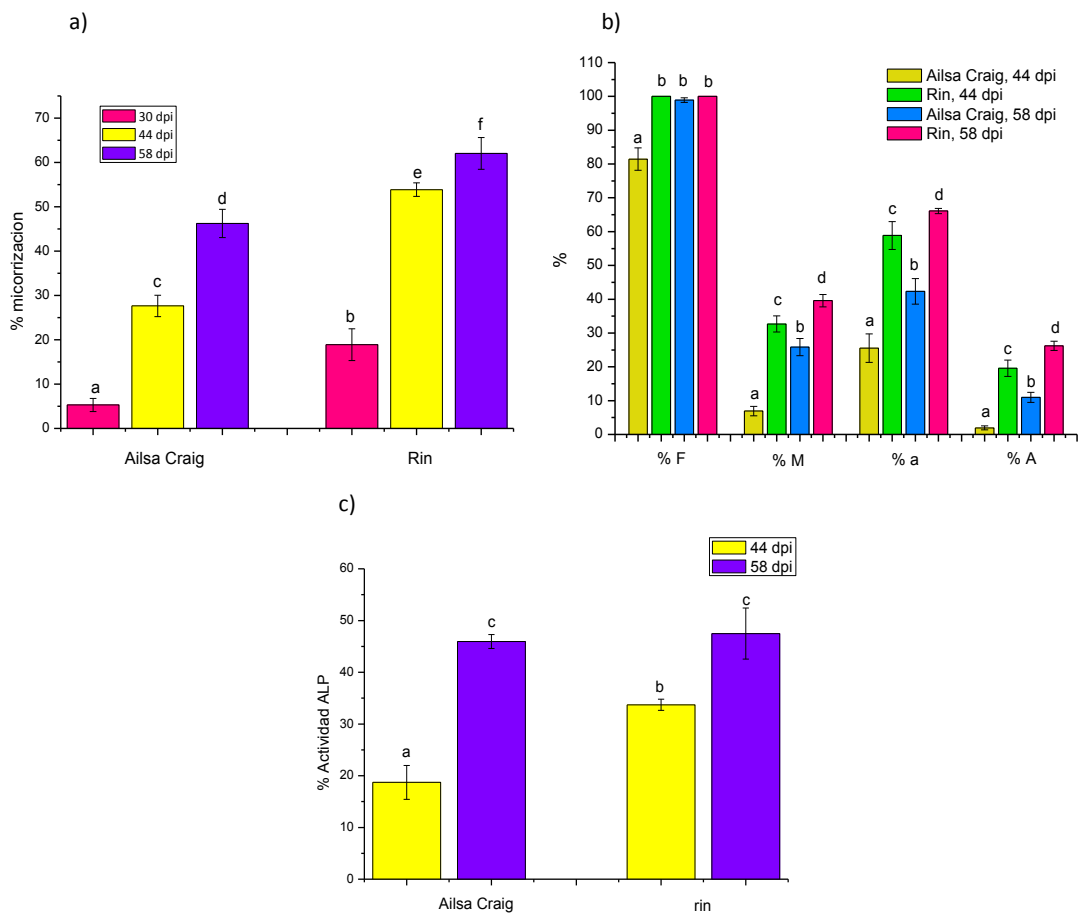
En primer lugar se realizó el estudio comparado de micorrización de plantas Ailsa Craig y mutantes *Rin*. Se analizó el peso fresco de la parte aérea y de la raíz de cada genotipo inoculado y no inoculado para determinar su relación con el etileno y la micorrización. En la comparación del peso fresco de la parte aérea no hubo diferencias entre el comportamiento de los genotipos silvestres y mutantes, observándose una respuesta positiva a la inoculación en ambos, pues los niveles de peso fresco en plantas inoculadas fueron mayores que en plantas no inoculadas para ambos genotipos y en el mismo nivel de incremento, y por tanto en ambos se apreció la misma respuesta a la micorrización. En el caso del peso fresco de la raíz, el mutante *Rin* mostró una disminución significativa del valor respecto a su silvestre, independientemente de la micorrización, y que se manifestó a los 44 y 58 dpi. No obstante, a los 30 dpi su comportamiento fue similar al silvestre Ailsa Craig, mostrando una respuesta positiva a la micorrización en ese tiempo de cosecha (**Figura IV.1.19**).



**Figura IV.1.19.** Peso fresco de la parte aérea y de raíz de plantas de tomate de los genotipos Ailsa Craig y mutante *Rin* no colonizadas (NI) y colonizadas (I) con *R. irregularis* y cosechadas a distinto tiempo tras la inoculación (dpi). a) Peso fresco de la parte aérea. b) Peso fresco de la raíz. Los datos representados son media de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  error estándar., y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

Al igual que en experimentos previos, la micorrización fue mayor en el mutante *Rin*, alterado en la percepción al etileno, respecto a la variedad silvestre a los 30 y 44 dpi, en tanto que a los 58 dpi la micorrización en *Rin* tiende a igualar los niveles con el cultivar silvestre

(Figura IV.1.20.a). La frecuencia de micorrización (% F) en raíces *Rin* fue mayor que en raíces Ailsa Craig a los 44 dpi, pero a los 58 dpi no hubo variación entre ambos genotipos (Figura IV.1.20.b). Los parámetros de micorrización como la intensidad arbuscular en la zona micorrizada (% a), la intensidad de micorrización (% M) y la intensidad arbuscular en el sistema radicular (% A) mostraron mayores valores en el mutante *Rin* respecto a Ailsa Craig a los 44 y 58 dpi. El parámetro % a se vio fuertemente estimulado por el genotipo *Rin*, ya que alcanzó valores entre el 60 y 70 % en *Rin* respecto a los 25-45 % en el genotipo silvestre Ailsa Craig, a los 44 y 58 dpi respectivamente (Figura IV.1.20.b).



**Figura IV.1.20.** Parámetros de micorrización en la raíz de plantas de tomate de la variedad silvestre Ailsa Craig y mutante *Rin* colonizadas con *R. irregularis* y cosechadas a distinto tiempo tras la inoculación (dpi). a) Porcentaje de longitud de raíz micorrizada; b) Parámetros de micorrización de Ailsa Craig y Rin; Frecuencia de micorrización (% F); Intensidad de micorrización (% M); Intensidad arbuscular en la zona micorrizada (% a); Intensidad arbuscular en el sistema radical (% A); y c) Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP). Los datos representados son media de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  error estándar, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

Las diferencias en micorrización se observaron sobre todo en el estadio exponencial de colonización a los 44 dpi, siendo estas diferencias menos severas a los 58 dpi. La actividad

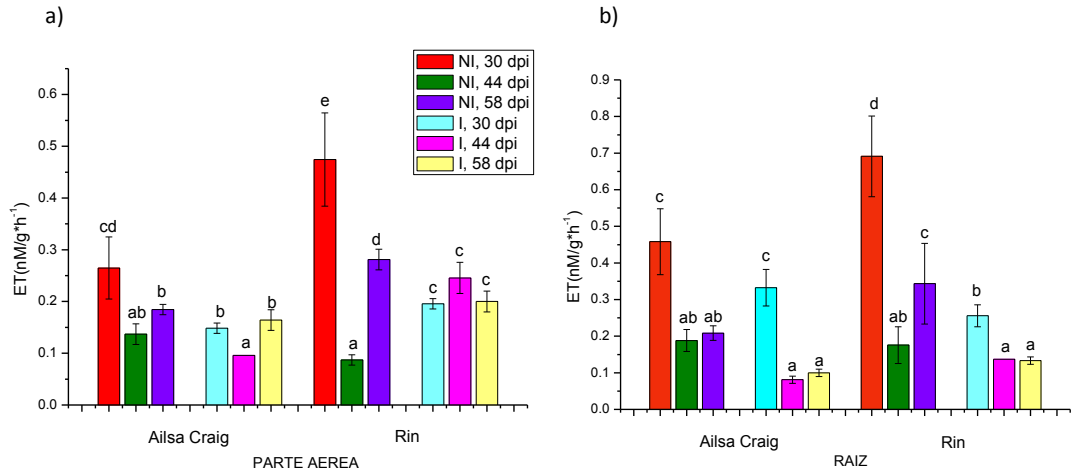
fosfatasa alcalina fúngica (ALP) mostró un comportamiento similar a los diversos parámetros de micorrización, aumentando en el genotipo *Rin* a los 44 dpi respecto a Ailsa Craig e igualándose al silvestre a los 58 dpi (**Figura IV.1.20.d**).

Aunado a lo anterior, se analizó la cantidad de etileno desprendido tanto en la parte aérea como en las raíces de ambos genotipos, tratando de correlacionar el etileno desprendido de las plantas inoculadas y el porcentaje de micorrización. La cuantificación de la acumulación de etileno en la parte aérea de plantas no micorrizadas mostró mayor concentración de etileno en *Rin* comparado con Ailsa Craig a los 30 dpi. En el caso de las plantas micorrizadas, la biosíntesis de etileno en la parte aérea de *Rin* fue mayor respecto a su silvestre a los todos los tiempos. De manera interesante, la curva de etileno desprendido en la parte aérea de las plantas inoculadas sigue una tendencia similar a la curva de micorrización de estos mismos genotipos (**Figura IV.1.21.a**).

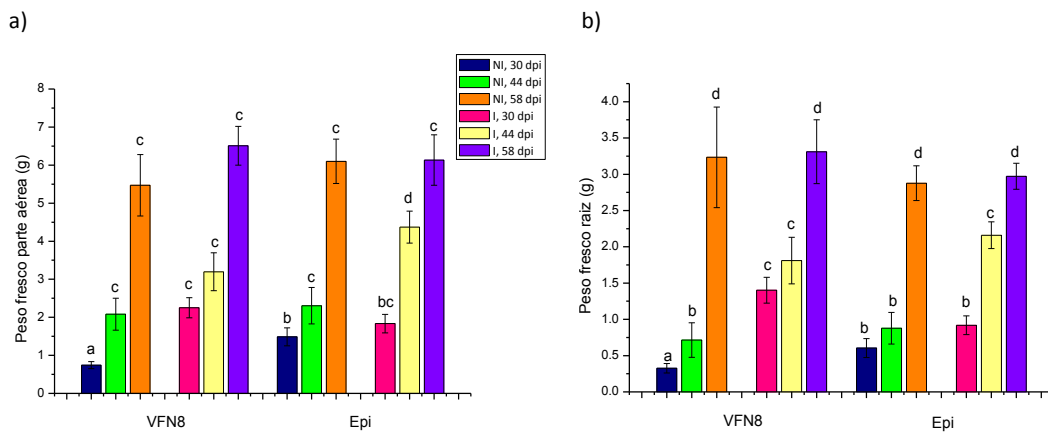
En ambos genotipos, la micorrización provocó una disminución de la acumulación de etileno en la parte aérea de las plantas durante la primera cosecha (30 dpi). Por otro lado, la medida de etileno desprendido por las raíces en plantas no inoculadas mostró que el genotipo mutante *Rin* presentó un mayor valor de desprendimiento de etileno a los 30 dpi respecto a su silvestre pero dicho valor se igualó a los 44 y sufrió un ligero aumento a los 58 dpi. En el caso de los genotipos inoculados, *Rin* mostró un valor ligeramente menor de etileno a los 30 dpi respecto al silvestre y también se igualaron los niveles a los 44 y 58 dpi en ambos genotipos. La micorrización, al igual que el caso de la parte aérea, provocó en ambos genotipos un descenso generalizado en los niveles de etileno, siendo este más significativo a los 30 dpi (**Figura IV.1.21.b**).

En un experimento paralelo se realizó el mismo análisis de micorrización de los genotipos silvestre VFN8 y mutante *Epi*. En relación al peso fresco de la parte aérea, el genotipo VFN8 inoculado aumentó su peso fresco a los 30 dpi respecto a su estado no inoculado, aunque a los 44 y 58 dpi no hubo diferencias entre ambos estados. El genotipo *Epi* únicamente aumentó significativamente su peso fresco a los 44 dpi en el estado inoculado, pues a los 30 y 58 dpi no mostró diferencias significativas entre ambas condiciones (**Figura IV.1.22a**). En el caso del peso fresco de la raíz, el genotipo silvestre VFN8 mostró mayores valores de peso fresco a los 30 y 44 dpi mayores cuando estuvo inoculado respecto al estado no inoculado, aunque a los 58 dpi el peso fresco se igualó en ambas condiciones. En *Epi*, a los 30 dpi el peso fresco no varió entre ambos estados de inoculación aunque a los 44 dpi aumentó en el estado inoculado casi dos

veces más que el mismo genotipo sin inocular, en tanto que a los 58 dpi se igualó el peso en ambas condiciones de inoculación (**Figura IV.1.22b**).



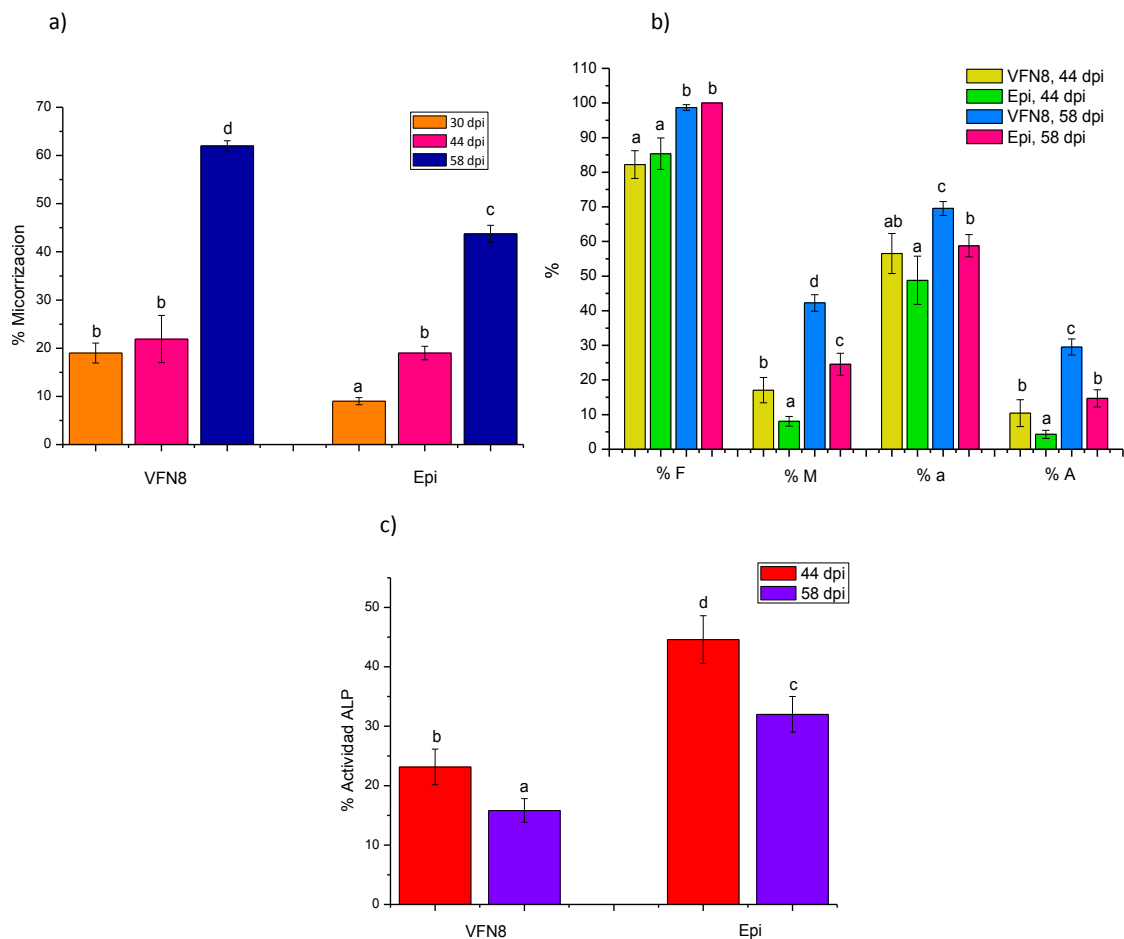
**Figura IV.1.21.** Etileno desprendido de raíces de plantas silvestres Ailsa Craig y mutantes *Rin* no colonizadas (NI) y colonizadas (I) por *R. irregularis* y cosechadas a distinto tiempo tras la inoculación (dpi). a) Etileno desprendido por la parte aérea de la planta. b) Etileno desprendido por las raíces de las plantas. Los datos representados son media de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).



**Figura IV.1.22.** Peso fresco de los genotipos VFN8 y mutante *Epi* no colonizadas (NI) y colonizadas (I) con *R. irregularis* y cosechadas a distinto tiempo tras la inoculación (dpi). a) Peso fresco de la parte aérea. b) Peso fresco de la raíz. Los datos representados son media de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

El valor de micorrización total alcanzado en la raíz de plantas *Epi* a los 30 dpi fue un 50 % inferior respecto al valor alcanzado por el silvestre, en tanto que a los 44 dpi los valores se igualaron en ambos genotipos. A los 63 dpi, el porcentaje de micorrización en raíces *Epi* fue menor en un 33 % respecto al silvestre (**Figura IV.1.23.a**). Los parámetros de frecuencia (% F)

no mostraron diferencias significativas entre los genotipos analizados a los 44 y 58 dpi, en tanto que el número de arbuscúlos en la zona micorrizada (% a), arbuscúlos totales en la raíz (% A) e intensidad de micorrización (% M) mostraron la misma tendencia, pues a los 44 dpi, las raíces *Epi* muestran valores menores respecto a las raíces silvestres para estos parámetros, y posteriormente a los 56 dpi esta tendencia se acentúa, pues las raíces silvestres aumentan considerablemente sus valores respecto a los niveles observados a 44 dpi, en tanto que en los valores en *Epi* no sufren un incremento considerable con el tiempo (**Figura IV.1.23.b**). Los parámetros % M y % A fueron los más afectados negativamente en el genotipo *Epi* respecto a la situación silvestre. El análisis histoquímico de la actividad ALP mostró que esta actividad enzimática vio regulada negativamente en el genotipo *Epi* a los 44 y 58 dpi comparado con su silvestre VFN8 (**Figura IV.1.23.c**).

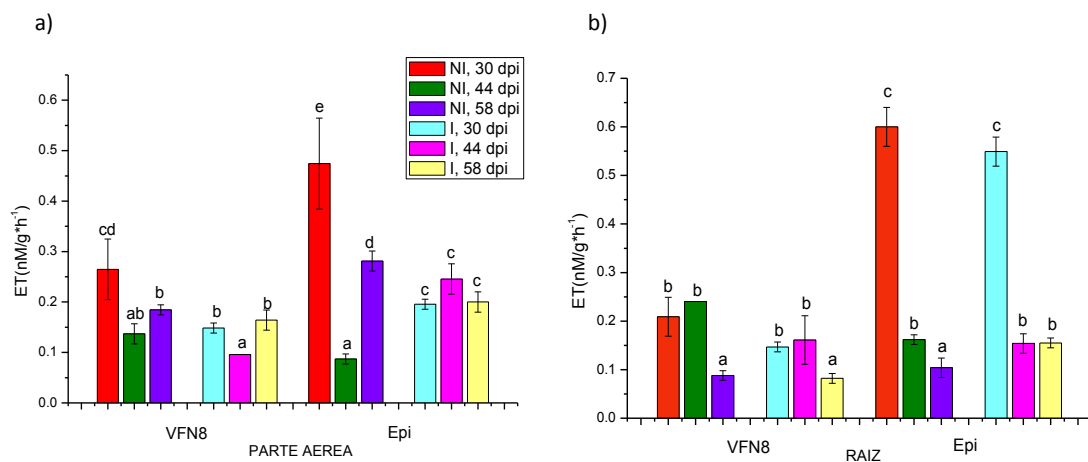


**Figura IV.1.23.** Parámetros de micorrización en la raíz de plantas de tomate de la variedad silvestre VFN8 y mutante *Epi*, hipersensible a la acción de etileno, colonizadas con *R. irregularis* y cosechadas a distinto tiempo tras la inoculación (dpi). a) Porcentaje de longitud de raíz micorrizada; b) Parámetros de micorrización de VFN8 y *Epi* ; Frecuencia de micorrización (% F); Intensidad de micorrización (% M); Intensidad arbuscular en la zona micorrizada (% a); Intensidad arbuscular en el sistema radical (% A) y c) Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP). Los datos representados son media de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  error estándar, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).



Se comparó el etileno desprendido por las plantas silvestres VFN8 y el mutante *Epi* inoculadas y no inoculadas para buscar una correlación con los parámetros de micorrización. El etileno de la parte aérea de plantas no micorrizadas mostró un perfil similar en ambos genotipos, con un nivel mayor a los 30 dpi y un descenso del 30% a los 44 y 56 dpi. A nivel cuantitativo, la acumulación de etileno fue mayor en *Epi* que en VFN8 a los 30 dpi. En el caso de las plantas micorrizadas, la biosíntesis de etileno en la parte aérea disminuyó en ambos genotipos en relación a plantas no micorrizadas, y en plantas *Epi* micorrizadas, la acumulación de etileno fue ligeramente mayor en VFN8 micorrizadas (**Figura IV.1.24.a.**).

En el caso de la medida de etileno desprendido por las raíces en plantas no inoculadas, el mutante *Epi* mostró valores significativos de hasta 4 veces más respecto al silvestre a los 30 dpi, en tanto que a los 44 y 56 dpi el valor en *Epi* descendió y no mostró diferencias respecto al silvestre en ambos estadios de cosecha. El mismo comportamiento ocurrió en las mediciones del etileno desprendido por las raíces de las plantas inoculadas, pues en *Epi*, los niveles de etileno en plantas micorrizadas fueron similares a los de plantas no micorrizadas (**Figura IV.1.24.b.**).



**Figura IV.1.24.** Etileno desprendido de raíces de la planta silvestre VFN8 y mutante *Epi* no colonizadas (NI) y colonizadas (I) por *R. irregularis* y cosechadas a distinto tiempo tras la inoculación (dpi). a) Etileno desprendido por la parte aérea de la planta. b) Etileno desprendido por las raíces de las plantas. Los datos representados son media de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

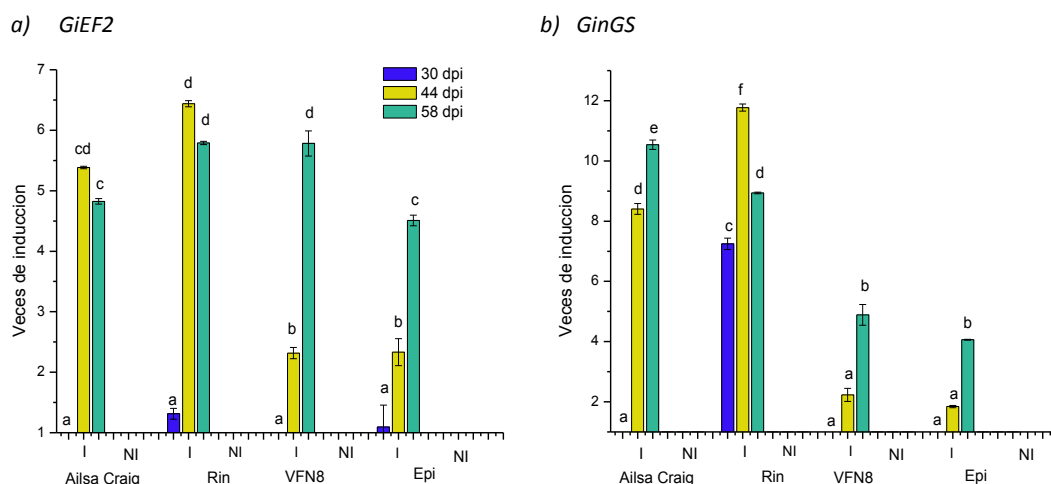
#### **IV.1.4.1. Expresión de genes marcadores de la simbiosis MA en genotipos de plantas con distinta sensibilidad a etileno inoculadas y no inoculadas con *R. irregularis***

Como en casos anteriores, se analizaron diversos genes vegetales relacionados con la funcionalidad de la simbiosis MA, así como de genes fúngicos relacionados con el grado de colonización y/o actividad fúngica en la raíz, comparando la expresión de dichos genes en plantas silvestres y mutantes alteradas en la sensibilidad a etileno en presencia/ausencia del hongo simbionte. Para el estudio de la expresión de los genes marcadores se utilizó la metodología de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qRT-PCR). Como marcador interno de la cantidad de ARN de la raíz se cuantificó la expresión del gen constitutivo que codifica para el factor de elongación de tomate, *LeEFA-1*. La tasa de colonización por el hongo se determinó a nivel molecular cuantificando la acumulación de ARNm para el gen codificante del factor de elongación  $1\alpha$  de *G. irregularis* (gen *GinEF2*) (**Figura IV.1.25.a**) Se evaluaron los genes de la glutamina sintetasa de *G. intraradices* (*R. irregularis*) (gen *GinGS*) y del transportador de fosfato *LePT4* (Nagy *et al.*, 2005; Gomez *et al.*, 2009) (**Figura IV.1.25.b y c**) y los genes *LeETR4* y *LeETR6* como marcadores de la respuesta a etileno. El cambio inducido en la expresión génica se calculó usando el método de  $2^{\Delta\Delta Ct}$ , mostrándose el valor en veces de inducción. Se evaluó la expresión de los genes descritos en plantas inoculadas y no inoculadas en los tres tiempos de cosecha realizados en el estudio.

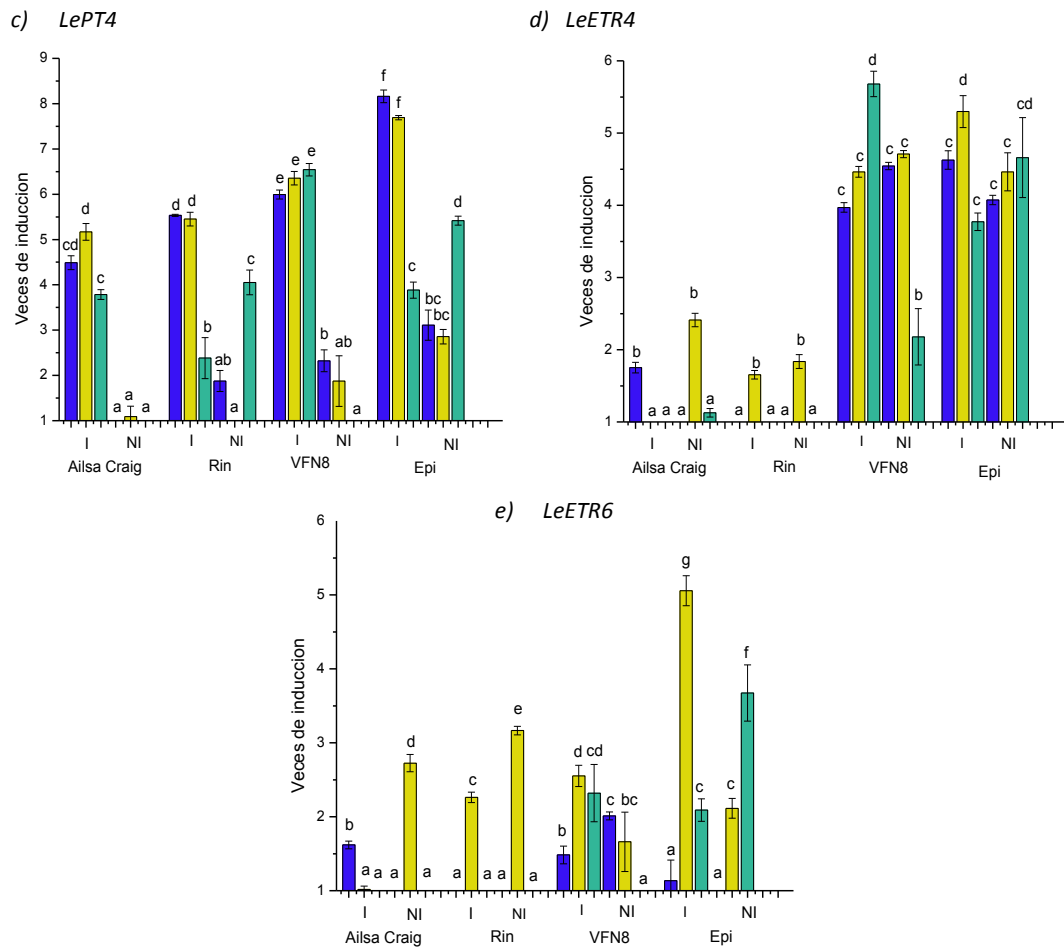
La expresión de los genes *GinEF2* y *GinGS* se detectó únicamente en las plantas micorrizadas, evidentemente porque son genes fúngicos marcadores de la presencia y actividad del hongo en la raíz durante el establecimiento de la simbiosis (**Figura IV.1.25.a y b**). El genotipo mutante *Rin* presentó una mayor micorrización y en consecuencia mayor expresión de los genes *GinEF2* y *GinGS* en relación al genotipo silvestre Ailsa Craig. En este sentido, el gen *GinEF2* se expresó más en el genotipo *Rin* comparado con su silvestre Ailsa Craig a los 44 y 58 dpi. Por su parte, el gen *GinGS* se expresó 7 y 4 veces más en *Rin* que en Ailsa Craig a los 30 y 44 dpi, respectivamente, si bien la expresión a 58 dpi fue menor en *Rin* respecto al genotipo silvestre. *Epi* y su silvestre VFN8 no mostraron diferencias en la expresión del gen *GinEF2* a los 30 y 44 dpi, aunque a los 58 dpi la expresión se redujo 1.5 veces en el genotipo *Epi* (**Figura IV.1.25.a**). En *Epi*, el gen *GinGS* no mostró diferencias en su expresión a lo largo de todo el ensayo comparado con su testigo correspondiente (**Figura IV.1.25.b**).

La expresión del gen *LePT4*, marcador de la eficiencia de la simbiosis por ser responsable de transporte de Pi a nivel arbuscular se vio incrementada en el caso de las plantas

micorrizadas. Tanto en Ailsa Craig como en *Rin*, el mayor valor de expresión ocurrió a los 44 dpi y en los días posteriores fue disminuyendo. En plantas *Epi*, la expresión del gen *LePT4* aumentó ligeramente hasta en 1.5 veces respecto al silvestre VFN8. Lo significativo de este gen es que aumenta su expresión en plantas *Epi* micorrizadas, aunque éstas tengan menor micorrización que su silvestre VFN8, lo que podría indicar una inducción del gen bajo una situación de mayor sensibilidad a etileno. Las plantas no micorrizadas mostraron una expresión débil y tardía del gen a los 58 dpi, y en algunos casos su expresión fue mayor que en los genotipos micorrizados que muestran una expresión débil del gen en esta última cosecha (**Figura IV.1.25.c**). Los genes *LeETR4* y *6* mostraron un patrón de expresión dependiente del genotipo e independiente de la micorrización. En Ailsa Craig y mutante *Rin*, los genes *LeETR4* y *6* se expresaron a niveles basales y únicamente se observó un incremento en la expresión a los 44 dpi. El gen *LeETR4* se expresó más en plantas VFN8 y *Epi*, en relación a Ailsa Craig y *Rin*. Así, se observó una expresión muy parecida en todos los tratamientos VFN8 y *Epi*, excepto dos picos de expresión relacionados con la micorrización de plantas VFN8 a los 58 dpi y plantas *Epi* a los 44 dpi (**Figura IV.1.25.d**). Por su parte, el gen *LeETR6* se expresó de manera muy significativa en plantas *Epi* inoculadas a los 44 dpi. En el resto de tratamientos y situaciones su expresión no siguió un patrón definido ni dependiente del estatus de micorrización ni la edad de la planta (**Figura IV.1.25.e**).



**Figura IV.1.25.** Patrón de expresión de genes marcadores del desarrollo de la micorrización, transporte de fósforo y percepción y biosíntesis de etileno en plantas de tomate silvestres de la variedad Ailsa Craig y VFN8 y sus mutantes *Rin* y *Epi*, respectivamente no inoculadas (NI) e inoculadas (I) inoculadas con *R. irregularis*. a) *GIEF2*, b) *GinGS*, c) *LePT4*, d) *LeETR4*, e) *LeETR6*. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ). El valor de expresión génica está representado como veces de inducción/represión de cada gen respecto al tratamiento con menor nivel de expresión, al cual se le atribuye un nivel de expresión igual a 1.

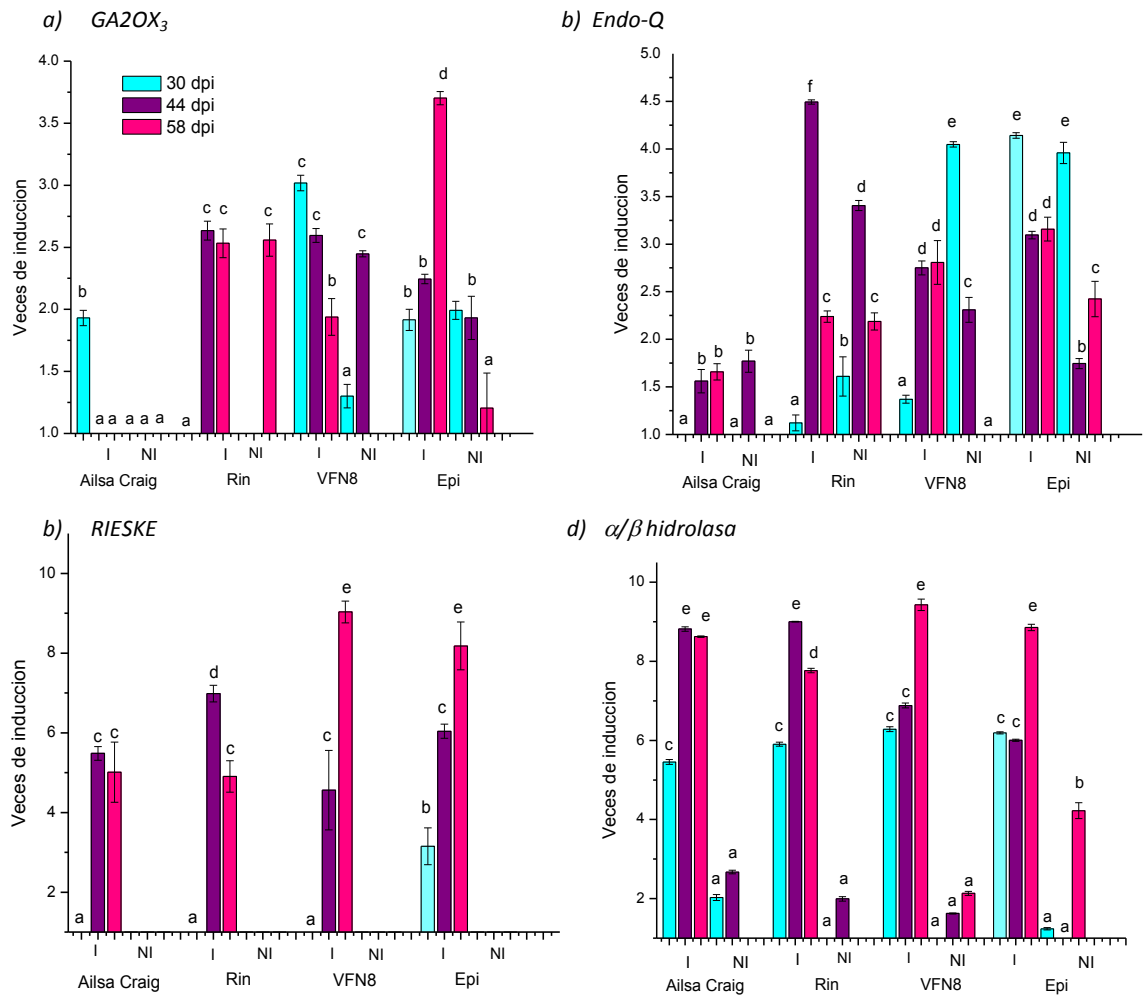


**Figura IV.1.25. Continuación.** Patrón de expresión de genes marcadores del desarrollo de la micorrización, transporte de fósforo y percepción y biosíntesis de etileno en plantas de tomate silvestres de la variedad Ailsa Craig y VFN8 y sus mutantes *Rin* y *Epi*, respectivamente no inoculadas (NI) e inoculadas (I) inoculadas con *R. irregularis*. a) *GinEF2*, b) *GinGS*, c) *LePT4*, d) *LeETR4*, e) *LeETR6*. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas ± el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ). El valor de expresión génica está representado como veces de inducción/represión de cada gen respecto al tratamiento con menor nivel de expresión, al cual se le atribuye un nivel de expresión igual a 1.

#### IV.1.4.2. Expresión de genes vegetales de defensa y metabolismo hormonal en genotipos de plantas de tomate con distinta sensibilidad a etileno inoculadas y no inoculadas con *R. irregularis*

Como en experimentos anteriores, decidimos analizar la expresión de los genes *GA2OX<sub>3</sub>*, *Endo-Q*, *RIESKE* y  $\alpha/\beta$  hidrolasa, marcadores de respuesta defensiva, metabolismo hormonal y cuya expresión está asociada al proceso de micorrización. Se evaluó así su expresión en plantas silvestres y mutantes alteradas en la sensibilidad a etileno en presencia/ausencia del hongo simbiote. La evaluación de la expresión de los genes se llevó a cabo como se describió en los apartados anteriores. La expresión de los genes *GA2OX<sub>3</sub>* y *Endo-Q* fue dependiente del

genotipo y de la micorrización (**Figura IV.1.26.a y b**). *GA2OX<sub>3</sub>* se expresó más en VFN8 respecto a Ailsa Craig, donde tuvo la expresión más baja. En plantas *Rin*, la expresión estuvo asociada a la micorrización a los 44 dpi y a una expresión constitutiva a los 58 dpi tanto en plantas inoculadas como no inoculadas. En plantas VFN8 y *Epi*, la expresión de *GA2OX<sub>3</sub>* se vio favorecida por la micorrización, aunque con un matiz diferencial. En plantas VFN8 la mayor expresión del gen se alcanzó a etapas tempranas de micorrización y en plantas *Epi* estuvo asociada a la etapa más avanzada de micorrización (**Figura IV.1.26.a**). El gen *Endo-Q* al igual que *GA2OX<sub>3</sub>* mostró un nivel de expresión bajo en el genotipo Ailsa Craig, y generalmente más alto en todos los tratamientos de plantas *Rin*, con especial relevancia a los 44 dpi en plantas micorrizadas (hasta 4.5 veces más respecto a su silvestre respectivo). Al parecer, el genotipo *Rin* favorece la expresión del gen *Endo-Q* y esta expresión aumenta en presencia de la micorrización. En el caso de *Epi*, el gen *Endo-Q* mostró los niveles más altos de expresión, tanto en plantas inoculadas como no inoculadas, con los valores más altos en el estadios más temprano de la micorrización (30 dpi), lo que sugiere una expresión ligada a la micorrización y mayor sensibilidad a etileno (**Figura IV.1.26.b**). La expresión de los genes *RIESKE* y  $\alpha/\beta$  hidrolasa fue dependiente de la presencia del hongo en la raíz y del estadio de la micorrización. El gen *RIESKE* únicamente se expresó en plantas micorrizadas, y a los 44 dpi su expresión fue ligeramente mayor en *Rin* respecto al cultivar silvestre Ailsa Craig, aunque a los 58 dpi se igualaron los niveles en ambos genotipos. En plantas *Epi* inoculadas, el gen *RIESKE* se expresó desde etapas tempranas de la micorrización y los niveles de expresión fueron en aumento en paralelo al nivel de colonización, aunque sin diferencias entre el genotipo mutante y el cultivar silvestre VFN8 a los 44 y 58 dpi (**Figura IV.1.26.c**). El gen que codifica para  $\alpha/\beta$  hidrolasa inducida durante la micorrización mostró un patrón similar al del gen *RIESKE*, pues la micorrización estimuló su expresión y ésta varió con el estadio de la colonización. No hubo diferencias ni en el patrón ni en los niveles de expresión entre genotipos silvestres y mutantes micorrizados (**Figura IV.1.26.c**)



**Figura IV.1.26.** Patrón de expresión de genes marcadores de defensa y metabolismo hormonal en plantas de tomate silvestres de la variedad Ailsa Craig y VFN8 y sus mutantes *Rin* y *Epi*, respectivamente no inoculadas (NI) e inoculadas (I) con *R. irregularis*. a) *GA2OX<sub>3</sub>*, b) *Endo-Q*, c) *RIESKE*, d)  $\alpha/\beta$  hidrolasa. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ). El valor de expresión génica está representado como veces de inducción/represión de cada gen respecto al tratamiento con menor nivel de expresión, al cual se le atribuye un nivel de expresión igual a 1.

## IV.2. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE FÓSFORO FÁCILMENTE ASIMILABLE SOBRE EL ESTABLECIMIENTO DE LA MICORRIZACIÓN DE TOMATE

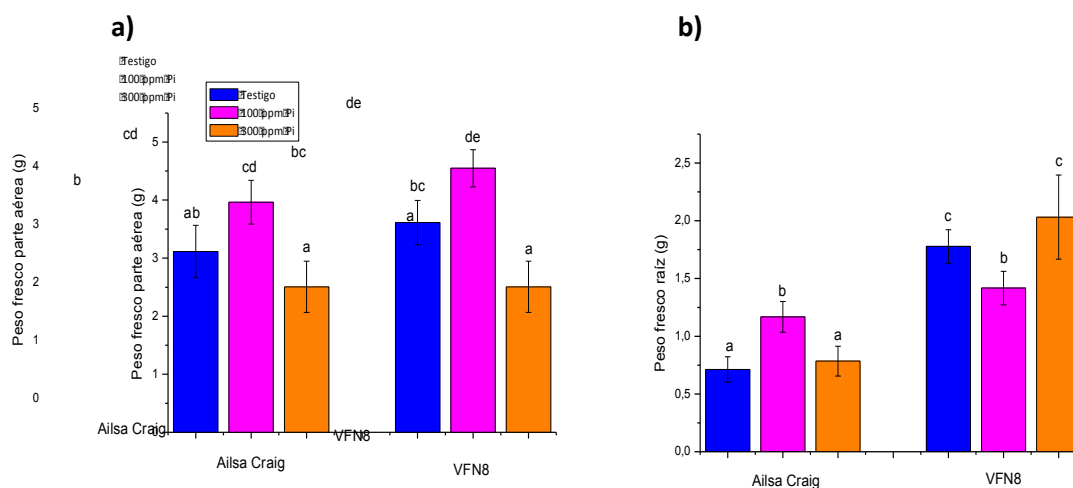
El fósforo es un nutriente imprescindible en el desarrollo de las plantas. Diversos estudios al respecto han demostrado que una alta disponibilidad del fósforo en el suelo inhibe la formación de las micorrizas arbusculares, aunque se desconocen los mecanismos activados en la planta mediante los cuales se lleva a cabo esta inhibición de la formación de la micorrización. En este apartado del trabajo de la presente tesis doctoral se describe el efecto de una alta disponibilidad de fósforo asimilable sobre diversos parámetros de la simbiosis MA

y sobre la expresión de genes que codifican para transportadores del fósforo y genes marcadores de la simbiosis MA.

#### **IV.2.1. Parámetros indicadores de la micorrización en condiciones de alta disponibilidad de fósforo**

En este estudio se comparó la respuesta de plantas de dos genotipos silvestres de tomate, Ailsa Craig y VFN8, inoculadas con el hongo *Rhizophagus irregularis* y tratadas con dos dosis altas de fósforo disponible (100 y 300 ppm en forma de solución de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). Para asegurarnos que el efecto del fósforo aplicado era sobre el desarrollo de la colonización dentro de la raíz y no sobre la fase presimbiótica, la solución de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  fue aplicada en suelo tras un periodo de colonización, comprobando que en el momento de la aplicación la micorrización era al menos de un 20% de la raíz. Transcurridos quince días del tratamiento con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  se realizó un análisis del efecto del fósforo sobre el peso fresco de la planta y se cuantificaron diversos parámetros de micorrización. Se complementó el estudio con el análisis de la expresión de genes transportadores de fósforo y otros genes marcadores de la presencia del hongo y de la eficiencia de la simbiosis MA.

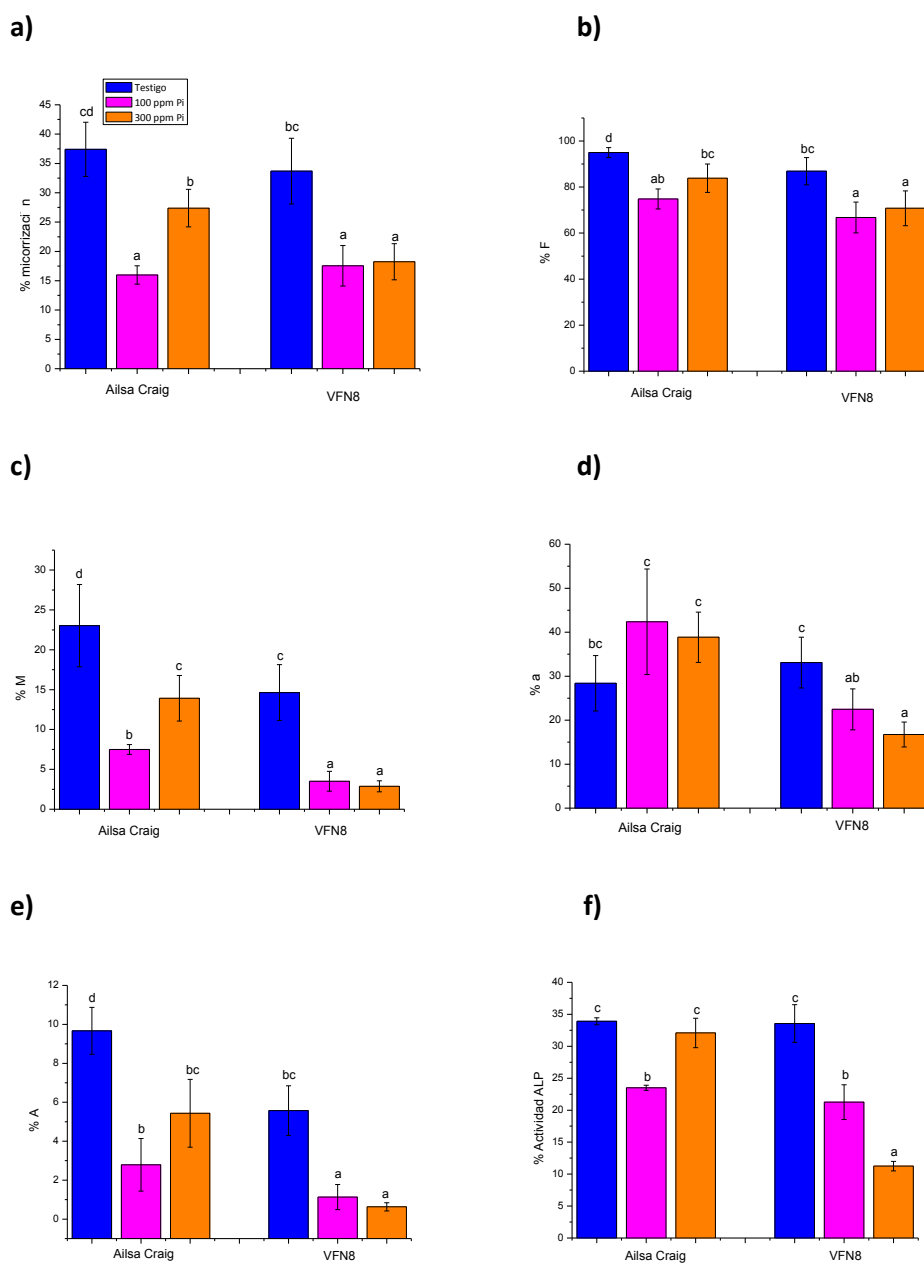
El parámetro de peso fresco de la parte aérea de la planta en respuesta a la disponibilidad de fósforo mostró un patrón de comportamiento similar en ambos genotipos estudiados. A los 14 dpt, el peso fresco de la parte aérea fue ligeramente mayor en el tratamiento de 100 ppm Pi e igual o menor en el tratamiento 300 ppm Pi, ambos respecto al tratamiento testigo. En el caso del peso fresco de la raíz, Ailsa Craig mostró un ligero aumento con 100 ppm Pi respecto al testigo, aunque a 300 ppm Pi no hubo diferencias respecto a dicho testigo. El genotipo VFN8 tuvo una ligera disminución del peso fresco de la raíz a los 100 ppm Pi, y no mostró diferencias a 300 ppm Pi respecto al testigo, aunque siempre los valores fueron mayores a los que presentó Ailsa Craig (**Figura IV.2.1**). En general, la aplicación de fósforo afectó negativamente el desarrollo de la parte aérea de la planta en ambos genotipos. En el caso del crecimiento de la raíz, Ailsa Craig se vio afectada negativamente y VFN8 no presentó diferencias respecto al testigo no tratado.



**Figura IV.2.1.** Peso fresco de plantas de tomate en respuesta al tratamiento con distintas dosis de fósforo. Las plantas fueron inoculadas con *R. irregularis* y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas con fósforo (en forma de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) a 100 y 300 ppm y cosechadas a los 14 días de dicho tratamiento (dpt). a) Peso fresco de la parte aérea; b) Peso fresco de la raíz. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

La aplicación de fósforo tuvo un efecto negativo en el desarrollo de la micorrización (**Figura IV.2.2**). La cantidad de raíz micorrizada, medida a los 14 dpt del tratamiento, fue menor respecto al tratamiento testigo en ambos genotipos cuando se trataron con las dos concentraciones de fósforo. En ningún caso la micorrización total cuantificada fue dependiente de la concentración de Pi aplicada, pues en el caso de Ailsa Craig, el valor de micorrización total fue ligeramente mayor a los 300 ppm Pi comparado con el mostrado a 100 ppm Pi. En el caso de VFN8, la disminución de la micorrización fue similar en los tratamientos de 300 ppm y 100 ppm (**Figura IV.2.2.a**). La frecuencia de micorrización (% F) fue ligeramente menor en ambos genotipos en las dos condiciones de tratamiento respecto al testigo. Por su parte, la intensidad de micorrización (% M) y la intensidad arbuscular en el sistema radicular (% A) fueron los parámetros más afectados negativamente por la alta disponibilidad de fósforo en los dos genotipos, y ambos parámetros mostrando una reducción en presencia de fósforo hasta de 5 veces respecto al testigo, si bien esa reducción no fue dependiente de la concentración de Pi aplicada (**Figura IV.2.2.c y e**). La intensidad arbuscular en la zona micorrizada (% a) no mostró diferencias significativas en el genotipo Ailsa Craig entre los tratamientos y el testigo, aunque en el genotipo VFN8 este parámetro se redujo en presencia de Pi (**Figura IV.2.2.d**).



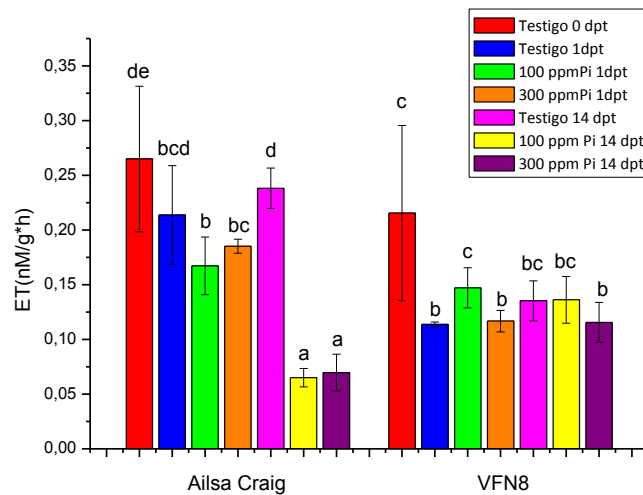


**Figura IV.2.2.** Parámetros de micorrización de plantas de tomate silvestres Ailsa Craig y VFN8 inoculadas con *R. irregularis* tratadas con distintas concentraciones de Pi. Las plantas fueron inoculadas con *R. irregularis* y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas con fósforo (en forma de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) a 100 y 300 ppm y cosechadas a los 14 días de dicho tratamiento (dpt). a) Porcentaje de raíz micorrizada; b) Frecuencia de micorrización (% F); c) Intensidad de micorrización (% M); d) Intensidad arbuscular en la zona colonizada (% a). Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

El análisis de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, indicador de la funcionalidad de la simbiosis MA, mostró una ligera reducción en el genotipo Ailsa Craig en presencia de Pi respecto al testigo. En el caso de VFN8 la reducción fue significativa respecto al testigo y al

igual que el parámetro de intensidad arbuscular en la zona micorrizada, la reducción fue dependiente de la concentración de Pi añadido (**Figura IV.2.2.f**).

Para establecer una posible relación entre la disponibilidad de Pi, la capacidad de micorrización de la raíz y la concentración de etileno, se cuantificó dicho compuesto desprendido por las raíces (**Figura IV.2.3**). El tratamiento con fósforo redujo los valores de etileno desde las primeras 24 horas postratamiento en ambos genotipos bajo las dos concentraciones de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  empleadas. A los 14 dpt, la reducción del etileno desprendido en Ailsa Craig fue de hasta 4 veces, en tanto que en VFN8 no se pudo detectar el mismo efecto, pues hubo una disminución generalizada de los niveles de etileno a los 14 dpt tanto en las plantas testigo como en las tratadas.



**Figura IV.2.3.** Etileno desprendido de raíces de plantas silvestres Ailsa Craig y VFN8 colonizadas por *R. irregularis* tratadas con distintas concentraciones de Pi. Las plantas fueron inoculadas con *R. irregularis* y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas con fósforo (en forma de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) a 100 y 300 ppm y cosechadas a diferentes días tras dicho tratamiento (dpt). Los datos representados son media de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  error estándar, y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

#### IV.2.2. Análisis de la expresión de genes marcadores de la micorrización y fisiología de etileno en condiciones de alta disponibilidad de fósforo

Con el fin de profundizar en el estudio de las alteraciones en la micorrización causadas por el tratamiento con fósforo en las dos variedades de tomate estudiadas, se evaluó a nivel molecular el desarrollo de la micorrización, analizando el patrón de expresión de genes fúngicos y vegetales marcadores del desarrollo del hongo y de la actividad arbuscular (**Figura IV.2.4**). La tasa de colonización por el hongo se determinó a nivel molecular cuantificando la

acumulación de ARNm para el gen codificante del factor de elongación  $1\alpha$  de *G. intraradices* (*R. irregularis*) (gen *GinEF*) (**Gráfica IV.2.4.a**). Para examinar tanto la presencia, como la funcionalidad de los arbusculos en las raíces micorrizadas se cuantificó la cantidad de transcrito de los genes glutamina sintasa de *G. intraradices* (*G. irregularis*) (gen *GinGS*) y del transportador de fosfato específico de arbusculos de plantas de tomate, *LePT4*. Ambos genes han sido descritos por otros investigadores como de expresión asociada a las células con arbusculos (Nagy *et al.*, 2005; Gomez *et al.*, 2009) (**Gráfica IV.2.4.b y c**). El nivel de expresión se normalizó respecto a la cantidad de ARNm del gen de tomate factor de elongación  $1\alpha$ , *LeEF $\alpha$ 1*. El cambio inducido en la expresión génica, tanto de *GinEF*, *GinGS* como de *LePT4*, se calculó usando el método de  $2^{\Delta\Delta Ct}$ , mostrándose el valor de expresión relativa entre tratamientos. El análisis se realizó una vez transcurridos 14 días posteriores al tratamiento con las dos concentraciones de fósforo asimilable, 100 y 300 ppm Pi (en forma de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ).

La aplicación de fósforo en las plantas de tomate silvestres Ailsa Craig y VFN8 produjo un efecto sobre la expresión de los genes *GinEF* y *GinGS* dependiente del genotipo de la planta y de la concentración de fósforo aplicada. Los niveles de expresión de los genes *GinEF* y *GinGS* se redujeron en ambos genotipos tras la aplicación de Pi, aunque de manera más acusada en el genotipo Ailsa Craig. Así, en Ailsa Craig tanto a la concentración de 100 ppm como de 300 ppm de Pi, la expresión de *GinEF* se redujo a niveles mínimos, en tanto que *GinGS* se redujo de manera proporcional a la concentración de Pi aplicada. En el caso de VFN8, la reducción de la expresión fue más pronunciada a 100 ppm de Pi que a 300 ppm, si bien ambos tratamientos afectaron muy negativamente la expresión de ambos genes, *GinEF* y *GinGS* (**Figura IV.2.4.a y b**).

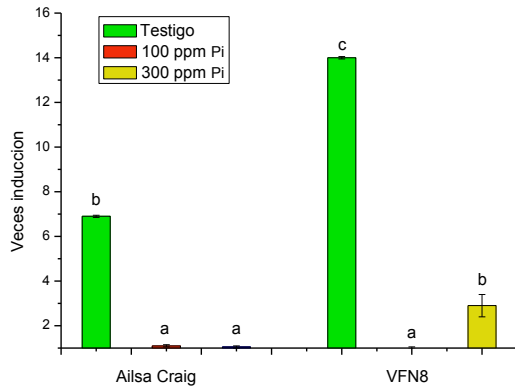
Es un hecho documentado que existe un efecto regulador negativo del fósforo sobre la micorrización, ya que a mayor disponibilidad de fósforo en el suelo es menor la probabilidad del establecimiento de la simbiosis MA. También es conocida la regulación de la expresión de los genes codificantes para transportadores de Pi en función de la disponibilidad de dicho nutriente y la existencia de transportadores específicos asociados al proceso de transferencia de Pi a nivel del arbusculo en las raíces micorrizadas. En este sentido, el gen *LePT4* se ha reconocido como un gen codificante de una proteína transportadora de fosfato y relacionada con la actividad de intercambio de fosfato en los arbusculos de las plantas micorrizadas de tomate (Nagy *et al.*, 2005), inducible durante el proceso de micorrización y asociado a la

actividad del arbúsculo (Nagy *et al.*, 2005; Balestrini *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007; Wegmueller *et al.*, 2008). Por lo tanto, decidimos analizar el patrón de expresión de este gen para estudiar su comportamiento bajo las dos concentraciones de fósforo disponible en los dos genotipos silvestres de tomate. En ambos genotipos, y al igual que para los genes *GinEF* y *GinGS*, se observó una reducción de la expresión del gen *LePT4* bajo condiciones de mayor disponibilidad de Pi. En Ailsa Craig la expresión se redujo con ambas concentraciones aplicadas y llegó a ser prácticamente inexistente. En tanto que en VFN8 se redujo hasta 10 veces a 100 ppm y 7 veces a 300 ppm de Pi. Por tanto, el genotipo silvestre VFN8 mostró un menor efecto negativo en la regulación del gen *LePT4* en concentraciones de alta disponibilidad de fósforo (300 ppm) respecto al silvestre Ailsa Craig (**Figura IV.2.4.c**).

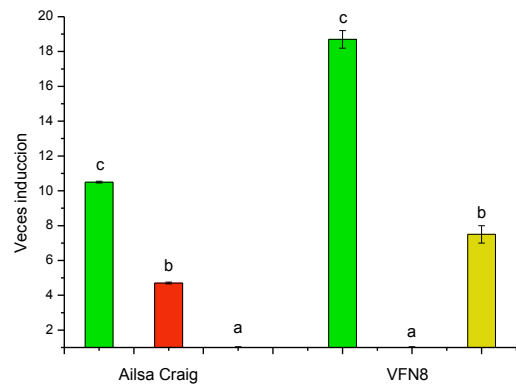
Dado que, al menos en el genotipo Ailsa Craig, la aplicación de Pi exógenamente afectó negativamente el contenido de etileno desprendido por las raíces (**Figura IV.2.3**) se decidió analizar si dicha aplicación afectó la respuesta a etileno en la raíz, analizando el patrón de expresión tanto de los genes *LeETR4* y *LeETR6*, que codifican para proteínas de membrana receptores de etileno, como del gen *rin*, que es un factor de transcripción tipo MADS-BOX relacionado con la respuesta de etileno en procesos de senescencia y maduración (Vrebalov *et al.*, 2002). El patrón de comportamiento de *LeETR4* y *LeETR6* fue similar. El gen *LeETR4* redujo su expresión en ambos genotipos al aplicar Pi, aunque el nivel de reducción varió según el genotipo y la concentración de Pi aplicada. En Ailsa Craig se redujo 3.5 veces a 100 ppm Pi, en tanto que a 300 ppm Pi se redujo aún más, hasta casi 9 veces. En el caso de VFN8, la reducción de *LeETR4* fue de hasta 9 veces a 100 ppm Pi y de 6 veces a 300 ppm Pi comparado con su respectivo genotipo no tratado. *LeETR6* siguió el mismo patrón de expresión que *LeETR4*, así en Ailsa Craig la reducción fue de hasta 6 veces a 100 ppm y de 9 veces a 300 ppm. En VFN8, *LeETR6* mostró menor variabilidad en la expresión que en Ailsa Craig, con una reducción de 2 veces respecto al control no tratado a las dos concentraciones de fósforo aplicadas (**Figura IV.2.4.d y e**).

En cuanto al gen *Rin*, este mostró un patrón de expresión variable en función del genotipo. El genotipo Ailsa Craig redujo su expresión hasta 17 veces a las dos concentraciones de fósforo, en tanto que el genotipo VFN8 la expresión de este gen fue mucho menos variable y tan solo a concentraciones de 100 ppm de Pi se detectó una leve disminución de la expresión respecto al testigo (**Figura IV.2.4.f**).

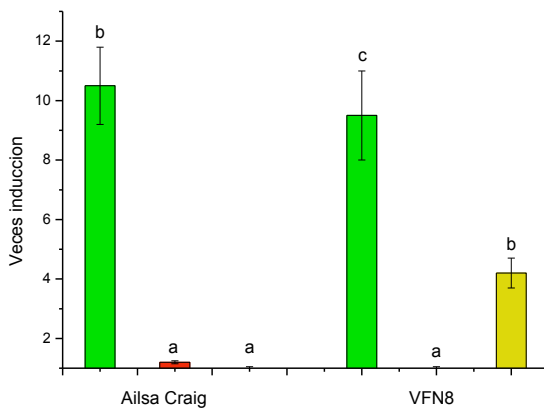
**a) *GinEF***



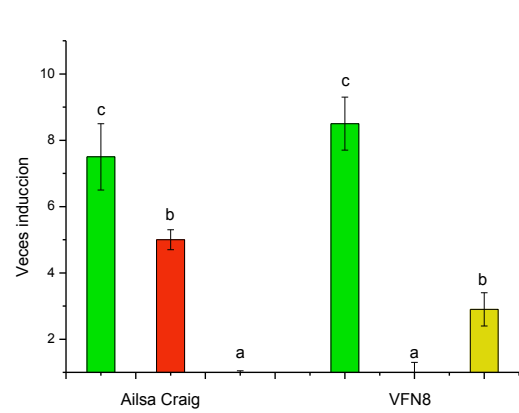
**b) *GinGS***



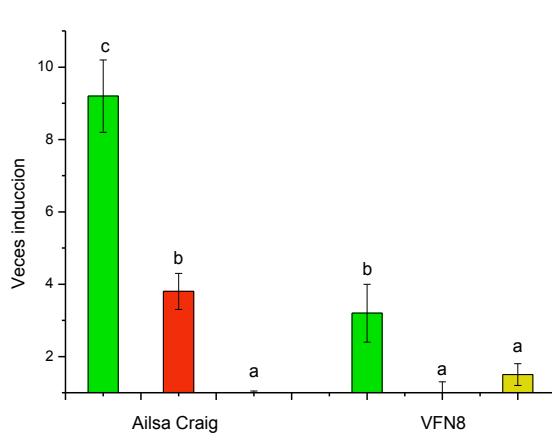
**c) *LePT4***



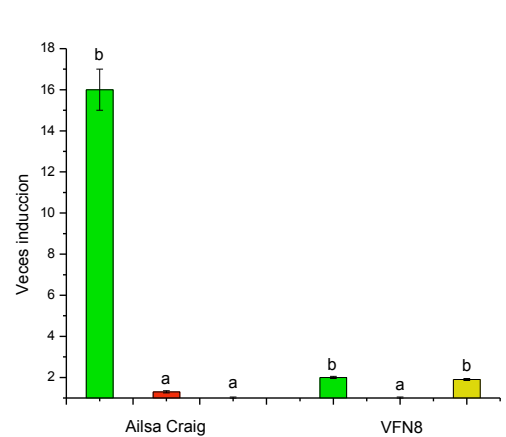
**d) *LeETR4***



**e) *LeETR6***



**f) *Rin***

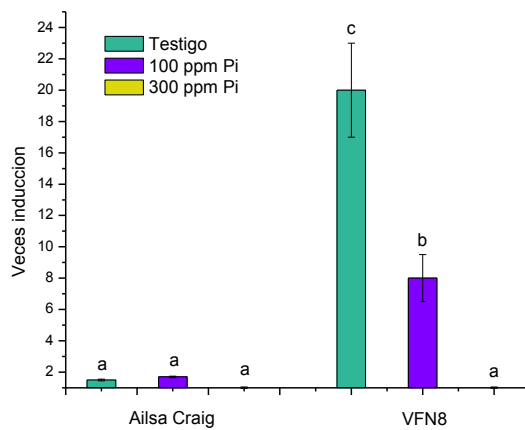
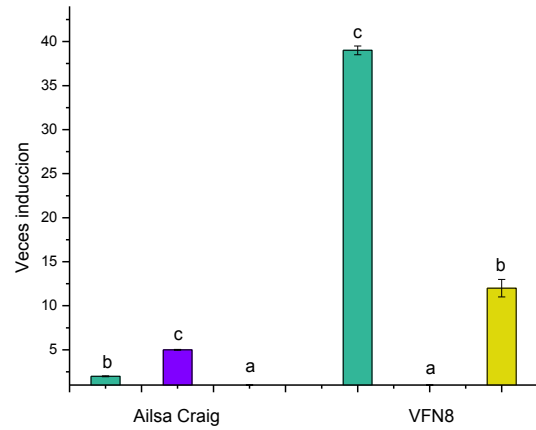
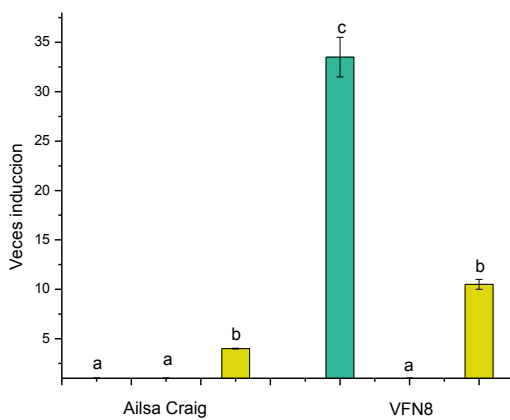
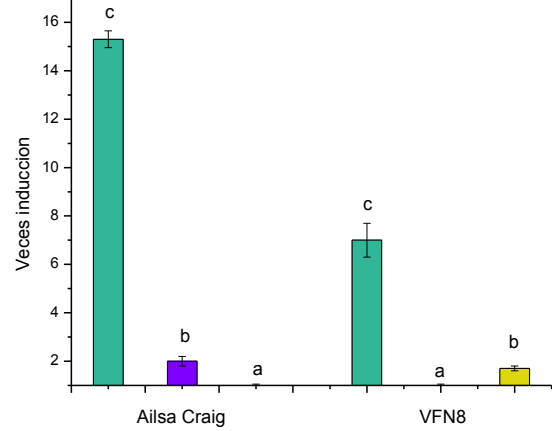
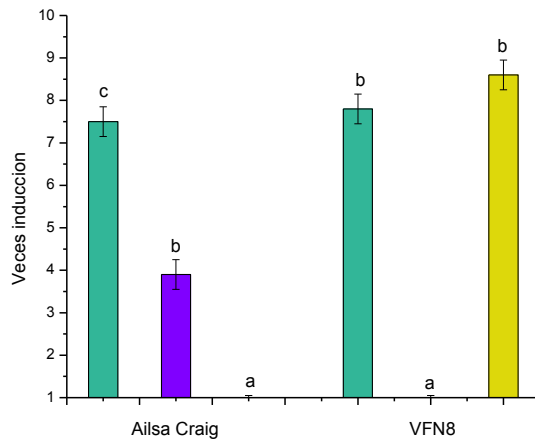
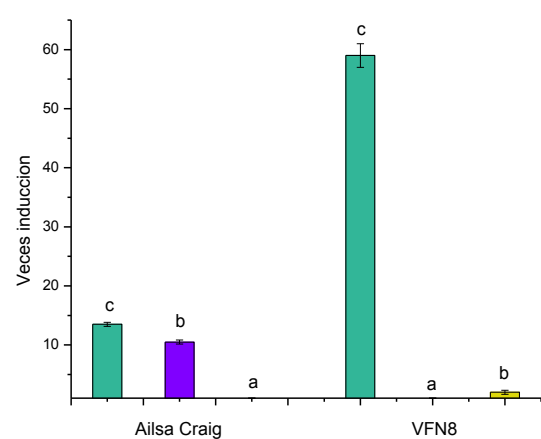


**Figura IV.2.4.** Patrón de expresión de genes marcadores del desarrollo de la micorrización, trasporte de fósforo y percepción y biosíntesis de etileno en plantas de tomate silvestres de la variedad Ailsa Craig y VFN8 inoculadas con *R. irregularis* y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas con fósforo (en forma de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) a 100 y 300 ppm y cosechadas 14 días tras dicho tratamiento (dpt). a) *GinEF*, b) *GinGS*, c) *LePT4*, d) *LeETR4*, e) *LeETR6*, f) *rin*. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ). El valor de expresión génica relativa representa las veces de inducción de cada gen en la raíz de las plantas, tomando como referencia para este cálculo el valor del tratamiento más bajo, cuya expresión relativa es igual a 1.

#### **IV.2.3. Expresión de genes vegetales de defensa y metabolismo hormonal durante el proceso de micorrización bajo condiciones de distinta disponibilidad de fósforo**

Como ya se ha mencionado en diversas ocasiones anteriores, 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 exactos mediante los cuales la alta disponibilidad de este nutriente inhibe la formación de la micorrización. También son hechos demostrados que la formación de la simbiosis micorriza arbuscular es un proceso regulado tanto por la activación/desactivación de mecanismos de defensa como por la acción de hormonas vegetales (Vierheilig, 2004b; García-Garrido y Vierheilig, 2007), que son moléculas esenciales en la activación y control de los cambios que suceden en la planta, como crecimiento, maduración, defensa, y demás procesos de adaptación morfológica y estructural de la planta. Por tanto, es lógico pensar que si la mayor o menor disponibilidad de Pi afecta el desarrollo de la micorrización, también puedan verse afectados procesos de respuesta defensiva y metabolismo hormonal asociados a la micorrización. Por tanto, decidimos analizar la expresión de un grupo de genes vegetales marcadores de respuesta defensiva y metabolismo hormonal cuya expresión está asociada al proceso de micorrización y por tanto pudiera ser regulada también por la disponibilidad de fósforo.

Analizamos el patrón de expresión de seis genes, uno de ellos relacionado con la respuesta a auxinas (*IAA-14* (Narise, *et al.*, 2010)); dos relacionados con la respuesta a giberelinas (*DELLA* y *GA<sub>3</sub>Ox<sub>1</sub>* (Serrani *et al.*, 2010)); un gen relacionado con respuesta defensiva y metabolismo de la pared celular *β-Exp*, (beta-expansina (García-Garrido *et al.*, 2010)); un gen codificante para quitinasa y relacionado con la respuesta defensiva en tomate (*ENDO-Q*, endoquitinasa-Q); y un gen que codifica para una proteína de la familia  $\alpha/\beta$  hidrolasa, probablemente relacionada con la percepción de señales hormonales, y cuya expresión ha sido descrita asociada al proceso de micorrización en tomate (García-Garrido *et al.*, 2010).

**a) IAA-14****b) DELLA****c) GA<sub>2</sub>OX<sub>3</sub>****d) β-Exp****e) Endo-Q****f) α/β hidrolasa**

**Figura IV.2.5.** Patrón de expresión de genes marcadores de defensa y metabolismo hormonal en plantas de tomate silvestres de la variedad Ailsa Craig y VFN8 inoculadas con *R. irregularis* y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas con fósforo (en forma de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a 100 y 300 ppm y cosechadas 14 días tras dicho tratamiento (dpt). a) IAA-14, respuesta a auxinas; b) DELLA, inactivación de giberelinas; c) GA<sub>3</sub>Ox<sub>1</sub>, metabolismo de giberelinas, d) β-Exp, beta-expansina; e) ENDO-Q, respuesta defensiva, f) α/β hidrolasa (hipotético receptor hormonal). Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas ± el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan (p<0.05). El valor de expresión génica relativa representa las veces de inducción de cada gen en la raíz de las plantas, tomando como referencia para este cálculo el valor del tratamiento más bajo, cuya expresión relativa es 1.

El patrón de expresión de los genes analizados fue dependiente tanto del genotipo de la planta como de la concentración de fósforo disponible aplicado, observándose dos categorías de genes. Los genes *IAA-14*, *DELLA*, y *GA<sub>3</sub>Ox<sub>1</sub>* apenas vieron afectada su expresión en plantas Ailsa Craig, independientemente de la concentración de Pi aplicada, si bien todos ellos disminuyeron su expresión en plantas VFN8 tratadas, sobre todo con la concentración de 100ppm (**Figura IV.2.5.a.b y c**). Por su parte, los genes *β-Exp*, *Endo-Q* y *α/β hidrolasa* sufrieron descensos en su expresión en los dos genotipos de plantas al ser tratadas con Pi, si bien dichos descensos solo fueron proporcionales a la cantidad de Pi añadido en el genotipo Ailsa Craig (**Figura IV.2.5.d.e y f**).

### **IV.3. EFECTO DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL FÓSFORO Y EL ETILENO SOBRE LA REGULACIÓN DE LA MICORRIZACIÓN DE TOMATE**

Uno de los principales beneficios de la simbiosis MA es el incremento en el aporte de fósforo inorgánico desde el suelo a la planta. Quizá por ello, una alta disponibilidad de fósforo en el suelo fácilmente disponible y asimilable por los mecanismos no simbióticos inhibe la formación de las micorrizas arbusculares (Jakobsen 1995; Fitter 2006), pues en esas circunstancias la planta no necesita la mediación del hongo para tomar el fósforo del suelo. Se han propuesto varias vías de señalización molecular implicadas en la regulación de la adquisición de Pi y la regulación de la formación de micorriza arbuscular y es probable que actúen de forma interconectada (Rouached *et al.*, 2010; Chiou *et al.*, 2011). Hay evidencias que apoyan el papel de las hormonas vegetales en el proceso de adquisición de fósforo y regulación en la planta de distintas situaciones de deficiencia, y así, por ejemplo, tratamientos con etileno comparados con plantas crecidas en condiciones de deficiencia de Pi causan cambios fenotípicos similares en las raíces (Gilbert *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2001). Este hecho indica que el etileno puede ser una hormona candidata en la mediación de la señalización y regulación de la adquisición de fósforo, y por tanto puede mediar en el mecanismo de la inhibición de la micorrización por disponibilidad de fósforo.

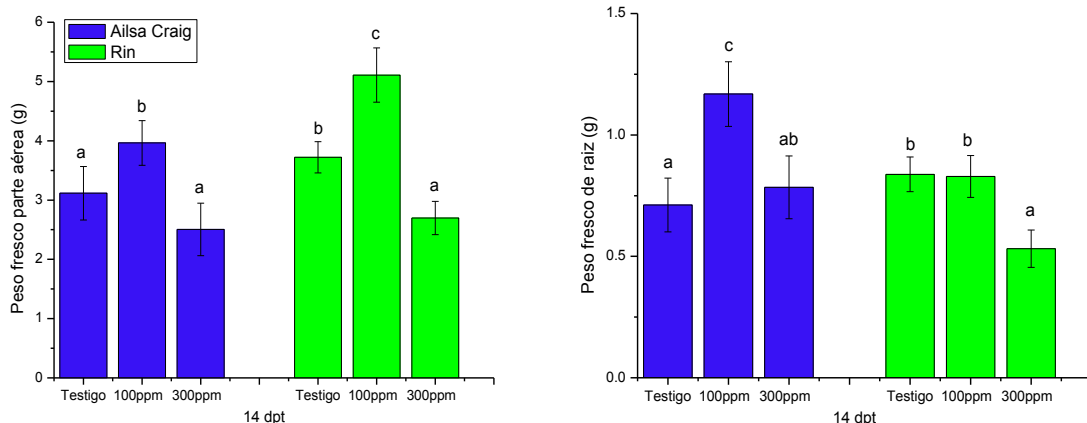
En este apartado de la presente tesis doctoral se describen los experimentos realizados para determinar la posible participación del etileno en la inhibición de la micorrización medida por altas concentraciones de fosfato disponible y fácilmente asimilable por la raíz. Con este fin, se estudió la evolución de la micorrización en cultivos con plantas de



tomate silvestres y mutantes alteradas en la percepción y respuesta a etileno sometidas a distintas concentraciones de fósforo disponible en diversos experimentos independientes. Aunado a lo anterior, se aplicaron tratamientos de etileno exógeno y el inhibidor de la biosíntesis de etileno en combinación con una alta dosis de Pi disponible. Se complementó el estudio con el análisis molecular de genes que codifican para transportadores del fósforo, genes marcadores de la simbiosis MA en tomate y genes marcadores de la acción de etileno, con el propósito de conocer si existe una interacción entre la ruta de señalización del etileno, la disponibilidad de fósforo y el establecimiento de la micorriza arbuscular en tomate.

#### **IV.3.1. Efectos sobre la micorrización de plantas mutantes de tomate alteradas en su percepción a etileno (*Rin*) en respuesta a una dosis alta de fósforo**

En esta etapa del estudio se utilizaron plantas mutantes de tomate afectadas en su capacidad de percepción de etileno (mutante *Rin*), las cuales se inocularon con el hongo arbuscular *R. irregularis* y se trataron con varias dosis de fósforo (150 ppm y 300 ppm añadido como  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) directamente al suelo. La aplicación del fósforo se realizó una vez establecida la micorrización, comprobando que en el momento de la aplicación los niveles de colonización eran al menos de un 20% de la raíz, para asegurarnos así que el efecto del fósforo aplicado era sobre el desarrollo de la colonización dentro de la raíz y no sobre la fase presimbiótica de contacto y penetración en la raíz. Transcurridos 14 días después del tratamiento con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  se realizó un análisis del efecto sobre el peso fresco de la planta y se cuantificaron diversos parámetros de micorrización. Se complementó el estudio con el análisis de la expresión de genes transportadores de fósforo y otros genes marcadores de la presencia del hongo y de la eficiencia de la simbiosis MA. El parámetro de peso fresco mostró un comportamiento paralelo en los genotipos Ailsa Craig y *Rin*, tanto en el peso fresco de la parte aérea como en la raíz. La adición de 100 ppm Pi aumentó ligeramente el peso fresco en los dos genotipos por encima de los valores del testigo, aunque a 300 ppm Pi en el genotipo *Rin* ambos parámetros se redujeron por debajo de los valores del testigo respectivo. Al parecer, el efecto de una alta concentración de fósforo (300 ppm Pi) reduce el peso fresco de la planta independientemente de su respuesta a etileno (**Figura IV.3.1**).

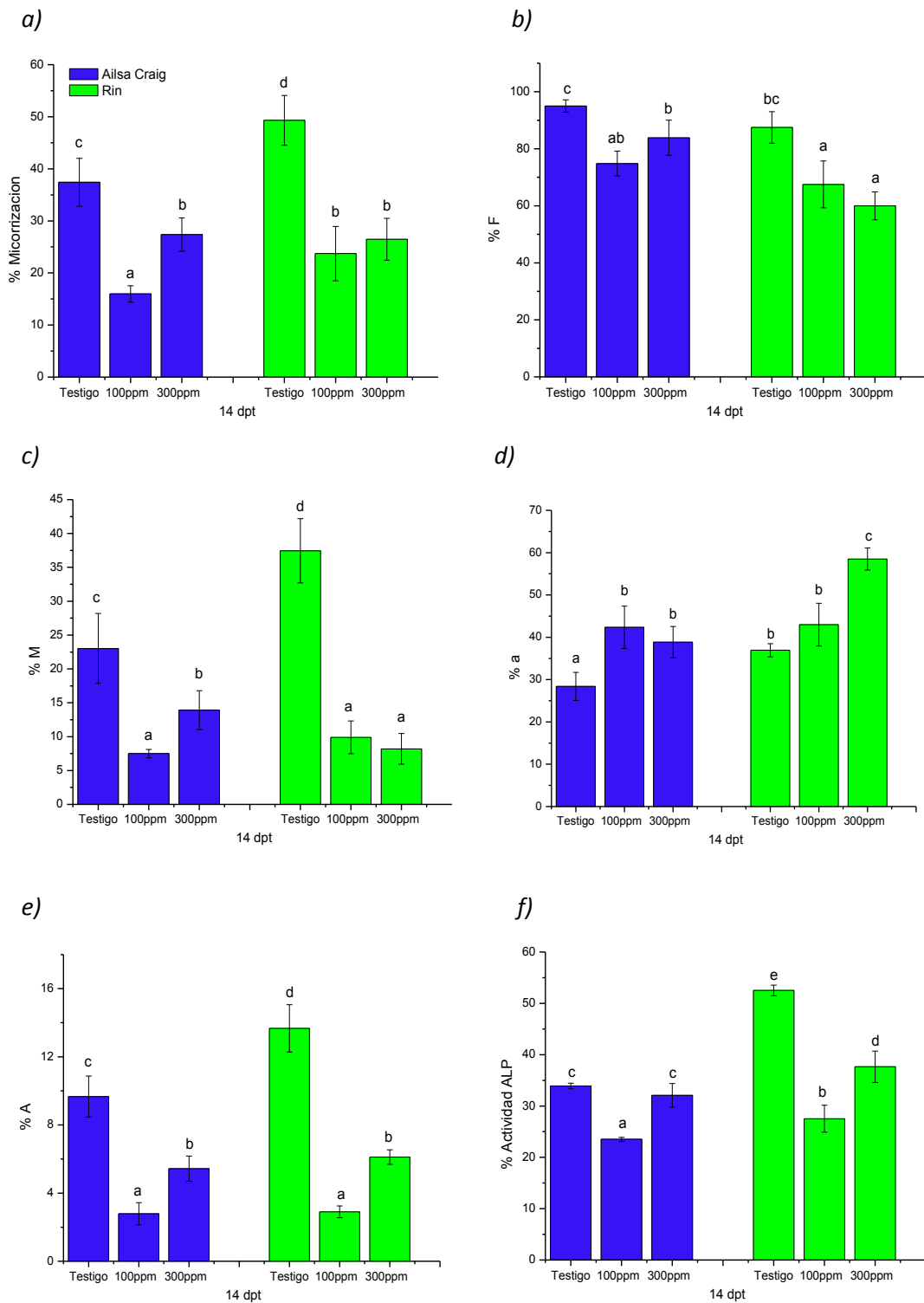


**Figura IV.3.1.** Peso fresco de plantas micorrizadas de tomate Ailsa Craig y mutantes *Rin* inoculadas con *R. irregularis* y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas con fósforo (en forma de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) a 100 y 300 ppm y cosechadas a los 14 días de dicho tratamiento (dpt). a) Peso fresco de la parte aérea; b) Peso fresco de la raíz. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

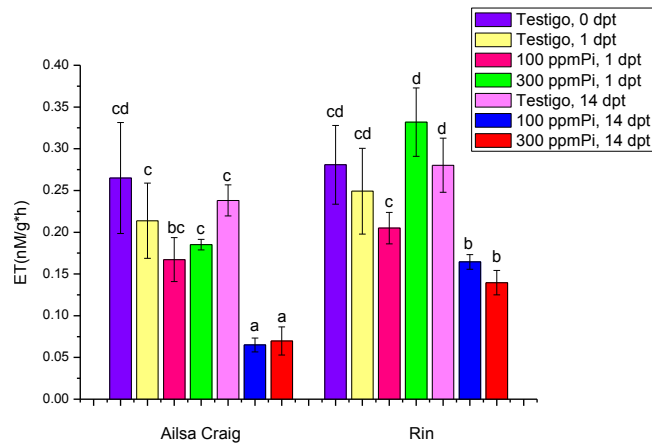
La medida de micorrización total en ambos genotipos fue significativamente menor en los tratamientos tratados con Pi respecto a la observada en su respectivo testigo no tratado, independientemente de la concentración de fósforo añadido, si bien la mayor disminución se observó en el genotipo silvestres Ailsa Craig tratado con 100 ppm Pi (**Figura IV.3.2.a**).

El resto de los parámetros de micorrización: frecuencia de micorrización (% F), intensidad de micorrización (% M), intensidad arbuscular total (% A) y el porcentaje de actividad de la fosfatasa alcalina se redujeron también significativamente cuando se aplicaron ambas concentraciones de Pi en ambos genotipos (**Figura IV.3.2.b, c, e, y f**). No obstante, y curiosamente, la intensidad arbuscular en la zona colonizada (% a) mostró un aumento al aplicar fósforo en ambas concentraciones, e incluso el mayor valor de % a se obtuvo al aplicar 300 ppm al mutante *Rin* (**Figura IV.3.2.d**).

La medida del etileno desprendido por las raíces mostró un patrón similar en ambos genotipos, aunque con diferencias cuantitativas. Se midió el etileno a tiempo 0, es decir antes de aplicar los tratamientos de Pi, a tiempo 24 horas tras la aplicación de dichos tratamientos y a los 14 días de la aplicación. Tras 14 días de la aplicación de los tratamientos de Pi, y en ambos genotipos, se encontraron valores reducidos de etileno como consecuencia de la adición de Pi e independientemente de la concentración aplicada, aunque esta reducción fue mucho mayor en Ailsa Craig, en tanto que en el mutante *Rin* la reducción fue menos acusada (**Figura IV.3.3**).



**Figura IV.3.2.** Parámetros de micorrización de plantas de tomate silvestres *Ailsa Craig* y *Rin* inoculadas con *R. irregularis*, y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas con fósforo (en forma de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) a 100 y 300 ppm y cosechadas a los 14 días de dicho tratamiento (dpt). a) Porcentaje de raíz micorrizada; b) Frecuencia de micorrización (% F); c) Intensidad de micorrización (% M); d) Intensidad arbuscular, en la zona colonizada (% a). Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

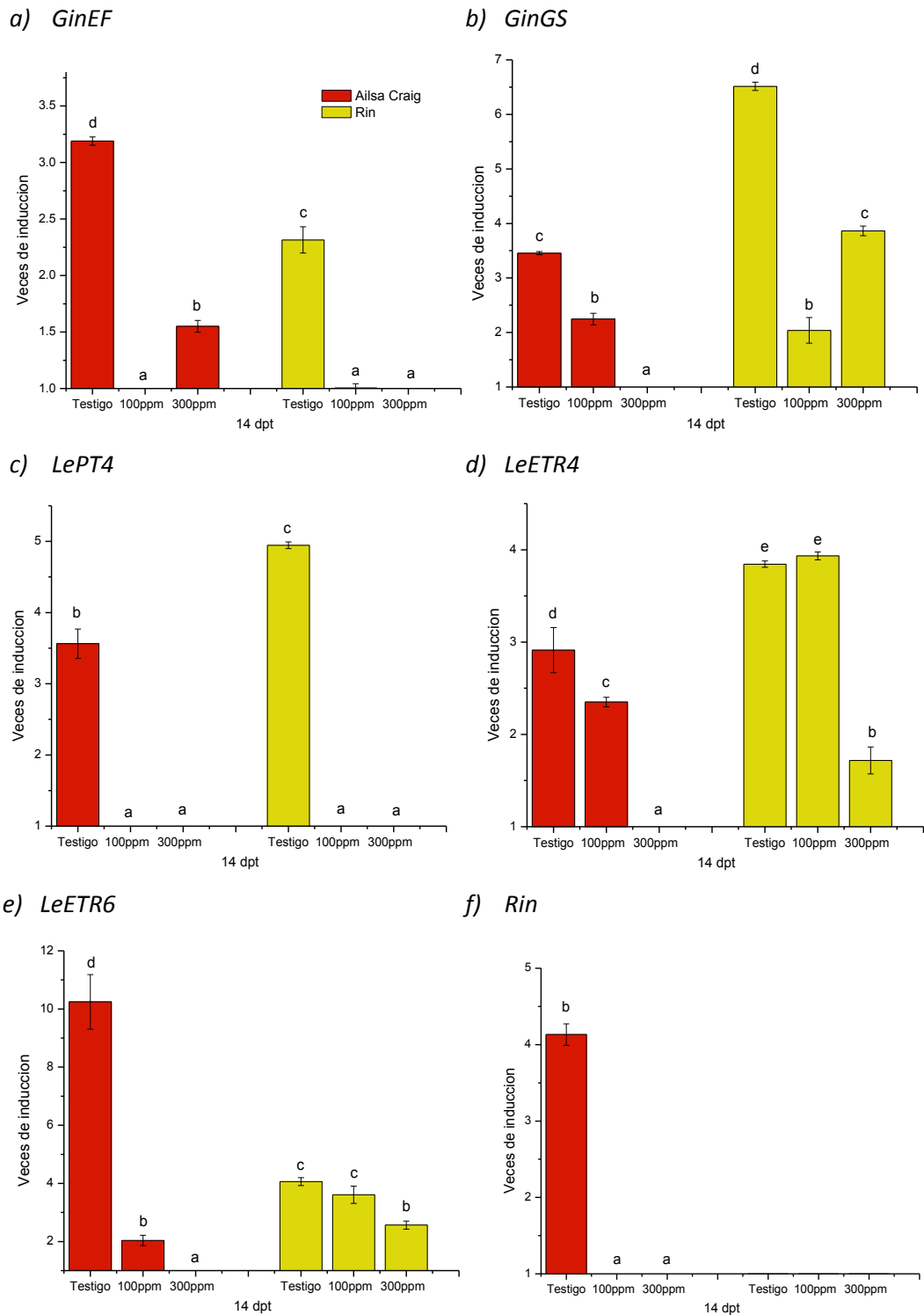


**Figura IV.3.3.** Etileno desprendido de raíces de plantas silvestres Ailsa Craig y su mutante *Rin* colonizadas por *R. irregularis* y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas con fósforo (en forma de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) a 100 y 300 ppm y cosechadas a diferentes días tras dicho tratamiento (dpt). Los datos representados son media de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  error estándar, y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

#### IV.3.1.1. Expresión de genes marcadores de la funcionalidad de la simbiosis MA, de respuesta a etileno y de transporte de Pi en plantas silvestres y mutantes de tomate alterados en su percepción a etileno (*Rin*) en respuesta a una dosis alta de fósforo

El análisis del patrón de expresión de genes fúngicos y vegetales marcadores del desarrollo del hongo y de la actividad arbuscular se realizó en paralelo al estudio de parámetros histoquímicos de micorrización. Se evaluaron genes relacionados con la tasa de colonización y funcionalidad del hongo, la biosíntesis y percepción de etileno y el transporte de fósforo. El nivel de expresión se normalizó respecto a la cantidad de ARNm del gen de tomate factor de elongación  $1\alpha$ , *LeEF $\alpha$ 1*. El cambio inducido en la expresión génica se calculó usando el método de  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ , mostrándose el valor de expresión relativa entre tratamientos. El análisis se realizó una vez transcurridos 14 días posteriores al tratamiento con las dos concentraciones de fósforo asimilable, 100 y 300 ppm Pi (en forma de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ).

La aplicación de fósforo redujo los niveles de expresión de todos los genes analizados en ambos genotipos, comparado los tratamientos con Pi con su testigo respectivo sin tratar. En Ailsa Craig, el gen *GinEF* redujo su expresión hasta 3 veces cuando se aplicó 100 ppm Pi aunque a la concentración de 300 ppm la reducción fue de solamente 2 veces (**Figura IV.3.4.a**). Los genes *LePT4* y *Rin* redujeron drásticamente su expresión independientemente de la concentración de fósforo aplicado (**Figura IV.3.4.c y f**), en tanto que los genes *GinGS*, *LeETR4* y *LeETR6* mostraron una reducción gradual de los niveles de expresión al aumentar la concentración de fósforo aplicado (**Figura IV.3.4.b, d y e**).



**Figura IV.3.4.** Patrón de expresión de genes marcadores del desarrollo de la micorrización, trasporte de fósforo asociado a la micorrización y percepción de etileno en plantas de tomate silvestres de la variedad Ailsa Craig y mutante *Rin*, tratadas con distintas concentraciones de Pi e inoculadas con *R. irregularis*, y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas con fósforo (en forma de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) a 100 y 300 ppm y cosechadas 14 días tras dicho tratamiento (dpt). a) *GinEF*; b) *GinGS*; c) *LePT4*; d) *LeETR4*; e) *LeETR6*; f) *Rin*. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ). El valor de expresión génica está representado como veces de inducción/represión de cada gen respecto al tratamiento con menor nivel de expresión, cuyo valor es igual a 1.

Respecto al mutante *Rin*, el gen *GinGS* redujo su expresión hasta 5 veces a 100 ppm Pi pero a 300 ppm Pi la reducción fue de solo 2.5 veces (**Figura IV.3.4.b**). Los genes *GinEF* y *LePT4* redujeron drásticamente su expresión a niveles mínimos independientemente de la concentración de Pi aplicada (**Figura IV.3.4.a y c**). Los genes *LeETR4* y *LeETR6* mostraron una reducción dependiente de la dosis de Pi aplicada, que fue más acusada en las plantas silvestres, donde a 100 y 300 ppm de Pi se detectó reducción respecto al tratamiento control. En plantas *Rin*, la reducción de la expresión de ambos genes solo fue apreciable con 300 ppm (**Figura IV.3.4.d y e**). El gen *Rin* no se expresó en el mutante *Rin* como se esperaba, y en plantas silvestres se redujo su expresión al mínimo tras la aplicación de ambos tratamientos con Pi (**Figura IV.3.4.f**).

En términos generales, el fósforo inhibió la expresión de los genes marcadores de la micorrización, de la biosíntesis y percepción de etileno y del transporte de fósforo asociado al proceso simbiótico independientemente del genotipo de la planta.

#### **IV.3.1.2. Expresión de genes vegetales de defensa y metabolismo hormonal durante el proceso de micorrización en mutantes de tomate alterados en su percepción a etileno (*Rin*) en respuesta a una dosis alta de fósforo**

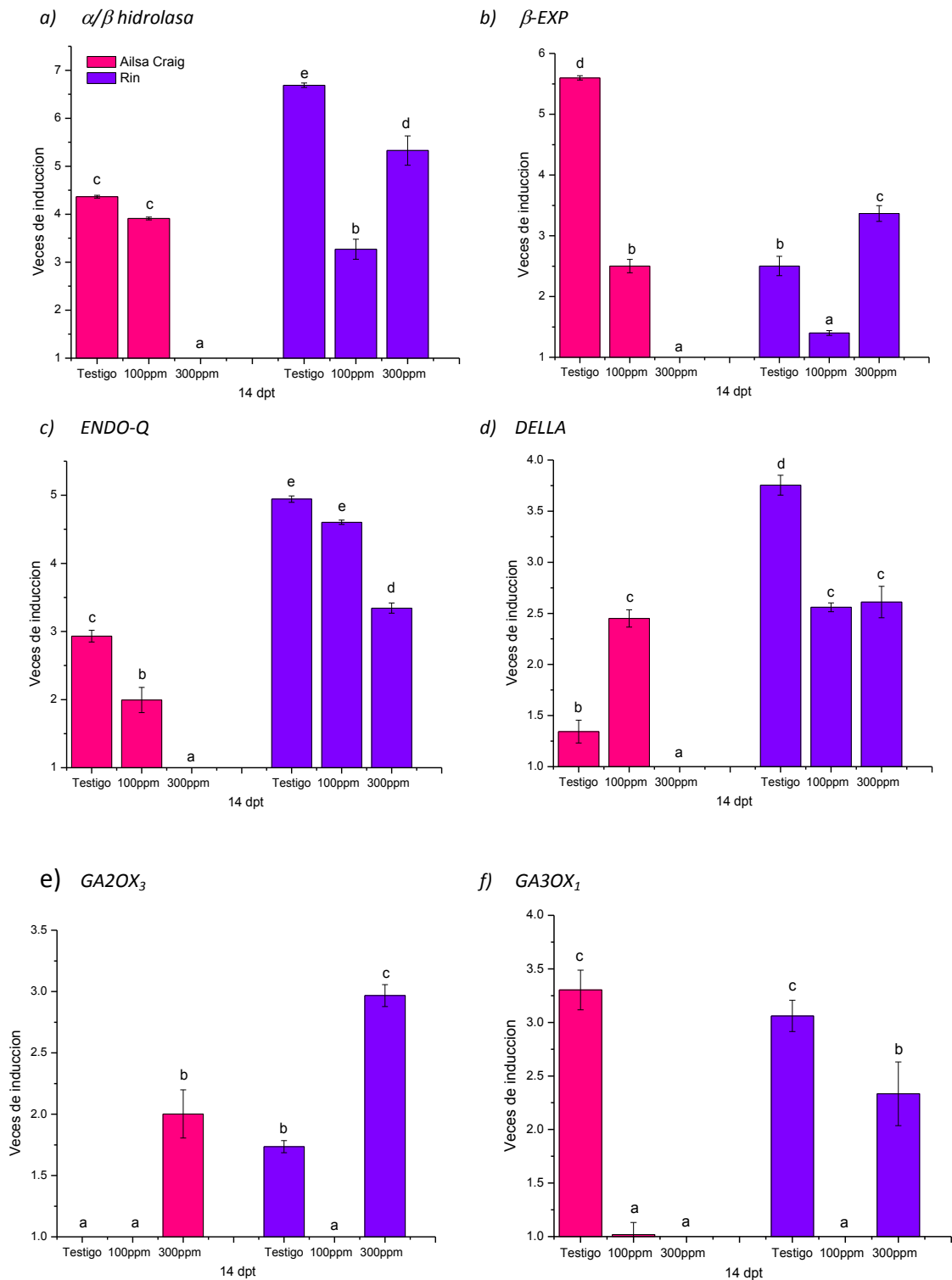
El análisis del patrón de expresión de diversos genes de defensa y metabolismo hormonal asociados al proceso de micorrización se evaluó para complementar los resultados histoquímicos de la micorrización y estimar en mayor detalle los cambios a nivel genético asociados al aporte de Pi. El nivel de expresión se normalizó respecto a la cantidad de ARNm del gen de tomate factor de elongación  $1\alpha$ , *LeEF $\alpha$ 1*. El cambio inducido en la expresión génica se calculó usando el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , mostrándose el valor de expresión relativa entre tratamientos. El análisis se realizó una vez transcurridos 14 días posteriores al tratamiento con las dos concentraciones de fósforo asimilable, 100 y 300 ppm Pi (en forma de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ).

En Ailsa Craig, el gen  $\alpha/\beta$  hidrolasa no mostró diferencias de expresión respecto al testigo sin tratar a 100 ppm Pi, pero a 300 ppm la reducción fue dramática, llegando a niveles mínimos de expresión (**Figura IV.3.5.a**). Los genes  *$\beta$ -Exp* y *ENDO-Q* mostraron un patrón de expresión similar, observándose una reducción de la expresión génica dependiente de la dosis de Pi

aplicada, pues la aplicación de 100 ppm Pi redujo los valores de expresión y la adición de una mayor concentración originó niveles mínimos de expresión (**Figura IV.3.5.b y c**). Por su parte, el gen *DELLA* aumentó su expresión hasta 2 veces cuando se aplicó 100 ppm Pi y se vio inhibido con una concentración de 300 ppm Pi (**Figura IV.3.5.d**). Los genes relacionados con el metabolismo de las giberelinas *GA2OX<sub>3</sub>* y *GA3OX<sub>1</sub>* mostraron un comportamiento distinto, pues *GA2OX<sub>3</sub>* únicamente se expresó a 300 ppm Pi (2.2 veces) mientras que *GA3OX<sub>1</sub>* se inhibió drásticamente a ambas concentraciones de fósforo aplicado (**Figura IV.3.5.e y f**).

En el mutante *Rin*, los genes  $\alpha/\beta$  hidrolasa y  $\beta$ -Exp mostraron un comportamiento similar, pues a 100 ppm Pi redujeron su expresión en mayor medida que a 300 ppm. Incluso el gen  $\beta$ -Exp vió favorecida su expresión con una dosis de 300 ppm (**Figura IV.3.5.a y b**). *ENDO-Q* y *DELLA* mostraron una reducción de su expresión cuando se aplicó fósforo a ambas concentraciones, aunque a 100 ppm la reducción de la expresión de *ENDO-Q* no fue significativa (**Figura IV.3.5.c y d**). *GA2OX<sub>3</sub>* mostró una reducción basal de su expresión a 100 ppm Pi pero al igual que en Ailsa Craig, la aplicación de una alta concentración de fosforo (300 ppm) incrementó su expresión respecto al testigo sin tratar (**Figura IV.3.5.e**). Por su parte, la expresión de *GA3OX<sub>1</sub>* se redujo con ambos tratamientos de Pi, siendo la mayor reducción con la dosis menor de 100 ppm Pi (**Figura IV.3.5.f**).

Todos los genes analizados en el mutante *Rin* mostraron mayores valores de expresión respecto al silvestre Ailsa Craig, excepto los genes  $\beta$ -Exp y *GA3OX<sub>1</sub>* que estuvieron siempre por debajo de los valores del silvestre. El gen *GA2OX<sub>3</sub>* mostró una estimulación de la expresión al aplicar una alta concentración de fósforo (300 ppm) tanto en el genotipo silvestre (hasta 2 veces mas que el testigo respectivo) como en el mutante *Rin* (hasta 1.2 veces respecto al testigo respectivo) (**Figura IV.3.5**).

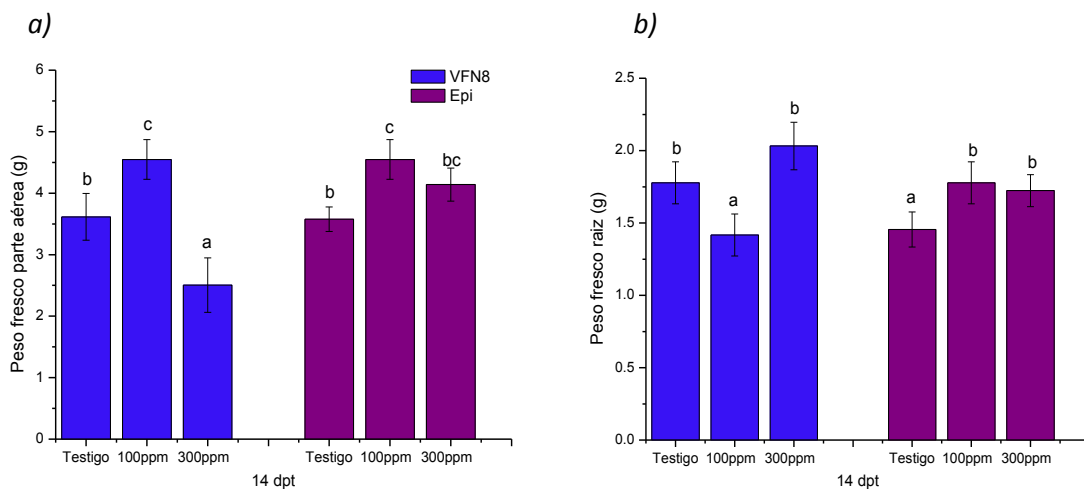


**Figura IV.3.5.** Patrón de expresión de genes marcadores de defensa y metabolismo hormonal en plantas de tomate silvestres de la variedad Ailsa Craig y mutantes *Rin* tratadas con distintas concentraciones de Pi e inoculadas con *R. irregularis* y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas con fósforo (en forma de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) a 100 y 300 ppm y cosechadas 14 días tras dicho tratamiento (dpt). a)  $\alpha/\beta$  hidrolasa (hipotético receptor hormonal); b)  $\beta$ -Exp, Expansina; c) ENDO-Q, respuesta defensiva, d) DELLA, inactivación de giberelinas; e) GA2OX<sub>3</sub>, metabolismo de giberelinas; f) GA3OX<sub>1</sub>, metabolismo de giberelinas. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ). El valor de expresión génica está representado como veces de inducción/represión de cada gen respecto al tratamiento con menor nivel de expresión cuyo valor siempre sea igual a 1.



### IV.3.2. Efectos sobre la micorrización de plantas mutantes de tomate de sensibilidad incrementada a etileno (*Epi*) en respuesta a una dosis alta de fósforo

Para continuar con el estudio de la interacción entre el fósforo y el etileno se realizaron una serie de experimentos en el mutante *Epi*, con sensibilidad incrementada a etileno. Las plantas del genotipo silvestre VFN8 y su mutante isogénico *Epi* fueron inoculadas con *R. irregularis* y se trataron con dos dosis de fósforo (100 y 300 ppm de Pi asimilable en forma de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ). La aplicación del fósforo se realizó una vez establecida la micorrización, comprobando que en el momento de la aplicación los niveles de colonización eran al menos de un 20% de la raíz en las plantas silvestres, para asegurarnos así que el efecto del fósforo aplicado era sobre el desarrollo de la colonización dentro de la raíz y no sobre la fase presimbótica de contacto y penetración en la raíz. Se analizaron parámetros fisiológicos de la planta y el efecto sobre la micorrización a los 14 días postratamiento con Pi. El análisis se complementó con la determinación de la expresión de genes marcadores de la simbiosis y respuesta de la planta a la colonización.

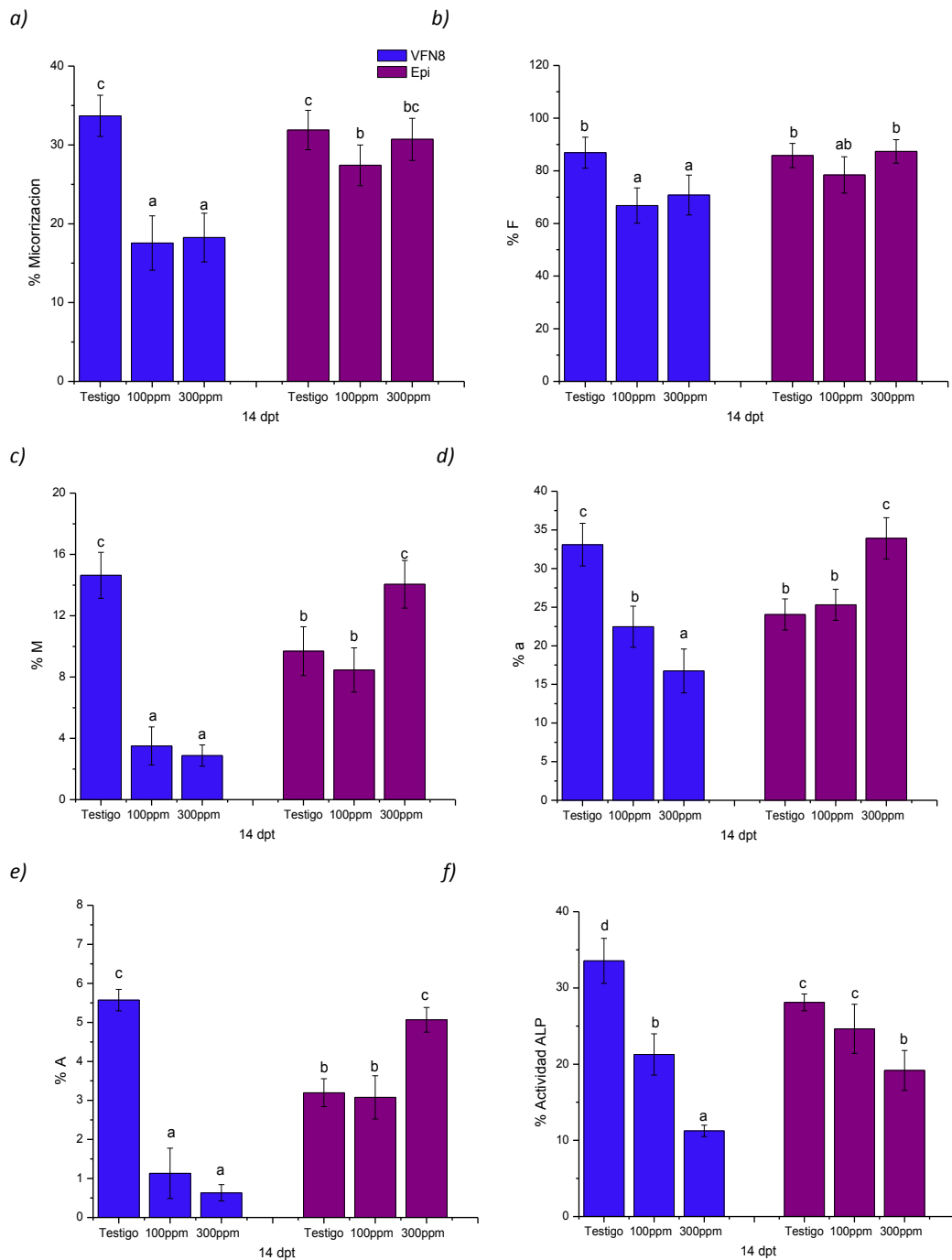


**Figura IV.3.6.** Peso fresco de plantas de tomate de la variedad silvestre VFN8 y mutantes *Epi*, hipersensible a la acción de etileno, en respuesta al tratamiento con distintas dosis de fósforo. Las plantas fueron inoculadas con *R. irregularis* y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas con fósforo (en forma de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) a 100 y 300 ppm y cosechadas a los 14 días de dicho tratamiento (dpt). a) Peso fresco de la parte aérea; b) Peso fresco de la raíz. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

El peso fresco mostró un comportamiento similar en ambos genotipos. La aplicación de Pi no afectó drásticamente este parámetro. Se observó un ligero incremento del peso fresco de la parte aérea con el tratamiento de 100 ppm, y únicamente en VFN8 se observó un descenso

del mismo con 300 ppm. El fresco de la raíz aumentó ligeramente comparado con el testigo en plantas *Epi*, y se afectó negativamente en plantas VFN8 a 100 ppm de Pi (**Figura IV.3.6**).

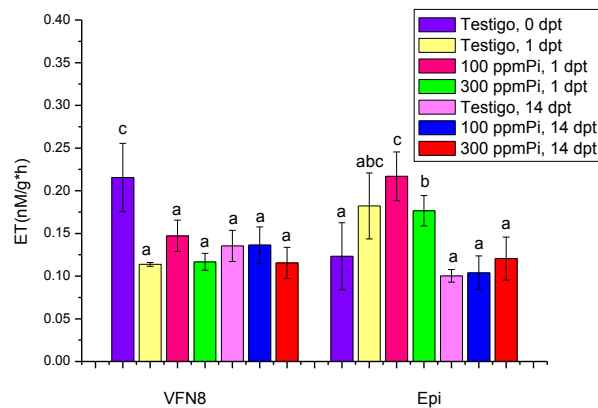
La micorrización total medida como porcentaje de colonización se vio negativamente afectada por la adición de Pi en plantas VFN8, independientemente de la concentración aplicada. Sin embargo, el mutante *Epi* mostró niveles similares de micorrización que su testigo no tratado tras los dos tratamientos con Pi (**Figura IV.3.7.a**). La frecuencia de micorrización (% F) se redujo ligeramente cuando se aplicó fósforo a las dos concentraciones establecidas en VFN8, en tanto que el mutante *Epi* no respondió negativamente al fósforo añadido, mostrando valores similares al testigo no tratado. Ambos testigos no tratados mostraron niveles similares de % F (**Figura IV.3.7.b**). Los parámetros % M, % a y % A mostraron un comportamiento similar entre sí y dependiente del genotipo estudiado. En VFN8 la adición de fósforo redujo drásticamente el valor de % M a ambas concentraciones (desde 16 % del testigo hasta el 4 % a las dos concentraciones (**Figura IV.3.7.c**). De igual modo ocurrió para el % a que se redujo de un 32 % hasta un 22 % y un 18 % cuando se aplicó fósforo en ambas concentraciones (**Figura IV.3.7.d**). En consecuencia, y dado que % A se calcula en función de % M y % a, el valor de % A se redujo significativamente en ambos tratamientos con Pi en plantas VFN8 (**Figura IV.3.7.e**). En el caso de *Epi*, los parámetros de % M, % a y % A mostraron el mismo patrón, pues a 100 ppm no variaron respecto al testigo, en tanto que a 300 ppm mostraron incrementos significativos en su valor comparado con el testigo sin tratar (**Figura IV.3.7.c, d y e**). El efecto de la adición de fósforo sobre la actividad de la fosfatasa alcalina fúngica (ALP) fue más acusado en el genotipo VFN8 que en el mutante *Epi*. En VFN8 hubo un efecto negativo dependiente de la dosis, y en *Epi* la adición de fósforo no afectó la actividad a 100 ppm Pi en tanto que a 300 ppm Pi provocó una ligera reducción, significativamente menor que la que provocó en VFN8 esta misma dosis (**Figura IV.3.7.f**). En términos generales, el mutante *Epi* con sensibilidad incrementada a etileno no mostró efectos negativos dramáticos en ningún parámetro de micorrización cuando se cultivó en condiciones de altas dosis de fósforo (100 y 300 ppm Pi), y únicamente la actividad ALP se vio ligeramente afectada a 300 ppm en dicho mutante.



**Figura IV.3.7.** Parámetros de micorrización de plantas de tomate de la variedad silvestre VFN8 y mutantes *Epi* inoculadas con *R. irregularis* y tras un periodo de micorrización de 28 días fueron tratadas con fósforo (en forma de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) a 100 y 300 ppm y cosechadas a los 14 días de dicho tratamiento (dpt). a) Porcentaje de raíz micorrizada; b) Frecuencia de micorrización (% F); c) Intensidad de micorrización (% M); d) Intensidad arbuscular en la zona colonizada (% a); e) Intensidad arbuscular total (% A); f) Actividad de la fosfatasa alcalina. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

La medida de la cantidad de etileno desprendido por la raíz se realizó a tiempo 0, es decir antes de aplicar los tratamientos de Pi, a tiempo 24 h tras la aplicación de dichos

tratamientos y a los 14 días de la aplicación. El genotipo VFN8 mostró una reducción del contenido en etileno en todos los tratamientos respecto al etileno medido a tiempo 0 en el tratamiento testigo, si bien esa reducción fue generalizada y no dependió de los tratamientos con fósforo. El mutante *Epi* mostró un incremento en los niveles de etileno a las 24 h de añadir Pi, que fue más acusado y significativo con la dosis de 100 ppm Pi. A los 14 días tras el tratamiento, los niveles de etileno se mantienen constantes entre tratamientos y se redujeron respecto al pico detectado a las 24 h (Figura IV.3.8).



**Figura IV.3.8.** Etileno desprendido de raíces de la planta silvestre VFN8 y su mutante isogénico *Epi*, colonizadas por *R. irregularis* y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas con fósforo (en forma de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) a 100 y 300 ppm y cosechadas a diferentes días tras dicho tratamiento (dpt). Los datos representados son media de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

#### IV.3.2.1. Expresión de genes marcadores de la funcionalidad de la simbiosis MA, respuesta a etileno y transporte de Pi en mutantes de tomate con sensibilidad incrementada a etileno en respuesta a una dosis alta de fósforo

El análisis histoquímico de la alteración del patrón de micorrización por efecto de una dosis alta de fósforo en el mutante de sensibilidad incrementada a etileno (*Epi*) se complementó con el análisis molecular de la expresión de genes marcadores de la funcionalidad de la simbiosis, del metabolismo del etileno y del transporte de fósforo, siguiendo el protocolo descrito en el capítulo III.5.

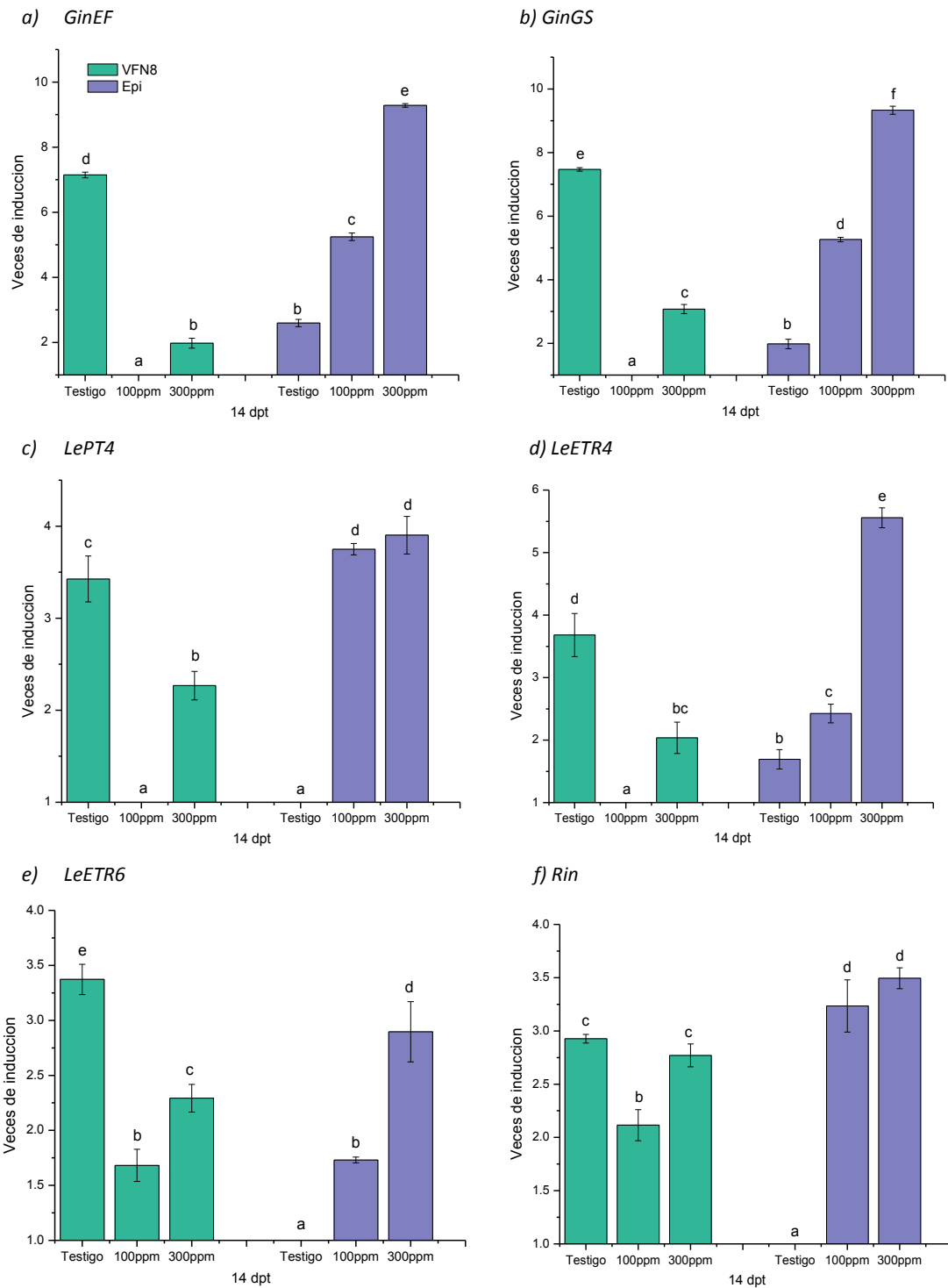
Los resultados mostraron dos categorías de genes en cuanto a su perfil de expresión. Por un lado, los genes *GinEF*, *GinGS*, *LePT4*, *LeETR4* y *LeETR6* mostraron un patrón de expresión similar (Figura IV.3.9.a.b.c.d. y e). Dicho patrón se caracterizó por una menor expresión en

plantas *Epi* sin tratar respecto a plantas VFN8 y una reducción en la expresión génica en plantas VFN8 tras la aplicación de Pi fue más acusado con la adición de 100 ppm que con 300 ppm. Sin embargo en plantas *Epi*, este grupo de genes incrementó su expresión cuando se aplicó Pi, siendo la expresión mayor con la dosis más alta (**Figura IV.3.9.a.b.c.d. y e**).

Así, en plantas *Epi*, aunque con valores cuantitativos diferentes, la expresión de los genes *GinEF*, *GinGS*, *LeETR4*, *LeETR6* y *LePT4* estuvo por encima del testigo tanto a 100 como a 300 ppm, siendo la tendencia a incrementar la expresión en paralelo al incremento de la dosis de Pi aplicado (**Figura IV.3.9.a.b.c.d. y e**).

Por otro lado, el segundo perfil de expresión lo constituye el gen *Rin*, que mostró un patrón de expresión caracterizado por una leve regulación negativa en plantas VFN8 con la dosis de 100 ppm de Pi, y un incremento en la expresión en plantas *Epi* como consecuencia de la aplicación de Pi (**Figura IV.3.9.f**).

Es importante señalar que en la mayoría de los casos y en plantas *Epi* de sensibilidad incrementada a etileno, la aplicación de Pi favoreció la expresión de los genes marcadores de la simbiosis MA, del metabolismo de etileno y del transporte de fósforo.

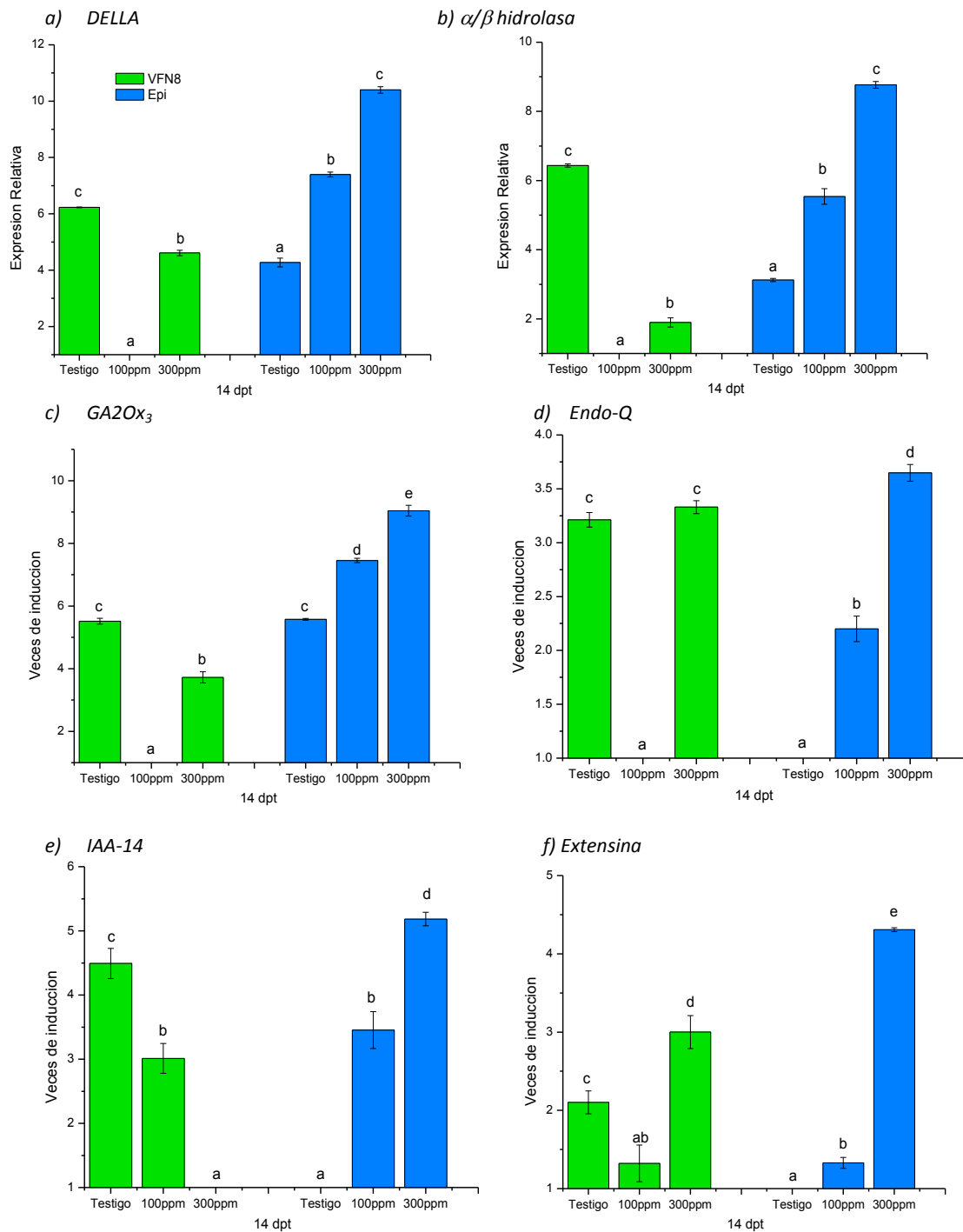


**Figura IV.3.9.** Patrón de expresión de genes marcadores del desarrollo de la micorrización, transporte de fósforo asociado a la micorrización y percepción de etileno en plantas de tomate silvestres de la variedad VFN8 y su mutante *Epi* inoculadas con *R. irregularis*, y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas con fósforo (en forma de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) a 100 y 300 ppm y cosechadas 14 días tras dicho tratamiento (dpt). a) *GinEF*; b) *GinGS*; c) *LePT4*; d) *LeETR4*; e) *LeETR6*; f) *Rin*. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ). El valor de expresión génica está representado como veces de inducción/represión de cada gen respecto al tratamiento con menor nivel de expresión, cuyo valor es igual a 1.

#### **IV.3.2.2 Expresión de genes vegetales de defensa y metabolismo hormonal durante el proceso de micorrización de mutantes de tomate con sensibilidad incrementada a etileno (*Epi*) en respuesta a una dosis alta de fósforo**

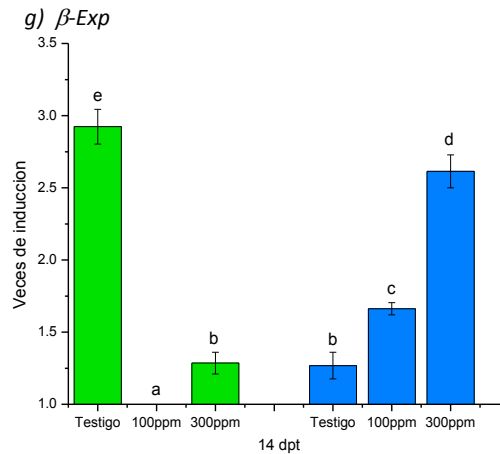
Al igual que en casos anteriores, el análisis histoquímico del efecto de una dosis alta de fósforo en el mutante de sensibilidad incrementada a etileno (*Epi*) se complementó con el análisis molecular de la expresión de genes vegetales de defensa y metabolismo hormonal cuya expresión se sabe que está regulada durante la micorrización.

Los genes analizados conformaron distintos grupos de expresión. En el genotipo VFN8, los genes *DELLA*,  $\alpha/\beta$  hidrolasa, *GA2Ox<sub>3</sub>*, *Endo-Q* y  *$\beta$ -Exp* mostraron una regulación negativa con valores de expresión mínimos cuando se aplicó 100 ppm Pi, si bien la aplicación de 300 ppm Pi afectó en menor grado la expresión de estos genes, e incluso en el caso de *Endo-Q* la dosis de 300 ppm no afectó su expresión respecto a la observada en el testigo no tratado (**Figura IV.3.10.a, b, c, d y g**). En el caso de *Epi*, la expresión de los genes *DELLA*,  $\alpha/\beta$  hidrolasa, *GA2Ox<sub>3</sub>*, *Endo-Q* y  *$\beta$ -Exp* se vió favorecida por la adición de ambas dosis de Pi, si bien la expresión basal en el testigo no tratado fue generalmente menor que la expresión en el testigo silvestre (**Figura IV.3.10.a, b, c, d y g**). Por su parte, en VFN8 el gen *IAA-14* también se reguló negativamente a ambas dosis aplicadas, pues a 100 pm se redujo casi 2.5 veces y a 300 ppm se redujo a niveles mínimos (casi 5 veces menos) respecto al testigo (**Figura IV.3.10.e**). El gen codificante para una Extensina de tomate regulada positivamente durante la micorrización se afectó poco por la aplicación de Pi en el genotipo VFN8, mostrando incluso a 300 ppm valores mayores al testigo (**Figura IV.3.10.f**). En el genotipo *Epi*, *IAA-14* y *Extensina* se regularon positivamente al adicionar fósforo disponible, alcanzando valores por encima del testigo. *IAA-14* aumentó 3.5 veces a 100 ppm y 5 veces a 300 ppm (**Figura IV.3.10.e**), en tanto que *Extensina* aumentó casi 0.5 veces a 100 ppm y hasta 4 veces a 300 ppm (**Figura IV.3.10.f**). El genotipo *Epi* con sensibilidad incrementada a etileno favoreció la expresión de los genes de defensa vegetal y metabolismo hormonal en condiciones de alta disponibilidad de fósforo.



**Figura IV.3.10.** Patrón de expresión de genes marcadores de defensa y metabolismo hormonal en plantas de tomate silvestres de la variedad VFN8 y su mutante *Epi* inoculadas con *R. irregularis*, y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas con fósforo (en forma de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) a 100 y 300 ppm y cosechadas 14 días tras dicho tratamiento (dpt). a) *DELLA*, inactivación de giberelinas; b) *ENDO-Q*, respuesta defensiva; c) *GA2OX<sub>3</sub>*, metabolismo de giberelinas; d) *ENDO-Q*, respuesta defensiva; e) *IAA-14*, respuesta a auxinas; f) *Extensina*; g)  *$\beta$ -Exp*, Expansina. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ). El valor de expresión génica está representado como veces de inducción/represión de cada gen respecto al tratamiento con menor nivel de expresión cuyo valor siempre sea igual a 1.





**Figura IV.3.10. Continuación.** Patrón de expresión de genes marcadores de defensa y metabolismo hormonal en plantas de tomate silvestres de la variedad VFN8 y su mutante *Epi* inoculadas con *R. irregularis*, y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas con fósforo (en forma de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) a 100 y 300 ppm y cosechadas 14 días tras dicho tratamiento (dpt). a) *DELLA*, inactivación de giberelinas; b) *ENDO-Q*, respuesta defensiva; c) *GA2OX<sub>3</sub>*, metabolismo de giberelinas; d) *ENDO-Q*, respuesta defensiva; e) *IAA-14*, respuesta a auxinas; f) *Extensina*; g)  $\beta$ -Exp, Expansina. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ). El valor de expresión génica está representado como veces de inducción/represión de cada gen respecto al tratamiento con menor nivel de expresión cuyo valor siempre sea igual a 1.

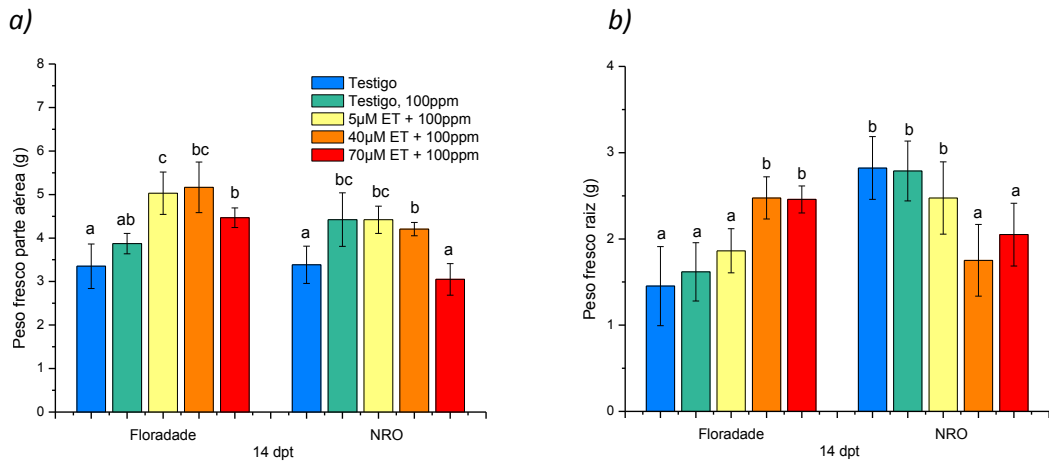
### IV.3.3. Micorrización en plantas mutantes de tomate con sensibilidad reducida a etileno (mutante *NRO*) cultivadas en condiciones de alta disponibilidad de fósforo y tratadas con etileno exógeno

Los experimentos descritos previamente respecto a la alteración diferencial del patrón de micorrización en respuesta a Pi en mutantes de distinta sensibilidad a etileno sugieren un mecanismo de interacción fósforo/etileno. Por ello decidimos dar un paso más en la investigación, intentando poner de manifiesto esa interacción. En este apartado de la Tesis doctoral se describen los resultados de los experimentos de aplicación conjunta de Pi y etileno tanto en plantas silvestres como mutantes *NRO*, que sobre-expresan el gen *LeETR3* que codifica para el receptor NR, lo que las hace más insensibles a la acción de etileno (Ciardi *et al.*, 2000). Plantas de ambos genotipos fueron inoculadas con *R. irregularis* y cultivadas en condiciones de alta disponibilidad de fósforo (100 ppm Pi en forma de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Este tratamiento se combinó con aplicaciones de etileno exógeno (ethephon, en concentraciones de 0, 5, 40 y 70  $\mu\text{M}$ ). Se evaluaron parámetros fisiológicos de la planta y un análisis secuencial de los parámetros de micorrización tras los 14 días de la aplicación de ambos compuestos (dpt). La aplicación del fósforo y ethephon se realizó una vez establecida la micorrización, comprobando que en el momento de la aplicación los niveles de colonización eran al menos de un 20% de la raíz en las plantas silvestres, para asegurarnos así que el efecto de la aplicación

era sobre el desarrollo de la colonización dentro de la raíz y no sobre la fase presimbótica de contacto y penetración en la raíz. Aunado a lo anterior, se analizaron parámetros de la eficiencia de la micorrización, así como marcadores de la simbiosis del hongo y de la planta a nivel molecular según el protocolo descrito en el **capítulo III.5**.

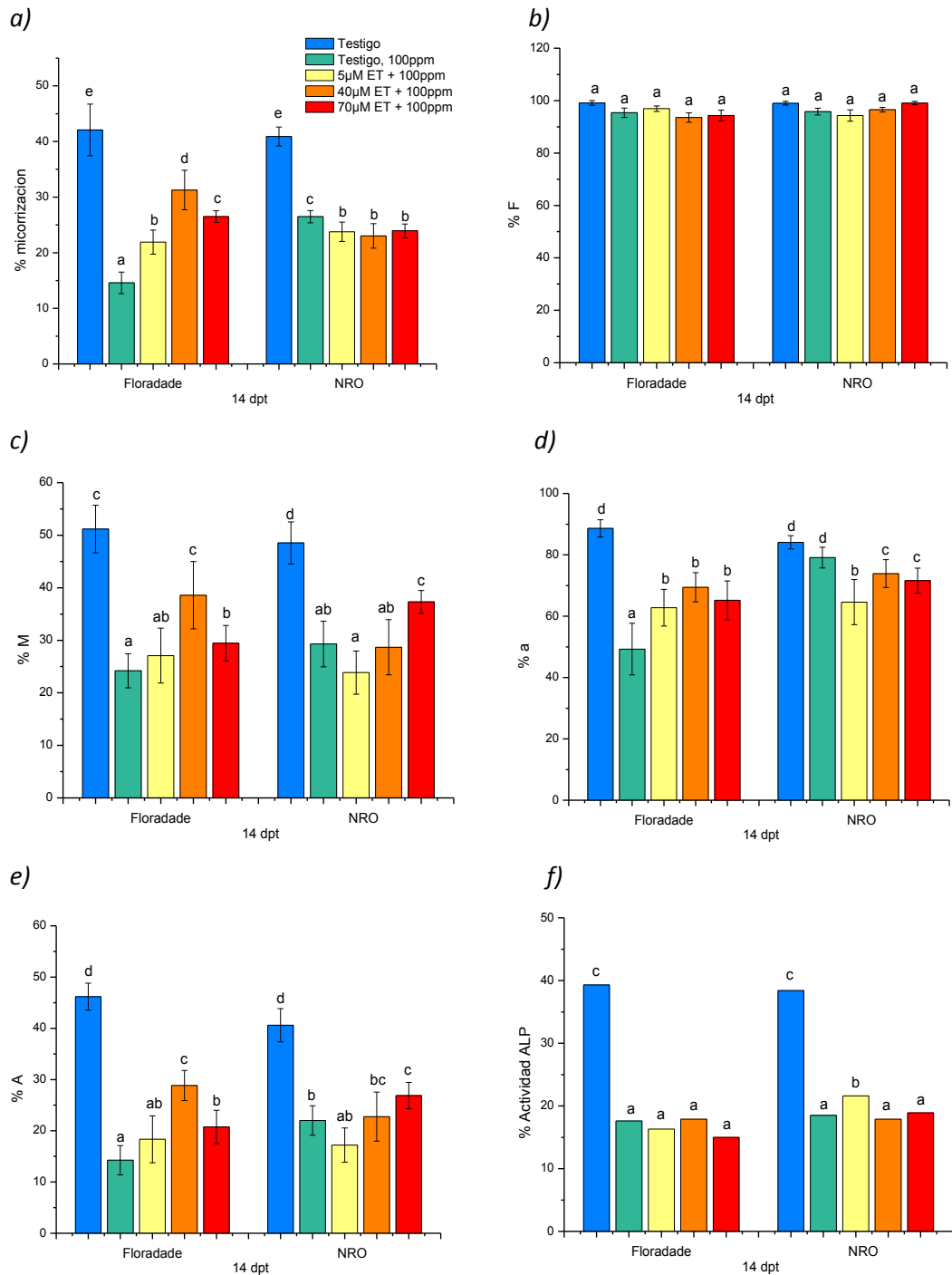
En el genotipo Floradade, el peso fresco de la parte aérea se vio favorecido cuando las plantas se trataron con 5  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$  y 70  $\mu\text{M}$  de ethephon combinado con 100 ppm Pi, y aunque mostraron valores mayores comparado con el testigo, entre sí los 3 tratamientos con ethephon no fueron diferentes. El tratamiento de 70  $\mu\text{M}$  combinado con 100 ppm Pi mostró los valores más altos (**Figura IV.3.11.a**). En tanto que en el mutante NRO, la aplicación de 100 ppm Pi favoreció el peso fresco de la parte aérea por encima de los valores del testigo, tanto aplicado de forma aislada o en combinación con dosis de 5 y 40  $\mu\text{M}$  de ethephon. La adición de 70  $\mu\text{M}$  eliminó el efecto positivo de la aplicación de 100 ppm Pi (**Figura IV.3.11.a**). En el caso del peso fresco de la raíz, únicamente los tratamientos de 40 y 70  $\mu\text{M}$  de ethephon combinados con 100 ppm Pi aumentaron significativamente el peso respecto al testigo en las plantas Floradade, en tanto que en NRO los mismos tratamientos mostraron el efecto contrario, reduciendo el peso fresco significativamente por debajo de los valores del testigo (**Figura IV.3.11.a**).

Se evaluaron diferentes parámetros histoquímicos relacionados con la micorrización y se obtuvieron los siguientes resultados. La micorrización total media como porcentaje de colonización de la raíz en el genotipo silvestre Floradade se redujo cuando se aplicó 100 ppm Pi, aunque la adición de ethephon atenuó el efecto inhibitor del fósforo, aumentando la micorrización al aumentar la concentración de ethephon. El valor máximo de micorrización se alcanzó en el tratamiento de 40  $\mu\text{M}$  de ethephon combinado con 100 ppm Pi, pues la combinación de 70  $\mu\text{M}$  ethephon con 100 ppm fue menos efectivo. Esto podría indicar cierto efecto saturante del ethephon.



**Figura IV.3.11.** Peso fresco de la planta como respuesta a la adición de etileno exógeno (ethephon 5 µM, 40 µM y 70 µM) de plantas silvestres Floradade y mutantes NRO colonizadas con *R. irregularis* y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas con ethephon y/o Pi y cosechadas 14 días pos-tratamiento (14 dpt). a) Peso fresco de la parte aérea; b) Peso fresco de la raíz. Los valores representan las medias de 5 repeticiones biológicas ± el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

El porcentaje de micorrización se vió negativamente afectado por la aplicación de 100 ppm de Pi, tanto en plantas silvestres Floradade como mutantes NRO. En plantas Floradade, la aplicación de ethephon en combinación con Pi resultó en una cierta recuperación del efecto negativo que sobre la micorrización tiene la aplicación de Pi, siendo esta recuperación dependiente de la dosis de ethephon aplicada. En el mutante NRO, la adición de fósforo redujo la micorrización en todos los casos y la adición de ethephon no varió el efecto inhibitor del fósforo e incluso la combinación de Pi con las diferentes combinaciones de ethephon resultó en una disminución más acusada que con el tratamiento de Pi solo (**Figura IV.3.12.a**). Si bien en plantas NRO el efecto inhibitor del fósforo en la micorrización es menos acusado que en plantas silvestres Floradade, la atenuación de este efecto negativo por la presencia de etileno exógeno no es evidente tal y como ocurre en plantas silvestres. Este hecho sugiere una interferencia del etileno durante la regulación de la micorrización en respuesta a la aplicación de Pi. El parámetro % F no mostró diferencias significativas entre genotipos ni entre tratamientos (**Figura IV.3.12.b**). Los parámetros % M y % A mostraron un patrón similar entre sí. En el genotipo Floradade ambos parámetros se redujeron cuando se aplicó fósforo pero la aplicación de ethephon redujo el efecto inhibitor del fósforo, aumentando los valores directamente con el aumento de la concentración de ethephon, aunque a la concentración mayor de 70 µM de ethephon el efecto positivo fue menor que a la concentración de 40 µM de ethephon.

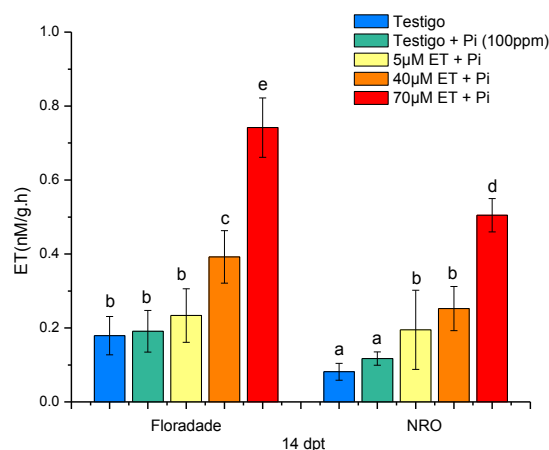


**Figura IV.3.12.** Parámetros de micorrización como respuesta a la adición de etileno exógeno (ethephon, 5 μM, 40 μM y 70 μM) de plantas silvestres Floradade y mutantes NRO inoculadas con *R. irregularis* y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas con ethephon y/o Pi y cosechadas 14 días pos-tratamiento (14 dpt). a) Porcentaje de raíz micorrizada; b) Frecuencia de micorrización (% F); c) Intensidad de micorrización (% M); d) Intensidad arbuscular en la zona micorrizada (% a); e) Intensidad arbuscular en el sistema radical (% A); f) Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP). Los datos representados son media de 5 repeticiones biológicas ± error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

En el mutante NRO, ambos parámetros (% M y % A) se afectaron negativamente con la aplicación de Pi, y tan solo la aplicación de ethephon a altas dosis (70 μM) revirtió en parte

este efecto negativo (**Figura IV.3.12.c y e**). Por otro lado, la proporción de arbusculos en la zona micorrizada de la raíz (% a) se redujo al aplicar fósforo en el genotipo Floradade y la adición de etileno exógeno junto al Pi recuperó ligeramente los valores, aunque la concentración aplicada de ethephon no influyó en el aumento. En el mutante NRO, los valores de % a no se afectaron tras la aplicación de Pi, y tan solo se redujeron ligeramente en los tratamientos combinados de fósforo y etileno (**Figura IV.3.12.d**). La actividad de la fosfatasa alcalina se redujo significativamente casi a la mitad al aplicar fósforo solo y en combinación con ethephon en ambos genotipos (**Figura IV.3.12.f**).

En resumen, los resultados muestran como la aplicación de etileno afecta de manera antagonista al efecto negativo de inhibición de la micorrización por exceso de Pi disponible. De esta forma, la aplicación de ethephon reduce el efecto negativo del Pi sobre la formación de arbusculos, principalmente, y sobre la extensión de la micorrización (**Figura IV.3.12.c. y d**) pero no tiene efecto en la actividad fúngica (% ALP) (**Figura IV.3.12.f**). Se ha observado un efecto dependiente de la dosis aplicada, pues la concentración del etileno aplicado a 40  $\mu\text{M}$  fue más efectiva que una dosis de 70  $\mu\text{M}$ . En este experimento se cuantificó el etileno desprendido de la raíz, observándose que la cantidad de etileno desprendido por las raíces en ambos genotipos fue incrementando en función de la dosis aplicada de ethephon, siendo este efecto más pronunciado en el genotipo Floradade (**Figura IV.3.13**). No se encontró una correlación directa entre el etileno desprendido y la micorrización.

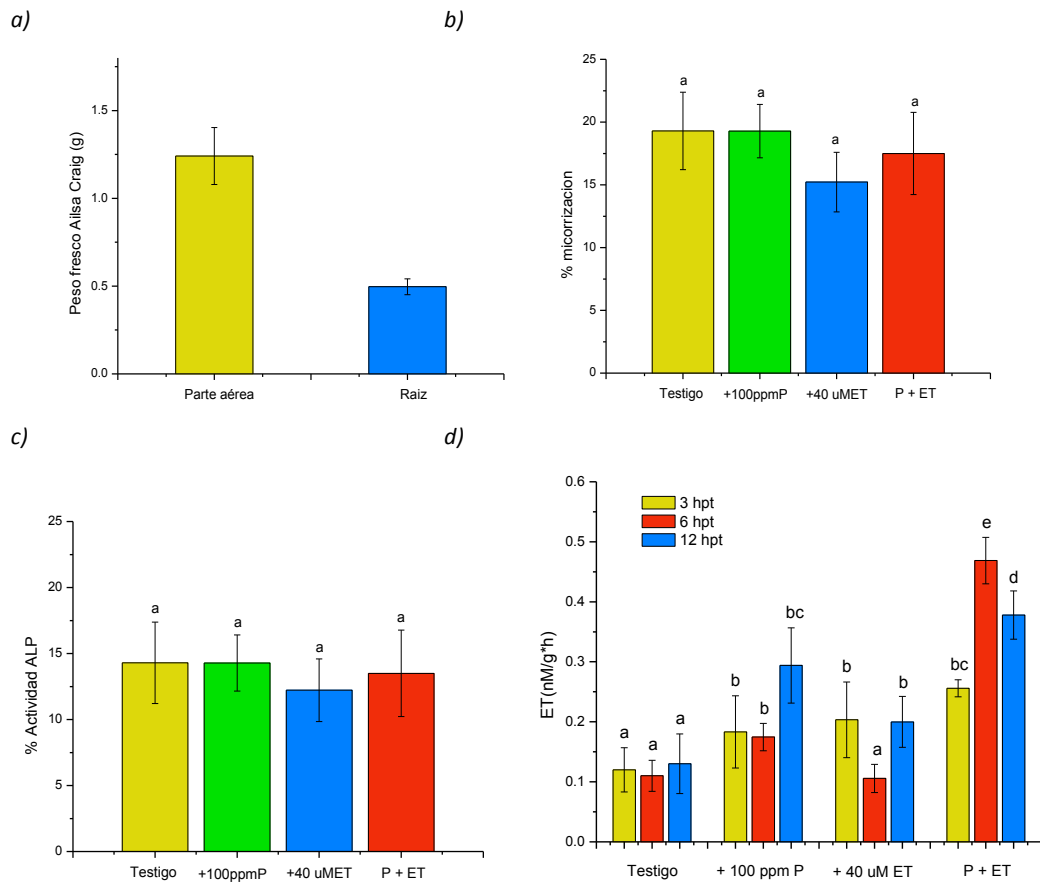


**Figura IV.3.13.** Etileno desprendido de raíces de plantas silvestres Floradade y NRO como respuesta a la adición de etileno exógeno (ethephon 5  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$  y 70  $\mu\text{M}$ ) inoculadas con *R. irregularis* y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas con ethephon y/o Pi y cosechadas 14 días pos-tratamiento (14 dpt). Los datos representados son media de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

#### **IV.3.4. Análisis de la respuesta de interferencia entre el fósforo y etileno en el establecimiento de la micorrización**

Una vez demostrado que existe un efecto antagonista entre el etileno y el fósforo en el establecimiento de la micorrización nos planteamos estudiar las respuestas moleculares que podrían mediar esa interacción y el periodo de tiempo en el que ocurren. Para realizar este estudio se planteó un experimento con plantas silvestres de tomate de la variedad Ailsa Craig inoculadas con *R. irregularis* y cultivadas en condiciones de baja disponibilidad de fósforo para obtener una micorrización adecuada. Una vez alcanzados niveles de micorrización superiores al 20 % (28 dpi) se aplicó la dosis de Pi de 100 ppm Pi en forma de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , y se trataron las plantas con ethephon a una concentración de 40  $\mu\text{M}$  (concentración en donde se observaron los mejores resultados antagonistas del etileno respecto al efecto inhibitor del fósforo en la micorrización (**Figura IV.3.12**). Se evaluaron parámetros de la eficiencia de la micorrización, así como expresión a tiempo corto de genes marcadores de la simbiosis tanto fúngicos como vegetales.

Se analizó el peso fresco de la parte aérea y raíz de las plantas en el momento de la aplicación de ambos compuestos (**Figura IV.3.14.a**), así como el porcentaje de micorrización. Todas las plantas evaluadas tuvieron igual porcentaje de micorrización que fue cercano al 20 % de colonización micorrízica (**Figura IV.3.14.b**). La actividad ALP se mantuvo constante entre las plantas al momento de la aplicación de los tratamientos (**Figura IV.3.14.c**). Finalmente, el etileno desprendido por las raíces fue estimulado bajo todos los tratamientos. Los tratamientos de 100 ppm Pi y 40  $\mu\text{M}$  de ethephon por separado incrementaron ligeramente los niveles de etileno, pero el tratamiento combinado (Pi + ETH) incrementó hasta casi 5 veces la cantidad de etileno desprendido a las 12 hpt, siendo ya importante el incremento desde las 6 hpt (**Figura IV.3.14.d**).

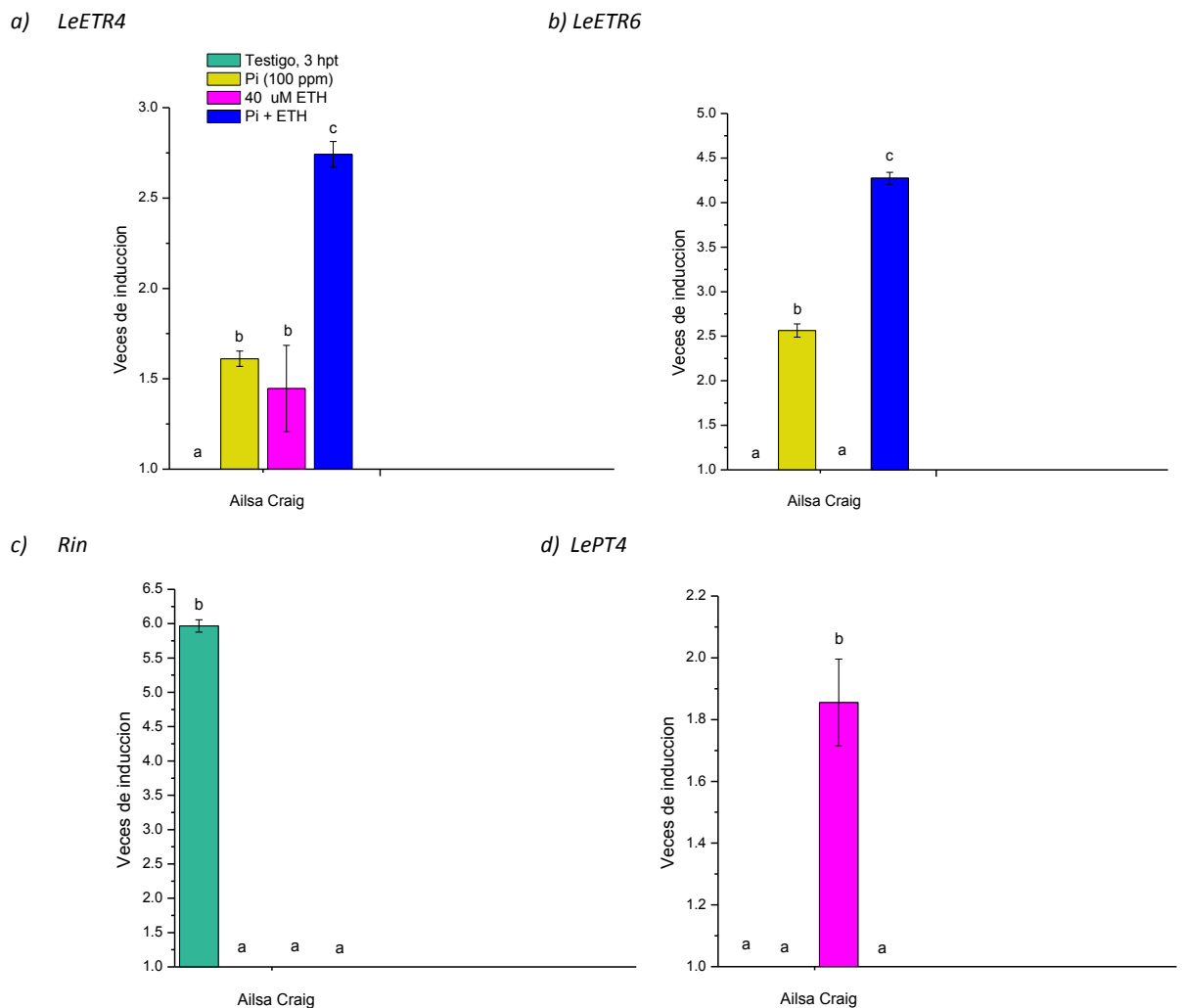


**Figura IV.3.14.** Parámetros fisiológicos de plantas silvestres Ailsa Craig colonizadas con *R. irregularis* y tratadas con 100 ppm (P) de Pi, 40  $\mu$ M de ethephon (ETH) o combinación de ambos compuestos (P+ETH). Las plantas fueron inoculadas con *R. irregularis* y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas con ethephon y/o Pi y cosechadas 3, 6 y 12 horas pos-tratamiento. a) Peso fresco de parte aérea y raíz en el momento de la aplicación; b) % micorrización total en el momento de la aplicación; c) Actividad ALP en el momento de la aplicación; d) Etileno desprendido por las raíces de las plantas tratadas cosechadas durante las 3, 6 y 12 h posteriores al tratamiento. Los datos representados son media de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

El análisis de los genes implicados en la biosíntesis de etileno y transporte de fósforo en plantas micorrizadas se realizó como ya se ha descrito en los capítulos anteriores. El tratamiento combinado de 100 ppm Pi y 40  $\mu$ M de ethephon fue el que más favoreció la expresión de *LeETR4*, ya que mostró una respuesta rápida incrementando su expresión hasta 1.7 mas que el testigo y hasta 1 vez comparado con el resto de los tratamientos (**Figura IV.3.15.a**).

Por su parte, *LeETR6* mostró un patrón de expresión distinto a *LeETR4*, pues no respondió a la aplicación de etileno exógeno. El tratamiento con 100 ppm Pi estimuló su expresión hasta 1.5 veces. También en este caso, en el tratamiento combinado (P + ETH) la expresión de *LeETR6* fue mayor, observándose incrementos de hasta 3.3 veces más (**Figura IV.3.15.b**). El gen *Rin* mostró una respuesta de inhibición de su expresión bajo todos los

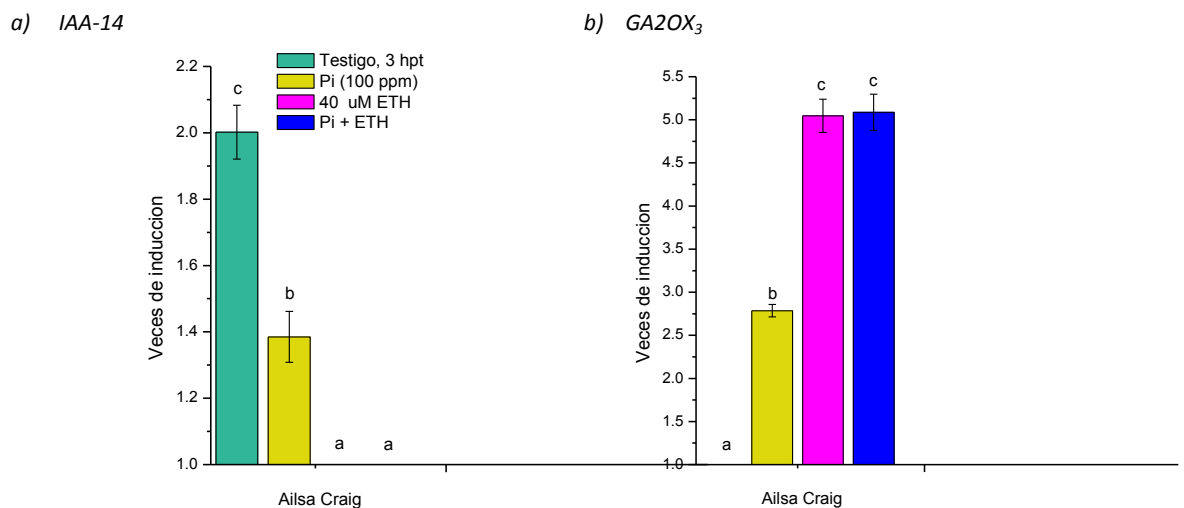
tratamientos (**Figura IV.3.15.c**). La expresión del gen *LePT4*, relacionado con el transporte de fósforo en estructuras simbióticas, fue significativamente estimulada cuando se aplicó el tratamiento individual de etileno exógeno (40  $\mu$ M), con valores de hasta 1 vez más de expresión. La aplicación de 100 ppm Pi no estimuló su expresión (**Figura IV.3.15.d**). Relacionado con lo anterior, el patrón de etileno desprendido por las raíces (**Figura IV.3.14.d**) se asemejó al patrón de expresión del gen *LeETR4* (**Figura IV.3.15.a**).



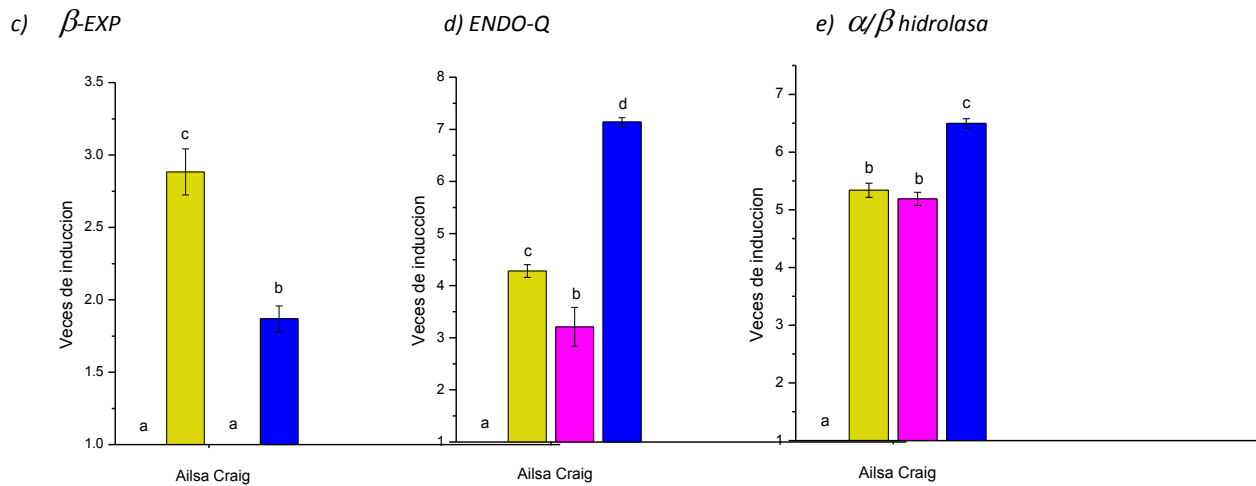
**Figura IV.3.15.** Patrón de expresión de genes marcadores de la percepción de etileno y transporte de fósforo en plantas Ailsa Craig colonizadas con *R. irregularis* y tratadas con 100 ppm (P) de Pi, 40  $\mu$ M de ethephon (ET) o combinación de ambos compuestos (P + ET). Las plantas fueron inoculadas con *R. irregularis* y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas con ethephon y/o Pi y cosechadas a las 3 horas pos-tratamiento. a) *LeETR4*; b) *LeETR6*; c) *Rin*; d) *LePT4*. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ). El valor de expresión génica está representado como veces de inducción/represión de cada tratamiento respecto al tratamiento con menor nivel de expresión, cuyo valor es igual a 1.



Otros genes vegetales relacionados con la defensa y el metabolismo de hormonas e importantes durante el proceso de micorrización también fueron evaluados (**Figura IV.3.16**). De los genes evaluados, únicamente el gen *IAA-14* se reguló negativamente en todos los tratamientos inhibiéndose su expresión hasta 0.6 veces cuando se aplicó Pi y hasta niveles similares al testigo cuando se trató con ETH y ETH+Pi (**Figura IV.3.16.a**). El resto de los genes: *GA2OX<sub>3</sub>*, *β-EXP*, *ENDO-Q* y *α/β hidrolasa* se regularon positivamente en todos los tratamientos. El gen *GA2OX<sub>3</sub>* se expresó hasta 1.7 veces más cuando se aplicó fósforo y, de modo similar, su expresión aumentó hasta 4 veces cuando se aplicó el tratamiento de etileno exógeno y el tratamiento combinado (**Figura IV.3.16.b**). La expresión del gen *β-EXP* fue principalmente estimulada por la adición de fósforo (casi 2 veces), aunque la aplicación de ethephon inhibió la expresión el tratamiento combinado atenuó dicha reducción (**Figura IV.3.16.c**). La expresión del gen *ENDO-Q* fue estimulada significativamente en todos los tratamientos y en todos los tiempos estudiados comparado con el testigo, aunque con el tratamiento combinado se obtuvieron los niveles máximos de expresión (hasta 6 veces comparado con el testigo) (**Figura IV.3.16.d**). De igual modo, el gen *α/β hidrolasa* se expresó más con todos los tratamientos aplicados, variando entre 4 y 5.5 veces respecto al testigo sin tratar (**Figura IV.3.16.e**).



**Figura IV.3.16.** Patrón de expresión de genes marcadores de defensa y metabolismo hormonal en plantas Ailsa Craig colonizadas con *R. irregularis* y tratadas con 100 ppm (P) de Pi, 40 μM de ethephon (ETH) o combinación de ambos compuestos (P+ETH). Las plantas fueron inoculadas con *R. irregularis* y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas con ethephon y/o Pi y cosechadas 3 horas pos-tratamiento. a) *IAA-14*; b) *GA<sub>2</sub>OX<sub>3</sub>*; c) *β-EXP*; d) *ENDO-Q*; e) *α/β hidrolasa*. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas ± el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan (p<0.05). El valor de expresión génica está representado como veces de inducción/represión de cada gen en los distintos tratamientos respecto al tratamiento con menor nivel de expresión, cuyo valor es igual a 1.



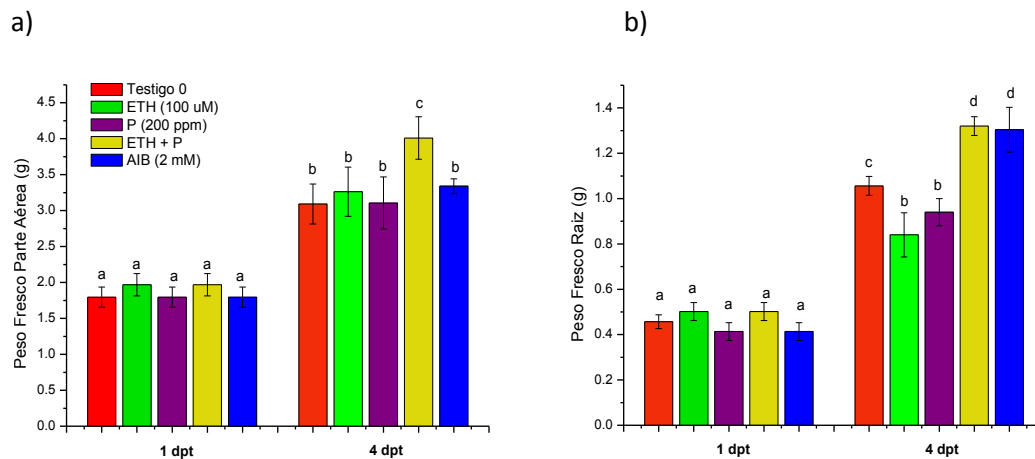
**Figura IV.3.16. Continuación.** Patrón de expresión de genes marcadores de defensa y metabolismo hormonal en plantas Ailsa Craig colonizadas con *R. irregularis* y tratadas con 100 ppm (P) de Pi, 40 μM de ethephon (ETH) o combinación de ambos compuestos (P+ETH). Las plantas fueron inoculadas con *R. irregularis* y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas con ethephon y/o Pi y cosechadas 3 horas pos-tratamiento. a) *IAA-14*; b) *GA<sub>2</sub>OX<sub>3</sub>*; c) *β-EXP*; d) *ENDO-Q*; e) *α/β hidrolasa*. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas ± el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ). El valor de expresión génica está representado como veces de inducción/represión de cada gen en los distintos tratamientos respecto al tratamiento con menor nivel de expresión, cuyo valor es igual a 1.

En términos generales, los genes *GA<sub>2</sub>OX<sub>3</sub>*, *ENDO-Q* y *α/β hidrolasa* se expresaron positivamente en todos los tratamientos aplicados. Por su parte, el gen *IAA-14* se reguló negativamente por los tratamientos aplicados. El patrón de expresión de los genes *GA<sub>2</sub>OX<sub>3</sub>* y *ENDO-Q* se asemeja al patrón de etileno desprendido por las raíces (**Figura IV.3.14.d**).

En un segundo experimento complementario al anterior se extendió el tiempo de evaluación de los resultados y se aplicaron dosis mayores de etileno y de fósforo para acentuar el efecto de la interacción. El experimento se planificó para obtener plantas de la variedad Ailsa Craig micorrizadas con *R. irregularis* con valores de una micorrización bien establecida en al menos un 20 % de la raíz, a los 28 dpi, y a partir de este tiempo (T0) se aplicaron dosis únicas de etileno exógeno (ethephon, 100 μM), 200 ppm Pi en forma de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, un tratamiento combinando fósforo y etileno y un tratamiento de 2 mM de ácido α-aminobutírico (AIB, inhibidor de la síntesis de etileno). Se analizó el peso fresco y etileno desprendido por las raíces, así como parámetros de la micorrización y funcionalidad de la simbiosis MA en cosechas consecutivas durante 1 y 4 días postratamiento (dpt).

El tratamiento combinado (ETH +P) mostró un ligero aumento en el peso fresco de la parte aérea a los 4 dpt, el resto de los tratamientos no se diferenciaron del testigo (**Figura IV.3.17a**). La aplicación de fósforo y etileno por separado inhibieron el crecimiento de la raíz a

los 4 dpt aún por debajo del testigo; el tratamiento combinado y la aplicación del inhibidor de la biosíntesis de etileno (AIB) favorecieron el peso de la raíz por encima de los valores del testigo (**Figura IV.3.17.b**).

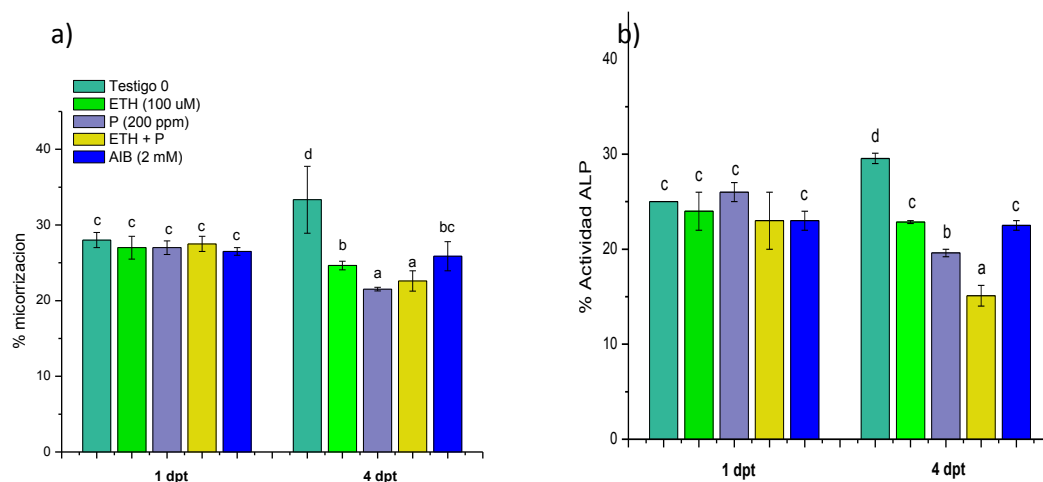


**Figura IV.3.17.** Peso fresco de plantas Ailsa Craig inoculadas con *R. irregularis*, tratadas con etileno exógeno (ethephon, 100 uM), 200 ppm Pi en forma de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , un tratamiento combinando el fósforo y el etileno y un tratamiento de 2 mM de ácido  $\alpha$ -aminobutírico y cosechadas a distinto tiempo posterior al tratamiento (dpt- días pos tratamiento). Las plantas fueron inoculadas con *R. irregularis* y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas y posteriormente cosechadas a 1 y 4 hpt (días pos-tratamiento). a) Peso fresco de la parte aérea; b) Peso fresco de la raíz. Los valores representan las medias de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

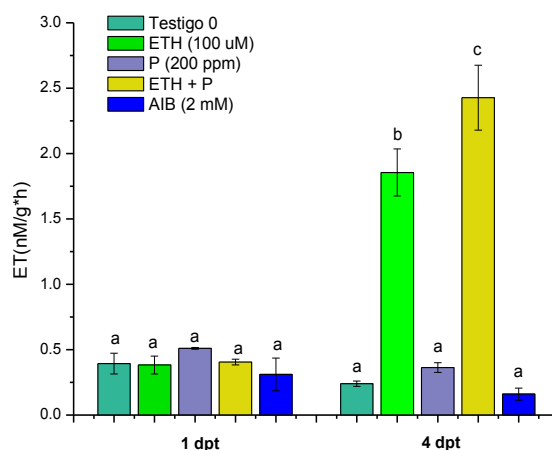
La micorrización total, medida como porcentaje de colonización de la raíz, se reguló negativamente en todos los tratamientos a los 4 dpt, apreciándose por tanto un efecto negativo inicial sobre la micorrización debido a la aplicación de todos los compuestos, y que en algunos casos fue del 20 % (**Figura IV.3.18.a**).

La actividad de la enzima fosfatasa alcalina fúngica (ALP) se vio reducida hasta un 30 % en los tratamientos individuales de etileno, fósforo y AIB y se redujo hasta un 50 % en el tratamiento combinado de etileno y fósforo durante los 4 dpt (**Figura IV.3.18.b**).

La cantidad de etileno desprendido por las raíces no se alteró con los distintos tratamientos en los tiempos ensayados, excepto un pico de etileno detectado a los 4 dpt en el tratamiento de etileno exógeno y el tratamiento combinado de etileno y fósforo (**Figura IV.3.19**).



**Figura IV.3.18.** Parámetros de micorrización de plantas de tomate de la variedad Ailsa Craig inoculadas con *R. irregularis* y tratadas con etileno exógeno (ethephon, 100 uM), 200 ppm Pi en forma de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , un tratamiento combinando el fósforo y el etileno y un tratamiento de 2 mM de ácido  $\alpha$ -aminobutírico y cosechadas a distinto tiempo posterior al tratamiento (dpt- días pos tratamiento). Las plantas fueron inoculadas con *R. irregularis* y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas y posteriormente cosechadas a 1 y 4 hpt (días post-tratamiento). a) Porcentaje de raíz micorrizada; b) Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP). Los datos representados son media de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).



**Figura IV.3.19.** Etileno desprendido de raíces de plantas de tomate de la variedad Ailsa Craig inoculadas con *R. irregularis* y tratadas con etileno exógeno (ethephon, 100 uM), 200 ppm Pi en forma de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , un tratamiento combinando el fósforo y el etileno y un tratamiento de 2 mM de ácido  $\alpha$ -aminobutírico y cosechadas a distinto tiempo posterior al tratamiento (dpt- días pos tratamiento). Las plantas fueron inoculadas con *R. irregularis* y tras un periodo de micorrización de 28 días, fueron tratadas y posteriormente cosechadas a 1 y 4 hpt (días post-tratamiento). Los datos representados son media de 5 repeticiones biológicas  $\pm$  error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

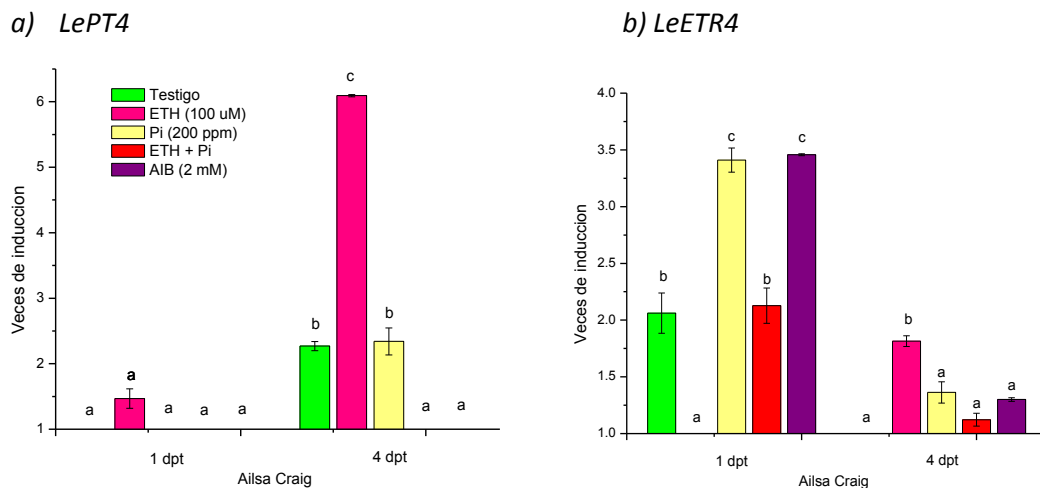
El análisis de la expresión de genes marcadores del proceso simbiótico mostró que el gen *LePT4* tuvo un patrón de expresión complejo, aunque con algunas respuestas significativas a determinados tratamientos. Inicialmente, a los 1 dpt no varió su expresión respecto al testigo. A los 4 dpt, Así, el tratamiento individual de etileno favoreció la expresión del gen (hasta 5 veces). El tratamiento de 200 ppm Pi no causó alteraciones en la dinámica de

expresión de este gen. En tanto que el tratamiento de etileno y fósforo combinado causó una afectación negativa sobre la expresión, ya que los valores de expresión se redujeron a niveles similares al testigo. El tratamiento con AIB no afectó los valores de expresión del gen *LePT4* respecto al testigo (**Figura IV.3.20.a**).

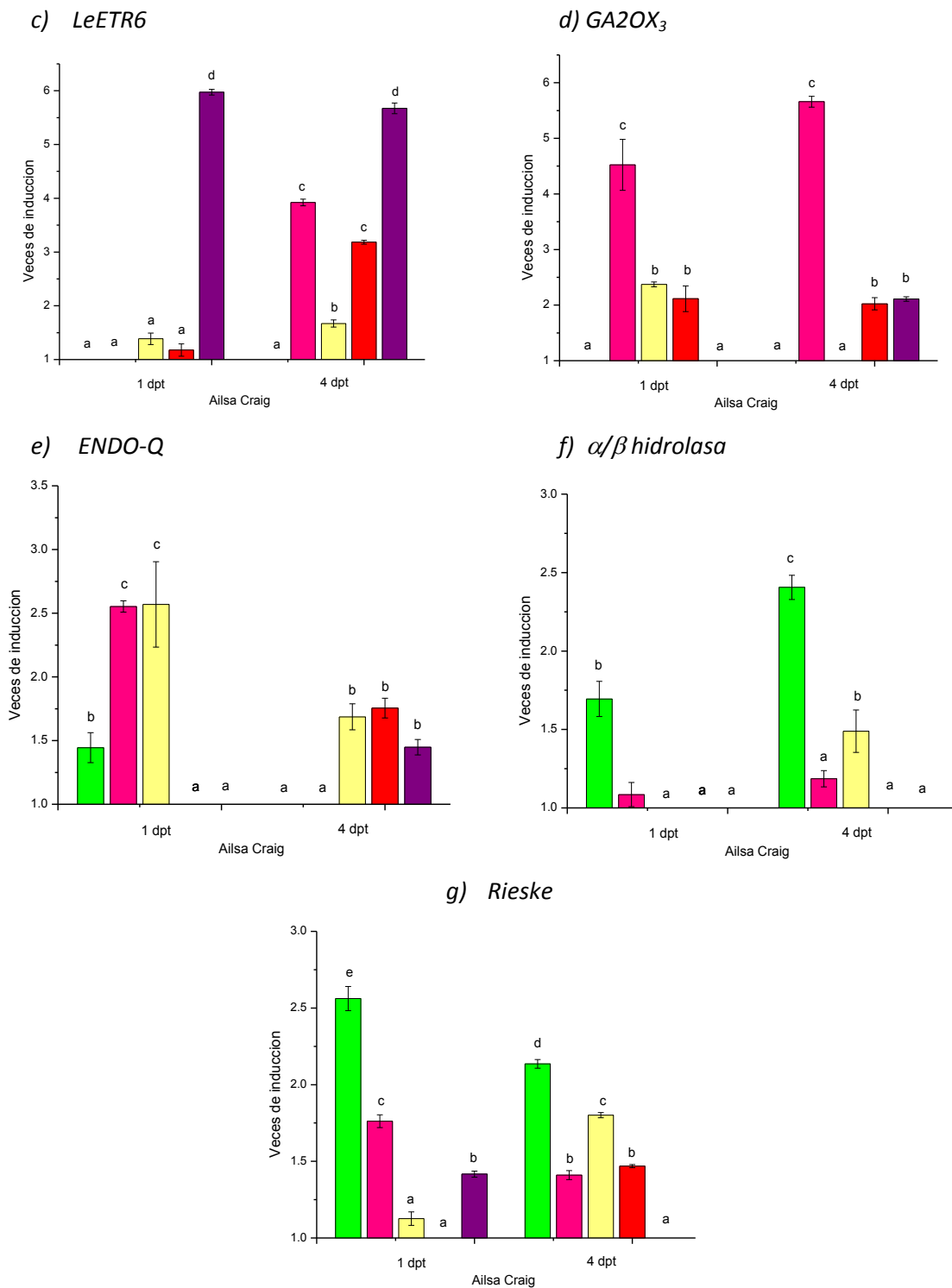
El gen *LeETR4* mostró una respuesta positiva y rápida al tratamiento de Pi y AIB desde 1 dpt, aunque a 4 dpt redujo su expresión a niveles similares al de los demás tratamientos y al testigo. A 1 dpt, la respuesta del gen al tratamiento con Pi y AIB fue mayor que en los demás tratamientos (hasta 1.5 veces más que el testigo), el tratamiento con ETH redujo su expresión hasta 1 vez respecto al testigo, y en tanto que el tratamiento combinado no afectó significativamente su expresión. A 4 dpt, la expresión del gen aumentó ligeramente cuando se trató con ETH pero no respondió al resto de los tratamientos (**Figura IV.3.20.b**). El gen *LeETR6* mostró una respuesta drástica y positiva cuando las plantas se trataron con AIB a 1 dpt con un aumento de hasta 5 veces su expresión comparado con el testigo, pero no respondió al resto de los tratamientos. A 4 dpt, todos los tratamientos estimularon la expresión del gen entre 0.5 y 2 veces más respecto al testigo aunque el nivel de expresión con el tratamiento AIB se mantuvo alto (5 veces). En resumen, la inhibición de la ruta de biosíntesis del etileno (tratamiento AIB) mostró ser el factor que más estimulo la expresión de este gen en el ensayo (**Figura IV.3.20.c**).

El gen *GA2OX<sub>3</sub>* respondió de manera positiva a todos los tratamientos, aunque fue el tratamiento con ethephon el que provocó una mayor expresión a los dos tiempos (entre 4.5 y 5 veces). El resto de los tratamientos indujeron ligeramente la expresión o bien no la alteraron respecto al testigo (**Figura IV.3.20.d**). El gen de respuesta de defensa vegetal, *ENDO-Q*, mostró un patrón de expresión positivo cuando se trató individualmente con ethephon y Pi (hasta 1.5 veces más respecto al testigo) a 1 dpt. En tanto que el tratamiento combinado y de AIB no alteraron la expresión. Curiosamente, a 4 dpt únicamente los tratamientos de Pi, combinado y AIB aumentaron ligeramente la expresión casi 0.7 veces respecto al testigo. La inhibición de la biosíntesis del etileno no afectó drásticamente la expresión del gen *ENDO-Q* (**Figura IV.3.20.e**). El gen  *$\alpha/\beta$  hidrolasa* mostró una regulación negativa bajo todos los tratamientos a 1 y 4 dpt. Los niveles de expresión no variaron entre tratamientos y el testigo a lo largo del tiempo (**Figura IV.3.20.f**). El gen que codifica para la proteína Rieske mostró una expresión variable aunque de tendencia negativa, con valores por debajo del testigo bajo todos los tratamientos en los dos tiempos evaluados. Siendo el tratamiento con ETH el que menor efecto negativo tuvo a 1 dpt y el tratamiento Pi el que menor efecto negativo generó a 4 dpt (**Figura IV.3.20.g**).

Concretando y considerando los efectos más destacados sobre la expresión génica, podemos decir que el gen *LePT4* alcanzó valores máximos de expresión cuando se aplicó 100  $\mu$ M ethephon durante todo el ensayo; el gen *LeETR4* alcanzó un pico máximo de expresión cuando se trató con fósforo y el inhibidor de la biosíntesis de etileno AIB a 1 dpt; la expresión del gen *LeETR6* alcanzó sus valores máximos al aplicar el inhibidor de la síntesis de etileno AIB, manteniéndose dicho efecto durante todo el ensayo; el gen *GA2OX<sub>3</sub>* mostró valores de expresión por encima del testigo durante todo el ensayo cuando se aplicó etileno exógeno; el gen *ENDO-Q* mostró respuesta positiva a los tratamientos individuales de etileno y fósforo; Finalmente, los genes  $\alpha/\beta$  hidrolasa y *Rieske* se regularon negativamente en los dos tiempos evaluados en todos los tratamientos (**Figura IV.3.20**).



**Figura IV.3.20.** Patrón de expresión de genes marcadores de la micorrización relacionados con el trasporte de fósforo, percepción de etileno y de defensa vegetal y metabolismo hormonal en plantas Ailsa Craig inoculadas con *R. irregularis* y tratadas con etileno exógeno (ethephon, 100  $\mu$ M), 200 ppm Pi en forma de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , un tratamiento combinando el fósforo y el etileno y un tratamiento de 2 mM de ácido  $\alpha$ -aminobutírico y cosechadas a distinto tiempo posterior al tratamiento (dpt- días pos tratamiento). a) *LePT4*; b) *LeETR4*; c) *LeETR6*; d) *GA2OX<sub>3</sub>*; e) *ENDO-Q*; f)  $\alpha/\beta$  hidrolasa; g) *Rieske*. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ). El valor de expresión génica está representado como veces de inducción/represión de cada gen en los distintos tratamientos respecto al tratamiento con menor nivel de expresión, cuyo valor es igual a 1.



**Figura IV.3.20. Continuación.** Patrón de expresión de genes marcadores de la micorrización relacionados con el transporte de fósforo, percepción de etileno y de defensa vegetal y metabolismo hormonal en plantas Ailsa Craig inoculadas con *R. irregularis* y tratadas con etileno exógeno (ethephon, 100 uM), 200 ppm Pi en forma de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , un tratamiento combinando el fósforo y el etileno y un tratamiento de 2 mM de ácido  $\alpha$ -aminobutírico y cosechadas a distinto tiempo posterior al tratamiento (dpt- días pos tratamiento). a) *LePT4*; b) *LeETR4*; c) *LeETR6*; d) *GA2OX3*; e) *ENDO-Q*; f)  $\alpha/\beta$  hidrolasa; g) *Rieske*. Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar, y aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ). El valor de expresión génica está representado como veces de inducción/represión de cada gen en los distintos tratamientos respecto al tratamiento con menor nivel de expresión, cuyo valor es igual a 1.

#### **IV.4. Las estrigolactonas como moléculas mediadoras en el antagonismo del fósforo y el etileno**

Recientes publicaciones han puesto de manifiesto la interacción entre varias fitohormonas durante el desarrollo radicular de distintas especies vegetales (*Arabidopsis*, *Solanum*, etc). Entre estas hormonas encontramos a las auxinas, el etileno y las estrigolactonas; todas ellas interaccionan entre sí para regular el desarrollo de los pelos radiculares, así como la formación y crecimiento de las raíces laterales, siendo parte de un proceso dirigido a mejorar la captación de nutrientes en el suelo (Kapulnik *et al.*, 2011b). Balzergue *et al.*, 2011 sugiere que la producción de estrigolactonas (SLs) en condiciones de disponibilidad de fósforo regula la simbiosis MA, aunque se desconoce el mecanismo. Estos autores sugieren la existencia de eventos tempranos de señalización molecular adicionales. Aunado a lo anterior, se reconoce una regulación de la biosíntesis de SLs mediada por auxinas y etileno (Beveridge y Kyojuka, 2010; Sugimoto *et al.*, 2003). Basado en lo anterior, y en nuestros resultados de interacción Pi/etileno, decidimos analizar si dicha interacción está al menos en parte mediada por estrigolactonas. Por ello analizamos la expresión de genes marcadores de la biosíntesis de estrigolactonas, estudiamos la expresión de un gen transportador de SLs en tomate ortólogo a otro recientemente reportado en petunia (Kretzschmar *et al.*, 2012) y complementamos el estudio con el análisis de la secreción de SLs en plantas silvestres y mutantes alteradas en su capacidad de percepción y respuesta a etileno cultivadas en condiciones de alta disponibilidad de fósforo.

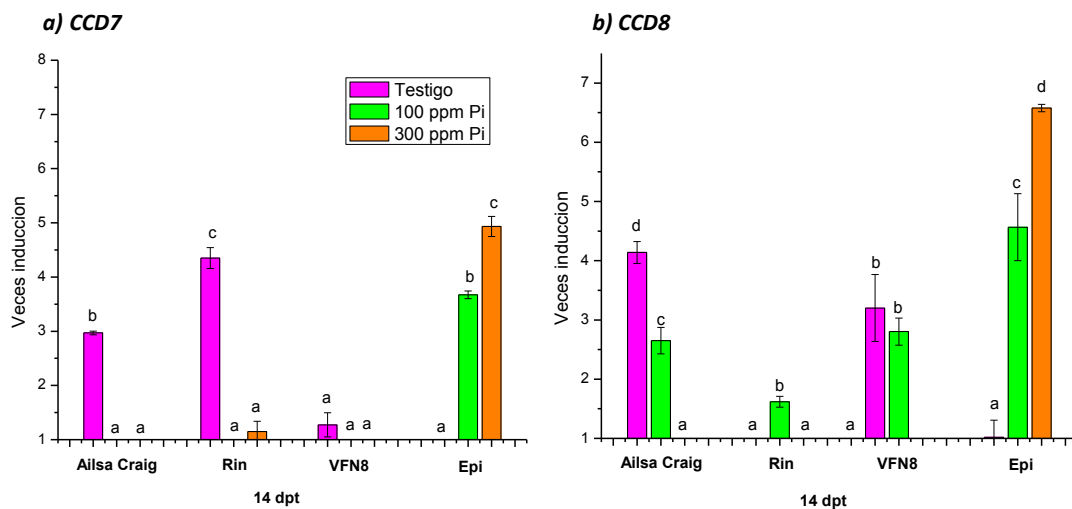
##### **IV.4.1. Expresión de genes de la biosíntesis de estrigolactonas en plantas micorrizadas de tomate con distinta sensibilidad a etileno bajo condiciones de fósforo fácilmente asimilable**

Las enzimas CCD7 y CCD8 (Carotenoid Cleavage Dioxygenases 7 y 8) tienen una participación clave en la biosíntesis de las estrigolactonas (Alder *et al.*, 2012; Beveridge y Kyojuka, 2010; Booker *et al.*, 2004; Sorefan *et al.*, 2003; Booker *et al.*, 2005; Snowden *et al.*, 2005; Gómez-Roldán *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2009; Waters *et al.*, 2012). Como ya se ha mencionado, la biosíntesis de las estrigolactonas está regulada negativamente por la disponibilidad de fósforo en el suelo. Aunque también se ha sugerido la regulación de la biosíntesis de etileno y su efecto en el desarrollo de las raíces mediado por las estrigolactonas. Dada la interacción antagónica del fósforo y etileno, diseñamos un ensayo para analizar la regulación de la expresión de los genes *CCD7* y *CCD8* en plantas de tomate alteradas en la percepción y



respuesta a etileno cultivadas en fósforo fácilmente asimilable. Una vez establecida la micorrización (al menos 20% de raíz colonizada), se aplicó el tratamiento con fósforo a dos concentraciones y se evaluó la expresión de los genes *CCD7* y *CCD8* a los 14 dpt.

La expresión del gen *CCD7* en los genotipos Ailsa Craig y *Rin* se reguló negativamente en presencia de fósforo asimilable hasta su inhibición total. Aunque la expresión del gen *CCD7* fue de hasta 1.5 veces mayor en el genotipo *Rin* sin tratar comparado con el genotipo silvestre Ailsa Craig sin tratar. En el caso del genotipo VFN8, la expresión del gen *CCD7* no mostró diferencias significativas entre el testigo y los tratamientos con Pi. El genotipo *Epi* tratado con fósforo mostró un aumento proporcional en la expresión directamente relacionado con la concentración del fósforo asimilable (hasta 3.7 veces a 100 ppm Pi y hasta 5 veces a 300 ppm Pi respecto al testigo sin tratar) (**Figura IV.4.1a**). La expresión del gen *CCD8* mostró una regulación negativa en los genotipos Ailsa Craig, *Rin* y VFN8 en condiciones de fósforo asimilable. El genotipo *Epi* mostró una regulación positiva directamente relacionada con la concentración de Pi de hasta 5 veces a 100 ppm Pi y de hasta 6.8 veces a 300 ppm Pi comparado con el testigo (**Figura IV.4.1b**).



**Figura IV.4.1.** Patrón de expresión de genes a) *CCD7* y b) *CCD8* responsables de la biosíntesis de estrigolactonas en plantas micorrizadas de tomate silvestres de la variedad Ailsa Craig y VFN8 y mutantes con distinta sensibilidad a etileno. Las plantas fueron inoculadas con *R. irregularis*, tratadas con Pi a distinta concentración (100 y 300 ppm) y cosechadas 14 días postratamiento (dpt). Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ). El valor de expresión génica está representado como expresión relativa de cada gen y cada genotipo mutante es comparado con su correspondiente cultivar silvestre. Para el cálculo del valor de veces inducción se ha tomado como referencia el valor del tratamiento más bajo cuyo valor de expresión es 1.

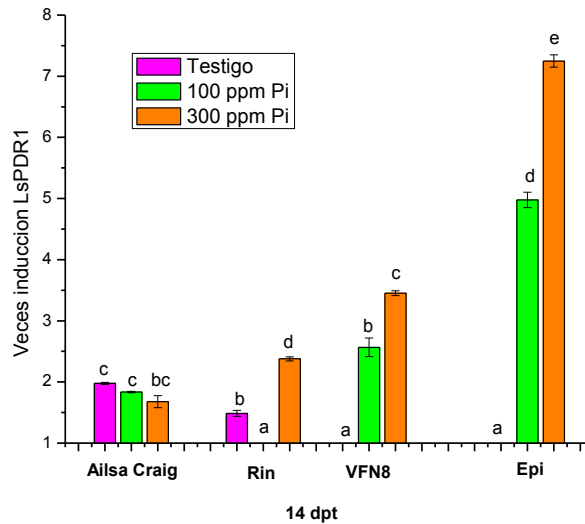
Los niveles de expresión de los genes *CCD7* y *CCD8* en el mutante *Epi*, que sobreexpresa la respuesta a etileno, estuvieron positivamente regulados por la concentración del Pi asimilable. En el mismo sentido, se sugiere que la ruta de señalización del etileno (mutante *Epi*) antagonizó el efecto negativo del fósforo en la regulación de la expresión de los genes *CCD7* y *CCD8* de la biosíntesis de estrigolactonas.

#### **IV.4.2. Expresión del ortólogo del transportador *LsPDR1* en plantas micorrizadas de tomate con distinta sensibilidad a etileno bajo condiciones de fósforo fácilmente asimilable**

Kretschmar *et al.*, 2012, reportan que la exudación y el transporte de SLs requieren de una proteína denominada PhPDR1 (GenBank accession number JQ292813), un transportador tipo ABC (cassete de unión a ATP) que se ha identificado recientemente como un exportador celular de SLs en *Petunia hybrida*. Reportan que la expresión de PhPDR1 en las raíces de *Petunia* fue inducida por la deficiencia de fósforo, la colonización MA y el tratamiento con GR24 (una estrigolactona sintética). Bajo el marco de referencia anterior, decidimos estudiar si esta proteína transportadora de SLs está implicada en la interacción entre el etileno y el fósforo. Para ello analizamos la expresión del gen ortólogo a *PhPDR1* en tomate. El diseño de los primers consistió en un alineamiento tipo BLAST utilizando la base de datos del borrador del genoma del tomate (<http://solgenomics.net>). Utilizamos la secuencia del gen *PhPDR1* para obtener la secuencia nucleotídica del hipotético gen ortólogo del transportador PDR1 en tomate, *LsPDR1* (Solyc08g067620.2.1: 89% de identidad con *PhPDR1*). Se diseñaron primers específicos para analizar la expresión de este gen por qRT-PCR en plantas silvestres y mutantes alteradas en su capacidad de percepción y respuesta a etileno y cultivadas en condiciones de alta disponibilidad de fósforo.

El genotipo Ailsa Craig mostró una expresión similar del gen *LsPDR1* en condiciones de micorrización en alto nivel de fósforo asimilable y en condiciones sin tratamiento de Pi (no diferencias significativas). Por su parte, en el mutante correspondiente, *Rin*, el fósforo reprimió la expresión del gen a 100 ppm Pi, aunque aumentó ligeramente su expresión a los 300 ppm Pi por encima del valor del testigo (hasta una vez) (**Figura IV.4.2**). En el caso del genotipo VFN8, la expresión del gen aumentó directa y significativamente con la concentración del fósforo. De manera similar, en el genotipo mutante *Epi* la expresión del gen estuvo regulada positivamente por la aplicación de Pi, y los niveles de expresión estuvieron por encima de los

observados en el genotipo silvestre (hasta 5 veces a 100 ppm Pi y hasta 7.5 veces a 300 ppm Pi). Este dato sugiere que la mutación *Epi* (sobreexpresión de la respuesta a etileno) interacciona con el fósforo para potenciar la expresión del gen *LsPDR1*, y probablemente con ello, el transporte de estrigolactonas (**Figura IV.4.2.**).



**Figura IV.4.2.** Patrón de expresión del gen de tomate ortólogo al transportador de estrigolactonas *LsPDR1* en plantas de la variedad Ailsa Craig y VFN8 y mutantes con distinta sensibilidad a etileno. Las plantas fueron inoculadas con *R. irregularis*, tratadas con Pi a distinta concentración (100 y 300 ppm) y cosechadas 14 días postratamiento (dpt). Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ). El valor de expresión génica está representado como expresión relativa de cada gen y cada genotipo mutante es comparado con su correspondiente cultivar silvestre. Para el cálculo del valor de veces inducción se ha tomado como referencia el valor del tratamiento más bajo cuyo valor de expresión es 1.

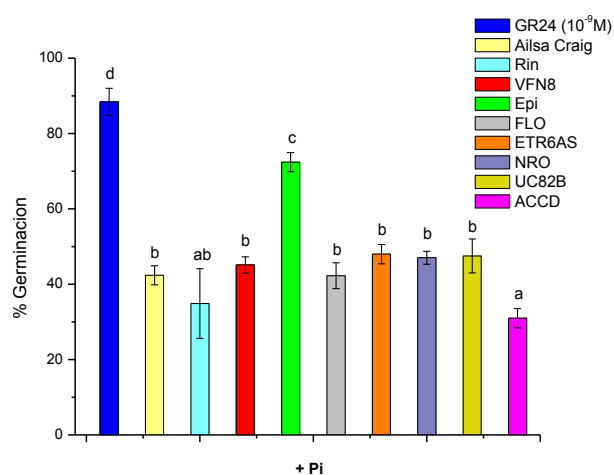
#### **IV.4.3. Determinación de la capacidad secretora de SLs de plántulas de tomate silvestres y mutantes alteradas en su capacidad de percepción y respuesta a etileno y cultivadas en condiciones de fósforo fácilmente asimilable**

La secreción de SLs de las plantas al suelo actúa como señal rizosférica para favorecer la interacción simbiótica entre las plantas hospederas y hongos micorrícicos arbusculares. Diversas hormonas vegetales, como el etileno y las auxinas, son reguladores del desarrollo de las raíces (López-Bucio *et al.*, 2002; Osmont *et al.*, 2007); además de regular las respuestas de las plantas a las condiciones nutricionales, incluyendo la deficiencia de Pi (López-Bucio *et al.*, 2002; Chiou y Lin, 2011). Así, la señalización de auxinas se incrementa bajo condiciones de deficiencia de Pi y podría intervenir en la señalización de SLs en situación de deficiencia de este nutriente, en cambio bajo condiciones óptimas de Pi los niveles de etileno son uno de los

moduladores de la respuesta a SLs (López-Bucio *et al.*, 2002). Por lo tanto, es probable que las SLs ejerzan su función a través de una red cuidadosamente controlada de interacción con otras hormonas vegetales.

En el contexto descrito, se diseñó un ensayo para evaluar la germinación de las semillas de *O. ramosa* como un método indirecto de la cantidad de estrigolactonas secretadas por la raíz de plantas silvestres y mutantes alteradas en la biosíntesis o percepción de etileno, colonizadas por *R. irregularis* y tratadas en condiciones de fósforo fácilmente asimilable (+ Pi, 100 ppm en forma de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), para determinar la influencia del etileno sobre la producción de SLs en plantas micorrizadas bajo diferentes situaciones de disponibilidad de fósforo

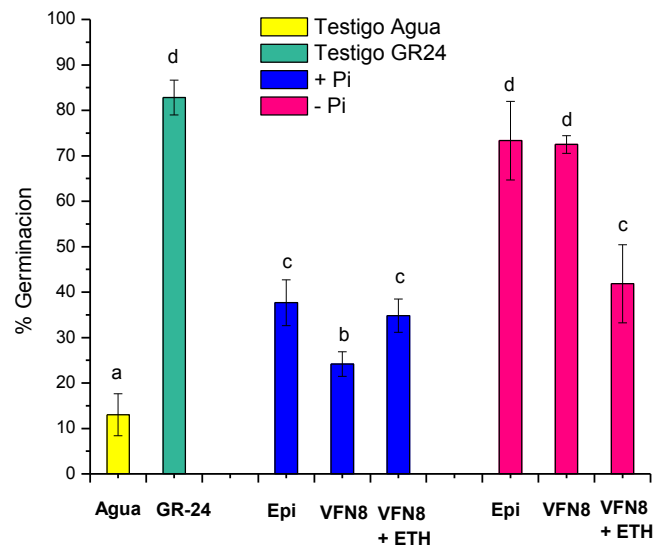
La estrigolactona sintética GR-24 se utilizó como testigo positivo del nivel de germinación de las semillas de jopo y en consecuencia su aplicación provocó el valor de germinación más alto (90 %), tal y como era de esperar por su alta pureza y por la concentración empleada (1x10<sup>-9</sup> M, concentración fisiológica en las raíces de las plantas) (**Figura IV.4.3**). En presencia de fósforo fácilmente asimilable (100 ppm), el porcentaje de germinación fue similar para casi todos los genotipos analizados, exceptuando el genotipo mutante *Epi* que mostró el mayor porcentaje de germinación (77 %) y el genotipo mutante *ACCD* que mostró el menor porcentaje, con tan solo un 33 % de germinación. Dado que el genotipo *Epi* es un mutante que sobreexpresa su respuesta a etileno, el alto valor de germinación por encima de su genotipo testigo VFN8 sugiere que la interacción entre el etileno y el fósforo estimula la biosíntesis y secreción de estrigolactonas. De igual modo este efecto se observa en la disminución del valor de germinación del genotipo *ACCD* en condiciones de fósforo asimilable, ya que el mutante *ACCD* tiene bloqueada la ruta de biosíntesis de etileno.



**Figura IV.4.3.** Porcentaje de germinación de semillas de *Orobancha ramosa* en respuesta a la secreción de estrigolactonas de las raíces de plantas de tomate silvestres y mutantes alteradas en su capacidad de percepción y respuesta a etileno cultivadas en condiciones de alta disponibilidad de fósforo (+ Pi, 100 ppm en forma de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ). GR-24, estrigolactona sintética utilizada como testigo.

En un experimento posterior determinamos el efecto de la interacción Pi/etileno en cuanto a la producción de SLs bajo condiciones de deficiencia y suficiencia de Pi en el genotipo silvestre VFN8 y el mutante *Epi* de respuesta constitutiva a etileno. Los resultados (**Figura IV.4.4.**) muestran que la interferencia del etileno sobre la producción de SLs es variable según la disponibilidad de Pi. Así, en condiciones de suficiencia de Pi, el mutante *Epi* tiene mayor capacidad de producción de estimulantes de la germinación de jopo que el cultivar silvestre, y cuando aplicamos etileno, dicho cultivar silvestre incrementa su capacidad de exudación de compuestos estimuladores. Bajo condiciones de deficiencia de Pi, tanto el cultivar silvestre como el mutante *Epi* muestran alta capacidad de producción de sustancias tipo SLs (% de germinación de semillas próximo al obtenido con GR24), y en este caso la presencia de etileno afecta negativamente dicha producción en el cultivar silvestre.

En consecuencia, los resultados de estos experimentos de medida de la capacidad de germinación de semillas de jopo en exudados de plantas con distinta sensibilidad a etileno y sometidas a diferente status nutricional de Pi, indican que el mutante *Epi* en condiciones de fósforo fácilmente asimilable mostró mayor capacidad de producción de sustancias tipo SLs. La interferencia Pi/etileno se ha puesto de manifiesto en un doble sentido: en presencia de Pi el etileno parece actuar favoreciendo la producción de SLs y en ausencia de Pi el efecto del etileno es negativo sobre dicha producción.



**Figura IV.4.4.** Porcentaje de germinación de semillas de *Orobanche ramosa* en respuesta a la secreción de estrigolactonas de las raíces de plantas de tomate silvestre VFN8 y su mutante *Epi* de respuesta constitutiva a etileno bajo condiciones de deficiencia y suficiencia de Pi (+ Pi, 100 ppm en forma de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). Los valores representan las medias de 3 repeticiones biológicas  $\pm$  el error estándar y, aquellas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ). GR-24, estrigolactona sintética utilizada como testigo.

## **V. DISCUSIÓN**

## V. DISCUSIÓN

En la naturaleza, las plantas interactúan con diversos organismos y microorganismos formando asociaciones benéficas o patogénicas (Barea *et al.*, 2005; Raaijmakers *et al.*, 2009). Se han caracterizado ciertas moléculas que, entre otras funciones, actúan de mediadores de dicha interacción (Pieterse *et al.*, 2012). En el caso concreto de la interacción simbiótica micorriza arbuscular (MA) resulta difícil investigar qué moléculas y cuál es su función durante la interacción planta-hongo, sobre todo debido a la incapacidad de cultivar y manipular los hongos arbusculares en ausencia de la planta hospedadora (Smith y Read, 2008). No obstante, si se sabe que ciertas moléculas juegan un papel clave en la interacción.

La combinación de estudios genéticos, moleculares y celulares ha puesto de manifiesto que la simbiosis MA funcional es el resultado de una serie de procesos de señalización y adaptación celular regulados por la planta, y donde las diferentes clases de hormonas vegetales juegan un papel protagonista. Así, múltiples fitohormonas interactúan para regular el establecimiento y funcionamiento de la simbiosis micorriza arbuscular (Revisado por Foo *et al.*, 2013; Bucher *et al.*, 2014; Gutjahr, 2014), y su acción puede llevarse a cabo a diferentes niveles y etapas del proceso (López-Ráez *et al.*, 2011). Algunas hormonas controlan los primeros pasos de señalización pre-simbiótica, otras regulan las adaptaciones morfológicas de la raíz para acomodar el hongo, controlan la extensión de la colonización fúngica o regulan la formación de los arbusculos. Sin embargo, aún no se han caracterizado completamente los procesos bioquímicos y morfogenéticos mediados por hormonas vegetales durante la formación de MA, ni tampoco se ha definido el papel individual de cada hormona durante este proceso, y mucho menos se han identificado las redes de interacción hormonal que participan.

### V.1 PARTICIPACIÓN DEL ETILENO EN LA FORMACIÓN DE LA MICORRIZA ARBUSCULAR EN TOMATE

En las interacciones con microorganismos patógenos, las hormonas vegetales con mayor importancia son el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y etileno, ya que inducen y coordinan la respuesta de defensa (Metraux *et al.*, 2002; Pozo *et al.*, 2004; Okubara y Paulitz, 2005). Estas moléculas también son importantes en interacciones con microorganismos simbiotes mutualistas, como las rizobacterias, donde el etileno y el JA se han relacionado con la inducción de la respuesta sistémica adquirida (ISR) frente a microorganismos patógenos



(Thomma *et al.*, 2000). Además, el SA y 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 (Guinel y Geil, 2002; Van Spronsen *et al.*, 2003). Así, 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, 1992; Penmetsa y Cook, 1997; Nukui *et al.*, 2000). Considerando el cierto grado de similitud entre ambas simbiosis, nodulación y micorrización, y la existencia de un mecanismo molecular con muchos puntos en común, podría plantearse que el etileno participa en la autorregulación de los principales órganos nutricionales y de intercambio de ambas simbiosis, nódulos y arbusculos (Azcón-Aguilar *et al.*, 1981; Morandi, 1989; Guinel y Geil, 2002; Van Spronsen *et al.*, 2003; Herrera-Medina, 2008).

La estructura sencilla y simple de la hormona gaseosa Etileno contrasta con la complejidad de los procesos fisiológicos que regula. En el caso de micorriza Arbuscular se ha observado que la aplicación de ethephon (compuesto químico que libera etileno) afecta negativamente el desarrollo de la micorrización (Azcón-Aguilar *et al.*, 1981; Morandi, 1989; Geil *et al.*, 2001; Geil y Guinel, 2002; Zsögön *et al.*, 2008; Herrera-Medina, 2008). Este efecto depende de la dosis aplicada, ya que a bajas concentraciones se ha observado un efecto positivo, estimulando la germinación de esporas del hongo Arbuscular (Ishii *et al.*, 1996; Geil y Guinel, 2002), y a altas concentraciones se inhibe el crecimiento de las hifas (Ishii *et al.*, 1996). Por lo tanto, y como suele ser habitual para las hormonas vegetales, es posible que el etileno tenga tanto un efecto inhibitorio como estimulante en la formación de la MA, según dosis aplicada y etapa simbiótica afectada (Fraccetto *et al.*, 2013). Manteniendo el paralelismo con el proceso de nodulación, el etileno parece actuar en las primeras etapas de reconocimiento de la bacteria simbiótica (Oldroyd *et al.*, 2001). Por comparación con el modelo de la nodulación, Geil y Guinel (2002) proponen dos posibles vías de regulación de la micorrización mediadas por el etileno: una, durante el reconocimiento inicial del hongo, y otra activando la respuesta de defensa en planta frente al hongo micorrízico para controlar el nivel de infección (Geil y Guinel, 2002). Si bien es evidente que el etileno ejerce una función importante, algunos datos aportados por la literatura científica muestran contradicciones en esta función.

En nuestro estudio, la aplicación de una dosis excesiva de etileno exógeno (0.3 mM) mostró efectos negativos en el desarrollo de la planta, apareciendo drásticos síntomas de epinastia: acentuada reducción del desarrollo de la raíz, atrofia de la estructura y ramificación radicular, aparición de raíces y pelos adventicios en el tallo, atrofia en el desarrollo de la parte

aérea y atrofia de la ramificación de la parte aérea (Barry *et al.*, 2001; Zsögön *et al.*, 2008). La dosis de 0.15 mM de ethephon también afectó negativamente los parámetros morfológicos de la planta, por lo que no se eligió como una dosis para el resto de los ensayos. En tanto que la concentración de 0.07 mM no alteró la morfología de la planta y al igual que en estudios anteriores (Herrera-Medina *et al.*, 2008) se eligió como dosis óptima de aplicación.

Evaluando el desarrollo de la micorrización, observamos que el valor de porcentaje de micorrización está directamente relacionada con la concentración de etileno aplicada y se relaciona inversamente con la disminución del peso fresco de la raíz. Evidentemente, ante una misma dosis de inóculo, la reducción de la zona de la raíz factible de ser colonizada, en un modo indirecto, aumenta el porcentaje de micorrización total y todos los parámetros de micorrización (% F, % M, % a, % A y la actividad ALP). Cuando se cuantificó la cantidad de etileno en la raíz, observamos una sobreproducción de etileno cuando se aplicó ethephon y más aún con el aumento de la concentración añadida, lo que podría estar relacionado con el mecanismo de regulación por retroalimentación, de tal forma que la presencia de etileno estimula la biosíntesis de más etileno (Hua *et al.*, 1995; Sakai *et al.*, 1998; De Paepe *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2008). Nuestros resultados muestran que el parámetro de % M, al igual que el % de micorrización, aumentó proporcionalmente con la dosis de ethephon añadida. En cambio, la frecuencia arbuscular (% a) se incrementa de manera significativa y por igual en la primera cosecha en todos los tratamientos con ethephon, siendo el incremento posterior solo con la dosis más alta.

Según estos resultados, el etileno tiene un efecto positivo indirecto, mediado por la longitud y tamaño de la raíz y un efecto directo sobre los parámetros de micorrización, principalmente % M, % a y % A que combina los datos de % M y % a. En este sentido, López-Bucio *et al.*, (2002) atribuyen las alteraciones en la morfología de la raíz a un efecto negativo de la presencia de la epinastia causada por etileno. Diversos estudios sugieren que la arquitectura de la raíz está regulada por la interacción del etileno con otras fitohormonas importantes en la fisiología de las plantas, las auxinas (Stepanova *et al.*, 2007; Basuet *et al.*, 2011; Alarcón *et al.*, 2013). Así, la elongación de las raíces en el maíz se vio estimulada por las auxinas cuando las raíces se pretrataron con inhibidores de la biosíntesis de etileno (Mulkey *et al.*, 1982). El efecto inhibitorio del etileno en el desarrollo de las raíces se describió por primera vez en 1901 por Neljubov (Dugardeyn y Van Der Straeten, 2008). Bajas concentraciones de etileno pueden promover la elongación de las raíces, mientras que altas concentraciones inhiben la elongación (De Cnodderet *et al.*, 2005; Dugardeyn y Van Der Straeten, 2008; Alarcón *et*

*al.*, 2012) mediante la reorientación de los microtúbulos reduciendo el crecimiento longitudinal de las células epidérmicas involucradas en la elongación de la raíz (Ishikawa y Evans, 1993; Verbelen *et al.*, 2006).

Respecto al efecto directo del etileno sobre la micorrización, Barea y Azcón-Aguilar (1982) postulan que la estimulación por parte del etileno puede estar relacionada con la resistencia de la planta hospedadora a factores de estrés del suelo. Bajos niveles de etileno producidos por estrés en la planta, parecen inhibir temporalmente el crecimiento de las raíces, pero al mismo tiempo se promueve la actividad del hongo micorrícico en la rizosfera, con lo que se favorece la micorrización y se minimiza el efecto estresante sobre la planta. En resumen, el etileno tiene un efecto positivo indirecto, mediado por la longitud y tamaño de la raíz y un efecto directo sobre los parámetros de micorrización.

El análisis molecular en nuestro estudio reveló que el gen *GinGS*, relacionado con la funcionalidad de la simbiosis, no mostró un comportamiento de expresión drástico, que indicaría que la funcionalidad de la simbiosis no se ve alterada por la alta concentración de etileno exógeno aplicado. El patrón de expresión del gen *LePT4* que codifica para el transportador de fosfato de tomate específico de la micorrización se limita exclusivamente a las células micorrizadas con arbusculos siendo por tanto un marcador genético para la funcionalidad de los arbusculos en raíces micorrizadas (Nagy *et al.*, 2005; Balestrini *et al.*, 2007). En nuestro estudio, el gen *LePT4* no se ajustó al perfil de evolución del parámetro % A, tal y como era de esperar, y su patrón de expresión fue un tanto errático en el sentido que se induce su expresión con la adición de la máxima concentración de ethephon empleada en este estudio (0.15 mM) pero solo en etapas tempranas de la micorrización (30 dpi). Esto posiblemente esta indicando que dicho gen responde positivamente a etileno, pero que su expresión se modula por otros muchos factores que se desencadenan durante el desarrollo de la micorrización. Por su parte, la expresión del gen *GinGS*, marcador de actividad fúngica en los arbusculos (Gómez *et al.*, 2009), si mostró un perfil más parecido al del parámetro de % A, y en definitiva su expresión indicó que la funcionalidad de la simbiosis no se ve alterada por la alta concentración de etileno exógeno aplicado.

Como marcadores de la acción de etileno hemos estudiado el patrón de expresión de los genes *LeETR4* y *LeETR6*, directamente relacionados con la percepción de etileno por la planta, ya que codifican para los receptores de etileno *LeETR4* y *LeETR6*, respectivamente; además son genes inducibles por etileno (Kevany *et al.*, 2008). En nuestro caso el patrón de

expresión del gen *LeETR6* estuvo más relacionado con la aplicación de ethephon y los niveles de etileno cuantificados en las plantas de nuestro experimento, corroborando la efectividad de la dosis aplicada. Posiblemente no todos los receptores tengan la misma afinidad por la hormona (O'Malley *et al.*, 2005), por lo que su respuesta variará, tanto con el tejido u órgano de la planta como en función de la concentración de etileno presente. En este sentido, la respuesta a etileno durante la micorrización dependerá de la concentración de etileno añadido, y en ella pueden intervenir la inducción de uno u otro receptor, ya que no todos se expresan con la misma intensidad en diferentes órganos de la planta (Klee, 2002). Por lo anterior, la función de los distintos receptores debe de ser diferente en cada proceso, y dependiente del órgano donde se localicen los receptores.

Analizamos el patrón de expresión del gen que codifica una proteína de la familia  $\alpha/\beta$  hidrolasa, probablemente relacionada con la percepción de señales hormonales, y cuya expresión que ha sido descrita asociada al proceso de micorrización en tomate (García-Garrido *et al.*, 2010); un gen relacionado con el catabolismo (desactivación) de giberelinas (GAs) (*GA2OX<sub>3</sub>* (Serrani *et al.*, 2010); un gen relacionado con la respuesta defensiva en tomate (*ENDO-Q*, endoquitinasa-Q) y un gen relacionado con respuesta defensiva y metabolismo de la pared celular, *Ext*, extensina (García-Garrido *et al.*, 2010). Todo ello para evaluar la acción de etileno sobre procesos directamente implicados en la micorrización, como la señalización de GAs, la defensa, la alteración de la pared celular o genes de función desconocida marcadores de micorrización. Lo más destacable de estos resultados es que el gen *GA<sub>2</sub>OX<sub>3</sub>* relacionado con el catabolismo de GAs mostró valores de expresión que variaron dependiendo de la concentración del etileno exógeno añadido, aunque de manera general la presencia del etileno favorece su expresión, y por lo tanto la degradación de las giberelinas, lo que sugiere una acción directa del etileno sobre el metabolismo de GAs. Este hecho es importante, pues se ha evidenciado una acción reguladora negativa de GAs sobre la abundancia arbúscular y la frecuencia de micorrización en plantas de tomate (Martín-Rodríguez, 2013; Martín-Rodríguez, *et al.*, 2014). Si el etileno incrementa la degradación de GAs, y éstas son inhibidores de la formación de arbúsculos, la acción positiva de etileno observada sobre el parámetro de % A puede en parte deberse a su interacción con el metabolismo de GAs.

Por su parte, la expresión de los genes *Endo-Q* y *Ext* fue acorde lo esperado, ya que el etileno exógeno estimuló la expresión en función de la concentración aplicada. Ambos genes están relacionados con los mecanismos de defensa de la planta y con modificaciones de la

pared celular. Estos mecanismos están regulados por la vía de etileno, lo que concuerda con el aumento de su expresión al añadir etileno exógeno.

El uso de plantas mutantes o alteradas genéticamente es una herramienta biotecnológica para conocer la implicación y función de ciertos genes en los procesos biológicos. En este sentido, la disponibilidad de mutantes en tomate es otra ventaja de esta planta modelo (Emmanuel y Levy 2002; Carvalho *et al.*, 2011). Recientemente, la utilización de mutantes en la síntesis o percepción de diferentes hormonas (Herrera-Medina *et al.*, 2003; 2007; 2008; Zsögön *et al.*, 2008; Martín-Rodríguez *et al.*, 2011) han permitido establecer su participación directa en el proceso de micorrización. A diferencia de otros estudios anteriores, en este trabajo se ha abordado la investigación de la participación del etileno en la regulación de la micorrización mediante una aproximación genética, combinado la alteración genotípica de los mutantes con la manipulación de los niveles endógenos de etileno mediante aporte externo del mismo o de algún inhibidor de su síntesis.

En una primera serie de experimentos se utilizaron las plantas *ETR6AS*, las cuales están silenciadas en el gen *LeETR6*, y por tanto son plantas con menor cantidad de receptor ETR6 funcional, lo que da lugar a plantas más sensibles a la acción de la hormona. La pérdida del número de receptores supone la falta de proteínas que inhiban la respuesta a etileno. Además, la presencia de menos receptores supone que se necesita menor concentración de etileno para saturarlos y en consecuencia la respuesta a etileno se produce con menor cantidad lo que en definitiva supone que estas plantas son más sensibles a la acción del etileno. En general, los parámetros de frecuencia, intensidad y frecuencia arbuscular fueron más bajos en las plantas *ETR6AS* que en las plantas silvestres durante las primeras cosechas, lo que indica menor capacidad de micorrización de los mutantes sensibles a etileno. Esto significa que la mayor sensibilidad a etileno provoca inhibición de la micorrización y por tanto un efecto negativo del etileno. Por tanto, si en el experimento anterior se pone de manifiesto un efecto positivo, ahora se ha evidenciado un efecto negativo sobre la micorrización.

En este sentido, como se ha comentado anteriormente, en los experimentos realizados con la variedad Ailsa Craig, la aplicación de etileno afectó positivamente la micorrización. En este segundo experimento, con plantas silvestres Floradade, la aplicación de ethephon causó un leve descenso tanto de la frecuencia (% F) como de la intensidad de micorrización (% M) en la primera y segunda cosecha. Este hecho diferencial podría deberse a la duplicidad de efectos

(positivo y negativo) del etileno, que se manifestarían según la dosis aplicada y la mayor o menor sensibilidad de la planta analizada.

La idea de un efecto distinto del etileno según la dosis aplicada y/o la sensibilidad de la planta viene avalada también por los resultados obtenidos del tratamiento con etileno de las plantas sensibles ETR6AS. En primer lugar, la aplicación de ethephon a plantas ETR6AS incrementó el parámetro de frecuencia de micorrización (% F) en etapas iniciales. Durante estas primeras etapas de micorrización, la frecuencia de las estructuras fúngicas en la raíz se debe principalmente a los puntos de infección del hongo, y estos podrían estar regulados por la modulación de los picos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Oldroyd *et al.*, 2001; Guinel y Geil, 2002, Chabaud *et al.*, 2011; Singh y Parniske, 2012). Posiblemente un exceso en la respuesta al etileno en estas líneas más sensibles pudo provocar un cambio diferente en la frecuencia o intensidad de los picos de  $\text{Ca}^{2+}$  que altere la penetración del hongo. Además, la aplicación de ethephon también provocó un incremento en la intensidad de arbusculos (% A) y en la actividad fosfatasa alcalina fúngica (% ALP) transitorios en ETR6AS. Este incremento específico en plantas ETR6AS puede deberse a una función positiva del etileno sobre estos parámetros relacionados con la intensidad de arbusculos en la raíz y que esté mediada por el receptor LeETR6 durante la micorrización. Así, la expresión de genes *LePT4* o *GinGs*, relacionados con la actividad arbuscular fue diferente en plantas silvestres o plantas ETR6AS tratadas con ethephon. Ya se ha comentado anteriormente que la participación en la regulación de micorrización debe de ser diferente para cada uno de estos receptores.

Según nuestros resultados, 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 la sensibilidad al mismo. Además, todo parece indicar que el etileno podría actuar en etapas distintas de la micorrización. En vista de ello, analizamos el comportamiento de dos nuevos mutantes (*Rin* y *Epi*), que tienen mutaciones que originan una deficiencia en la percepción y una sensibilidad incrementada a etileno, respectivamente, y por tanto podrían esperarse efectos contrarios en cada uno de ellos sobre la micorrización. El mutante *Rin* es consecuencia de una mutación recesiva que bloquea el proceso de maduración del fruto, impidiendo la acumulación de etileno durante dicho proceso, además de impedir la respuesta de maduración ante el aporte exógeno de etileno (Vrebalov *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2008). El mutante natural *Epi* se

caracteriza por mostrar una respuesta constitutiva a etileno (Ursin, 1987; Fujino *et al.*, 1988; Barry *et al.*, 2001).

Efectivamente, existe una correlación directa entre la baja sensibilidad a etileno de las plantas mutantes *Rin*, el incremento de la longitud de raíz micorrizada, el descenso de la micorrización en plantas *Epi* y su mayor sensibilidad a la acción de etileno. En este sentido, los resultados obtenidos están de acuerdo con lo propuesto por Geil y Guinel (2002) en cuanto a la acción reguladora de etileno como activador de la respuesta de defensa en plantas frente al hongo micorrícico. En nuestros experimentos, la acción del etileno no se debe a un incremento o descenso de los niveles de etileno en raíz, pues durante el tiempo intermedio de cosecha el contenido en etileno en plantas mutantes era igual que el de su correspondiente silvestre. Por tanto, la respuesta observada es debida a la distinta capacidad de percepción de etileno y señalización posterior que tienen las plantas mutantes.

Si observamos con atención la evolución de los diferentes parámetros de micorrización en los distintos genotipos de plantas observamos como la etapa crucial que supone la ruptura del patrón normal de micorrización en los mutantes corresponde con la etapa exponencial de colonización, representada en nuestros experimentos por la segunda cosecha. Por un lado, es la etapa en la que las plantas *Rin* alcanzaron mayor diferencia en micorrización respecto a las plantas silvestres Ailsa-Craig, y por otro es la etapa en la que se detiene el desarrollo de la micorrización en plantas *Epi*. Las plantas *Epi* no muestran signos de deficiencia en su capacidad de micorrización en etapas tempranas de micorrización, pues incluso a 48 dpi los valores de frecuencia e intensidad de micorrización y porcentaje de arbusculos son similares o mayores que en plantas silvestres, y a partir de ese momento el desarrollo del hongo queda frenado. Este patrón de afectación de la micorrización, en función de la capacidad de respuesta de la planta a etileno, sugiere que dicho compuesto afecta sobre todo la etapa de desarrollo exponencial del hongo en la raíz, y por tanto la expansión de la colonización. Por tanto podríamos decir que el etileno actúa como agente regulador de la expansión del hongo en la raíz, es decir de la dinámica de colonización.

Los estudios de expresión génica realizados corroboran los datos histoquímicos de medida de micorrización. Por un lado, la expresión de genes marcadores del nivel de hongo en la raíz (*GinEF2* y *GinGS*) se corresponde perfectamente con el nivel observado para los distintos parámetros de micorrización, es decir, incremento en *Rin* y disminución en plantas *Epi* en relación a sus respectivos genotipos silvestres. De igual forma, el gen de tomate *ERT1b*,

marcador de micorrización (García Garrido *et al.*, 2010) también sigue este patrón de expresión ligado al grado de micorrización. El hecho de que el incremento relativo en la expresión génica para *GinEF2*, *GinGS* y *ERT1b*, en plantas *Rin* sea mayor que la disminución de dicha expresión en plantas *Epi* puede deberse al distinto periodo de micorrización analizado en cada caso, así como a la distinta variedad silvestre de referencia para cada mutante. La micorrización de plantas *Epi* de 63 dpi, aunque más extensa, es menos activa debido a la edad de las plantas y la senescencia de las estructuras fúngicas en la raíz.

Al contrario de otros genes marcadores de micorrización, el gen *LePT4*, gen de tomate que codifica para una proteína de transporte de fósforo específica de la raíz micorrizada e íntimamente ligada a la actividad arbuscular (Nagy *et al.*, 2005) y *AOS3*, gen que codifica para una allene oxido sintasa que participa en la ruta de la síntesis de oxilipinas, como ácido jasmónico, mostraron un patrón de expresión diferente en plantas *Epi*. Siguiendo el patrón típico, los genes *LePT4* y *AOS3* presentaron mayores niveles de expresión en raíces de plantas *Rin* respecto a las silvestres Ailsa Craig coincidiendo con el incremento de los niveles de micorrización en dichas plantas. Sin embargo, no se detectó una disminución en su expresión en raíces micorrizadas de plantas *Epi*, con menor micorrización que los silvestres VFN8, tal y como ocurrió para los genes *GinEF2*, *GinGS* y *ERT1b*. Al contrario, en dichas plantas se pudo observar un incremento en la expresión génica de 1.6 veces para *LePT4* y 1.5 veces para *AOS3* respecto a plantas silvestres VNF8. Este resultado sugiere que estos genes pueden estar regulados tanto por los niveles de micorrización, como por la señalización de etileno. De hecho el gen *AOS<sub>3</sub>* responde positivamente a la aplicación de etileno (García Garrido *et al.*, 2010) y el gen *LePT4* tal y como hemos comentado anteriormente presenta una modulación de su expresión también dependiente de etileno. En este sentido, el gen *LePT4* codifica para una proteína responsable del transporte de fósforo en las células con arbuscúlos y su expresión se ha relacionado con la funcionalidad de los mismos. Si tal y como muestran los resultados la expresión de dicho gen fue similar en plantas silvestres y mutantes *Epi* aunque éstas tengan un nivel menor de infección y de intensidad arbuscular, significa que los cambios en el patrón de micorrización en dicho mutante sensible a etileno si bien afectan el grado de ocupación de la raíz, no afectan a la funcionalidad del arbuscúlo, e incluso la estimulan, pues para una menor intensidad arbuscular se detecta una expresión mayor del gen *LePT4*, lo que sugiere una estabilización de la funcionalidad de los arbuscúlos debida al etileno.

En el caso de plantas *Rin*, la mayor expresión de *LePT4* estaría relacionada con un mayor número de arbuscúlos en su raíz en relación a plantas Ailsa Craig. Estos resultados



muestran en su conjunto que dependiendo del genotipo de la planta silvestre se afecta la micorrización de forma diferente y de acuerdo con la sensibilidad a etileno de cada cultivar. Diversos autores sugieren que varios factores intervienen en la efectividad de la simbiosis micorrízica como el genotipo del HMA, la especie de la planta y las características químicas, físicas y biológicas del suelo (Brundrett y Abbott, 2002; Kosuta *et al.*, 2005; Baar, 2008).

Hasta ahora la investigación realizada se había centrado en la comparación del patrón de micorrización de diferentes fondos genéticos caracterizados por una mayor o menor sensibilidad y/o capacidad de respuesta a etileno. El siguiente paso en nuestra investigación fue averiguar si la presencia del hongo en la planta provocaba algún cambio en la biosíntesis o señalización del etileno, y por tanto determinar la participación del etileno en la regulación de la micorrización para diferenciar respuestas inducidas por la micorrización de la raíz de respuestas constitutivas debidas a la alteración de la sensibilidad a etileno en los distintos mutantes. Para ello se analizó la micorrización de plantas silvestres y mutantes *Rin* y *Epi* y se compararon los efectos entre plantas micorrizadas o no en cuanto a la producción de etileno, expresión de genes marcadores de la señalización de la respuesta a etileno, y marcadores de la simbiosis MA.

La inoculación favoreció, en términos generales, el peso fresco de la planta, aunque la micorrización fue dependiente del genotipo como ya se ha explicado. Los parámetros de micorrización analizados volvieron a confirmar la regulación negativa de la expansión fúngica debida a etileno. Como en experimentos anteriores las plantas *Rin* mostraron mayor capacidad de micorrización y las plantas *Epi* manifestaron un retroceso en el proceso infectivo. En consonancia, la variación en la expresión de los genes *GinEF2* y *GinGS* fue paralela a la variación en los parámetros de micorrización. La expresión de estos genes se detectó únicamente en las plantas micorrizadas, evidentemente porque son genes fúngicos marcadores de la presencia y actividad del hongo en la raíz durante el establecimiento de la simbiosis

No hubo correlación entre los niveles de etileno detectados en raíz y los parámetros de micorrización. En este sentido, la micorrización parece inducir una leve disminución de los niveles de etileno, más patente en los genotipos *Ailsa Craig/Rin* que en *VFN8/Epi*. No obstante este efecto es independiente del grado de micorrización, y no tan acusado como el claro efecto sobre los niveles de etileno observado para la variable tiempo de cultivo. En este sentido las plantas más jóvenes mostraron niveles significativamente superiores tanto en hoja como en raíz, independientemente del genotipo y de la inoculación. A nivel de expresión de

genes que codifican para los receptores de etileno LeETR4 y LeETR6 se observó un patrón de expresión dependiente del genotipo e independiente de la micorrización. Así, podemos decir que en la variedad VFN8 y su mutante *Epi* tiene mayor importancia cuantitativa el receptor LeETR4 en comparación con la variedad Ailsa Craig. En cuanto al receptor LeETR6, se observó una expresión muy parecida en todos los tratamientos con un máximo a los 44 dpi posiblemente como consecuencia del pico máximo de etileno detectado en todos los tratamientos a los 30 dpi. No obstante, y desde el punto de vista de la micorrización, el gen *LeETR6* se expresó de manera muy significativa en plantas *Epi* inoculadas a los 44 dpi, y esta expresión podría estar asociada a una función del etileno que esté mediada por el receptor ETR6 durante la micorrización. En este sentido y como ya se ha apuntado anteriormente puede estar relacionado con la regulación de la expresión del gen *LePT4*, cuya expresión fue mayor en los tratamientos *Epi* inoculados a 30 y 44 dpi, lo que sugiere de nuevo una inducción del gen bajo una situación de mayor sensibilidad a etileno. Aunque Fraccetto *et al.*, (2013) no encontraron una correlación directa entre la micorrización, específicamente la frecuencia arbuscular, y la expresión del gen *LePT4* en el mutante *Epi*.

El análisis de expresión de otros genes relacionados con micorrización en tomate, la señalización de GAs y la defensa mostró que los genes *RIESKE* y  $\alpha/\beta$  hidrolasa asociados al proceso de micorrización en tomate (García Garrido *et al.*, 2010) no tienen una expresión regulada por etileno. Por su parte, la expresión de los genes *GA<sub>2</sub>OX<sub>3</sub>* y *Endo-Q* fue dependiente del genotipo y de la micorrización, mostrando un patrón de expresión complejo. En este sentido lo más destacable y significativo es que los resultados ponen de manifiesto la interacción entre el proceso de micorrización, la respuesta a etileno y la señalización por giberelinas.

#### **IV.2. LA REGULACIÓN DEL FÓSFORO DURANTE EL ESTABLECIMIENTO DE LA MICORRIZACIÓN ES DEPENDIENTE DEL GENOTIPO DE LA PLANTA**

Numerosos estudios se han realizado sobre las consecuencias sobre la fisiología y nutrición de las plantas ocasionadas por una limitación en la disponibilidad de fósforo, así como las estrategias que desarrollan las mismas para mejorar su adquisición en dichas condiciones limitantes (Franco-Zorrilla *et al.*, 2004; Desnos, 2008; Fang *et al.*, 2009). Precisamente una de las estrategias para paliar en lo posible las condiciones de agotamiento y limitación de fósforo es la formación de la simbiosis Micorriza cuyo desarrollo está condicionado por la

disponibilidad de este nutriente en la rizosfera. Una fertilización alta en fósforo inorgánico (Pi) limita la formación de la simbiosis MA (He y Nara, 2007), lo que se traduce en pérdida de los beneficios de la simbiosis, tales como la adquisición de nitrógeno por parte del hongo para la planta (Govindarajulu *et al.*, 2005), compuestos sulfurados (Allen y Shachar-Hill, 2009) y microelementos (George, 2000), así como incremento de la resistencia a patógenos y de la tolerancia al estrés (Pozo y Azcon-Aguilar, 2007).

Diversos estudios al respecto han demostrado que una alta disponibilidad del fósforo en el suelo inhibe la formación de las micorrizas arbusculares, aunque se desconocen los mecanismos activados en la planta mediante los cuales se lleva a cabo esta inhibición de la formación de la micorrización. Por otro lado, se sabe que las plantas despliegan diversas respuestas adaptativas a la disponibilidad de fósforo, incluyendo adaptaciones morfológicas o fisiológicas de la raíz que pueden afectar la adquisición de fósforo (Raghothama, 1999; Lynch y Brown, 2001, 2006; Vance, Uhde-Stone y Allan, 2003; Lynch, 2007).

La ruta de adquisición directa de fósforo, presente en todas las plantas, involucra la expresión de los transportadores de fósforo de alta afinidad a través de las raíces (Poirier y Bucher, 2002; Grunwald *et al.*, 2009) o cambios en la arquitectura del sistema radicular que proveen acceso a un mayor volumen de suelo (Pérez *et al.*, 2011). Algunas de estas adaptaciones responden a una disponibilidad local de fósforo (Svistoonoff *et al.*, 2007), mientras que otras son reguladas a un nivel sistémico como una función del estatus nutricional de la planta (Thibaud *et al.*, 2010). La ruta indirecta de adquisición de fósforo llamada la Ruta simbiótica implica la asociación entre las plantas y los HMA (Smith y Read, 2008).

En nuestro estudio, la micorrización fue inhibida casi completamente por una alta disponibilidad de fósforo tanto en el cultivar Ailsa Craig como en el genotipo VFN8. El genotipo de la planta fue un factor clave en la respuesta/señalización a una alta concentración de fósforo disponible según los datos obtenidos de los parámetros fisiológicos, bioquímicos y moleculares evaluados. Así, la aplicación de Pi a plantas micorrizadas tuvo un efecto positivo a la dosis 100 ppm que fue más evidente en el genotipo Ailsa Craig. De otra parte, los parámetros de colonización fúngica evaluados muestran que la variedad VFN8 fue más sensible a la aplicación de Pi, observándose un efecto dosis dependiente de inhibición de la intensidad arbúscular que no fue tal en la variedad Ailsa Craig.

Al objeto de evaluar una posible dependencia de la respuesta a la alta disponibilidad de Pi con la ruta de señalización de etileno se determinó tanto la cantidad de etileno en raíz como la expresión de los genes que codifican para los receptores ETR4-6. La aplicación de Pi redujo los niveles de etileno desprendido en raíces de Ailsa Craig, pero no en VFN8, poniéndose de manifiesto de nuevo un efecto dependiente de la variedad. Sin embargo, la expresión de genes de receptores de etileno (*ETR4* y *6*) y del gen *Rin* (señalización de etileno) se vio afectada negativamente por la aplicación de fósforo, independientemente del genotipo de la planta. Estos resultados sugieren que la aplicación de Pi a plantas micorrizadas, que conlleva una inhibición de la micorrización, altera la señalización de etileno, suprimiendo la expresión de genes de receptores y en el caso de la variedad Ailsa Craig también disminuyendo la cantidad de etileno en la raíz. Por tanto, es posible sugerir que el Pi añadido suprime la señalización de etileno y en consecuencia repercute negativamente en la micorrización, dado que como se comentó anteriormente hemos puesto de manifiesto un efecto positivo directo sobre los parámetros de micorrización.

En el caso de la respuesta a nivel genético, todos los genes relacionados con la presencia del hongo en la raíz ( *$\alpha/\beta$  hidrolasa*,  *$\beta$  exp*, *GinEF* y *GinGS*), y transporte simbiótico de fósforo (*LePT4*), se vieron regulados negativamente por el fósforo disponible, si bien el nivel de afectación varió en función del genotipo de la planta. El establecimiento de la simbiosis MA puede ser alterada por las condiciones ambientales, incluyendo la disponibilidad de fósforo (Breuillin *et al.*, 2010; Bonneau *et al.*, 2013). Chen *et al.*, (2014) encontró que el gen *LePT4* estuvo fuertemente activado en raíces colonizadas en condiciones de baja disponibilidad de fósforo y en alta disponibilidad fue fuertemente inhibido. Breuillin *et al.*, (2010) proponen que el fósforo puede estar regulando los transportadores PTs específicos de la micorriza y que son éstos los que en realidad pueden estar mediando el establecimiento de la micorriza. En este sentido, dependiendo de las condiciones experimentales, como del estado y extensión de la simbiosis MA, se ha sugerido que la disponibilidad del fósforo puede inhibir esta asociación a diferentes niveles (Gosling *et al.*, 2013). Esto sugiere la existencia de múltiples mecanismos regulatorios que pueden prevenir el establecimiento de la simbiosis o bien conducir a la eliminación del hongo de la raíz (Koide y Schreiner, 1992).

Algunas evidencias apuntan a una participación negativa del fósforo durante el establecimiento de la simbiosis a través de la reducción de la producción de diversos compuestos radiculares, como las estrigolactonas (Akiyama *et al.*, 2002). En este sentido, tanto auxinas como etileno pueden mediar la función de estrigolactonas, al menos en parte (Koltai *et*

*al.*, 2011), por lo que en nuestros experimentos no es descartable que la bajada en la señalización de etileno debida a la aplicación de Pi podría interferir en la función promotora de estrigolactonas sobre la micorrización. De hecho, la medida de la expresión de genes de metabolismo hormonal asociados a la micorrización reveló resultados interesantes de interacción hormonal. En concreto, la expresión de genes de respuesta a auxinas (*IAA-14*) y gen *DELLA*, represor de la respuesta a Giberelinas se vió afectada negativamente en el cultivar VFN8, y no en el cultivar Ailsa Craig. Curiosamente el cultivar Ailsa Craig mostró menor afectación en el % de arbusculos como consecuencia de la aplicación de Pi, y tanto auxinas como *DELLA* son elementos reguladores positivos de la formación de arbusculos (Etemadi *et al.*, 2014; Floss *et al.*, 2014). Es decir podría ocurrir que la menor afectación del parámetro de % a sea consecuencia de una menor afectación de la señalización vía auxinas y *DELLA*. En el caso de la variedad VFN8, la expresión del gen *IAA-14* se vió afectada negativamente por la aplicación de Pi, y esto concuerda con algunos estudios que sugieren una represión de la respuesta a auxinas mediada por la disponibilidad y concentración del fósforo en el suelo (Jain *et al.*, 2007; López-Bucio *et al.*, 2002; Nacry *et al.*, 2005). Además, Pérez-Torres *et al.*, (2008) y Goh *et al.*, (2012) apuntan que la señalización de auxinas en el desarrollo de la raíz involucra el gen *IAA14* que interviene en el remodelado de las membranas lipídicas cuando la planta se encuentra en suelos con una baja disponibilidad de fósforo asimilable.

#### **IV.2. EL FÓSFORO Y EL ETILENO SON REGULADORES ANTAGONISTAS DEL PROCESO DE ESTABLECIMIENTO DE LA MICORRIZACIÓN**

Se han propuesto varias vías de señalización molecular implicadas en la regulación de la adquisición de Pi y la regulación de la formación de micorriza arbuscular y probablemente actúen de forma interconectada (Rouached *et al.*, 2010; Chiou *et al.*, 2011). Hay evidencias que apoyan el papel de las hormonas vegetales en el proceso de adquisición de fósforo y regulación en la planta de distintas situaciones de deficiencia, y así, por ejemplo tanto tratamientos con etileno como plantas crecidas en condiciones de deficiencia de Pi causan cambios fenotípicos similares en las raíces (Gilbert *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2001). Este hecho indica que el etileno puede ser una hormona candidata en la mediación de la señalización y regulación de la adquisición de fósforo, y por tanto puede mediar en el mecanismo de la inhibición de la micorrización por disponibilidad de fósforo. Nuestros resultados obtenidos en los experimentos de aplicación de Pi así lo sugieren, pues como se ha

discutido anteriormente, la aplicación de Pi a plantas micorrizadas desencadena una supresión de la respuesta a etileno.

Para intentar obtener evidencias experimentales que apoyen esta hipótesis de la interacción Pi con la vía de señalización de etileno y su repercusión en la formación de micorriza arbuscular se diseñaron una serie de experimentos que combinaron el análisis de micorrización bajo la aplicación de Pi en genotipos silvestres y plantas alteradas en la vía de señalización de etileno. El análisis del efecto de la aplicación exógena de Pi en el mutante *Rin*, alterado en su capacidad de percepción del etileno, y del cuál conocíamos su mayor capacidad de micorrización, mostró que su comportamiento fue similar al de la variedad silvestre Ailsa Craig de la cuál proviene. La concentración más alta de Pi aplicada tuvo un efecto negativo sobre los parámetros de peso fresco tanto en Ailsa Craig como *Rin*, y se apreció un efecto inhibitor de la aplicación de Pi sobre la capacidad de acumulación de etileno en la raíz. De igual modo, en ambos genotipos se apreció una disminución de la capacidad de micorrización que no afectó al parámetro de abundancia arbuscular en la zona colonizada. En términos generales, el fósforo inhibió la expresión de los genes marcadores de la micorrización, de percepción de etileno y del transporte de fósforo asociado al proceso simbiótico independientemente del genotipo de la planta.

Estos resultados se confirman a nivel molecular con los datos de expresión y génica nos permiten asegurar que ambos genotipos mostraron un patrón similar de respuesta lo que indica que la señalización mediada por el gen *Rin* no afecta a la regulación de la micorrización debida a la aplicación de Pi, aunque como ya sabíamos esta señalización si afecta la capacidad de micorrización del mutante, siendo superior a la de su cultivar silvestre.

En otra serie de experimentos, similares a los descritos con el mutante *Rin*, usamos la variedad VFN8 y su mutante *Epi*, caracterizado por una respuesta acentuada a etileno. La aplicación de Pi a *Epi* no afectó de manera dramática el peso fresco de la planta tanto en VFN8 como en el mutante *Epi*. Como es de esperar, la micorrización en el cultivar silvestre VFN8 se inhibió con la presencia de Pi, afectándose de manera negativa todos los parámetros de micorrización y la expresión de los genes asociados al proceso de colonización MA. De igual manera, la aplicación de Pi afectó de manera negativa a la expresión de genes de respuesta a etileno, tales como los genes de los receptores ETR4-6. Sin embargo, y aunque el mutante *Epi* mostró menor capacidad infectiva que el cultivar VFN8 en condiciones control, la aplicación de Pi no tuvo ningún efecto negativo aparente sobre la micorrización independientemente de la

concentración aplicada. Incluso la funcionalidad de la simbiosis, evaluada mediante la actividad ALP, se afectó únicamente en el genotipo silvestre VFN8 y en el genotipo *Epi* se vio alterada únicamente a la concentración mas alta de Pi aplicada.

A nivel molecular, la aplicación de Pi no afectó, e incluso favoreció, la expresión de genes genes marcadores de la micorrización, que si mostraron un patrón de inhibición en el genotipo silvestre VFN8 tratado con las dos concentraciones de fósforo. De manera similar y contrariamente al comportamiento del genotipo silvestre, los genes de los receptores ETR4-6 se activaron por la aplicación de Pi en el genotipo *Epi*. De igual modo, en *Epi* se activó la expresión de genes relacionados con el metabolismo de giberelinas y auxinas, hormonas implicadas en la regulacion de la colonización MA (Etemadi *et al.*, 2014; Floss *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos muestran claramente una interacción Pi/etileno durante el proceso de micorrización, de tal forma que la regulación negativa de la micorrización por exceso de Pi está acompañada de una supresión de la vía de señalización de etileno, y que esta interacción es independiente de *Rin*. La mutación *Epi* conlleva mayor sensibilidad a etileno y el efecto del Pi añadido es anterior o independiente de la mutación que conlleva a esa mayor sensibilidad. En este sentido, existe una limitante para delucidar el mecanismo por el cual el gen *Epi* interviene en el proceso, pues aún no se ha caracterizado el locus de este gen ni asignado una función específica (Ursin, 1987; Fujino, *et al.*, 1989; Wang y Ying, 2004; Zsögön *et al.*, 2008; Torres de Los Santos *et al.*, 2011). Hay que mencionar que tanto en el genotipo *Rin* como en *Epi* únicamente se evaluó la expresión de los receptores de etileno *LeETR4* y *LeETR6*, aunque en tomate se han caracterizado hasta 6 receptores LeETR (Wilkinson *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1996; Lashbrook *et al.*, 1998; Tieman y Klee, 1999; Klee y Tieman, 2002), y cuyo nivel de expresión o regulación durante la respuesta al ayuno o aplicación de Pi se desconoce.

Para corroborar la hipótesis de la interacción antagonística Pi/etileno durante la regulación de la formación de MA, realizamos un experimento de aplicación conjunta de Pi y etileno tanto a plantas silvestres como mutantes NRO, que sobre-expresan el gen *LeETR3* que codifica para el receptor NR, lo que las hace más insensibles a la acción de etileno. La idea del experimento es compensar la inhibición de la señalización de etileno mediada con Pi añadiendo etileno exógeno. Y, efectivamente, la aplicación conjunta de Pi y etileno compensa el efecto negativo sobre la micorrización ocasionado por la aplicación de Pi. Esta compensación es dependiente de la concentracion de etileno aplicada, pues altas concentraciones no tuvieron efecto, y afecta principalmente a los parámetros de intensidad de colonizacion y cantidad de

arbúsculos. En definitiva los resultados muestran que el etileno interfiere en el efecto negativo del Pi sobre la micorrización y esa interferencia es dosis dependiente.

Los resultados con el mutante NRO dan validez a nuestra hipótesis. En el mutante NRO, más insensible a la acción de etileno, la aplicación de Pi redujo la micorrización en todos los casos y la adición de ethephon no varió el efecto inhibitor del fósforo e incluso la combinación de Pi con las diferentes combinaciones de ethephon resultó en una disminución más acusada que con el tratamiento de Pi solo. Si bien en plantas NRO el efecto inhibitor del fósforo en la micorrización es menos acusado que en plantas silvestres Floradade, la atenuación de este efecto negativo por la presencia de etileno exógeno no es evidente tal y como ocurre en plantas silvestres. Este hecho reafirma la hipótesis de una interferencia del etileno durante la regulación de la micorrización en respuesta a la aplicación de Pi.

Con objeto de caracterizar mejor la interacción Pi/etileno se realizaron una serie de experimentos que combinaban la aplicación de ambos compuestos y se midieron efectos interactivos a corto plazo, de respuesta temprana (horas) que nos pudieran dar información sobre posibles mecanismos implicados en dicha interacción. Si bien los resultados de estos experimentos fueron un tanto contradictorios, y a veces difíciles de interpretar, si podemos extraer algunas conclusiones válidas. En primer lugar, el gen *LePT4* alcanzó valores máximos de expresión a tiempos cortos cuando se aplicó ethephon, lo que confirma su capacidad de respuesta positiva a etileno e implica al etileno en la funcionalidad de los arbúsculos. Además, la aplicación conjunta de Pi y etileno resultó en una amplificación de la respuesta a etileno de la raíz, manifestada por una mayor acumulación de etileno y expresión de genes marcadores de su respuesta. Este hecho puede ser consecuencia de una mayor sensibilidad a etileno en las plantas tratadas con Pi, y por tanto mayor capacidad de respuesta a la aplicación de etileno exógeno. Este razonamiento vuelve a reforzar la idea de una interferencia antagonista Pi/etileno.

#### **IV.4. LAS ESTRIGOLACTONAS PODRÍAN SER MOLÉCULAS MEDIADORAS EN EL ANTAGONISMO DEL FÓSFORO Y EL ETILENO**

Las estrigolactonas son consideradas como señales primarias durante la etapa pre-simbiótica de la simbiosis MA (Czarnecki *et al.*, 2013) y son responsables de efectos en la raíz que favorecen la micorrización, como el aumento del crecimiento de las raíces laterales en



condiciones de baja disponibilidad de fósforo (Ruyter-Spira *et al.*, 2013). Se biosintetizan en las raíces y pueden viajar a través del xilema hacia las hojas donde modifican la arquitectura de la planta a través de la inhibición de la ramificación de la parte aérea y la formación de vástagos (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008, 2010; Kohlen *et al.*, 2011; Brewer *et al.*, 2013). Recientes publicaciones han puesto de manifiesto la interacción entre las fitohormonas auxinas, el etileno y las estrigolactonas que interaccionan entre sí para regular el desarrollo de los pelos radiculares, así como la formación y crecimiento de las raíces laterales, siendo parte de un proceso dirigido a mejorar la captación de nutrientes en el suelo regular la interacción con el entorno biótica de la raíz (Kapulnik *et al.*, 2011b; Kapulnik y Koltai, 2014). Balzergue *et al.*, (2011) sugieren que la producción de estrigolactonas (SLs) en condiciones de baja disponibilidad de fósforo regula la simbiosis MA, aunque se desconoce el mecanismo. Estos autores sugieren la existencia de eventos tempranos de señalización molecular adicionales al propio nivel de Pi. Además, y si bien no se conoce con detalle la vía de señalización ni la vía de biosíntesis de SLs (Seto y Yamaguchi, 2014) y su regulación, existen evidencias de que su acción está mediada por auxinas y etileno (Beveridge y Kyojuka, 2010; Sugimoto *et al.*, 2003).

Los genes *CCD7* y *CCD8* (*Carotenoid Cleavage Dioxygenases 7 y 8*) son partícipes de la biosíntesis de SLs, y se regulan negativamente en presencia de alta disponibilidad de fósforo y de ese modo se reduce la biosíntesis de SLs (Alder *et al.*, 2012; Beveridge y Kyojuka, 2010; Booker *et al.*, 2004; Sorefan *et al.*, 2003; Booker *et al.*, 2005; Snowden *et al.*, 2005; Gómez-Roldán *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2009; Waters *et al.*, 2012). Por tanto, es un hecho demostrado que la presencia de Pi inhibe la biosíntesis de SLs y eso afecta de manera negativa a la micorrización (García-Garrido *et al.*, 2009).

Tal y como se ha comentado, se reconoce una regulación de la acción de SLs mediada por etileno, y según nuestros resultados existe una interacción Pi/etileno durante la formación de MA, por tanto es lógico pensar que pueda existir una mediación de SLs en la conexión Pi/etileno. Para investigar este supuesto analizamos la expresión de genes marcadores de la biosíntesis de estrigolactonas, estudiamos la expresión de un gen transportador de SLs en tomate ortólogo a otro recientemente descrito en petunia (Kretschmar *et al.*, 2012) y complementamos el estudio con el análisis de la secreción de SLs en plantas silvestres y mutantes alteradas en su capacidad de percepción y respuesta a etileno cultivadas en condiciones de alta disponibilidad de fósforo.

El análisis de expresión de los genes de biosíntesis de SL en los genotipos Ailsa Craig y VFN8 mostró un patrón similar, si bien con ciertos matices específicos del cultivar, sobre todo en el gen *CCD7*, cuya expresión fue mayor en Ailsa Craig. Tanto *CCD7* como el gen *CCD8* se regularon negativamente dependiendo de la concentración de Pi disponible, lo que concuerda con datos sobre regulación negativa por Pi de otros genes de la ruta biosintética de carotenoides y apocarotenoides, tales como *DXS2* y *DAD1* (Yoneyama *et al.*, 2007; Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008; López-Raez *et al.*, 2008; Breuillinet *et al.*, 2010).

El análisis de los genotipos alterados en la señalización de etileno mostró que las concentraciones de fósforo aplicado (100 y 300 ppm Pi) provocaron efectos contrarios en función del genotipo. La aplicación al genotipo alterado en la percepción del etileno (*Rin*) resultó en una inhibición de ambos genes de igual manera que ocurría en los cultivares silvestres, y por tanto sugiere que la menor sensibilidad a etileno vía mutación *Rin* no afecta la conexión Pi-SLs. Contrariamente, la expresión de ambos genes en el genotipo alterado con mayor capacidad de respuesta a etileno, *Epi*, se vio favorecida por encima de los valores del testigo. Por tanto, la respuesta constitutiva a etileno bloquea la acción negativa de Pi sobre la producción de SLs, y en consecuencia pone de manifiesto que al menos parte del antagonismo Pi/etileno puede estar mediado por SLs.

En función de las condiciones de fósforo o nitrógeno las plantas pueden exudar elevadas cantidades de SLs a la rizósfera (Akiyama *et al.*, 2005; Yoneyama *et al.*, 2013), donde estas moléculas disparan las respuestas de desarrollo de los HMA, principalmente el crecimiento y ramificación del micelio (Akiyama *et al.*, 2005; Besserer *et al.*, 2006; 2008). Se ha puesto de manifiesto la existencia de transportadores de SLs necesarios para la exportación específica de estas moléculas a su lugar de acción. En nuestros resultados, la expresión del gen transportador de SLs en tomate, ortólogo a otro recientemente reportado en petunia, *LsPDR1* (Kretschmar *et al.*, 2012) fue dependiente del genotipo y de la aplicación de Pi. Contrariamente a los genes *CCD7* y *8*, la expresión del transportador se activó por la presencia de Pi, sobre todo en el genotipo VFN8/*Epi* y la expresión del gen estuvo potenciada en *Epi* bajo condiciones de Pi. Este dato sugiere que la mutación *Epi* (sobreexpresión de la respuesta a etileno) interacciona con el fósforo para potenciar la expresión del gen *LsPDR1*, y probablemente con ello, el transporte de estrigolactonas.

El gen *PDR1* de petunia es un transportador tipo ABC, cuya función está relacionada con la exportación de SLs y cuya actividad es necesaria para el desarrollo de micorriza

Arbuscular (Kretschmar *et al.*, 2012). Los mutantes defectivos en *PhPDR1* están limitados en la exudación de SLs y tienen una micorrización reducida (Kretschmar *et al.*, 2012).

Los datos de expresión en tomate del gen ortólogo a *PhDR1* sugieren que al contrario de los genes de biosíntesis, la regulación del transporte de SLs no es tan dependiente de los niveles de Pi, y sí del genotipo en cuestión, así como de la interacción Pi/etileno, lo que sugiere un patrón de regulación más complejo. Además, no tenemos certeza que el gen analizado en este trabajo en tomate corresponda realmente con el transportador específico de SLs en esta planta.

La deficiencia de Pi estimula la producción de SLs, y existe un test sencillo de cuantificación del porcentaje de semillas germinadas de *Orobanche* que permite establecer una correlación entre dicho porcentaje y concentración de SLs en los exudados o extractos de raíz. En nuestro caso analizamos la capacidad de exudación de SLs de diferentes genotipos de tomate caracterizados por poseer deficiencias en la síntesis o percepción de etileno con el fin de establecer si dichas deficiencias repercuten de manera directa en la producción de SLs, y así obtener una nueva evidencia de la interacción etileno/SLs. En presencia de fósforo fácilmente asimilable (100 ppm), los exudados de raíz del genotipo mutante *Epi* mostraron los mayores niveles de SLs, medidos como porcentaje de germinación de semillas de jopo. Por el contrario, el genotipo mutante *ACCD* (deficiente en la síntesis de etileno) mostró la menor capacidad de inducir germinación, lo que sugiere que la mayor activación de la señalización de etileno estimula la secreción de SLs, aún en condiciones de suficiencia de Pi.

En un segundo experimento se determinó específicamente el efecto de la interacción Pi/etileno en cuanto a la producción de SLs bajo condiciones de deficiencia y suficiencia de Pi en el genotipo silvestre *VFN8* y el mutante *Epi* de respuesta constitutiva a etileno. Los resultados muestran que la interferencia del etileno sobre la producción de SLs es variable según la disponibilidad de Pi. Así, la interferencia Pi/etileno se ha puesto de manifiesto en un doble sentido: en presencia de Pi el etileno parece actuar favoreciendo la producción de SLs y en ausencia de Pi el efecto del etileno es negativo sobre dicha producción. En consecuencia, volvemos a observar un doble papel del etileno, positivo o negativo, que pudiera interferir en la micorrización. En este caso a través de la estimulación o no de SLs en función de la disponibilidad de Pi.

## **VI. CONCLUSIONES**

## VI. CONCLUSIONES

1.- La hormona vegetal etileno tiene efectos directos positivos o negativos sobre la formación de Micorriza Arbuscular en tomate. La duplicidad de efectos (positivo y negativo) se manifiesta según la dosis aplicada y la mayor o menor sensibilidad de la variedad analizada.

2.- Uno de los efectos positivos de la acción del etileno sobre la micorrización pudiera estar mediada por una estabilización de la funcionalidad de los arbusculos, debida a la acción de etileno sobre la regulación de la expresión del gen *LePT4* y su interacción con el metabolismo de Giberelinas.

3.- El patrón de afectación de la micorrización, en función de la capacidad de respuesta de la planta a etileno, sugiere que dicho compuesto afecta sobre todo la etapa de desarrollo exponencial del hongo en la raíz, y por tanto la expansión de la colonización. En definitiva, el etileno actúa como agente regulador negativo de la expansión del hongo en la raíz, es decir de la dinámica de colonización.

4.- El fósforo es un regulador negativo de la micorrización del tomate, afectando tanto la funcionalidad de la simbiosis como el establecimiento del hongo en la raíz. El efecto negativo del fósforo sobre la micorrización es dependiente del genotipo de la planta.

5.- Existe una interacción antagonista fósforo-etileno durante el proceso de micorrización de tal forma que la regulación negativa de la micorrización por exceso de fósforo inorgánico (Pi) está acompañada de una supresión de la vía de señalización de etileno. Por su parte, el etileno añadido interfiere en el efecto negativo del Pi sobre la micorrización y esa interferencia es dosis dependiente.

6.- Parte del antagonismo entre el fósforo y el etileno regulando la formación de Micorriza Arbuscular en tomate está mediado por la producción de Estrigolactonas (SLs) en la raíz. Así, existe un doble papel del etileno, positivo en presencia de fósforo o negativo en deficiencia de fósforo, que pudiera interferir en la micorrización a través de la estimulación o no de SLs en función de la disponibilidad de Pi.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abel S, Nguyen MD, Chow W y Theologis A (1995)** ACS4, a primary indoleacetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase in *Arabidopsis thaliana*. Structural characterization, expression in *Escherichia coli*, and expression characteristics in response to auxin. *J Biol Chem* 270 (32): 19093-19099.
- Abeles FB, Morgan PW y Sltveit ME (1992)** Ethylene in plant biology. Academic Press. San Diego.
- Acosta-Echeverría M, Sánchez-Bravo J y Bañón-Arno M (2000)** Auxinas. In: Azcón-Bieto J, Talón M, eds. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Barcelona, España: 305-323.
- Adams DO y Yang SF (1979)** Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76: 170-174.
- Adams-Phillips LC, 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.
- Akiyama K, Matsuoka H y Hayashi H (2002)** Isolation and identification of a phosphate deficiency-induced C-glycosylflavonoid that stimulates arbuscular mycorrhiza formation in melon roots. *Mol Plant Microbe Interact* 15(4): 334-40.
- Akiyama K, Matsuzaki K y Hayashi H (2005)** Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: 824-827.
- Alarcón A, Hernández-Cuevas LV, Ferrera-Cerrato R y Franco-Ramírez A (2012)** Diversity and Agricultural Applications of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Mexico. *J Biofertil Biopestici* 3:115. doi:10.4172/2155-6202.1000115
- Alarcón MV, Lloret PG y Salguero J (2013)** Auxin–ethylene interaction in transversal and longitudinal growth in maize primary root. *Botany* 91: 680-685.
- Albinsky D, Masson JE, 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. *Plant Journal* 17: 73-82.
- Albrecht C, Geurts R, Lapyrie F y Bisseling T (1998)** Endomycorrhizae and rhizobial Nod factors both require SYM8 to induce the expression of the early nodulin genes *PsENOD5* and *PsNOD12A*. *Plant J* 15:605-614.

- Alder A, Jamil M, Marzorati M, Bruno M, Vermathen M, Bigler P, Ghisla S, Bouwmeester H, Beyer P y Al-Babili S (2012)** The path from beta-carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. *Science* 335: 1348-1351.
- Allen JW y Shachar-Hill Y (2009)** Sulfur Transfer through an Arbuscular Mycorrhiza. *Plant Physiology* 149 (1): 549-560.
- Allen MF, Swenson W, Querejeta JI, Egerton-Warburton LM y Treseder KK (2003)** Ecology of mycorrhizae: A conceptual framework for complex interactions among plants and fungi. *Annual Review of Phytopathology* 41: 271-303.
- Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S y Ecker JR (1999)** EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. *Science* 284: 2148-2152.
- An FY, Zhao QO, Ji YS, Li WY, Jiang ZQ, Yu XC, Zhang C, Han Y, He WR, Liu YD, Zhang SQ, Ecker JR, Guo HW (2010)** Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 binding F-Box 1 and 2 that requires EIN2 in Arabidopsis. *The Plant Cell* 22: 2384-2401.
- Arfan M, Athar HR y Ashraf M (2007)** Does exogenous application of salicylic acid through the rooting medium modulate growth and photosynthetic capacity in two differently adapted spring wheat cultivars under salt stress? *Journal of Plant Physiology* 164: 685-694.
- Argueso CT, Hansen M y Kieber JJ (2007)** Regulation of ethylene biosynthesis. *Journal of Plant Growth Regulation* 26:92-105.
- Arite T, Umehara M, Ishikawa S, Hanada A, Maekawa M, Yamaguchi S, Kozuka J (2009)** D14, a strigolactone-insensitive mutant of rice, shows an accelerated outgrowth of tillers. *Plant Cell Physiol* 50: 1416-1424.
- Aroca R, Alguacil MM, Vernieri P y Ruiz-Lozano JM (2008)** Plant Responses to Drought Stress and Exogenous ABA Application are Modulated Differently by Mycorrhization in Tomato and an ABA-deficient Mutant (*Sitiens*). [Microbial Ecology](#) 56: 704-719.
- Asai T, Stone JM, Heard JE, Kovtun Y, Yorgey P, Sheen J y Ausubel FM (2000)** Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate, ethylene, and salicylate dependent signaling pathways. *Plant Cell* 12: 1823-1835.
- Aung K, Lin SI, Wu CC, Huang YT, Su CL, Chiou TJ (2006)** *Pho2*, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. *Plant Physiol* 141:1000-1011.
- Ayling SM, Smith SE y Smith FA (2000)** Transmembrane electric potential difference of germ tubes of arbuscular mycorrhizal fungi responds to external stimuli. *New Phytologist* 147: 631-639.



- Azcón-Aguilar C, Rodríguez-Navarro DN y Barea JM (1981)** Effects of ethrel on the formation and responses to VA mycorrhiza in *Medicago sativa* and *Triticum vulgare*. *Plant and Soil* 60: 461-468.
- Baar J (2008)** From production to application of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural systems: requirements and needs. In: Varma A, ed. *Mycorrhiza*. Berlin: 361-373.
- Bago B y Azcon-Aguilar C (1997)** Changes in the rhizosphere pH induced by arbuscular mycorrhiza formation in onion (*Allium cepa*). *Z Pflanzenernaehr Bodenkm* 160: 333-339.
- Bago B, Azcón-AC, Shachar-Hill y Pfeffer P (2000)** El micelio externo de la micorriza arbuscular como puente simbiótico entre la raíz y su entorno. En: Alarcón A, Ferrera-Cerrato R (eds) *Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular*. Colegio de Postgraduados, Ediciones Mundi Prensa, Montecillo, México: 78-92.
- Bago B, Cano C, Azcón-Aguilar C, Samson J, Coughlan AP y Piché Y (2004)** Differential morphogenesis of the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus grown monoxenically on spatially heterogeneous culture media. *Mycologia* 96:452-462.
- 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 PE y Shachar-Hill Y (2000)** Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology* 124: 949-958.
- Bago B, Pfeffer PE, Abubaker J, Jun J, Allen JW, Brouillette J, Douds DD, Lammers PJ y Shachar-HY (2003)** Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiology* 131:1496-1507.
- Bago B, Pfeffer PE, Douds DD, Brouillette J, Becard G y Shachar-Hill Y (1999)** Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiology* 121: 263-272.
- Bago B, Vierheilig H, Piché Y y Azcón-Aguilar C (1996)** Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture. *New Phytologist* 133:273-280.
- Bago B, Zipfel W, Williams RM, Jun J, Arreola R, Lammers PJ, Pfeffer PE y Shachar-Hill Y (2002)** Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* 128: 108-124.
- Baier MC, Keck M, Gödde V, Niehaus K, Küster H y Hohnjec N (2010)** Knockdown of the symbiotic sucrose synthase MtSucS1 affects arbuscule maturation and maintenance in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 152:1000-1014.
- Balestrini R, Gomez-Ariza J, Lanfranco L y Bonfante P (2007)** Laser microdissection reveals

that transcripts for five plant and one fungal phosphate transporter genes are contemporaneously present in arbusculated cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 1055-1062.

**Balergue C, Puech-Page V, Bécard G y Rochange SF (2011)** The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. *Journal of Experimental Botany* 62(3): 1049-1060.

**Barea JM (1986)** Importance of hormones and root exudates in mycorrhizal phenomena. *En: Physiological and genetical aspects of mycorrhizae: proceedings of the 1<sup>st</sup> European Symposium on Mycorrhizae*. Editores: Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. INRA, Dijon, Paris: 177-187.

**Bari R, Datt PB, Stitt M y Scheible WR (2006)** *PHO2*, *microRNA399*, and *PHR1* define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol* :141, 988-999.

**Barry C y Giovannoni JJ (2007)** Ethylene and Fruit Ripening. *Journal of Plant Growth Regulation*. 26:143-159.

**Bartnicki-García S (1968)** Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annual review of Microbiology* 22: 87-108.

**Bates TR y Lynch JP (1996)** Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. *Plant Cell Environ* 19: 529-538.

**Becard G y Pfeffer PE (1993)** Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi *in vitro* development. *Protoplasma*: 174: 62-68.

**Becard G y Piché Y (1989)** Fungal growth-stimulation by CO<sub>2</sub> and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Appl Environ Microbiol* 55: 2320-2325.

**Becard G, Doner LW, Rolin DB, Douds DD y Pfeffer PE (1991)** Identification and quantification of trehalose in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi *in vivo* <sup>13</sup>C NMR and HPLC analyses. *New Phytol* 118: 547-552.

**Beilby JP (1980)** Fatty acids and sterol composition of ungerminated spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Acaulospora laevis*. *Lipids* 15: 949-952.

**Benedetto A, Magurno F, Bonfante P y Lanfranco L (2005)** Expression profiles of a phosphate transporter gene (*GmosPT*) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* 15: 620-627.

**Bennett T, Sieberer T, Willett B, Booker J, Luschnig C, Leyser O (2006)** The *Arabidopsis* *MAX* pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. *Current Biology* 16: 553-563.

**Berrocal-Lobo M, Molina A y Solano R (2002)** Constitutive expression of *ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1* in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J*. 29:23-32.

- Besserer A, Puech-Pages V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, Portais JC, Roux C, Becard G y Sejalon-Delmas N (2006)** Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology* 4: e226.
- Besserer A, Puech-PV, Kiefer P, Gomez-RV, Jauneau A, RS, Portais JC, Roux C y Séjalon-DN (2008)** GR24, a synthetic analog of strigolactones, stimulates the mitosis and growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* by boosting its energy metabolism. *Plant Physiol* 148: 402-413.
- Bethlenfalvay GJ (1992)** Mycorrhizae in the agricultural plant-soil system. *Symbiosis* 14: 413-425.
- Bethlenfalvay GJ y Linderman RG (1992)** Mycorrhizae in sustainable agriculture. American Society of Agronomy: *Crop Science Society of America*. Madison, Wisconsin, USA.
- Beveridge CA y Kyojuka J (2010)** New genes in the strigolactone-related shoot branching pathway. *Curr. Opin. Plant Biol* (13): 34-39.
- Beveridge CA, Ross JJ y Murfet IC (1996)** Branching in pea (action of genes *Rms3* and *Rms4*). *Plant Physiol* 110: 859-865.
- Bi HH, Song YY y Zeng RS (2007)** Biochemical and molecular responses of host plants to mycorrhizal infection and their roles in plant defence. *Allelopathy J*: 2015-27.
- Binder BM, Chang C, Schaller GE (2012)** Perception of ethylene by plants ethylene receptors. *Annual Plan Reviews* 44:117-145.
- Binder BM, Rodríguez FI y Bleecker AB (2010)** The Copper Transporter RAN1 Is Essential for Biogenesis of Ethylene Receptors in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 285: 37263-37270.
- Bisson MMA, Bleckmann A, Allekotte S y Groth G (2009)** EIN2, the central regulator of ethylene signalling, is localized at the ER membrane where it interacts with the ethylene receptor ETR1. *Biochemical Journal* 424: 1-6.
- Bisson MMA, Groth G (2010)** New insight in ethylene signaling: autokinase activity of ETR1 modulates the interaction of receptors and EIN2. *Molecular Plant* 3: 882-889.
- Blée E (2002)** Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science* 7: 315-322.
- Blée KA y Anderson AJ (1998)** Regulation of arbuscule formation by carbon in the plant. *Plant Journal* 16: 523-530.
- Bleecker AB y Kende H (2000)** ETHYLENE: A gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 1-18.
- Bleecker AB, Estelle MA, Somerville C y Kende H (1988)** Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 241:1086-89.
- Blilou I, Bueno P, Ocampo JA y Garcia-Garrido JM (2000a)** Induction of catalase and ascorbate

- peroxidase activities in tobacco roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal *Glomus mosseae*. *Mycological Research* **104**: 722-725.
- Blilou I, Ocampo JA y García-Garrido JM (2000b)** Induction of Ltp (lipid transfer protein) and Pal (phenylalanine ammonia-lyase) gene expression in rice roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1969-1977.
- Blilou I, Ocampo JA, García-Garrido JM (1999)** Resistance of pea roots to endomycorrhizal fungus or *Rhizobium* correlates with enhanced levels of endogenous salicylic acid. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1663-1668.
- 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-Fasolo P (1984)** Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. En: Powell CL, Bagyaraj DJ (eds) VA mycorrhiza, CRC Press, Boca Raton, pp 5-33.
- Bonfante-Fasolo P y Fontana A (1985)** VAM fungi in *Ginkgo biloba* roots-their association at the cellular level. *Symbiosis* **1**: 53-67.
- Bonfante-Fasolo P, Peretto R y Perotto S (1992)** Cell surface interaction in endomycorrhizal symbiosis. En: Callow JA, Green JR (eds) *Perspectives in plant cell recognition*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 239-255.
- Bonneau L, Huguet S, Wipf D, Pauly N y Truong HN (2013)** Combined phosphate and nitrogen limitation generates a nutrient stress transcriptome favorable for arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Medicago truncatula*. *New Phytol* **199**(1): 188-202. doi: 10.1111/nph.12234.
- Booker J, Auldridge MWS, McCarty D, Klee H y Leyser O (2004)** MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Curr. Biol* **14**: 1232-1238.
- Booker J, Sieberer T, Wright W, Williamson L, Willett B, Stirnberg P, Turnbull C, Srinivasan M, Goddard P y Leyser O (2005)** MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Dev. Cell* **8**: 443-449.
- Borch K, Bouma T, Lynch J y Brown K (1999)** Ethylene: a regulator of root architectural responses to soil phosphorus availability. *Plant Cell Environ* **22**: 425-431.
- Börstler B, Raab PA, Thiéry O, Morton JB y Redecker D (2008)** Genetic diversity of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as determined by mitochondrial large subunit rRNA gene sequences is considerably higher than previously expected. *New Phytologist* **180**: 452-465.

- Botella JR, Arteca JM, Schlaghauer CD, Arteca RN y Phillips AT (1992)** Identification and characterization of a full-length cDNA encoding for an auxin-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase from etiolated mung bean hypocotyl segments and expression of its mRNA in response to indole-3-acetic acid. *PMB* 20(3): 425-436.
- Botella JR, Arteca RN y Frangos JA (1995)** A mechanical strain-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 92(5): 1595-1598.
- Braunberger PG, Abbott LK y Robson AD (1996)** Infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi after wetting and drying. *New Phytologist* 134: 673-684.
- Breullin F, Schramm J, Hajirezaei M, Ahkami A, Favre P, Druège U, Hause B, Bucher M, Kretzschmar T, Bossolini E. et al., (2010)** Phosphate systemically inhibits development of arbuscular mycorrhiza in *Petunia hybrida* and represses genes involved in mycorrhizal functioning. *Plant Journal* 64: 1002-1017.
- Breuninger M, Trujillo CG, 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.
- Brewer PB, Koltai H y Beveridge CA (2013)** Diverse roles of strigolactones in plant development. *Mol Plant* 6: 18-28.
- Broeckling CD, Huhman DV, Farag MA, Smith JT, May GD, Mendes P, Dixon RA y Sumner LW (2005)** Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. *J Exp Bot* 56: 323-336.
- Brundrett MC y Abbott LK (2002)** Arbuscular mycorrhizas in plant communities. In: *Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity*. Ed. by: Sivasithamparam K, Dixon KW, Barrett RL. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 151-193.
- Bucher M, Hause B, Krajinski F, and Küster H (2014)** Through the doors of perception to function in arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*: DOI: 10.1111/nph.12862.
- Bucher M, Wegmueller S y Drissner D (2009)** Chasing the structures of small molecules in arbuscular mycorrhizal signaling. *Curr Opin Plant Biol* 12: 1-8. Doi: 10.1016/j.pbi.2009.06.001
- Bücking H, Beckmann S, Heyser W y Kottke I (1998)** Elemental contents in vacuolar granules of ectomycorrhizal fungi measured by EELS and EDXS: a comparison of different methods and preparation techniques. *Micron* 29 (1): 53-61.
- Buee M, Rossignol M, Jauneau A, Ranjeva R y Becard G (2000)** The presymbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant

- root exudates. *Mol Plant Microbe interact* 13: 693-8.
- Bun-Ya M et al., (1991)** The Pho84 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol Cell Biol* 11: 3229-3238.
- Burleigh SH y Harrison MJ (1999)** The down-regulation of Mt4-like genes by phosphate fertilization occurs systemically and involves phosphate translocation to the shoots. *Plant Physiol* 119:241-248.
- Bustin SA (2002)** Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29: 23-39
- Bustos R, Castrillo G, Linhares F, Puga MI, Rubio V et al., (2010)** A Central Regulatory System Largely Controls Transcriptional Activation and Repression Responses to Phosphate Starvation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 6(9): e1001102. doi:10.1371/journal.pgen.1001102.
- Campanella JJ, Smith SM, Leib D, Wexler S y Ludwig-Müller J (2008)** The auxin conjugate hydrolase family of *Medicago truncatula* and their expression during the interaction with two symbionts. *Journal of Plant Growth Regulation* 27: 26-38.
- Cancel JD y Larsen PB (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.
- Cappellazzo G, Lanfranco L, Fitz M, Wipf D y Bonfante P (2008)** Characterization of an Amino Acid Permease from the Endomycorrhizal Fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiology* 147: 429-437.
- Caradus JR (1981)** Effect of root hair length on white clover growth over a range of soil P levels. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 24: 353-358.
- Carvalho RF, Campos ML, Pino LE, Crestana SL, Zsögön A, Lima JE, Benedito VA y Peres LEP (2011)** Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. *Plant Methods* 7:18.
- Chabaud M, Genre A, Sieberer BJ, Faccio A, Fournier J, Novero M, Barker DG, Bonfante P (2011)** Arbuscular mycorrhizal hyphopodia and germinated spore exudates trigger Ca<sup>2+</sup> spiking in the legume and nonlegume root epidermis. *New Phytologist* 189: 347-355.
- Chabaud M, Venard C, Defaux-Petras A, Becard G y Barker DG (2002)** Targeted inoculation of *Medicago truncatula* in vitro root cultures reveals *MtENOD11* expression during early stages of infection by arbuscular mycorrhizal fungi. *New phytol* 156: 265-273.
- Chabot S, Becard G y Piche Y (1992)** Life cycle of *Glomus intraradices* in root organ culture. *Mycologia* 84: 315-321.
- Chalot M, Blaudez D y Brun A (2006)** Ammonia: a candidate for nitrogen transfer at the mycorrhizal interface. *Trends in Plant Science* 11: 263-266.

- Chang C y Shockey (1999)** The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *J Curr Opin Plant Biol* 2: 352-358
- Chang C, Kwok SF, Bleecker AB y Meyerowitz EM (1993)** Arabidopsis ethylene-response gene *ETR1*: similarity of product to two- component regulators. *Science* 262: 539-544.
- Chao QM, Rothenberg M, Solano R, Roman G, Terzaghi W y Ecker JR (1997)** Activation of the ethylene gas response pathway in Arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* 89: 1133-1144.
- Chen T, Liu J, Lei G, Liu YF, Li ZG, Tao JJ, Hao YJ, Cao YR, Lin Q, Zhang WK, Ma B, Chen SY, Chen YF, Gao ZY, Kerris RJ, Wang WY, Binder BM y Schaller GE (2010)** Ethylene receptors function as components of high-molecular-mass protein complexes in *Arabidopsis*. *PLoS One* 5: e8640.
- Chen X, Song F, Liu F et al., ( 2014)** Effect of Different Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Growth and Physiology of Maize at Ambient and Low Temperature Regimes. *The Scientific World Journal*. Doi:10.1155/2014/956141
- Chen YF, Rylett MD, Findell JL y Schaller GE (2002)** Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* 277:19861-19866.
- Chen YF, Shakeel SN, Bowers J, Zhao XC, Etheridge N y Schaller GE (2007)** Ligand-induced degradation of the ethylene receptor ETR2 through a proteasome-dependent pathway in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* 282:24752-24758.
- Chiou TJ y Lin SI (2011)** Signaling network in sensing phosphate availability in plants. *Annu. Rev. Plant Biol* 62: 185-206.
- Chiou TJ, Aung K, Lin SI, Wu CC, Chiang SF y Su CL (2006)** Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in Arabidopsis. *Plant Cell* 18: 412-421.
- Chiou TJ, Liu H y Harrison MJ (2001)** The spatial expression patterns of a phosphate transporter (MtPT1) from *Medicago truncatula* indicate a role in phosphate transport at the root/soil interface. *The Plant Journal* 25: 281-293.
- Ciardi JA, Tieman DM, Jones JB y Klee HJ (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.
- Ciardi JA, Tieman DM, Lund ST, Jones JB, Stall RE y Klee HJ (2000)** Response to *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria in tomato involves regulation of ethylene receptor gene expression. *Plant Physiology* 123: 81-92.
- Clapp JP, Rodriguez A y Dodd JC (2001)** Inter and intra-isolate rRNA large subunit variation in *Glomus coronatum* spores. *New Phytol* 149:539-554.

- Clark KL, Larsen PB, Wang X y Chang C (1998)** Association of the Arabidopsis CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 95:5401-5406.
- Clarke JD, Volko SM, Ledford H, Ausubel FM y Dong X (2000)** Roles of salicylic acid jasmonic acid and ethylene in *cpr* induced resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 2175-2190.
- Condron LM, Turner BL y Cade-Menun BJ (2005)** Chemistry and dynamics of soil organic phosphorus. In JT Sims, AN Sharpley (Eds) *Phosphorus: Agriculture and the Environment*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Inc., Madison, WI, USA, pp 87-121.
- Conforth J, Milborrow B, Ryback G y Wareing P (1965)** Chemstrand and Physiology of Dormins. En Sycamore: Identity of Sycamore Dormin with Abscisin II. *Nature* 205: 1269-1270.
- Cook CE, Whichard LP, Turner B y Wall ME (1996)** Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour)-Isolation and properties of a potent stimulant. *Science* 154: 1189-1190.
- Cox G, Moran KJ, Syers F, Nockolds C y Tinker PB (1980)** Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. III. Polyphosphate granules and phosphorus translocation. *New Phytologist* 84: 649-659.
- Cracker LE y Abeles FB (1969)** Abscission: Role of Abscisic Acid. *Plant Physiology* 44: 1144-1149.
- Crawford S, et al., (2010)** Strigolactones enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport. *Development* 137: 2905-2913.
- Cristescu SM, De Martinis D, Hekkert ST, Parker DH y Harren FJM (2002)** Ethylene production by *Botrytis cinerea* in vitro and in tomatoes. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5342-5350.
- Crocker W (1932)** The effect of ethylene on living organisms. *Proc Am Philos Soc* 71:295-98.
- Czarnecki O, Yang J, Weston DJ, Tuskan GA y Chen JG (2013)** A Dual Role of Strigolactones in Phosphate Acquisition and Utilization in Plants. *Int J Mol Sci* 14(4): 7681-7701.
- Danielson RM (1984)** Ectomycorrhiza formation by the operculate discomycete *Sphaerospora brunnea* (Pezizales). *Mycologia* 76: 454-461.
- Daram P et al., (1998)** Functional analysis and cell specific expression of a phosphate transporter from tomato. *Planta* 206:225-233
- Davies PJ (2004)** Introduction. In: Davies PJ, editor. *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action*. Dordrecht: *Springer*, p. 1-35.
- De Cnodder T, Vissenberg K, Van Der Straeten D y Verbelen JP (2005)** Regulation of cell length in the *Arabidopsis thaliana* root by the ethylene precursor 1-aminocyclopropane- 1-



- carboxylic acid: a matter of apoplastic reactions. *New Phytologist* 168: 541-550.  
Doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01540.x
- de la Providencia IE, de Souza FA, Fernandez F, Delmas NS y Declerck S (2005)** Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenetic groups. *New Phytol* 165:261-271.
- De Paepe A y Van Der Straeten D (2005)** Ethylene biosynthesis and signaling: an overview. *Vitamins and Hormones* 72:399-430.
- Declerck S, Strullu DG 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.
- Demchenko K, Winzer T, Stougaard J, Parniske M y Pawlowski K (2004)** Distinct roles of *Lotus japonicas* SYMRK y SYM15 in root colonization and arbuscule formation. *New Phytol* 163: 381-392.
- Denison RF y Kiers ET (2011)** Life histories of symbiotic rhizobia and mycorrhizal fungi. *Current Biology* 21:775-785.
- Desnos T (2008)** Root branching responses to phosphate and nitrate. *Curr Opin Plant Biol* 11: 82-87.
- Dharmasiri N, Dharmasiri S y Estelle M (2005)** The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 441-445.
- Dinkelaker B, Hengeler C y Marschner H (1995)** Distribution and function of proteoid roots and other root clusters. *Botanica Acta* 108: 183-200.
- Dolatabadian A, Sanav SAMM y Sharif M (2009)** Effect of salicylic acid and salt on wheat seed germination. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science* 59: 456-464.
- Dong CH, Jang M, Scharein B, Malach A, Rivarola M, Liesch J, Groth G, Hwang I y Chang C (2010)** Molecular association of the *Arabidopsis* ETR1 ethylene receptor and a regulator of ethylene signaling, RTE1. *J Biol Chem* 285: 40706-40713.
- Dong CH, Rivarola M, Resnick JS, Maggin BD y Chang C (2008)** Subcellular co-localization of Arabidopsis RTE1 and ETR1 supports a regulatory role for RTE1 in ETR1 ethylene signaling. *The Plant Journal* 53:275-286.
- Douds J (1997)** A procedure for the establishment of *Glomus mosseae* in dual culture with Ri T-DNA-transformed carrot roots. *Mycorrhiza* 7: 57-61.
- Douds J y Schenck NC (1991)** Germination and hyphal growth of vsm fungi during and after storage in soil at five matric potentials. *Soil Biology and Biochemistry* 23: 177-183.
- Drennan DSH y Norton C (1972)** Effect of Ethrel on Nodulation in *Pisum-Sativum* L. *Plant and Soil* 36: 53.

- Duddridge JA y Read DJ (1982)** An Ultrastructural Analysis of the Development of Mycorrhizas in *Monotropia hypopitys* L. *New Phytologist* 92: 203-214.
- Dugardeyn J y Van Der Straeten D (2008)** Ethylene: fine tuning plant growth and development by stimulation and inhibition of elongation. *Plant Science* 175: 59-70.
- Dun EA, Brewer PB y Beveridge CA (2009)** Strigolactones: discovery of the elusive shoot branching hormone. *Trends in Plant Science* 14: 364 - 372.
- Dunkley TPJ (2006)** Mapping the Arabidopsis organelle proteome. *Proc Nat Acad Sci USA* 103:6518-6523.
- Ecker JR (2004)** Reentry of the ethylene MPK6 module. *The Plant Cell* 16: 3169-3173.
- El Ghachtouli N, Martin-Tanguy J, Paynor M, y Gianinazzi S (1996)** First-report of the inhibition of arbuscular mycorrhizal infection of *Pisum sativum* by specific and irreversible inhibition of polyamine biosynthesis or by gibberellic acid treatment. *FEBS Letters*. 385: 189-192.
- Ellis C y Turner JG (2001)** The Arabidopsis mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *The Plant Cell* 13: 1025-1033.
- Emmanuel y Levy AA (2002)** Tomato mutants as tools for functional genomics. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 112-117.
- Esch H, Hundeshagen B, Schneider-Poetsch H y Bothe H (1994)** Demonstration of abscisic acid in spores and hyphae of the arbuscular-mycorrhizal fungus *Glomus* and in the N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Plant Science* 99: 9-16.
- Etemadi M, Gutjahr C, Couzigou JM, Zouine M, Lauressergues D, Timmers A, Audran C, Bouzayen M, Becard G, Combier JP (2014)** Auxin perception is required for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol* Doi : <http://dx.doi.org/10.1104/pp.114.246595>
- Fammartino A, Verdagner B, Fournier J, Tamietti G, Carbonne F, Esquerré-Tugayé MT y Cardinale F (2010)** Coordinated transcriptional regulation of the divinyl ether biosynthetic genes in tobacco by signal molecules related to defense. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48: 225-231.
- Fang ZY, Shao C, Meng YJ, Wu P y Chen M (2009)** Phosphate signaling in Arabidopsis and *Oryza sativa*. *Plant Science* 176(2):170-180.
- Fellbaum CR, Gachomo EW, Beesetty Y, Choudhari S, Strahan GD, Pfeffer PE, Kiers ET y Bücking H (2012)** Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 109: 2666-2671.

- Ferguson BJ, Foo E, Ross JJ y Reid JB (2011)** Relationship between gibberellin, ethylene and nodulation in *Pisum sativum*. *New Phytologist* 189: 829-842.
- Ferguson BJ, Ross JJ y Reid JB (2005)** Nodulation phenotypes of gibberellin and brassinosteroid mutants of pea. *Plant Physiology* 138: 2396-2405.
- Fester T, Strack D y Hause B (2001)** Reorganization of tobacco root plastids during arbuscule development. *Planta* 213: 864-868.
- Finkelstein RR y Rock CD (2002)** Abscisic Acid Biosynthesis and Response. *The Arabidopsis Book* e0058, doi:10.1199/tab.0058.
- Fitter AH, Graves JD, Watkins NK, Robinson D y Scrimgeour C (1998)** Carbon transfer between plants and its control in networks of arbuscular mycorrhizas. *Functional Ecology* 12:406-412.
- Floss DS, Levy JG, Lévesque-Tremblay V, Pumplin N y Harrison MJ (2013)** DELLA proteins regulate arbuscule formation in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *PNAS* 110(51): E5025-E5034. Doi: 10.1073/pnas.1308973110.
- Föhse D, Claassen N y Jungk A (1988)** Phosphorus efficiency in plants. I. External and internal P requirement and P uptake efficiency of different plant species. *Plant Soil* 110: 101-109.
- Foo E (2013)** Auxin influences strigolactones in pea mycorrhizal symbiosis. *Journal of Plant Physiology* 170:523-528.
- Foo E, Bullier E, Goussot M, Foucher F, Rameau C y Beveridge CA (2005)** The branching gene *RAMOSUS1* mediates interactions among two novel signals and auxin in pea. *The Plant Cell* 17:464-474.
- Fracetto GGM, Peres LEP, Mehdy MC y Lambais MR (2013)** Tomato ethylene mutants exhibit differences in arbuscular mycorrhiza development and levels of plant defense-related transcripts. *Symbiosis* 60 (3): 155-167.
- Francl LJ (1993)** Interacciones de nematodos con micorrizas y hongos micorrizógenos. Consultado el: 17-02-2013. Disponible en: <http://www.invenia.es/oai:dialnet.unirioja.es:ART0000148236>.
- Franco-Zorrilla JM, Gonzalez E, Bustos R, Linhares F, Leyva A, Paz-Ares J (2004)** The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation. *J Exp Bot* 55:285-293
- Franco-Zorrilla JM, Martin AC, Leyva A y Par-Ares JP (2005)** Interaction between phosphate-starvation, sugar, and cytokinin signaling in Arabidopsis and the roles of cytokinin receptors CRE1/AHK4 and AHK3. *Plant Physiol* 138: 847-857.
- Franco-Zorrilla JM, Valli A, Todesco M, Mateos I, Puga MI, Rubio-Somoza I et al., (2007)** Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat Genet* 39: 1033-1037.

- Frey B y Schüepp H (1993)** Acquisition of nitrogen by external hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Zea mays* L. *New Phytologist* 124:221-230.
- Fujino DW, Burger DW y Bradford KJ (1989)** Ineffectiveness of ethylene biosynthetic and action inhibitors in phenotypically reverting the Epenastic mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J Plant Growth Regul* 8:53-61.
- Fujino DW, Burger DW, Yang SF y Bradford KJ (1988)** Characterization of an ethylene overproducing mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. Cultivar VFN8). *Plant Physiol* 88:774-779.
- Gagne JM, Smalle J, Gingerich DJ, Walker JM, Yoo SD, Yanagisawa S y Vierstra RD (2004)** Arabidopsis EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 101: 6803-6808.
- Gallaud J (1905)** Étude sur les mycorrhizes endotrophes. *Rev Gén Bot* 17:5-48.
- Gamble RL, Coonfield ML y Schaller GE (1998)** Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 95:7825-7829.
- Gane R (1934)** Production of ethylene by some fruits. *Nature* 134:1008
- Gao Z, Wen CK, Binder BM, Chen YF, Chang J, Chiang YH, Kerris RJ III, Chang C y Schaller GE (2008)** Heteromeric interactions among ethylene receptors mediate signaling in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* 283:23801-23810.
- Gao ZY, Chen YF, Randlett MD, Zhao XC, Findell JL, Kieber JJ y Schaller GE (2003)** Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. *Journal of Biological Chemistry*: 278:34725-34732.
- García-Garrido JM y Ocampo JA (2002)** Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal Experimental Botany* 53: 1377-86.
- García-Garrido JM, Lenzemo V, Castellanos V, Steinkellner S y Vierheilig H (2009)** Strigolactones, signals for parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 19: 449-459.
- García-Garrido JM, León-Morcillo RJ, Martín-Rodríguez JA y Ocampo-Bote JA (2010)** Variations in the mycorrhization characteristics in roots of wild-type and ABA-deficient tomato are accompanied by specific transcriptomic alterations. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 651-664.

- García-Rodríguez S (2007)** Tesis Doctoral: Efecto de las micorrizas arbusculares sobre la regulación de genes implicados en el metabolismo carbonado en plantas de tomate (*Solanum lycopersicon*). *Estación Experimental del Zaidín-CSIC*. Granada, España.
- García-Rodríguez S, Azcón-Aguilar C y Ferrol N (2007)** Transcriptional regulation of host enzymes involved in the cleavage of sucrose during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Physiologia Plantarum* 129:737-746
- García-Rodríguez S, Pozo MJ, Azcón-Aguilar C y Ferrol N (2005)** Expression of a tomato sugar transporter is increased in leaves of mycorrhizal or *Phytophthora parasitica*-infected plants. *Mycorrhiza* 15:489-496.
- Gazzarrini S, Lejay L, Gojon A, Ninnemann O, Frommer WB y von Wirén N (1999)** Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell Online* 11:937-948.
- Geil RD y Guinel FC (2002)** Effects of elevated substrate-ethylene on colonization of leek (*Allium porrum*) by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus aggregatum*. *Canadian Journal of Botany* 80: 114-119.
- Geil RD, Peterson RL y Guinel FC (2001)** Morphological alterations of pea (*Pisum sativum* cv. Sparkle) arbuscular mycorrhizas as a result of exogenous ethylene treatment. *Mycorrhiza* 11: 137-143.
- Genre A, Chabaud M, Timmers T, Bonfante P y Barker DG (2005)** Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell* 17: 3489-3499.
- Genre A, Ortu G, Bertoldo C, Martino E y Bonfante P (2009)** Biotic and abiotic stimulation of root epidermal cells reveals common and specific responses to arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology* 149: 1424-1434.
- George E (2000)** Nutrient uptake. In: Kapulnik Y dDe, ed. *Arbuscular mycorrhizas: physiology ad function*. Kluwer, Dordrecht: 307-343.
- George E, Häussler K-U, Vetterlein D, Gorgus E y Marschner H (1992)** Water and nutrient translocation by hyphae of *Glomus mosseae*. *Canadian Journal of Botany* 70:2130-2137
- 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. and Gerd.) *New Phytologist*. 82: 127-132.
- Gianinazzi-Pearson V, Smith SE, Gianinazzi S y Smith FA (1991)** Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas. Is H<sup>+</sup>-ATPase a component of ATP-hydrolysing enzyme activities in plant fungus interfaces? *New phytol.* 117: 61-74.

- Gianinazzi-Pearson V, Dumas-Gaudot E, Gollotte A, Tahiri-Alaoui A y Gianinazzi S (1996)** Cellular and molecular defence-related responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 133: 45-57.
- Gibson SI (2004)** Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *J Exp Bot* 55: 253-264.
- Gil F (1995)** Elementos de Fisiología Vegetal. Editorial Mundi -Prensa, Madrid (1047 pgs).
- Gilbert GA, Knight JD, Vance CP y Allan DL (2000)** Proteoid root development of phosphorus deficient lupin is mimicked by auxin and phosphonate. *Ann Bot* 85: 921-928.
- Giovannetti M y Mosse B (1980)** An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *Symbiosis*. 25: 145-157.
- Giovannetti M, Avio L y Sbrana C (2010)** Fungal Spore Germination and Pre-symbiotic Mycelial Growth-Physiological and Genetic Aspects. En: Koltai H, Kapulnik Y, eds. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Springer Netherlands, 3-32.
- Giovannetti M, Azzolini D y Citernesi AS (1999)** Anastomosis formation and nuclear and protoplasmic exchange in arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5571-5575.
- Giovannetti M, Fortuna P, Citernesi AS, Morini S y Nuti MP (2001)** The Occurrence of Anastomosis Formation and Nuclear Exchange in Intact Arbuscular Mycorrhizal Networks. *New Phytol* 151(3): 717-724.
- Glassop D, Smith SE, Smith FW (2005)** Cereal phosphate transporters associated with the mycorrhizal pathway of phosphate uptake into roots. *Planta* 222: 688-698.
- Goh T, Kasahara H, Mimura T, Kamiya Y y Fukaki H (2012)** Multiple AUX/IAA-ARF modules regulate lateral root formation: the role of Arabidopsis SHY2/IAA3-mediated auxin signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367 (1595): 1461-1468.
- Gomez SK, Javot H, Deewatthanawong P, Torres-Jerez I, Tang Y, Blancaflor EB, Udvardi MK y Harrison MJ (2009)** *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC Plant Biology* 9:10.
- Gomez-Roldan V, Femas S, Brewer PB, Puech-Pages V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matusova R, Danoun S y Portais JC (2008)** Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455, 189-194.
- Gosling P, Mead A, Proctor M, Hammond JP y Bending GD (2013)** Contrasting arbuscular mycorrhizal communities colonizing different host plants show a similar response to a soil phosphorus concentration gradient. *New Phytol* 198: 546-556. Doi: 10.1111/nph.12169.

- Govindarajulu M, Pfeffer PE, Jin H, Abubaker J, Douds DD, Allen JW, Bucking H, Lammers PJ y Shachar-Hill Y (2005)** Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* 435: 819-823.
- Grechkin A (1998)** Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog Lipid Res* 37: 317-352.
- Greenberg JT, Silverman FP 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.
- Grefen C, Stadele K, Ruzicka K, Obrdlik P, Harter K y Horak J (2008)** Subcellular localization and in vivo interactions of the *Arabidopsis thaliana* ethylene receptor family members. *Molecular Plant* 1:308-320.
- Grunwald U, Guo W, Fischer K, Isayenkov S, Ludwig-Müller J, Hause B, Yan X, Küster H, Franken P (2009)** Overlapping expression patterns and differential transcript levels of phosphate transporter genes in arbuscular mycorrhizal, Pi-fertilised and phytohormone-treated *Medicago truncatula* roots. *Planta* 229: 1023-1034.
- Guether M, Neuhäuser B, Balestrini R, Dynowski M, Ludewig U y Bonfante P (2009)** A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Plant Physiology* 150: 73-83.
- Guimil S, Chang HS, Zhu T et al., (2005)** Comparative transcriptomics of rice reveals an ancient pattern of response to microbial colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 102: 8066-8070.
- Guinel FC y Geil RD (2002)** A model for the development of the rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses in legumes and its use to understand the roles of ethylene in the establishment of these two symbioses. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* 80: 695-720.
- Guo H y Ecker JR (2004)** The ethylene signaling pathway: new insights. *Current Opinion in Plant Biology* 7:40-49.
- Guo HW y Ecker JR (2003)** Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF (EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* 115:667-677.
- Gutierrez-Martínez P, Lopez-Gomez R, y Gomez-Lim MA (2001)** Identification of an ETR1-homologue from mango fruit expressing during fruit ripening and wounding. *Journal of Plant Physiology* 158: 101-108.
- Gutjahr C (2014)** Phytohormone signaling in arbuscular mycorrhiza development. *Current Opinion in Plant Biology* 2014, 20:26-34.

- Gutjahr C y Parniske M (2013)** Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 29:593-617.
- Gutjahr C y Paszkowski U (2009)** Weights in the balance: jasmonic acid and salicylic acid signaling in root biotroph interactions. *Molecular Plant Microbe Interactions* 22: 763-772.
- Gutjahr C, Casieri L y Paszkowski U (2009)** *Glomus intraradices* induces changes in root system architecture of rice independently of common symbiosis signaling. *New Phytologist* **182**: 829-837.
- Guttenberger M (2000)** Arbuscules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi inhabit an acidic compartment within plant roots. *Planta* 211:299-304.
- Guzmán P y Ecker JR (1990)** Exploiting the triple response of Arabidopsis to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* 2:513-23
- Hahn A y Harter K (2009)** Mitogen-activated protein kinase cascades and ethylene: signaling, biosynthesis, or both? *Plant Physiology* 149: 1207-1210.
- Hall AE, Findell JL, Schaller GE, Sisler EC y Bleecker AB (2000)** Ethylene perception by the ERS1 protein in Arabidopsis. *Plant Physiology* 123:1449 - 1458.
- Hall BP, Shakeel SN, Amir M, Haq NU, Qu X y Schaller GE (2012)** Histidine kinase activity of the ethylene receptor ETR1 facilitates the ethylene response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 159: 682-695.
- Hamiaux C, Drummond RSM, Janssen BJ, Ledger SE, Cooney JM, Newcomb RD y Snowden KC (2012)** DAD2 is an alpha/beta hydrolase likely to be involved in the perception of the plant branching hormone, strigolactone. *Curr Biol* 22: 2032-2036.
- Hanlon MT y Coenen C (2011)** Genetic evidence for auxin involvement in arbuscular mycorrhiza initiation. *New Phytologist* 189: 701-709.
- Hao JH, Wang XL, Dong CJ, Zhang ZG y Shang QM (2011)** Salicylic acid induces stomatal closure by modulating endogenous hormone levels in cucumber cotyledons. *Russian Journal of Plant Physiology* 58: 906-913.
- Harberd NP (2003)** Relieving DELLA Restraint. *Science* 299: 1853-1854.
- Harberd NP y Belfield E y Yasumura Y (2009)** The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: How an “inhibitor of an inhibitor” enables flexible response to fluctuating environments. *Plant Cell* 21(5):1328-1339.
- Harrier LA, Wright F y Hooker JE (1998)** Isolation of the 3-phosphoglycerate kinase gene of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. and Gerd.) Gerdemann y Trappe. *Current Genetics* 34: 386-392.
- Harrison M 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*. *Plant J* 6: 9-20.

- Harrison MJ (1996)** A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *The Plant Journal* 9:491-503.
- Harrison MJ (1997)** The arbuscular mycorrhizal symbiosis. Academic. Press Inc. England. ISBN 0-12-325560-0.
- Harrison MJ (1999)** Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 361-389.
- Harrison MJ (2005)** Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology* 59: 19-42.
- Harrison MJ y van Buuren ML (1995)** A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378: 626-632.
- Harrison MJ, Dewbre GR y Liu J (2002)** A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* 14: 2413-2429.
- Hause B y Schaarschmidt S (2009)** The role of jasmonates in mutualistic symbioses between plants and soil-born microorganisms. *Phytochemistry* 70: 1589-1599.
- Hause B, Maier W, Miersch O, Kramell R y Strack D (2002)** Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiol* 130: pp. 1213-1220.
- Hause B, Mrosk C, Isayenkov S y Strack D (2007)** Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry* 68:101-110.
- Hawkins HJ, Johansen A y George E (2000)** Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 226: 275-285.
- Hayman DS (1987)** VA mycorrhizas in field crop systems. In: *Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants*. (G.R. Safir, ed.). 171-192. CRC press, Boca Raton, Florida.
- He C, Finlayson SA, Drew MC, Jordan WR y Morgan PW (1996)** Ethylene biosynthesis during aerenchyma formation in roots of maize subjected to mechanical impedance and hypoxia. *Plant Physiol*, 112(4): 1679-1685
- He XH y Nara K (2007)** Element biofortification: can mycorrhizas potentially offer a more effective and sustainable pathway to curb human malnutrition? *Trends in Plant Science* 12: 331-333.
- Hedden P y Proebsting WM (1999)** Genetic Analysis of Gibberellin Biosynthesis. *Plant Physiology* 119: 365-370.

- Helber N y Requena N (2008)** Expression of the fluorescence markers DsRed and GFP fused to a nuclear localization signal in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 177: 537-548.
- Helber N, Wippel K, Sauer N, Schaarschmidt S, Hause B y Requena N (2011)** A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp is crucial for the symbiotic relationship with plants. *The Plant Cell* 23: 3812-3823.
- Hepper CM (1981)** Techniques for studying the infection of plants by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi under axenic conditions. *New Phytol* 88: 641-647.
- Hepper CM (1984)** Regulation of spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora laevis* by soil pH. *Transactions of the British Mycological Society* 83: 154-156.
- Herner R C y Sink K C (1973)** Ethylene production and respiratory behavior of the rin tomato mutant. *Plant Physiol* (1973) 52: 38-42.
- Herrera-Medina M J (2008)** Tesis Doctoral: Estudio sobre la participación y función de moléculas señal en la regulación de la simbiosis Micorriza Arbuscular. *Estación Experimental del Zaidín*. Grupo: Micoorganismos Rizosféricos que Promueven el Crecimiento y Desarrollo Vegetal.
- Herrera-Medina MJ, Gagnon H, Piché Y, Ocampo JA, García-Garrido JM 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 MJ, Steinkellner S, Vierheilig H, Ocampo Bote JA y García-Garrido JM (2007)** Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist* 175: 554-564.
- Hildebrandt U, Janetta K y Bothe H (2002)** Towards growth of arbuscular mycorrhizal fungi independent of a plant host. *Appl Environ Microbiol* 68: 1919-1924.
- Hirayama T, Kieber JJ, Hirayama N, Kogan M, Guzman P, Nourizadeh S, Alonso JM, Dailey WP, Dancis A y Ecker JR (1999)** Responsive-to-antagonist1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in Arabidopsis. *Cell* 97: 383-393.
- Ho I y Trappe JM (1973)** Translocation of <sup>14</sup>C from Festuca plants to their endomycorrhizal fungi. *Nature* 244: 30-31.
- Ho I y Trappe JM (1975)** Nitrate reducing capacity of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia* 67:886-888.

- Hodge A y Fitter AH (2010)** Substantial nitrogen acquisition by arbuscular mycorrhizal fungi from organic material has implications for N cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 107: 13754-13759.
- Hodge A, Campbell CD y Fitter AH (2001)** An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature* 413: 297-299.
- Hoffman T, Schmidt JS, Zheng XY y Bent AF (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 AM, Pühler A y Küster 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 MF, Pühler A, Becker A y Küster H (2005)** Overlaps in the transcriptional profiles of *Medicago truncatula* roots inoculated with two different *Glomus* fungi provide insights into the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* 137: 1283-1301.
- Horton TR, Bruns TD y Parker VT (1999)** Ectomycorrhizal fungi associated with *Arctostaphylos* contribute to *Pseudotsuga menziesii* establishment. *Can J Bot* 77: 93-102.
- Hosny M, Gianinazzi-Pearson V y Dulieu H (1998)** Nuclear DNA content of 11 fungal species in Glomales. *Genome* 41: 422-428.
- Howe GA y Schillmiller AL (2002)** Oxylin metabolism in response to stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 230-236.
- Howe GA, Lightner J, Browse J y Ryan CA (1996)** An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *Plant Cell* 8: 2067-2077.
- <http://invam.wvu.edu/>**. International Collection of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Database of The West Virginia University. Consultado el 15 de Abril de 2014.
- Hua J et al., (1995)** Ethylene sensitivity conferred by Arabidopsis ERS gene. *Science* 269: 1712-1714.
- Hua J y Meyerowitz EM (1998)** Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in Arabidopsis thaliana. *Cell* 94:261-271.
- Huttly AK y Phillips AL (1995)** Gibberellin-regulated plant genes. *Physiologia Plantarum* 95: 310-317.
- Imaseki H, Nakajima N y Nakagawa N (1989)** Auxin- and wound-induced expression of ACC synthase. *Cell Biol* 35: 51-59

- 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.
- Ishikawa H y Evans ML (1993)** The role of the distal elongation zone in the response of maize roots to auxin and gravity. *Plant Physiol* 102: 1203-1210.
- Ishikawa S, Maekawa M, Arite T, Onishi K, Takamura I y Kyojuka J (2005)** Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. *Plant Cell Physiol* 46, 79-86.
- Ito Y, Kitagawa M, Ihashi N, Yabe, K, Kimbara J, Yasuda J, Ito H, Inakuma T, Hiroi S y Kasumi T (2008)** DNA-binding specificity, transcriptional activation potential, and the rin mutation effect for the tomato fruit-ripening regulator RIN. *Plant J* 55: 212-223.
- Jain A, Poling MD, Karthikeyan AS, et al., (2007)** Differential effects of sucrose and auxin on localized phosphate deficiency-induced modulation of different traits of root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 144: 232-247.
- Jain A, Poling MD, Smith AP, Nagarajan VK, Lahner B, Meagher RB y Raghothama KG (2009)** Variations in the composition of gelling agents affect morphophysiological and molecular responses to deficiencies of phosphate and other nutrients. *Plant Physiology* 150: 1033-1049.
- Jansa J, Mozafar A y Frossard E (2003)** Long-distance transport of P and Zn through the hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus in symbiosis with maize. *Agronomie* 23: 481-488.
- Jany JL y Pawlowska TE (2010)** Multinucleate spores contribute to evolutionary longevity of asexual Glomeromycota. *Am Nat*. 175:424-435.
- Javelle A, Yre B, Marini AM y Chalot M (2003)** High-affinity ammonium transporters and nitrogen sensing in mycorrhizas. *Trends in Microbiology* 11:53-55.
- Javelle A, Morel M, Rodríguez-Pastrana BR, Botton B, Yre B, Marini AM, Brun A y Chalot M (2003)** Molecular characterization, function and regulation of ammonium transporters (Amt) and ammonium-metabolizing enzymes (GS, NADP-GDH) in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Molecular Microbiology* 47:411-430.
- Javelle A, Rodríguez-Pastrana BR, Jacob C, Botton B, Brun A, Yre B, Marini AM y Chalot M (2001)** Molecular characterization of two ammonium transporters from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *FEBS Letters* 505:393-398

- Javot H, Penmetsa RV, Terzaghi N, Cook DR y Harrison MJ (2007)** A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 104: 1720-1725.
- Jeffries P y Barea JM (2001)** Arbuscular Mycorrhiza-a key component of sustainable plant soil ecosystems. En: Hock (ed) *The Mycota IX. Fungal Associations*. Springer- Verlag, Berlin, pp 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 CF, Gao XH, Liao L, Harberd NP y Fu XD (2007)** Phosphate starvation root architecture and anthocyanin accumulation responses are modulated by the gibberellin-DELLA signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 145: 1460-1470.
- Jin H, Pfeffer PE, Douds DD, Piotrowski E, Lammers PJ y Shachar-Hill Y (2005)** The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 168: 687-696.
- Jin HR, Liu J, Liu J y Huang XW (2012)** Forms of nitrogen uptake, translocation, and transfer via arbuscular mycorrhizal fungi: a review. *Science China Life Sciences* 55:474-482
- Johansen A, Finlay RD y Olsson PA (1996)** Nitrogen metabolism of external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 133:705-712.
- Johansen A, Jakobsen I y Jensen ES (1992)** Hyphal transport of <sup>15</sup>N-labeled nitrogen by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and its effect on depletion of inorganic soil N. *New Phytologist* 122:281-288.
- Johansen A, Jakobsen I y Jensen ES (1993)** External hyphae of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* Hyphal Transport of <sup>32</sup>P and <sup>15</sup>N. *New Phytologist* 124:61-68.
- Johnson P y Ecker JR (1998)** The ethylene gas signaling pathway in plants: a molecular perspective. *Annual Review of Genetics* 32:227-254.
- Johnson X, Brcich T, Dun EA, Goussot M, Haurogné K, Beveridge CA, Rameau C (2006)** Branching genes are conserved across species. Genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. *Plant Physiology* 142: 1014-1026.
- Ju C y Chang C (2012)** Advances in ethylene signaling: protein complexes at the endoplasmic reticulum (ER) membrane. *AoB PLANTS* : pls031; doi: 10.1093 /aobpla/pls031.
- Jung JY, Shin R y Schachtman DP (2009)** Ethylene Mediates Response and Tolerance to Potassium Deprivation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21(2): 607-621.

- 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.
- 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.
- Kang, J, et al., (2010)** PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 2355-2360.
- Kapulnik y koltai (2014)** Strigolactone Involvement in Root Development, Response to Abiotic Stress, and Interactions with the Biotic Soil Environment. *Plant Physiology* 166: 560-569.
- Kapulnik Y, Resnick N, Mayzlish-Gati E, et al., (2011)** Strigolactones interact with ethylene and auxin in regulating root-hair elongation in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 62: 2915-2924.
- Karandashov V, Nagy R, Wegmüller S, Amrhein N y Bucher M (2004)** Evolutionary conservation of a phosphate transporter in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 101(16): 6285-6290.
- Karthikeyan AS, Varadarajan DK, Jain A, Held MA, Carpita NC y Raghothama KG (2007)** Phosphate starvation responses are mediated by sugar signaling in Arabidopsis. *Planta* 225: 907-918.
- Karyashov V y Bucher M (2005)** Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Plant Science* 10: 22-29.
- 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 Physiol* 105: 89-94.
- Kauss H, Theisingerhinkel E, Mindermann R y Conrath U (1992)** Dichloroisonicotinic and salicylic acid, inducers of systemic acquired resistance, enhance fungal elicitor responses in parsley cells. *Plant Journal* 2:655-660.
- Kende H (1993)** Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44:283- 307.
- Kessler A, Halitschke R y Baldwin IT (2004)** Silencing the jasmonate cascade: induced plant defenses and insect populations. *Science* 305:665-668.
- Kevany BM, Taylor MG y Klee HJ (2008)** Fruit-specific suppression of the ethylene receptor LeETR4 results in early-ripening tomato fruit. *Plant Biotechnology Journal* 6: 295-300.
- Khaosaad T, García-Garrido JM, Steinkellner S y Vierheilig H (2007)** Take-all disease is systemically reduced in roots of mycorrhizal barley plants. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 727-734.
- Khatabi B, Molitor A, Lindermayr C, Pfiffi S, Durner J et al., (2012)** Ethylene Supports Colonization of Plant Roots by the Mutualistic Fungus *Piriformospora indica*. *PLoS ONE*

7(4): e35502. doi:10.1371/journal.pone.0035502

- Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA y Ecker JR (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.
- Kircher S y Schopfer P (2012)** Photosynthetic sucrose acts as cotyledon-derived long-distance signal to control root growth during early seedling development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 11217-11221.
- Kitagawa Y, Yamamoto H y Oritani T (1995)** Biosynthesis of Abscisic Acid in the Fungus *Cercospora cruenta*: Stimulation of Biosynthesis by Water Stress and Isolation of a Transgenic Mutant with Reduced Biosynthetic Capacity. *Plant and Cell Physiology* 36: 557-564.
- Klee H y Tieman D (2002)** The tomato ethylene receptor gene family: Form and function. *Physiologia Plantarum*. 115: 336-341.
- Klee HJ, Hayford MB, Kretzmer KA, Barry GF y Kishore GM (1991)** Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *Plant Cell* 3: 1187-1193.
- Knoester M, Bol JF, van Loon LC y Linthorst HJM (1995)** Virus-induced gene expression for enzymes of ethylene biosynthesis in hypersensitively reacting tobacco. *MPMI*, 8(1): 177-180.
- Knoester M, Van Loon LC, Van den Heuvel J et al., (1998)** Ethylene-insensitive tobacco lacks non host resistance against soil-borne fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 95: 1933-1937.
- Kobayashi M, MacMillan J, Phinney B, Gaskin P, Spray CR y Hedden (2000)** Gibberellin biosynthesis: metabolic evidence for three steps in the early 13-hydroxylation pathway of rice. *Phytochemistry* 55: 317-321.
- Kobayashi M, MacMillan J, Phinney B, Gaskin P, Spray CR y Hedden P (2000)** Gibberellin biosynthesis: metabolic evidence for three steps in the early 13-hydroxylation pathway of rice. *Phytochemistry* 55: 317-321.
- Kohlen W, Charnikhova T, Liu Q et al., (2011)** Strigolactones are transported through the xylem and play a key role in shoot architectural response to phosphate deficiency in nonarbuscular mycorrhizal host *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 155: 974-987.
- Koide RT y Schreiner RP (1992)** Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 557-581.
- Köljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor AFS, Bahram M, Bates ST, Bruns TD, Bengtsson-Palme J, Callaghan TM, Douglas B, Drenkhan T, Eberhardt U, Dueñas M,**

- Grebenc T, Griffith GW, Hartmann M, Kirk PM, Kohout P, Larsson E, Lindahl BD, Lücking R, Martín MP, Matheny PB, Nguyen NH, Niskanen T, Oja J, Peay KG, Peintner U, Peterson M, Põldmaa K, Saag L, Saar I, Schüßler A, Scott JA, Senés C, Smith ME, Suija A, Taylor DL, Telleria MT, Weiß M y Larsson K-H (2013)** Towards a unified paradigm for sequence-based identification of Fungi. *Molecular Ecology* DOI: 10.1111/mec.12481
- Kolomiets MV, Hannapel DJ, Chen H, Tymeson M y Gladon RJ (2001)** Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. *Plant Cell* 13: 613-626.
- Koltai H (2011)** Strigolactones are regulators of root development. *New Phytologist* 190: 545-549.
- Koltai H y Kapulnik Y (2010)** (Eds.) *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. DOI 10.1007/978-90-481-9489-6. Springer Science+Business Media B.V.
- Koltai H, Cohen M, Chesin O, Mayzlish-Gati E, Bécard G, Puech V, Ben Dor B, Resnick N, Wininger S y Kapulnik Y (2011)** Light is a positive regulator of strigolactone levels in tomato roots. *J Plant Physiol* 168 (16) : 1993-6
- Kosugi S y Ohashi Y (2000)** Cloning and DNA-binding properties of a tobacco Ethylene-Insensitive3 (EIN3) homolog. *Nucleic Acids Res*, 28:960-967.
- Kosuta S, Chabaud M, Loughon G, Gouch C, Denarie J, Barker DG y Bercard G (2003)** A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific *MtENOD11* expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant physiol* 131: 952-962.
- Kosuta S, Winzer T y Parniske M (2005)** Arbuscular mycorrhiza. *In Lotus japonicus Handbook* (Marquez, A.J., ed.). Dordrecht, The Netherlands: Springer, pp. 87-95.
- Kretschmar T, Kohlen W, Sasse J, Borghi L, Schlegel M, Bachelier JB, Reinhardt D, Bours R, Bouwmeester HJ y Martinoia E (2012)** A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature* 483: 341-344.
- Kuhn G, Hijri M y Sanders IR (2001)** Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 414: 745-748.
- Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ y Klee HJ (1994)** The Never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell* 6: 521-530.
- Landgraf R, Schaarschmidt S y Hause B (2012)** Repeated leaf wounding alters the colonization of *Medicago truncatula* roots by beneficial and pathogenic microorganisms. *Plant, Cell and Environment* 35(7) 1344-1357.
- Lanfranco L, Delpero M y Bonfante P (1999)** Intrasporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Mol Ecol* 8:37-46
- Lashbrook CC, Tieman DM y Klee HJ (1998)** Differential regulation of the tomato ETR gene family throughout plant development. *Plant J* 15: 243-252.



- Leake JR (1994)** The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist* 127: 171-216.
- Leclercq J, Adams-Phillips LC, Zegzouti H, Jones B, Latche A, Giovannoni JJ, Pech JC 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 KH y LaRue TA (1992)** Exogenous ethylene inhibits nodulation of *Pisum sativum* L. cv Sparkle. *Plant Physiol* 100: 1759-1763.
- Leggewie G, Wilmitzer L y Riesmeier JW (1997)** Two cDNAs from potato are able to complement a phosphate uptake-deficient yeast mutant: identification of phosphate transporters from higher plants. *Plant Cell* 9: 381-392
- Lei M, Zhu C, Liu Y, Karthikeyan AS, Bressan RA, Raghothama KG, et al., (2011)** Ethylene signalling is involved in regulation of phosphate starvation-induced gene expression and production of acid phosphatases and anthocyanin in Arabidopsis. *New Phytol* 189: 1084-1095.
- Leigh J, Hodge A y Fitter AH (2009)** Arbuscular mycorrhizal fungi can transfer substantial amounts of nitrogen to their host plant from organic material. *New Phytologist* 181:199-207.
- Lejay L, Gansel X, Cerezo M, Tillard P, Müller C, Krapp A, von Wirén N, Daniel-Vedele F y Gojon A (2003)** Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. *The Plant Cell* 15:2218-2232.
- León-Morcillo RJ (2013)** Tesis Doctoral: Estudio del papel del ácido jasmónico (JA) como señal reguladora del proceso de micorrización arbuscular en Solanáceas. Estación Experimental "El Zaidín"-CSIC. Granada, España.
- León-Morcillo RJ, Ocampo-Bote JA y García-Garrido JM (2012)** 9-LOX oxylipin metabolism in response to arbuscular micorrhiza. *Plant Signaling and Behavior* 7(12): 1584-1588.
- Leung J y Giraudat J (1998)** Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 199-222.
- Li C, Liu G, Xu C et al., (2003)** The tomato Suppressor of prosystemin- mediated responses2 gene encodes a fatty acid desaturase required for the biosynthesis of jasmonic acid and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *The Plant Cell* 15: 1646-1661.
- Li L, Li C y Howe GA (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, Zhao Y, McCaig BC, Wingerd BA, Wang J, Whalon ME, Pichersky E y Howe GA (2004)** The tomato homolog of *CORONATINE INSENSITIVE1* is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *The Plant Cell* 16: 126-143.
- Liang X, Abel S, Keller JA, Shen NF y Theologis A (1992)** The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 89: 11046-11050
- Lin H, Wang RX, Qian Q, Yan MX, Meng XB, Fu ZM, Yan CY, Jiang B, Su Z, Li JY, et al., (2009)** DWARF27, an iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. *Plant Cell* 21: 1512-1525.
- Lin SI, Chiang SF, Lin WY, Chen JW, Tseng CY, Wu PC y Chiou TJ (2008)** Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. *Plant Physiol* 147: 732-746.
- Lincoln JE, Campbell AD, Oetiker J, Rottman WH, Oeller PW, Shen NF y Theologis A (1993)** LE-ACS4, a fruit ripening and wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J Biol Chem* 265:19422-30
- Linderman RG (1992)** Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. In: Bethlenfalvai GJ, Linderman RG, eds. *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. ASA, madison, Wisconsin, USA: 45-70.
- Linkohr BI, Williamson LC, Fitter AH y Leyser HMO (2002)** Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *Plant J* 29: 751-760.
- Liu CM, et al., (1998a)** Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiol* 116: 91-99.
- Liu H, et al., (1998b)** Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Mol Plant-Microbe Interact* 11: 14-22.
- Liu JQ, Samac DA, Bucciarelli B, Allan DL y Vance CP (2005)** Signaling of phosphorus deficiency-induced gene expression in white lupin requires sugar and phloem transport. *The Plant Journal* 41: 257-268.
- Liu Q, Xu C y Wen CK (2010)** Genetic and transformation studies reveal negative regulation of ERS1 ethylene receptor signaling in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* 10:60.
- Livak K y Schmittgen T (2001)** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup> method. *Methods* 25: 402-408.
- López-Bucio J, Cruz-Ramirez A y Herrera-Estrella L (2003)** The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* 6: 280-287.

- López-Pedrosa A, González-Guerrero M, Valderas A, Azcón-Aguilar C, Ferrol N. (2006).** *GintAMT1* encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*. *Fungal Genetics and Biology* 43: 102-110.
- López-Raéz JA, Charnikhova T, Fernández I, Bouwmeester H y Pozo MJ (2011)** Arbuscular mycorrhizal symbiosis decreases strigolactone production in tomato. *Journal of Plant Physiology* 168: 294-297.
- López-Raéz JA, Charnikhova T, Gómez-Roldán V, Matusova R, Kohlen W, De Vos R., et al., (2008)** Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytol* 178: 863–874. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02406.x
- López-Raéz JA, Verhage A, Fernández I, García JM, Azcón-Aguilar C, Flors V, y Pozo MJ (2010)** Hormonal and transcriptional profiles highlight common and differential host responses to arbuscular mycorrhizal fungi and the regulation of the oxylipin pathway. *Journal of Experimental Botany*. 61: 2589-2601.
- Lorenzo O y Solano R (2005)** Señalización de ácido jasmónico e interacciones con otras hormonas. *Biojournal.net* 1: 1-16.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sanchez-Serrano JJ et al., (2003)** *ETHYLENE RESPONSE FACTOR1* integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell* 15: 165-178.
- Lu H (2009)** Dissection of salicylic acid-mediated defense signaling networks. *Plant Signaling and Behavior* 4: 713-717.
- Ludwig-Müller J (2010)** Hormonal Responses in Host Plants Triggered by Arbuscular Mycorrhizal Fungi (pp. 169-190). In: Koltai H, Kapulnik Y, eds. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Springer Netherlands.
- Ludwig-Müller J, Bennett R, García-Garrido JM, Piché Y y Vierheilig H (2002)** Reduced arbuscular mycorrhizal root colonization in *Tropaeolum majus* and *Carica papaya* after jasmonic acid application cannot be attributed to increased glucosinolate. *Journal Plant Physiology* 159: 517-523.
- Ludwig-Müller J, Kaldorf M, Sutter EG 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.

- Ludwing-Müller J (2000)** Hormonal balance in plants during colonization by mycorrhizal fungi. *En: Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Editores: Kapulnic, Y. and Couds, D.D., Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands pp. 263-285.
- Lund ST, Stall RE y Klee HJ (1998)** Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell* 10: 371-382.
- Lynch J y Brown K (2006)** Whole plant adaptations to low phosphorus availability. *Plant-Environment Interactions* 237(2):209-242.
- Lynch JP (2007)** Rhizoeconomics: The Roots of Shoot Growth Limitations. *Hortscience* 42(5):1107-1109.
- Lynch JP (2011)** Root Phenes for Enhanced Soil Exploration and Phosphorus Acquisition: Tools for Future Crops. *Plant Physiology* 156: 1041-1049
- Lynch JP y Brown KM (2001)** Top soil foraging-an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. *Plant and Soil* 237(2):225-237.
- Ma Z, Baskin TI, Brown KM y Lynch JP (2003)** Regulation of root elongation under phosphorus stress involves changes in ethylene responsiveness. *Plant Physiol* 131:1381-1390.
- Ma Z, Bielenberg DG, Brown KM y Lynch JP (2001)** Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 24: 459-467.
- MacDonald RM y Lewis M (1978)** Occurrence of some acid-phosphatases and dehydrogenases in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *New Phytologist* 80: 135-141.
- MacMillan J y Takahashi N (1968)** Proposed Procedure for the Allocation of Trivial Names to the Gibberellins. *Nature* 217: 170-171.
- Maeda D, Ashida K, Iguchi K, Chechetka SA, Hijikata A, Okusako Y, Deguchi Y, Izui K y Hata S (2006)** Knockdown of an arbuscular mycorrhiza-inducible phosphate transporter gene of *Lotus japonicus* suppresses mutualistic symbiosis. *Plant and Cell Physiology* 47: 807-817.
- Maillet F, Poinot V, Aptroot A, Puech-Pagès V, Haouy A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Formey D, Niebel A, Martinez EA, Driguez H, Bécard G y Dénarié J (2011)** Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469: 58-64.
- Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR y Harrison MJ (2001)** A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 1140-1148.
- Malloch DW, Pirozynski KA y Raven PH (1980)** Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 77(4): 2123-2118.
- Marini AM, Soussi-Boudekou S, Vissers S y Yre B (1997)** A family of ammonium transporters in

*Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 17:4282-4293

- Marini AM, Vissers S, Urrestarazu A y Yre B (1994)** Cloning and expression of the *MEP1* gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo Journal* 13:3456-3463
- Marschner H (1995)** (Ed.) Mineral Nutrition of Higher Plants, Academic Press.
- Marschner H (1998)** Role of root growth, arbuscular mycorrhiza, and root exudates for the efficiency in nutrient acquisition. *Field Crops Research* 56: 203-207.
- Martin F, Gianinazzi-Pearson V, Hijri M, Lammers P, Requena N, Syers IR, Shachar-Hill Y, Shapiro H, Tuskan GA y Young JPW (2008)** The long hard road to a completed *Glomus intraradices* genome. *New Phytologist* 180: 747-750.
- Martín-Rodríguez (2013)** Tesis Doctoral: Estudio del papel del ácido abscísico como señal reguladora del proceso de simbiosis Micorriza Arbuscular. Estación Experimental "El Zaidín"-CSIC. Universidad de Granada. 315 pp.
- Martín-Rodríguez JA, León Morcillo R, Vierheilig H, Ocampo BJA, Ludwig-Müller J y García-Garrido JM (2010)** Mycorrhization of the *notabilis* and *sitiens* tomato mutants in relation to abscisic acid and ethylene contents. *Journal of Plant Physiology* 167: 606-613.
- Martín-Rodríguez JA, León Morcillo R, Vierheilig H, Ocampo Bote JA, Ludwig-Müller J y García-Garrido JM (2011)** Ethylene-dependent/ethylene-independent ABA regulation of tomato plants colonized by arbuscular mycorrhiza fungi. *New phytologist* 190: 193-205.
- Martín-Rodríguez JA, Ocampo- Bote JA, Molinero-Rosales N, Tarkowská D, Ruíz-Rivero O y García-Garrido JM (2014)** Role of gibberellins during Arbuscular mycorrhizal formation in tomato: new insights revealed by endogenous quantification and genetic analysis of their metabolism in mycorrhizal roots. *Physiologia Plantarum*. DOI: 10.1111/ppl.12274
- Marzluf GA (1996)** Regulation of nitrogen metabolism in mycelial fungi In Brambl R, Marzluf GA (eds) *The Mycota III: Biochemistry and Molecular Biology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 357-368.
- Mattoo AK y Suttle JC (1991)** *The Plant Hormone Ethylene* (pp. 337). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Matusova R, Rani K, Verstappen FW, Franssen MC, Beale MH y Bouwmeester HJ (2005)** The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobancha spp.* are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiology* 139: 920-934.
- Mayerhofer H, Panneerselvam S y Mueller-Dieckmann J (2012)** Protein kinase domain of CTR1 from *Arabidopsis thaliana* promotes ethylene receptor cross talk. *Journal of Molecular Biology* 415: 768-779.
- Mayzlish Gati, E., et al., (2012)** Strigolactones are involved in root response to low phosphate

conditions in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 160: 1329-1341.

- McCarty DR (1995)** Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46: 71-93.
- Meixner C, Ludwig-Mueller J, Miersch O, Gresshoff PM, Staehelin C y Vierheilig H (2005)** Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant *nts1007*. *Planta* 222: 709-715.
- Memelink J, Verpoorte R y Kijne J (2001)** Organization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends Plant Sci* 6: 212-219.
- Métraux JP (2002)** Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. *Trends Plant Sci* 7: 332-334.
- Miller AJ y Cramer MD (2004)** Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and Soil* 274:1-36.
- Miyasaka SC y Habte M (2001)** Plant mechanisms and mycorrhizal symbioses to increase phosphorus uptake efficiency. *Communications in Soil Science and Plan Analysis* 32: 1101-1147.
- Moeder W, Barry CS, Tauriainen AA, Betz C, Tuomainen J, Utriainen M, Grierson D, Sandermann H, Langebartels C y Kangasjärvi J (2002)** Ethylene synthesis regulated by biphasic induction of *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase* and *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase* genes is required for hydrogen peroxide accumulation and cell death in ozone-exposed tomato. *Plant Physiol* 130:1918-1926.
- Morales-Vela G, Molinero-Rosales N, Ocampo JA, y García-Garrido JM (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 Physiol Biochem* 27: 697-701.
- Mosblech A, Feussner I y Heilmann I (2009)** Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 511-517.
- Moussatche P y Klee HJ (2004)** Autophosphorylation activity of the *Arabidopsis* ethylene receptor multigene family. *Journal of Biological Chemistry* 279:48734-48741.
- Muchhal US y Raghothama KG (1999)** Transcriptional regulation of plant phosphate transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96: 5868-5872.
- Muchhal US, Pardo JM y Raghothama KG (1996)** Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 10519-10523.

- Mudge SR, Rae AL, Diatloff E y Smith FW (2002)** Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 31: 341-353.
- Mulkey TJ, Kuzmanoff KM y Evans ML (1982)** Promotion of growth and hydrogen ion efflux by auxin in roots of maize pretreated with ethylene biosynthesis inhibitors. *Plant Physiol* 70:186-188.
- MYCOCAL** - <http://www.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocal-pgr/download.html>
- Nacry P, Canivenc G, Muller B, Azmi A, Van Onckelen H, Rossignol M y Dumas P (2005)** A role for auxin redistribution in the responses of the root system architecture to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 138: 2061-2074.
- Nagahashi G y Douds DD (2000)** Partial separation of root exudate components and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. *Mycol. Res.*, 104, 1453-1464.
- Nagarajan VK y Smith AP (2012)** Ethylene's Role in Phosphate Starvation Signaling: More than Just a Root Growth Regulator. *Plant Cell Physiol* 53(2): 277-286.
- Nagarajan VK, Jain A, Poling MD, Lewis AJ, Raghothama KG y Smith AP (2011)** *Arabidopsis* Pht1;5 mobilizes phosphate between source and sink organs, and influences the interaction between phosphate homeostasis and ethylene signaling. *Plant Physiol*. 156: 1149-1163.
- Nagy R, Karyashov VI CV, Kalinkevich K, Tamasloukht MB, Xu G., Jakobsen I, Levy AA, 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.
- Nagy R, Vasconcelos M, Zhao S, McElver J, Bruce W, Amrhein N, Raghothama K y Bucher M (2006)** Differential regulation of five Pht1 phosphate transporters from maize (*Zea mays* L.). *Plant Biol* 8:186-197.
- Nambara E y Marion-Poll A (2005)** Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol* 56:165-185.
- Naoumkina M, Farag MA, Sumner LW, Tang Y, Liu CJ y Dixon RA (2007)** Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 17909-17915.
- Neumann G, Massonneau A, Langlade N, Dinkelaker B, Hengeler C, Romheld V y Martinoia E (2000)** Physiological aspects of cluster root function and development in phosphorus-deficient white lupin (*Lupinus albus* L.). *Annals of Botany* 85: 909-919.

- Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N y Larsson KH (2008)** Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics* 4: 193-201.
- Nishimura R, Hayashi M, Wu G-J, Kouchi H, Imaizumi-Anraku H, Murakami Y, Kawasaki S, Akao S, Ohmori M, Nagasawa M, Harada K y Kawaguchi M (2002)** HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature* 420: 426-429.
- 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.
- Oehl F, Silva GA, Goto BT y Sieverding E (2011)** Glomeromycota: three new genera and glomoid species reorganized. *Mycotaxon* 116:75-120
- Oelkers EH y Valsami-Jones E (2008)** Phosphate mineral reactivity and global sustainability. *Elements* 4: 83-87
- Oetiker JH, Olson DC, Shiu OY y Yang SF (1997)** Differential induction of seven 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase genes by elicitor in suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *PMB* 34(2): 275-286
- Ohme-Takagi M y Shinshi H (1995)** Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* 7:173-182.
- Okubara PA y Paulitz TC (2005)** Root defense responses to fungal pathogens: A molecular perspective. *Plant and Soil* 274: 215-226.
- Oláh B, Brière C, Bécard G, Dénarié 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. *Plant Journal* 44: 195-207.
- Oldroyd GED, Engstrom EM y Long SR (2001)** Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *The Plant Cell* 13: 1835-1849.
- Olson DC, Oetiker J y Yang SF (1995)** Analysis of *LE-ACS3*, an ACC synthase gene expressed during flooding in the roots of tomato plants. *J Biol Chem* 270:14056-14061.
- O'Malley R, Rodríguez FI, Esch JJ, Binder BM, O'Donnell PJ, Klee H y Bleecker AB (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.
- Op den Camp R, Streng A, De Mita S, Cao Q, Polone E, Liu W, Ammiraju JSS, Kudrna D, Wing R, Untergasser A, Bisseling T y Geurts R (2011)** LysM-Type Mycorrhizal Receptor Recruited for Rhizobium Symbiosis in Non legume *Parasponia*. *Science* 331(6019): 909-912.



- Ortu G, Balestrini R, Pereira PCA, Becker JD, Küster H y Bonfante P (2012)** Plant Genes Related to Gibberellin Biosynthesis and Signaling Are Differentially Regulated during the Early Stages of AM Fungal Interactions. *Molecular plant* 5: 951-954.
- Osmont KS, Sibout R y Hardtke CS (2007)** Hidden branches: developments in root system architecture. *Annu Rev Plant Biol* 58:93-113.
- Overvoorde P, Fukaki H y Beeckman T (2010)** Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2.
- Page-Degivry MT, Bidard JN, Rouvier E, Bulard C y Lazdunski M (1986)** Presence of abscisic acid, a phytohormone, in the mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83: 1155-1158.
- Pant BD, Buhtz A, Kehr J y Scheible WR (2008)** MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant J* 53: 731-738.
- Pao SS, Paulsen IT y Saier MH (1998)** Major facilitator superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 1-34.
- Parniske M (2008)** Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Review Microbiology* 6: 763-775.
- Paszkowski U, Kroken S, Roux C y Briggs SP (2002)** Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99: 13324-13329.
- Pawlowska TE y Taylor JW (2004)** Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*. 427: 733-737.
- Pearson JN y Jakobsen I (1993)** The relative contribution of hyphae and roots to phosphorus uptake by arbuscular mycorrhizal plants measured by dual labelling with <sup>32</sup>P and <sup>33</sup>P. *New Phytologist* 124: 489-494.
- Penmetza RV y Cook DR (1997)** A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiotic. *Science*. 275: 527-530.
- Penninckx IAMA, Thomma BPHJ, Buchala A, Métraux J-P y Broekaert WF (1998)** Cooperative activation of jasmonate and ethylene response pathways in parallel is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *Plant Cell* 10:2103-2114.
- Peret B, Clement M, Nussaume L y Desnos T (2011)** Root developmental adaptation to phosphate starvation: better safe than sorry. *Trends in Plant Science* 16: 442-450.
- Pérez-Tienda J, Testillano PS, Balestrini R, Fiorilli V, Azcón-Aguilar C y Ferrol N (2011)** GintAMT2, a new member of the ammonium transporter family in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Fungal Genetics and Biology* 48: 1044-1055.
- Pérez-Torres CA, López-Bucio J, Cruz-Ramírez A et al., (2008)** Phosphate availability alters

- lateral root development in Arabidopsis by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. *Plant Cell* 20: 3258-3272.
- Pfeffer PE, Douds Jr DD, 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.
- Pharis RP y King RW (1985)** Gibberellins and Reproductive Development in Seed Plants. *Annual Review of Plant Physiology* 36: 517-568.
- Phillips JM y Hayman DS (1979)** 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.
- Pieterse CMJ, van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A y van Wees SCM (2012)** Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28:489-521.
- Pieterse CMJ, Van Wees SCM, Van Pelt JA, Knoester M, Laan R, Gerrits H, Weisbeek PJ y Van Loon LC (1998)** A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* 10:1571-1586.
- Pivato B, Offre P, Marchelli S, Barbonaglia B, Mougel C, Lemanceau P y Berta G (2009)** Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza* 19: 81-90.
- Poirier Y y Bucher M (2002)** Phosphate transport and homeostasis in Arabidopsis. In *The Arabidopsis Book* (Somerville, C.R. and Meyerowitz, E.M., eds), doi/10.1199/tab.0024, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis>, American Society of Plant Biologists.
- Potuschak T, Lechner E, Parmentier Y, Yanagisawa S, Grava S, Koncz C y Genschik P (2003)** EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two Arabidopsis F box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell* 115: 679-689.
- Pozo MJ y Azcon-Aguilar C (2007)** Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion Plant Biol* 10: 393-398.
- Pozo MJ, Van Loon LC y Pieterse CMJ (2004)** Jasmonates-Signals in plant-microbe interactions. *Journal of Plant Growth Regulation*. 23: 211-222.
- Pumplin N y Harrison MJ (2009)** Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in *Medicago truncatula* roots during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* 151: 809-819.
- Purin S y Morton J (2011)** In situ analysis of anastomosis in representative genera of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 21: 505-514.
- Qiao H, Chang KN, Yazaki J y Ecker JR (2009)** Interplay between ethylene, ETP1/ETP2 F-box proteins, and degradation of EIN2 triggers ethylene responses in Arabidopsis. *Genes and*

*Development* 23: 512-521.

- Qu X, Hall BP, Gao Z y Schaller GE (2007)** A strong constitutive ethylene-response phenotype conferred on Arabidopsis plants containing null mutations in the ethylene receptors ETR1 and ERS1. *BMC Plant Biology* 7:3.
- Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C y Moenne-Loccoz Y (2009)** The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil* 321(1-2): 341-361
- Rae AL, et al., (2003)** Characterization of two phosphate transporters from barley: evidence for diverse function and kinetic properties among members of the Pht1 family. *Plant Mol. Biol.* 53: 27-36.
- Raghothama KG (1999)** Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol* 50: 665-693.
- Rancé I, Fournier J y Esquerré-Tugayé MT (1998)** The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 95: 6554-6559.
- Rasmussen HN (2002)** Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil* 244: 149-163.
- Rasmussen N, Lloyd DC, Ratcliffe RG, Hansen PE y Jakobsen I (2000)** <sup>31</sup>P NMR for the study of P metabolism and translocation in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 226: 245-253.
- Ratnasingham S y Hebert PDN (2007)** BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Molecular Ecology Notes* 7: 355-364. Doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x
- 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, Wu Y y Graham JH (2003)** Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect expression of genes coding for sucrose synthases in maize roots. *New Phytologist* 157:539-545.
- Rawat SR, Silim SN, Kronzucker HJ, Siddiqi MY y Glass ADM (1999)** *AtAMT1* gene expression and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. *The Plant Journal* 19:143-152
- Redecker D, Morton JB y Bruns TD (2000)** Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14: 276-284.
- Regvar M, Gogala N y Zalar P (1996)** Effects of jasmonic acid on mycorrhizal *Allium sativum*.

*New Phytologist* 134: 703-707.

- Remy W, Taylor TN, Hass H y Kerp H (1994)** Four hundred million year old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 91: 11841-11843.
- Resnick JS, Rivarola M y Chang C (2008)** Involvement of RTE1 in conformational changes promoting ETR1 ethylene receptor signaling in Arabidopsis. *Plant Journal* 56: 423-431.
- Resnick JS, Wen CK, Shockey JA y Chang C (2006)** REVERSION-TO-ETHYLENE SENSITIVITY1, a conserved gene that regulates ethylene receptor function in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 103: 7917-7922.
- Reymond M, Svistoonoff S, Loudet O, Nussaume L y Desnos T (2006)** Identification of QTL controlling root growth response to phosphate starvation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 29: 115-125.
- Richardson AE (2001)** Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 897-906.
- Richardson AE, Barea JM, McNeill AM y Prigent-Combaret C (2009)** Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321: 305-339.
- Riechmann JL y Meyerowitz EM (1998)** The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biol Chem* 379:633-646.
- Riedel T, Groten K y Baldwin IT (2008)** Symbiosis between *Nicotiana attenuata* and *Glomus intraradices*: ethylene plays a role, jasmonic acid does not. *Plant, Cell and Environment* 31: 1203-1213.
- Rieu I, Mariani C y Weterings K (2003)** Expression analysis of five tobacco EIN3 family members in relation to tissue-specific ethylene responses. *J Exp Bot* 54:2239-2244.
- Rock CD (2000)** Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytologist* 148: 357-396.
- Rodrigues-Pousada RA, Rycke RD, Dedonder A, Caeneghem WV, Engler G, Montagn MV y Straeten DVD (1993)** The *Arabidopsis* 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase *gene1* is expressed during early development. *Plant Cell* 5(8): 897-911
- Rodríguez FI, Esch JJ, Hall AE, Binder BM, Schaller GE y Bleecker AB (1999)** A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science* 283: 996-998.
- Rojo E, Leon J y Sanchez-Serrano JJ (1999)** Cross-talk between wound signaling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 20: 135-142.
- Rojo E, Solano R y Sanchez-Serrano JJ (2003)** Interactions between signaling compounds involved in plant defense. *Journal of Plant Growth Regulation* 22: 82-98.

- Rosewarne G, Barker S, Smith S, Smith F y Schachtman D (1999)** A *Lycopersicon esculentum* phosphate transporter (*LePT1*) involved in phosphorus uptake from a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 144: 507-516.
- Rouached H, Arpat AB y Poirier Y (2010)** Regulation of phosphate starvation responses in plants: Signaling players and cross-talks. *Mol Plant* 3: 288-299.
- Rouached H, Stefanovic A, Secco D, Arpat AB, Gout E, Bligny R et al., (2011)** Uncoupling phosphate deficiency from its major effects on growth and transcriptome via PHO1 expression in *Arabidopsis*. *Plant J* 65: 557-570.
- Ruther J y Kleier S (2005)** Plant-plant signaling, ethylene synergizes volatile emission in *Zea mays* induced by exposure to (Z)-3-hexen-1-ol. *Journal of Chemical Ecology* 31: 2217-2222.
- Ruyter-Spira C, Al-Babili S, Van der Krol S y Bouwmeester H (2013)** The biology of strigolactones. *Trends Plant Sci.* 18, 72–83. Doi: 10.1016/j.tplants.2012.10.003.
- Ruyter-Spira C, Kohlen W, Charnikhova T et al., (2011)** Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in *Arabidopsis*: another belowground role for strigolactones? *Plant Physiology* 155: 721-734.
- Saito M (1995)** Enzyme activities of the internal hyphae and germinated spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker and Hall. *New Phytologist* 129: 425-431.
- Sakai H et al., (1998)** ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 95: 5812-5817.
- Sakano K (1990)** Proton phosphate stoichiometry in uptake of inorganic phosphate by cultured- cells of *Catharanthus roseus* (L) G-Don. *Plant Physiology* 93: 479-483.
- Sakano K, Yazaki Y y Mimura T (1992)** Cytoplasmic acidification induced by inorganic phosphate uptake in suspension cultured *Catharanthus roseus* cells - measurement with fluorescent pH indicator and P31 NMR. *Plant Physiology* 99: 672-680.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989)** *Molecular cloning a laboratory manual*. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Calderon L, Lopez-Bucio J, Chacon-Lopez A, Cruz-Ramirez A, Nieto-Jacobo F, Dubrovsky JG, et al., (2005)** Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 46: 174-184.
- Sanchez-Calderon L, Lopez-Bucio J, Chacon-Lopez A, Gutierrez-Ortega A, Hernyez-Abreu E y Herrera-Estrella L (2006)** Characterization of low phosphorus insensitive mutants reveals a crosstalk between low phosphorus-induced determinate root development and the

activation of genes involved in the adaptation of *Arabidopsis* to phosphorus deficiency. *Plant Physiology* 140: 879-889.

**Sanders FE y Tinker PB (1973)** Phosphate flow into mycorrhizal roots. *Pesticide Science* 4: 385-395.

**Sanders IR y Croll D (2010)** Arbuscular mycorrhiza: the challenge to understand the genetics of the fungal partner. *Annual Review of Genetics* 44: 271-292.

**Sanders IR, 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.

**Sato S y Esashi Y (1984)** Identification and Content of 1-Malonylamino-cyclopropanecarboxylic Acid in Germinating Cocklebur Seeds. *Plant Cell Physiol* 25 (4): 583-587.

**Saxena PK y Rashid A (1980)** Differentiation of bud-cell on the protonema of the moss *Anoetanthium fhmsonii*. Effect of aspirin and salicylic acid. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie* 99: 187-189.

**Scervino JM, Ponce MA, Erra-Bassells R, Bompadre MJ, Vierheilig H, Ocampo JA y Godeas A (2006)** Glycosidation of apigenin results in a loss of its activity on different growth parameters of arbuscular mycorrhizal fungi from the genus *Glomus* and *Gigaspora*. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 2919-2922.

**Scervino JM, Sampedro I, Ponce MA, Rodriguez MA, Ocampo JA y Godeas A (2008)** Rhodotorulic acid enhances root colonization of tomato plants by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi due to its stimulatory effect on the pre-symbiotic stages of the AM fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 2474-2476.

**Schaarschmidt S, 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.

**Schaller GE y Bleecker AB (1995)** Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the Arabidopsis ETR1 gene. *Science* 270: 1809-1811.

**Schaller GE, Ladd AN, Lanahan MB, Spanbauer JM y Bleecker AB (1995)** The ethylene response mediator ETR1 from Arabidopsis forms a disulfide-linked dimer. *Journal of Biological Chemistry* 270:12526-12530.

**Schenck NC y Smith GS (1982)** Additional new and unreported species of mycorrhizal fungi (Endogonaceae) from Florida. *Mycologia* 74: 77-92.

**Schlaghhauser CD, Arteca RN y Pell EJ (1997)** Sequential expression of two 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase genes in response to biotic and abiotic

- stresses in potato (*Solanum tuberosum* L.) leaves. *PMB* 35(6): 683-688
- Schliemann W, Ammer C y Strack D (2008)** Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* 69: 112-146.
- Schmelz EA, Alborn HT y Tumlinson JH (2003)**. Synergistic interactions between volicitin, jasmonic acid and ethylene mediate insect-induced volatile emission in *Zea mays*. *Physiol. Plantar* 117 403-412.
- Schmidt W y Schikora A (2001)** Different pathways are involved in phosphate and iron stress-induced alterations of root epidermal cell development. *Plant Physiol* 125: 2078-2084.
- Schunmann PHD, Richardson AE, Smith FW y Delhaize E (2004)** Characterization of promoter expression patterns derived from the Pht1 phosphate transporter genes of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany* 55: 855-865.
- Schüßler A y Walker C (2010)** The Glomeromycota: a species list with new families and genera. Edinburgh and Kew, UK: *The Royal Botanic Garden*; Munich, Germany: Botanische Staatssammlung Munich; Oregon, USA: Oregon State University. URL: <http://www.amf-phylogeny.com>.
- Schüßler A (2000)** *Glomus claroideum* forms an arbuscular mycorrhiza-like symbiosis with the hornwort *Anthoceros punctatus*. *Mycorrhiza* 10: 15-21.
- Schwarzott D, Walker C y Schussler A (2001)** *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21: 190-197.
- Seddas P, Arias C, Arnould C, van Tuinen D, Godfroy O, Benhassou H, Gouzy Moryi D, Dessaint F y Gianinazzi-Pearson V (2009)** Symbiosis-related plant genes modulate molecular responses in an arbuscular mycorrhizal fungus during early root interactions. *Mol Plant-Microbe Interact* 22:341-351.
- Segura J (2000)** Introducción al desarrollo. Concepto de hormona vegetal. In: Azcón-Bieto J, Talón M, eds. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Barcelona, España: 285-303.
- Seki M, Umezawa T, Urano K y Shinozaki K (2007)** Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 296-302.
- Seto Y y Yamaguchi S (2014)** Strigolactone biosynthesis and perception. *Curr Opin Plant Biol* 21C:1-6. Doi: 10.1016/j.pbi.2014.06.001.
- Shachar-Hill Y, Befroy DE, Pfeffer PE y Ratcliffe RG (1997)** Using Bulk Magnetic Susceptibility to Resolve Internal and External Signals in the NMR Spectra of Plant Tissues. *Journal of Magnetic Resonance* 127: 17.

- Shachar-Hill Y, Pfeffer PE, Douds D, Osman SF, Doner LW y Ratcliffe RG (1995)** Partitioning of intermediary carbon metabolism in vesicular arbuscular mycorrhizal leek. *Plant Physiology* 108:7-15.
- Shaul-Keinan O, Gadkar V, Ginzberg I, Grünzweig JM, 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.
- Shepherd VA, Orlovich DA y Ashford AE (1993)** A dynamic continuum of pleiomorphic tubules and vacuoles in growing hyphae of a fungus. *Journal of Cell Science* 104: 495-507.
- Siciliano V, Genre A, Balestrini R, Cappellazzo G, DeWit PJGM y Bonfante P (2007)** Transcriptome analysis of arbuscular mycorrhizal roots during development of the prepenetration apparatus. *Plant Physiology* 144: 1455-1466.
- Singh S y Parniske M (2012)** Activation of calcium- and calmodulin-dependent protein kinase (CCaMK), the central regulator of plant root endosymbiosis. *Curr Opin Plant Biol* 15: 444-453. Doi: 10.1016/j.pbi.2012.04.002
- Sirrenberg A, Göbel C, Grond S, Czempinski N, Ratzinger A, Karlovsky P, Santos P, Feussner I y Pawlowski K (2007)** *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. *Physiologia Plantarum* 131: 581-589.
- Smil V (2000)** Phosphorus in the environment: natural flows and human interferences. *Annual Review of Energy and the Environment* 25: 53-88.
- Smith F, Cybinski D y Rae A (1999)** Regulation of expression of genes encoding phosphate transporters in barley roots. En *Plant Nutrition: Molecular Biology and Genetics* (ed. A. Jensen y G. Gissel-Nielsen) pp. 145–150. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Smith FA, Jakobsen I y Smith SE (2000)** Spatial differences in acquisition of soil phosphate between two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. *New Phytologist* 147: 357-366.
- Smith FW, Ealing PM, Dong B y Delhaize E (1997)** The cloning of two *Arabidopsis* genes belonging to a phosphate transporter family. *The Plant Journal* 11: 83-92.
- Smith SE y Gianninazzi-Pearson V (1988)** Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39: 221-244.
- Smith SE y Read DJ (1997)** Mycorrhizal symbiosis. *Academic Press*. San Diego.
- Smith SE y Read DJ (2008)** *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd ed.; *Academic Press*: San Diego, CA, USA.



- Smith SE y Smith FA (2011)** Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology* 62:227-250.
- Smith SE, Dickson S y Smith FA (2001)** Nutrient transfer in arbuscular mycorrhizas: how are fungal and plant processes integrated? *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 683-694.
- Smith SE, Smith FA y Jakobsen I (2003)** Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiology* 133: 16-20.
- Smith SE, Smith FA y Jakobsen I (2004)** Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytol* 162:511-524.
- Snowden KC, Simkin AJ, Janssen BJ, Templeton KR, Loucas HM, Simons JL, Karunairetnam S, Gleave AP, Clark DG y Klee HJ (2005)** The Decreased apical dominance 1/petunia hybrida carotenoid cleavage dioxygenase 8 gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development. *Plant Cell* 17: 746-759.
- Solaiman MZ y Saito M (1997)** Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry. *New Phytologist* 136: 533-538.
- Solaiman MZ, Ezawa T, Kojima T y Saito M (1999)** Polyphosphates in intraradical and extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5604-5606.
- Solaiman MZ, 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 QM y Ecker JR (1998)** Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by *ETHYLENE-INSENSITIVE3* and *ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1*. *Genes and Development* 12: 3703-3714.
- Sonoda Y, Ikeda A, Saiki S, von Wirén N, Yamaya T y Yamaguchi J (2003)** Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OsAMT1;1-1;3*) in rice. *Plant and Cell Physiology* 44:726-734
- Sorefan K, Booker J, Haurogne K, Goussot M, Bainbridge K, Foo E, Chatfield S, Ward S, Beveridge C, Rameau C, et al., (2003)** MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in Arabidopsis and pea. *Genes Dev* 17: 1469-1474.
- Splivallo R, Fischer U, Göbel C, Feussner I y Karlovsky P (2009)** Truffles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene. *Plant Physiology* 150: 2018-2029.
- Sponsel VM (1995)** Gibberellins biosynthesis and metabolism. Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. In: Davies PJ, ed. *Plant Hormones. Physiology,*

*Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrech, The Netherlands: *Kluwer Academic Publishers*, 66-97.

- Stanley PB y Stolwijk JAJ (1959)** A highly sensitive katharometer and its application to the measurement of ethylene and other gases of biological importance. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering* 1 (3): 245-259.
- Staswick PE, Yuen GY y Lehman CC (1998)** Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *The Plant Journal* 15: 747-754.
- Stepanova AN y Alonso JM (2009)** Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 548-555.
- Stepanova AN, Yun J, Likhacheva AV y Alonso JM (2007)** Multiple interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 19:2169-2285.
- Stirnberg P, Van De Sye K y Leyser O (2002)** *MAX1* y *MAX2* control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Development* 129, 1131-1141.
- Stockinger H, Walker C y Schüßler A (2009)** "*Glomus intraradices* DAOM 197198" a model fungus in a arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New phytologist*. 183 (4):1176-1187.
- Strack D y Fester T (2006)** Isoprenoid metabolism and plastid reorganization in arbuscular mycorrhizal roots. *New Phytologist* 172: 22-34.
- Stumpe M, Carsjens JG, Stenze I, Gobel C, Lang I, Pawlowski K, Hause B y Feussner I (2005)** Lipid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* 66, 781-791.
- Sturm A y Tang GQ (1999)** The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in Plant Science* 4:401-407.
- Stürmer SL (2012)** A history of the taxonomy and systematics of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the phylum *Glomeromycota*. *Mycorrhiza* 22: 247-258.
- Subramanian KS y Charest C (1998)** Arbuscular mycorrhizae and nitrogen assimilation in maize after drought and recovery. *Physiol Plant* 102:285-296
- Suenaga A, Moriya K, Sonoda Y, Ikeda A, von Wirén N, Hayakawa T, Yamaguchi J y Yamaya T (2003)** Constitutive expression of a novel type ammonium transporter OsAMT2 in rice plants. *Plant and Cell Physiology* 44:206-211
- Sugimoto Y, Ali AM, Yabuta S, Kinoshita H, Inanaga S y Itai A (2003)** Germination strategy of *Striga hermonthica* involves regulation of ethylene biosynthesis. *Physiologia Plantarum* 119: 137-145.
- Svistoonoff S, Creff A, Reymond M, Sigoillot-Claude C, Ricaud L, Blanchet A, Nussaume L y Desnos T (2007)** Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root

architecture. *Nature Genetics* 39: 792-796.

**Symons GM, Ross JJ y Murfet IC (2002)** The *bushy* pea mutant is IAA-deficient. *Physiologia Plantarum* 116:389-397.

**Talón M (2000)** Giberelinas. In: Azcón-Bieto J, Talón M, eds. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Barcelona, España: 325-341.

**Tamasloukht M, Sejalon-Delmas N, Kluever A, Jauneau A, Roux C, Becard G, Franken P. 2003.** Root factors induce mitochondrial-related gene expression and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Plant Physiolist* 131: 1468-1478.

**Tanaka YOK y Yano KAT (2005)** Nitrogen delivery to maize via mycorrhizal hyphae depends on the form of N supplied. *Plant, Cell and Environment* 28: 1247-1254.

**Tapia-Goné J, Ferrera-Cerrato R, Varela-Fregoso L, Rodriguez-Ortiz JC, Lara-Mireles, Soria-Coluga JC, Cuellar-Torres H, Tiscareño-Iracheta MA y Cisnero-Almazan R (2008)** Caracterización e identificación morfológica de hongos formadores de micorriza arbuscular, en cinco suelos salinos del estado de San Luis Potosi, México. *Rev Mex Mic* 26: 1-7.

**Tawaraya K, Natio M y Wagatsuma T (2006)** Solubilization of insoluble inorganic phosphate by hyphal exudates of arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Nutrition* 29: 657-665.

**Tejeda-Sartorius M y Délano-Fier JP (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 JM, Azcón C, Gutiérrez F, González F, y Molina AJ. Gráficas Zaidín, Granada, España.

**Tejeda-Sartorius M, de la Vega OM y Delano-Frier JP (2008)** Jasmonic acid influences mycorrhizal colonization in tomato plants by modifying the expression of genes involved in carbohydrate partitioning. *Physiologia Plantarum* 133: 339-353.

**Terajima Y, Nukui H, Kobayashi A, Fujimotov S, Hase S, Yoshioka T, Hashiba T y Satoh S (2001)** Molecular cloning and characterization of a cDNA for a novel ethylene receptor, NT-ERSI, of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Cell Physiol* 42: 308-313.

**The C. M Rick Tomato Genetics Resource Center.** [<http://tgrc.ucdavis.edu>].

**Thibaud MC, Arrighi JF, Bayle V, Chiarenza S, Creff A, Bustos R, Paz-Ares J, Poirier Y y Nussaume L (2010)** Dissection of local and systemic transcriptional responses to phosphate starvation in Arabidopsis. *Plant Journal* 64: 775-789.

**Thoma I, Loeffler C, Sinha A, Gupta M, Krischke M, Steffan B, Roitsch T y Mueller M (2003)** Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant J* 34: 363-375.

- Thomas SG, Rieu I y Steber CM (2005)** Gibberellin Metabolism and Signaling. *Vitam Horm* 72:289-338.
- Thomma BPHJ, Eggermont K, Broekaert WF, y Cammue BPA (2000)** Disease development of several fungi on *Arabidopsis* can be reduced by treatment with methyl jasmonate. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 421-427.
- Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA et al., (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 USA* 95: 15107-15111.
- Thomma BPHJ, Eggermont K, Tierens KFM et al., (1999)** Requirement of functional *ethylene-insensitive2* gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* 121: 1093-1102.
- Thomma BPHJ, Penninckx IAMA, Broekaert WF et al., (2001)** The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Immunology* 13:63-68.
- Tian C, Kasiborski B, Koul R, Lammers PJ, Bucking H, Shachar-Hill Y (2010)** Regulation of the nitrogen transfer pathway in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: Gene characterization and the coordination of expression with nitrogen flux. *Plant Physiology* 153:1175-1187.
- Ticconi CA, Delatorre CA y Abel S (2001)** Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 127: 963-972.
- Ticconi CA, Delatorre CA, Lahner B, Salt DE y Abel S (2004)** *Arabidopsis pdr2* reveals a phosphate-sensitive checkpoint in root development. *Plant J* 37: 801-814.
- Ticconi CA, Lucero RD, Sakhonwasee S, Adamson AW, Creff A, Nussaume L, et al., (2009)** ER-resident proteins PDR2 and LPR1 mediate the developmental response of root meristems to phosphate availability. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 14174-14179.
- Tieman DM, Ciardi JA, Taylor MG y Klee HJ (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 DM, Klee HJ (1999)** Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family. *Plant Physiol* 120: 165-172
- Tieman DV, Taylor MG, Ciardi JA y Klee HJ (2000)** The tomato ethylene receptors NR and LeETR4 are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97: 5663-5668.

- Tisserant B, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S, Gollotte A (1993)** In planta histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycol Res* 97: 245-250.
- Tisserant E, Kohler A, Dozolme-Seddas P, Balestrini R, Benabdellah K, Colard A, Croll, D, Da Silva C, Gomez S K, Koul R, Ferrol N, Fiorilli V, Formey D, Franken Ph, Helber, N, Hijri M, Lanfranco L, Lindquist E, Liu Y, Malbreil M, Morin E, Poulain J, Shapiro H, van Tuinen D, Waschke A, Azcón-Aguilar C, Bécard G, Bonfante P, Harrison MJ, Küster H, Lammers P, Paszkowski U, Requena N, Rensing SA, Roux C, Syers IR, Shachar-Hill Y, Tuskan G, Young JPW, Gianinazzi-Pearson V y Martin F (2012)** The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytologist* 193: 755-769.
- Tobar R, Azcón R y Barea JM (1994)** Improved nitrogen uptake and transport from <sup>15</sup>N-labeled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water-stressed conditions. *New Phytologist* 126:119-122.
- Tommerup IC (1983)** Temperature relations of spore germination and hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Transactions of the British Mycological Society* 81: 381-387.
- Torres de Los Santos RT, Vierheilig H, Ocampo JA, García-Garrido JM (2011)** Altered pattern of Arbuscular mycorrhizal formation in tomato ethylene mutants. *Plant Signaling and Behavior* 6: 755-758.
- Trouvelot A, Kough JL 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. and Gianinazzi, S. INRA, Paris, France. 217-221.
- Trouvelot S, van Tuinen D, Hijri M y Gianinazzi-Pearson V (1999)** Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence in situ hybridization. *Mycorrhiza* 8(4): 203-206.
- Tudela D y Primo-Millo E (1992)** l-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid transported from roots to shoots promotes leaf abscission in *Cleopatra myarin* (*Cifrus reshni* Hort. ex Tan.) seedlings rehydrated after water stress. *Plant Physiol* 100: 131-137.
- Tuomainen J, Betz C, Kangasjarvi J, Ernst D, Yin Z-H, Langebartels C y Syermann HJ (1997)** Ozone induction of ethylene emission in tomato plants: regulation by differential accumulation of transcripts for the biosynthetic enzymes. *Plant J* 12(5): 1151-1162

- Turner BL, Paphazy MJ, Haygarth PM y McKelvie ID (2002)** Inositol phosphates in the environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 357: 449-469
- Ueno O (1998)** Induction of Kranz anatomy and C<sub>4</sub>-like biochemical characteristics in a submerged amphibious plant by abscisic acid. *Plant Cell* 10: 571-583.
- Ullrich CI y Novacky AJ (1990)** Extracellular and intracellular pH and membrane potential changes induced by K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake and fusaric acid in root hairs of *Limnobium stoloniferum*. *Plant Physiology* 94: 1561-1567.
- Ullrich-Eberius CI, Novacky A y Vanbel AJE (1984)** Phosphate uptake in *Lemna gibba* G1: energetics and kinetics. *Planta* 161: 46-52.
- Ullrich-Eberius CI, Novacky A, Fischer E y Lüttge U (1981)** Relationship between energy-dependent phosphate uptake and the electrical membrane potential in *Lemna gibba* G1. *Plant Physiology* 67: 797-801.
- Umehara M, Hanada A, Magome H, Takeda-Kamiya N y Yamaguchi S (2010)** Contribution of Strigolactones to the Inhibition of Tiller Bud Outgrowth under Phosphate Deficiency in Rice. *Plant Cell Physiol* 51(7): 1118-1126.
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T et al., (2008)** Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455:195-200.
- Urao T, Miyata S, Yamaguchi-Shinozaki K y Shinozaki K (2000)** Possible His to Asp phosphorelay signaling in an Arabidopsis two- component system. *FEBS Letters* 478:227-232.
- Ursin VM (1987)** Tesis Doctoral: Morphogenetic and Physiological Analysis of Two Developmental Mutant of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), Epinastics and ageotropic. University of California, Davis.
- Vadassery J, Ritter C, Venus Y, Camehl I, Varma A, Shahollari B, Novák O, Strnad M, Ludwig-Müller J y Oelmüller R (2008)** The role of auxins and cytokinins in the mutualistic interaction between Arabidopsis and *Piriformospora indica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 1371-1383.
- Vahala J, Schlaghauser CD y Pell EJ (1998)** Induction of an ACC synthase cDNA by ozone in light-grown *Arabidopsis thaliana* leaves. *Physiol Plant* 103:45-50.
- Van Aarle IM y Olsson PA (2003)** Fungal Lipid Accumulation and Development of Mycelial Structures by Two Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 6762-6767.

- Van Spronsen PC, Tak T, Rood AMM, Van Brussel A, Kijne JW y Boot KJM (2003)** Salicylic acid inhibits indeterminate-type nodulation but not determinate-type nodulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 83-91.
- Van Wees SCM, Luijendijk M, Smoorenburg I et al., (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.
- Vance CP (2010)** Quantitative trait loci, epigenetics, sugars, and microRNAs: quaternaries in phosphate acquisition and use. *Plant Physiol* 154: 582-588.
- Vance CP, Uhde-Stone C y Allan DL (2003)** Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157: 423-447.
- Varadarajan DK, Karthikeyan AS, Matilda PD y Raghothama KG (2002)** Phosphite, an analog of phosphate, suppresses the coordinated expression of genes under phosphate starvation. *Plant Physiology* 129: 1232-1240.
- Velosillo T, Martínex M, López MA, Vicente J, Castón T, Dolan L, Hamberg M y Castresana C (2007)** Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *The Plant Cell* 19: 831-846.
- Verbelen JP, De Cnodder T, Le J, Vissenberg K y Baluska F (2006)** The root apex of *Arabidopsis thaliana* consists of four distinct zones of cellular activities. Meristematic zone, transition zone, fast elongation zone, and growth terminating zone. *Plant Signaling and Behavior* 1(6): 296-304.
- Vierheilig H y Piché Y (2002)** Signalling in arbuscular mycorrhiza: facts and hypothesis. In: Buslig, B., Manthey, J. (Eds.), *Flavonoids in Cell Function*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Vijayan P, Shockey J, Levesque CA et al., (1998)** A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 95: 7209-7214.
- Voet-van-Vormizeele J y Groth G (2008)** Ethylene controls autophosphorylation of the histidine kinase domain in ethylene receptor ETR1. *Molecular Plant* 1:380-387.
- Vogel JT, Walter MH, Giavalisco P et al., (2010)** *SICCD7* controls strigolactone biosynthesis, shoot branching and mycorrhiza-induced apocarotenoid formation in tomato. *The Plant Journal* 61: 300-311.
- Vom Endt D, Kijne JW y Memelink J (2002)** Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? *Phytochemistry* 61:107-114.

- von Dahl CC, Winz R, Halitschke R, Kühnemann F, Gase K y Baldwin IT (2007)** Tuning the herbivore-induced ethylene burst: the role of transcripts accumulation and ethylene perception in *Nicotiana attenuata*. *The Plant Journal* 51: 293- 307.
- von Wiren N y Merrick M (2004)** Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi and plants. *Top Curr Genet* 9: 95-120.
- von Wirén N, Lauter FR, Ninnemann O, Gillissen B, Walch-Liu P, Engels C, Jost W y Frommer WB (2000)** Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. *Plant Journal* 21: 167-175.
- Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, White R, Medrano D, Drake R, Schuch W y Giovannoni J (2002)** A MADS-Box Gene Necessary for Fruit Ripening at the Tomato Ripening-Inhibitor (Rin) Locus. *Science* 296:343-6.
- Walker NJ (2002)** A technique whose time has come. *Science* 296: 557-559.
- Walter MH, Floss DS, Hans J, Fester T y Strack D (2007)** Apocarotenoid biosynthesis in arbuscular mycorrhizal roots: contributions from methylerythritol phosphate pathway isogenes and tools for its manipulation. *Phytochemistry* 68: 130-138.
- Wang KLC, Li H y Ecker JR (2002)** Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *The Plant Cell* S131–S151.
- Wang W, Hall AE, O'Malley R, Bleecker AB (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 USA* 100:352-357.
- Wang ZF y Ying TJ (2004)** Phenotypes analysis of ethylene response in tomato mutant *Epinastics*. *J Plant Physiol and Mol Biol* 30:27-33.
- Ward JT, Lahner B, Yakubova E, Salt DE y Raghothama KG (2008)** The effect of iron on the primary root elongation of *Arabidopsis* during phosphate deficiency. *Plant Physiology* 147: 1181-1191.
- Wasilewska A, Vlad F, Sirichyra C, Redko Y, Jammes F, Valona C et al., (2008)** An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Mol Plant* 1:198-217.
- Wasternack C (2007)** Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Annals of Botany* 100: 681-697.
- Wasternack C y Hause B (2002)** Jasmonates and octadecanoids signals in plant stress response and development. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 72: 165- 221.
- Waters MT, Brewer PB, Bussell JD, Smith SM y Beveridge CA (2012)** The *Arabidopsis* ortholog of rice *DWARF27* acts upstream of *MAX1* in the control of plant development by strigolactones. *Plant Physiol* 159: 1073-1085.



- Weber H, Chételat A, Caldelari D y Farmer EE (1999)** Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell* 11: 485-94.
- Wilkinson JQ, Lanahan MB, Yen H-C, Giovannoni JJ y Klee HJ (1995)** An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by *Never-ripe*. *Science* 270: 1807-1809
- Woeste KE y Kieber JJ (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. *The Plant Cell* 12: 443 - 455.
- Wright DP, Scholes JD, Read DJ y Rolfe SA (2005)** European and African maize cultivars differ in their physiological and molecular responses to mycorrhizal infection. *New Phytologist* 167:881-896.
- Wright DP, Read DJ y Scholes JD (1998)** Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment* 21:881-891.
- Xie XN, Yoneyama K, Yoneyama K (2010)** The strigolactone story. *Annu Rev Phytopathol* 48: 93-117.
- Xu GH, Chague V, Melamed-Bessudo C, Kapulnik Y, Jain A, Raghothama KG, Levy AA, Silber A (2007)** Functional characterization of LePT4: A phosphate transporter in tomato with mycorrhiza-enhanced expression. *Journal of Experimental Botany* 58: 2491-2501.
- Xu Y, Chang PFL, Liu D, Narasimhan ML, Raghothama KG, Hasegawa PM y Bressan RA (1994)** Plant Defense Genes Are Synergistically Induced by Ethylene and Methyl Jasmonate. *The Plant Cell* 6(8): 1077-1085.
- Yang XJ, Finnegan PM (2010)** Regulation of phosphate starvation responses in higher plants. *Ann Bot* 105: 513-526.
- 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, Xie X, Kisugi T, Nomura T y Yoneyama K (2013)** Nitrogen and phosphorus fertilization negatively affects strigolactone production and exudation in sorghum. *Planta* DOI: 10.1007/s00425-013-1943-8
- 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.
- Yu N, Luo D, Zhang X, Liu J, Wang W, Jin Y, Dong W, Liu J, Liu H, Yang W, Zeng L, Li Q, He Z, Oldroyd GED y Wang E (2014)** A DELLA protein complex controls the arbuscular mycorrhizal symbiosis in plants. *Cell Research* 24:130-133. doi:10.1038/cr.2013.167.
- Yu TE, Egger KN y Peterson LR (2001)** Ectendomycorrhizal associations-characteristics and functions. *Mycorrhiza* 11: 167-177.

- Zarembinski TI y Theologis A (1997)** Expression characteristics of *OS-ACS1* and *OS-ACS2*, two members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene family in rice (*Oryza sativa* L. cv. Habiganj Aman II) during partial submergence. *PMB* 33(1): 71-77.
- Zegzouti H, Jones B, Frasse P, Marty C, Maitre B, Latche A, Pech JC 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.
- Zhang J, Jia W, Yang J y Ismail AM (2006)** Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research* 97: 111-119.
- Zhang YJ, Lynch JP y Brown KM (2003)** Ethylene and phosphorus availability have interacting yet distinct effects on root hair development. *Journal of Experimental Botany* 54: 2351-2361.
- Zhao Q y Guo HW (2011)** Paradigms and paradox in the ethylene signaling pathway and interaction network. *Molecular Plant* 4: 626-634.
- Zhong S y Chang C (2012)** Ethylene Signalling: The CTR1 Protein Kinase (pp. 147-168). En Annual Plant Reviews 44: The Plant Hormone Ethylene (ed M. T. McManus), Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Zhong S, Lin Z y Grierson D (2008)** Tomato ethylene receptor-CTR interactions: visualization of NEVER-RIPE interactions with multiple CTRs at the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Botany* 59:965-972.
- Zhou D, Mattoo AK y Tucker ML (1996)** Molecular cloning of a tomato cDNA (accession no. U47279) encoding an ethylene receptor. *Plant Physiol* 110: 1435
- Zhou X, Liu Q, Xie F y Wen CK (2007)** RTE1 is a Golgi-associated and ETR1-dependent negative regulator of ethylene responses. *Plant Physiol* 145: 75-86.
- Zsögön A, Lambais MR, Benedito VA, Figueira AVO y Peres LEP (2008)** Reduced arbuscular mycorrhizal colonization in tomato ethylene mutants. *Scientia Agricola* 65: 259-267.