



Universidad de La Habana
Facultad de Biología

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas
Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas



Caracterización de la infectividad y la eficacia simbiótica en la interacción hongos micorrizógenos arbusculares - *Solanum lycopersicum* L.

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas

Autor: Ms. C. Yakelin Rodríguez Yon



La Habana
2013



Universidad de La Habana
Facultad de Biología

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas
Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas



Caracterización de la infectividad y la eficacia simbiótica en la interacción hongos micorrizógenos arbusculares - *Solanum lycopersicum* L.

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas

Autor: Ms. C. Yakelin Rodríguez Yon

Tutor: Dra. C. Belkis Peteira Delgado

Asesor: Dra. C. Yolande Dalpé

La Habana
2013

A Pedro Enrique
A mi familia toda

“A veces creemos que lo que hemos logrado
es sólo una gota en el océano.
Pero sin ella, el océano estaría incompleto”

Madre Teresa de Calcuta

Síntesis

SÍNTESIS

Durante la interacción planta-hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) se producen alteraciones bioquímicas dependientes de la cepa involucrada. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la infectividad y la eficacia de estos hongos mediante las respuestas bioquímicas que inducen en plantas de tomate, durante las dos fases de la simbiosis. Para ello, se evaluó el efecto de seis cepas de HMA pertenecientes a la colección del INCA, sobre el tomate cv. 'AMALIA', en cuanto a colonización radical, crecimiento de las plantas, actividad de enzimas de defensa y cuatro patrones isoenzimáticos. Se seleccionaron las cepas INCAM-4 e INCAM-2 por presentar diferencias en su infectividad (colonización e intensidad) y en las variables bioquímicas determinadas, y por su alta eficacia simbiótica expresada a través del crecimiento vegetal, en condiciones de suelo Ferralítico Rojo Lixiviado y fertilidad química de media a alta. Estas cepas se identificaron mediante taxonomía polifásica y se emplearon los marcadores *ITS* del ADN ribosomal y *V-H⁺-ATPasa*, demostrándose la identidad de INCAM-2 como *Funneliformis mosseae*. INCAM-4 resultó ser una especie nueva, la que fue denominada *Glomus cubense*. Se evaluó la infectividad de las cepas seleccionadas, así como las respuestas fisiológicas (crecimiento y nutrición vegetal) y bioquímicas (enzimas que degradan la pared celular vegetal y algunos sistemas antioxidantes), en las fases de la simbiosis. El estudio reveló que las actividades catalasa, endo-polimetilgalacturonasa y endo-glucanasa, de raíz, y la superóxido dismutasa de hoja, así como isoenzimas específicas peroxidasa, polifenol oxidasa, superóxido dismutasa, esterasa y fosfatasa ácida, constituyen marcadores bioquímicos de la infectividad y la eficacia simbiótica de las cepas, en plantas de tomate cv. 'AMALIA'.

Listado de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
AC	Anhidrasa carbónica
AJ o JA	ácido jasmónico
APS	Fosfatasa ácida
APX	Ascorbato peroxidasa
AS o SA	ácido salicílico
C	Capa de la pared de la espora
CAT	Catalasa
DOL	Daño oxidativo a los lípidos
EcoMic [®]	productos inoculantes a base de HMA (sólido)
EDTA	ácido etileno-diamino tetra-acético
EG	Endo-glucanasa
Endo-PMG	Endo-polimetilgalacturonasa
EST	Esterasa
GPX	Guayacol peroxidasa
GR	Glutación reductasa
HMA	hongos micorrizógenos arbusculares
IES	Instituto de Ecología y Sistemática
L-DOPA	L-dihidroxi-fenilalanina
MA	micorrizas arbusculares o micorrízica arbuscular
MDA	malondialdehído
min	minutos
NBT	nitro azul de tetrazolio
nmolMDA g ⁻¹	nanomoles de malondialdehído por gramo de masa fresca
PAGE	geles de poliacrilamida
PAL	Fenilalanina amonio liasa
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
POX	Peroxidasa
PPO	Polifenol oxidasa
PVLG	alcohol polivinílico- ácido láctico- glicerol
Rf	distancia media de migración en PAGE
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SDH	Succinato deshidrogenasa
seg	segundos
SOD	Superóxido dismutasa
TAE	Tris, ácido acético y EDTA
TRC	Tasa relativa del crecimiento
UAE mg ⁻¹ proteína	Unidades de actividad enzimática por miligramos de proteína (Unidades de actividad específica)
V-H ⁺ -ATPasa	ATPasa vacuolar

Citación correcta

Estilo Apellido, año

Rodríguez Yon, Yakelín. 2013. Caracterización de la infectividad y la eficacia simbiótica en la interacción hongos micorrizógenos arbusculares - *Solanum lycopersicum* L. [Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Biológicas] La Habana: Universidad de La Habana, Facultad de Biología. 94 p.

Estilo Numérico

Rodríguez Yon, Yakelín. Caracterización de la infectividad y la eficacia simbiótica en la interacción hongos micorrizógenos arbusculares - *Solanum lycopersicum* L. [Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Biológicas] La Habana: Universidad de La Habana, Facultad de Biología, 2013. 94 p.

ÍNDICE	Págs.
INTRODUCCIÓN	1
I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1.1. Hongos Micorrizógenos Arbusculares	5
1.1.1. Identificación morfológica y molecular	5
1.2. Desarrollo de la simbiosis micorrízica arbuscular	9
1.3. Señalización y regulación en la simbiosis MA	12
1.3.1. Señales en la etapa presimbiótica	12
1.3.2. Regulación en la fase simbiótica mediada por mecanismos de defensa	13
1.3.3. Otras vías de regulación	15
1.4. Estudios enzimáticos en plantas micorrizadas	17
1.5. Significado de las micorrizas en el sistema suelo-planta	23
1.6. El cultivo del tomate. Respuestas de su interacción con los HMA	25
II. MATERIALES Y MÉTODOS	26
Material vegetal	26
Hongos micorrizógenos arbusculares (HMA)	26
2.1. <i>Caracterización y selección de hongos micorrizógenos arbusculares en las fases del establecimiento de la simbiosis con tomate</i>	26
2.1.1. Cuantificación de la colonización micorrízica e intensidad	28
2.1.2. Evaluación del crecimiento de las plantas	28
2.1.3. Determinación en raíces y hojas de la actividad de enzimas relacionadas con los mecanismos de defensa en plantas	29
2.1.4. Determinación en raíces de patrones isoenzimáticos polimórficos mediante geles de poliacrilamida (PAGE)	31
2.2. <i>Identificación de las cepas de HMA seleccionadas</i>	33
2.2.1. Caracterización morfológica	33
2.2.2. Caracterización molecular mediante los marcadores <i>ITS</i> y <i>V-H⁺-ATPasa</i>	33
2.3. <i>Infectividad de las cepas de HMA seleccionadas y respuestas bioquímicas y fisiológicas del tomate en las fases de la simbiosis. Relación entre las mismas</i>	36
2.3.1. Cuantificación de la colonización micorrízica e intensidad	37
2.3.2. Evaluación del crecimiento y nutrición de las plantas	37
2.3.3. Determinación de la actividad de enzimas que degradan la pared celular vegetal	38
2.3.4. Determinación en hojas y raíces de las alteraciones asociadas al sistema antioxidante	39
2.3.4.1. Actividades enzimáticas	40
2.3.4.2. Daño oxidativo a los lípidos (DOL)	41
2.3.5. Determinación en hojas y raíces de los patrones de isoenzimas relacionadas con la simbiosis mediante geles de poliacrilamida (PAGE)	41
2.3.6. Relación de las actividades enzimáticas y los patrones de isoenzimas con la infectividad y la eficacia simbiótica de las cepas de HMA seleccionadas en plantas de tomate	42
III. RESULTADOS	43
3.1. <i>Caracterización y selección de hongos micorrizógenos arbusculares en las fases del establecimiento de la simbiosis con tomate</i>	43
3.1.1. Cuantificación de la colonización micorrízica e intensidad	43
3.1.2. Evaluación del crecimiento de las plantas	43
3.1.3. Determinación en raíces y hojas de la actividad de enzimas relacionadas con los mecanismos de defensa en plantas	44

3.1.3.1.	Actividades enzimáticas en raíces	44
3.1.3.2.	Actividades enzimáticas en hojas	46
3.1.4.	Determinación en raíces de patrones isoenzimáticos polimórficos mediante geles de poliacrilamida (PAGE)	49
3.2.	<i>Identificación de las cepas de HMA seleccionadas</i>	52
3.2.1.	Caracterización morfológica	52
3.2.2.	Caracterización molecular mediante los marcadores <i>ITS</i> y <i>V-H⁺-ATPasa</i>	53
3.3.	<i>Infectividad de las cepas de HMA seleccionadas y respuestas bioquímicas y fisiológicas del tomate en las fases de la simbiosis. Relación entre las mismas</i>	55
3.3.1.	Cuantificación de la colonización micorrízica e intensidad	55
3.3.2.	Evaluación del crecimiento y nutrición de las plantas	56
3.3.3.	Determinación de la actividad de enzimas que degradan la pared celular vegetal	58
3.3.4.	Determinación en hojas y raíces de las alteraciones asociadas al sistema antioxidante	59
2.3.4.1.	Actividades enzimáticas	59
2.3.4.2.	Daño oxidativo a los lípidos (DOL)	61
3.3.5.	Determinación en hojas y raíces de los patrones de isoenzimas relacionadas con la simbiosis mediante geles de poliacrilamida (PAGE)	62
3.3.6.	Relación de las actividades enzimáticas y los patrones de isoenzimas con la infectividad y la eficacia simbiótica de las cepas de HMA seleccionadas en plantas de tomate	64
IV. DISCUSIÓN		67
4.1.	<i>Caracterización y selección de hongos micorrizógenos arbusculares en las fases del establecimiento de la simbiosis con tomate</i>	67
4.2.	<i>Identificación de las cepas de HMA seleccionadas</i>	79
4.3.	<i>Infectividad de las cepas de HMA seleccionadas y respuestas bioquímicas y fisiológicas del tomate en las fases de la simbiosis. Relación entre las mismas</i>	83
4.4.	<i>Consideraciones generales</i>	90
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		94
5.1.	CONCLUSIONES	94
5.2.	RECOMENDACIONES	94
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		
ANEXOS		

INTRODUCCIÓN

En el contexto agrícola mundial están bien argumentados los múltiples y extraordinarios beneficios que la simbiosis micorrízica confiere a las plantas implicadas. Las micorrizas del tipo arbuscular constituyen las más comunes y ampliamente distribuidas en los ecosistemas terrestres (Smith y Read, 2008). Estas evidencias, unidas a la antigüedad de los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) (Simon *et al.*, 1993), sugieren la importante contribución de éstos a la exitosa colonización de la tierra por las plantas y el papel crucial que han desempeñado en su evolución y diversificación (Plenchette y Fortin, 2009). En los últimos años se ha incrementado el conocimiento acerca de la asociación simbiótica planta-HMA. Sin embargo, numerosos aspectos relevantes de la biología, la genética y el funcionamiento de estos hongos continúan siendo un enigma (Jude *et al.*, 2009).

El establecimiento de la simbiosis micorrízica involucra una secuencia sincronizada de eventos morfo-fisiológicos y bioquímicos, mediados por un complejo intercambio de señales entre la planta hospedera y el hongo, los cuales comienzan a producirse desde etapas muy tempranas, incluso previas al contacto físico entre los simbiosiontes. Estos procesos se encuentran sujetos a una fina regulación espacial y temporal, originada por el “diálogo” molecular que tiene lugar entre los genomas vegetal y fúngico, sin obviar la influencia de los factores ambientales (Harrison, 2005; García-Garrido y Vierheilig, 2009).

Los principales resultados sobre el tema demuestran que los HMA inducen cambios bioquímicos en las plantas que colonizan. Entre estos cambios se conocen: alteraciones en la síntesis de metabolitos secundarios y de nuevas proteínas, en los contenidos de hormonas, así como en la actividad enzimática y en los patrones de isoenzimas. Dentro de las enzimas se encuentran las relacionadas con los mecanismos de defensa en las plantas, las que degradan la pared celular vegetal y las que participan en el metabolismo de nutrientes como el fósforo (Smith y Read, 2008). La mayoría de los estudios han revelado que tales alteraciones están en dependencia de la cepa implicada y prueban la desigualdad existente, no solo a nivel estructural, sino también funcional entre los HMA de distintos géneros, especies, e incluso entre ecotipos de una misma especie (Scervino *et al.*, 2007; 2009).

Un estudio reciente de la interacción del tomate con cuatro cepas de HMA demostró que las enzimas implicadas en la defensa de las plantas manifiestan incrementos de actividad entre los 15 y 18 días y los 30 y 33 días, coincidiendo con las dos fases que caracterizan el establecimiento de esta interacción, conocidas como de estrés biótico y simbiótica (Pérez, 2010).

Otros trabajos evidencian diferencias en la eficiencia de las cepas en términos de crecimiento, rendimiento y protección de la planta contra estrés biótico y abiótico (Rivera *et al.*, 2007; Smith y Read, 2008). La comprensión de las asociaciones preferenciales de estos hongos con las plantas y los mecanismos bioquímicos que median esta condición poseen una elevada relevancia ecológica, cuyo desconocimiento podría limitar el uso eficiente de los HMA, y por tanto, afectar las prácticas agrícolas de manejo sostenible. En este sentido, la literatura internacional carece de trabajos donde se exprese la relación entre la infectividad y la eficacia simbiótica de estos hongos con las alteraciones bioquímicas antes mencionadas, inducidas en las plantas que colonizan.

El Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) cuenta con una colección de cepas de HMA, constituyendo algunas de éstas la base de biopreparados de gran repercusión económica y ecológica en la agricultura cubana y latinoamericana. Se han alcanzado resultados satisfactorios con la aplicación de estos biofertilizantes micorrizógenos a diversos cultivos de interés económico en diferentes tipos de suelo. Entre estos se destaca el incremento de los rendimientos agrícolas de un 30 a un 45%, un mejor aprovechamiento de los nutrientes del suelo y la disminución de la dosis de los fertilizantes químicos en los cultivos (Rivera *et al.*, 2007). Se ha informado, además, cierto aumento de la resistencia a patógenos en algunas interacciones (Noval *et al.*, 2007; Pérez, 2010), el aumento de la tolerancia al déficit hídrico y a la salinidad (Fernández *et al.*, 2006; Fundora *et al.*, 2008) y el favorecimiento de la aclimatización de vitroplantas (Rodríguez *et al.*, 2008). No obstante, se han manifestado diferencias en estos resultados dependientes de la cepa inoculada y del suelo utilizado, donde sobresalen: INCAM-2, INCAM-4 e INCAM-9.

Teniendo en cuenta lo anterior, se le ha concedido especial atención a la caracterización agronómica y bioquímica, así como a la identificación, de las cepas pertenecientes a la colección de HMA del

INCA, con énfasis en las de comportamiento diferencial o contrastante desde los puntos de vista bioquímico y estructural, así como por sus conocidos impactos económico y ecológico.

A partir de las consideraciones anteriores se plantea la siguiente **hipótesis**: Los niveles de infectividad y la eficacia de los hongos micorrizógenos arbusculares en plantas de tomate cv. 'AMALIA', se pueden caracterizar a través de las respuestas bioquímicas durante las fases del establecimiento de la simbiosis.

Objetivo general: Caracterizar la infectividad y la eficacia de los hongos micorrizógenos arbusculares mediante las respuestas bioquímicas de plantas de tomate cv. 'AMALIA', en las dos fases de la simbiosis.

Objetivos específicos:

1. Seleccionar cepas de HMA de la colección del INCA con comportamiento diferente, en función de variables relacionadas con la infectividad del hongo, el crecimiento vegetal y variables bioquímicas de la interacción, en plantas de tomate cv. 'AMALIA'.
2. Identificar las cepas seleccionadas mediante taxonomía polifásica.
3. Evaluar respuestas bioquímicas de la interacción del tomate con las cepas seleccionadas en las fases de la simbiosis y determinar su relación con la infectividad y la eficacia simbiótica de las cepas.

Novedad Científica:

1. Se identifica y describe una nueva especie de HMA para la ciencia: *Glomus cubense*, y se demuestra que la cepa INCAM-2 es *Funneliformis mosseae*, syn. *Glomus mosseae*.
2. Se utiliza por primera vez en Cuba el marcador $V-H^+-ATPasa$ en la taxonomía molecular de cepas de HMA y se informan cinco nuevos cebadores del mismo, los que pudieran ser útiles en la identificación de especies de la familia *Glomeraceae*.
3. Se demuestra que la evaluación combinada de las variables de infectividad del hongo, del crecimiento y desarrollo de las plantas y de respuestas bioquímicas de la interacción durante las

fases de la simbiosis, permite caracterizar y diferenciar el funcionamiento de distintas cepas de HMA en plantas de tomate cv. 'AMALIA', bajo condiciones específicas de sustrato.

4. Se revela que las actividades catalasa, endo-polimetilgalacturonasa y endo-glucanasa, de raíz, y la superóxido dismutasa de hoja, además de isoenzimas específicas de peroxidasa, polifenol oxidasa, superóxido dismutasa, esterasa y fosfatasa ácida, constituyen marcadores bioquímicos de la infectividad y la eficacia simbiótica de los HMA en plantas de tomate cv. 'AMALIA'.

Importancia teórica: Este trabajo realiza aportes al conocimiento sobre los marcadores moleculares y los cebadores utilizados en la identificación de los HMA de la familia *Glomeraceae*. Además, contribuye al esclarecimiento de las respuestas bioquímicas inducidas por los distintos HMA para la colonización exitosa del tomate, haciendo énfasis en las enzimas involucradas en la penetración del hongo en raíces y en las relacionadas con los procesos de defensa en las plantas. Se revela la relación entre algunas de estas respuestas bioquímicas diferenciales con la infectividad y la eficacia de las cepas de HMA *Funneliformis mosseae* (INCAM-2) y *Glomus cubense* (INCAM-4), en plantas de tomate.

Importancia práctica: Se incrementó el valor documental de la colección de cepas de HMA del INCA, resaltando la identificación de dos de las cepas con mayor repercusión económica y ecológica en la agricultura cubana y latinoamericana: *Funneliformis mosseae* (INCAM-2) y *Glomus cubense* (INCAM-4), constituyendo esta última la base del producto EcoMic[®] que más se comercializa y aplica en los sistemas agrícolas sostenibles. El marcador molecular *V-H⁺-ATPasa* y los nuevos cebadores informados de éste resultan útiles y por tanto, se recomienda su aplicación en la identificación de especies de la familia *Glomeraceae*. Las estrategias desarrolladas para la secuenciación de los fragmentos de *V-H⁺-ATPasa* sientan las bases para el diseño de cebadores específicos de las dos cepas estudiadas, los cuales pudieran ser empleados en el monitoreo y en la identificación de las mismas en suelo y en las raíces de los agrosistemas donde se aplican.

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Hongos micorrizógenos arbusculares

Las micorrizas arbusculares (MA) pueden formarse en una variedad muy amplia de plantas hospederas (más de 200 000 especies, Brundrett, 2009) al asociarse con los HMA. Paradójicamente, se conocen poco más de 200 especies de estos hongos coenocíticos, cuyo origen al parecer data de 1000 millones de años atrás (Plenchette y Fortin, 2009).

A pesar del reconocido valor ecológico de esta simbiosis y su omnipresencia en los ecosistemas terrestres (Brachmann y Parniske, 2006), los HMA son un enigma biológico si se tiene en cuenta que ciertos aspectos fundamentales de su genética y fisiología se desconocen aún. Los avances en este campo son complicados por la naturaleza “primitiva” de estos hongos, los cuales aparentemente carecen de reproducción sexual clásica, y por su condición de biotrofos obligados (Jude *et al.*, 2009).

1.1.1. Identificación morfológica y molecular

Tradicionalmente los estudios taxonómicos de los HMA se han basado en la morfología y apariencia de las esporas, así como en su desarrollo ontogénico. Numerosas familias y géneros se han distinguido fundamentalmente por la unión de la hifa y el modo de formación de la espora, mientras que la subestructura de las paredes de las esporas juega un papel importante en la identificación de las especies (Gerdemann y Trappe, 1974; Morton y Benny, 1990).

Dentro de las características morfológicas más notorias de estos hongos se encuentran el tamaño, la forma y el color de las esporas. Su tamaño varía entre 20 y 500 μm según la especie. Su forma puede ser globosa, subglobosa, elíptica, ovoide, reniforme, piriforme, claviforme o irregular; además de poseer una gran gama de colores que ayuda también a su identificación. Algunas especies forman esporocarpos, mientras que en otras aparecen las esporas aisladas, ya sea en el interior o exterior de la raíz (Schüßler y Walker, 2010).

La mayoría de las especies descritas hasta el momento han sido caracterizadas sólo por la morfología de sus esporas y muchas de ellas no han podido ser cultivadas aún (www.amf-phylogeny.com). Algunos de estos hongos han crecido exitosamente en macetas en cultivos puros,

en asociación con distintas plantas hospederas por varias décadas (Mosse 1953; Gerdemann y Trappe, 1974). El cultivo es fácil para un gran número de HMA comunes, como *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices*, pero difícil para muchos otros, especialmente los que requieren nichos específicos (Redecker *et al.*, 2007; Oehl *et al.*, 2009; Palenzuela *et al.*, 2010).

Sin embargo, el criterio basado solamente en su morfología no refleja la gran plasticidad fisiológica y diversidad genética de las poblaciones micorrízicas (Redecker *et al.*, 2000). Por lo que desde principios de la década de los 90, la aplicación de técnicas basadas en la PCR ha permitido un avance importante en los estudios moleculares concernientes a la identificación de los HMA, conduciendo a erigir nuevos órdenes, familias y géneros, con la descripción de nuevas especies (Morton y Redecker, 2001; Walker *et al.*, 2007; Blaszkowski *et al.*, 2009a,b). Una de las contribuciones más notables lo constituyó la separación de los mismos en un *phylum* independiente: *Glomeromycota* (Schüßler *et al.*, 2001a) y así hasta llegar a la clasificación actual (Schüßler y Walker, 2010) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación actual de los hongos micorrizógenos arbusculares (Schüßler y Walker, 2010)

Phylum <i>Glomeromycota</i>		
Clase <i>Glomeromycetes</i>		
Orden (4)	Familia (14)	Género: 24 (No. Especies, 235)
<i>Glomerales</i>	<i>Glomeraceae</i>	<i>Glomus</i> sensu stricto (1), <i>Glomus</i> sensu lato (79), <i>Funneliformis</i> (11), <i>Rhizophagus</i> (10), <i>Sclerocystis</i> (11)
	<i>Claroideoglomeraceae</i>	<i>Claroideoglomus</i> (7)
<i>Diversisporales</i>	<i>Gigasporaceae</i>	<i>Gigaspora</i> (8)
	<i>Scutellosporaceae</i>	<i>Scutellospora</i> 10 (26)
	<i>Racocetraceae</i>	<i>Racocetra</i> (11), <i>Cetraspora</i> (5)
	<i>Dentiscutataceae</i>	<i>Dentiscutata</i> (8), <i>Fuscutata</i> (4), <i>Quatunica</i> (1)
	<i>Acaulosporaceae</i>	<i>Acaulospora</i> (37)
	<i>Entrophosporaceae</i>	<i>Entrophospora</i> (3), <i>Kuklospora</i> (2)
	<i>Pacisporaceae</i>	<i>Pacispora</i> (8)
<i>Paraglomerales</i>	<i>Diversisporaceae</i>	<i>Diversispora</i> (4), <i>Otospora</i> (1), <i>Redeckera</i> (1)
	<i>Paraglomeraceae</i>	<i>Paraglomus</i> (3)
<i>Archaeosporales</i>	<i>Geosiphonaceae</i>	<i>Geosiphon</i> (1)
	<i>Ambisporaceae</i>	<i>Ambispora</i> (9)
	<i>Archaeosporaceae</i>	<i>Archaeospora</i> (1), <i>Intraspora</i> (1)

Asimismo, se han desarrollado estrategias basadas en el uso de metodologías innovadoras de ecología microbiana, que combinan las técnicas de PCR con las de SSCP (en inglés, Single Strand

Conformational Polimorfism) y TGGE (en inglés, Temperature Gradient Gel Electrophoresis), para identificar los diferentes ecotipos presentes tanto en una raíz colonizada como en el suelo asociado a la misma (Cornejo *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2009).

Los distintos genes ribosómicos nucleares (ADNr) han sido los marcadores más frecuentemente empleados: 18S o SSU (siglas en inglés, subunidad menor), 25S o LSU (siglas en inglés, subunidad mayor) e ITS (siglas en inglés, espaciadores internos de transcripción) que comprende las regiones ITS1, ITS2 y el fragmento 5.8S.

El 18S ha contribuido de forma sustancial al conocimiento de la gran diversidad ecológica de los HMA (DeBellis y Widden, 2006; Öpik *et al.*, 2009), pero no se considera apropiado para la resolución de especies, fundamentalmente de la familia *Glomeraceae*, al abarcar un elevado número de especies (118) que se acrecienta por día y cuyas diferencias morfológicas entre algunas de ellas son, en la mayoría de los casos, muy sutiles (Cano *et al.*, 2009; Stockinger *et al.*, 2010). El 25S ha sido utilizado con éxito tanto en estudios ecológicos (Alves da Silva *et al.*, 2006; Rodríguez-Echeverría *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010), como en la identificación y cuantificación de los HMA que colonizan una raíz o se encuentran en el suelo asociado (van Tuinen *et al.*, 1998a,b).

Los ITS constituyen los candidatos más exitosos para la resolución a nivel de especie en el reino fúngico (Nilsson *et al.*, 2008), dada la elevada variabilidad inter-específica de sus secuencias. El análisis de las secuencias de estos genes en los HMA ha puesto de manifiesto que a pesar de su elevado polimorfismo es posible establecer criterios confiables para estudios de filogenia y diversidad (Simon *et al.*, 1993; Gollotte *et al.*, 2004; Redecker y Raab, 2006; Öpik *et al.*, 2008a). Sin embargo, en ocasiones son inapropiados para la identificación de las especies debido al alto grado de variación intra-específica e inclusive, intra-espora (Sanders *et al.*, 1995; Jansa *et al.*, 2002), la cual es a veces mucho mayor que la esperada (Börstler *et al.*, 2008; Rosendahl, 2008).

Autores como Stockinger *et al.*, (2009) han sugerido la utilización combinada de los ADNr, demostrando que la combinación de las regiones ITS y LSU permite un análisis filogenético consistente y la resolución de varias especies de HMA. Posteriormente, estos mismos autores recomendaron como base para estos análisis un fragmento de 1500 pb que comprende las regiones

18S y 25S, parcialmente, y la región ITS completa, el cual podría ser aplicado con éxito en los estudios ecológicos y en la identificación de especies (Stockinger *et al.*, 2010).

Paralelamente a estas investigaciones, otros autores han propuesto el uso de genes que codifican para proteínas, tales como tubulina (Msiska y Morton, 2009), V-H⁺-ATPasa, el factor de elongación *EF1-α* y la F-ATPasa subunidad β (Sokolski *et al.*, 2010). En particular, las H⁺-ATPasas del tipo vacuolar fueron estudiadas por Corradi *et al.*, (2004), quienes encontraron un linaje simple de este gen en *Glomus* sp. con algunas variaciones ligeras. Esta región ha sido secuenciada en algunas especies de HMA pero no se había utilizado en la identificación. Sokolski *et al.*, (2010) emplearon este marcador con éxito para separar especies de *Glomus* similares morfológicamente (*G. intraradices* y *G. irregulare* Błaszk., Wubet, Renker & Buscot). La secuenciación de este gen reveló un amplicón de 1468 pb sin intrón. Cada cepa analizada presentó una secuencia única que evidenció la distinción con respecto a las otras, mostrando entre un 92 y 95% de similitud entre pares de ellas. Otro aspecto importante a tener en cuenta, además del marcador, son los cebadores a utilizar. Algunos cebadores empleados a partir de secuencias de los ADNr no son específicos para los HMA. La mayoría de ellos amplifica ácido desoxirribonucleico (ADN) sólo de un número restringido de taxones de *Glomeromycota*, o de otros microorganismos, incluso, de plantas; además de carecer de poder de resolución para las especies (Helgason *et al.*, 1999; Krüger *et al.*, 2009; Stockinger *et al.*, 2009; 2010). Un ejemplo lo constituye el cebador AM1 (Helgason *et al.*, 1998), específico de la región 18S de los HMA, el cual se emplea comúnmente con el cebador universal de eucariota NS31, cubriendo la mayor parte de los taxones. No obstante, presenta los inconvenientes señalados. Lee *et al.*, (2008) informaron un nuevo par de cebadores (AML1 y AML2) con mayor especificidad y alcance para los grupos conocidos de estos hongos, aunque al parecer, no ha tenido la aceptación esperada pues no se ha utilizado en trabajos posteriores.

Se han diseñado cebadores basados en la región 25S como LR1, FLR2, FLR3, FLR4, NDL22, e incluso algunos taxón-específico como 4.24 (*Racocetra castanea*, syn. *Scutellospora castanea* (Walker) Oehl, Souza & Sieverd.), 5.25 (*G. mosseae*), 8.22 (*G. intraradices*) y 23.46 (*Gigaspora rosea* Nicolson & Schenck) (van Tuinen *et al.*, 1998a,b; Gollotte *et al.*, 2004), los cuales han sido

utilizados de forma combinada con éxito. Los mismos resultaron eficientes para identificar y cuantificar las especies particulares presentes en la raíz o en el suelo asociado, pero no son aplicables en la descripción de nuevas especies. Los cebadores más utilizados para la región ITS son universales y se conocen como ITS1, ITS3, ITS4 e ITS5 (White y Bruns, 1990). Recientemente, Sokolski *et al.*, (2010) informaron el par GLO2A-GLO2R, específico de *Glomus*, el que fue ensayado con buenos resultados en la identificación molecular de *Rhizophagus custos*, syn. *G. custos* (Cano & Dalpé) Walker & Schüßler (Cano *et al.*, 2009).

En la actualidad no se dispone de un simple set de cebadores que abarque todos los grupos de *Glomeromycota* y que permita la identificación de los HMA a nivel de especie. Por estas razones se ha tenido que recurrir a estrategias complejas, muchas de las cuales requieren combinar diferentes pares de cebadores y varios intentos de PCR independientes. El desarrollo de las distintas tácticas está en dependencia del taxón de interés.

La aplicación combinada de los métodos convencionales (morfológicos, respuesta a tinciones específicas, características fenotípicas, bioquímicas y químicas, entre otros) con los moleculares en los estudios taxonómicos se conoce hoy día como taxonomía polifásica (Tindall *et al.*, 2010).

1.2. Desarrollo de la simbiosis micorrízica arbuscular

La simbiosis MA puede ser dividida en dos fases: la fase de estrés biótico (Anexo I) que comprende las etapas asimbiótica y presimbiótica, y la fase simbiótica (Jude *et al.*, 2009).

Etapas asimbiótica: Esta etapa consiste en el crecimiento de una hifa en forma recta (hifa corredora) a partir de la espora, independientemente de la especie fúngica (Dalpé *et al.*, 2005). No obstante, Giovannetti (2000) observó ocasionalmente un patrón diferente de crecimiento, con la producción de algunas ramificaciones finas y torcidas poco tiempo después de la germinación de la espora (Anexo I). Se conoce que sobre la germinación de la espora influyen factores como el pH, la temperatura, la humedad, las concentraciones de nutrientes, las plantas hospederas y/o los microorganismos del suelo (Giovannetti, 2000). Recientemente se ha informado que estos mismos factores pueden influir también sobre los patrones de germinación de las esporas determinando la ocurrencia de uno u otro (Jude *et al.*, 2009).

En ausencia de una raíz hospedera, el crecimiento del tubo germinativo puede mantenerse solo por 2-4 semanas, luego de este periodo ocurre la retracción del citoplasma y aparece un septo en la hifa (Logi *et al.*, 1998). Este mecanismo se considera una estrategia de supervivencia y parece ser una característica generalizada de estos hongos (Mosse, 1988). Sin embargo, en algunos casos las esporas mueren (Mosse y Hepper, 1975), aspecto que posiblemente está relacionado a los patrones de crecimiento o germinación. Otro evento morfológico observado durante esta etapa es la producción de esporas secundarias (de menor tamaño) en el tubo germinativo de algunas especies (Mosse, 1995; Karandashov *et al.*, 2000).

Etapa presimbiótica: En la vecindad de las raíces hospederas, la hifa germinativa sufre cambios morfológicos constituyendo los primeros signos visibles de la interacción planta-hongo. La inducción de los patrones de crecimiento hifal y su ramificación ocurre tanto en presencia de raíces hospederas como en presencia de exudados radicales o de ciertas moléculas que ellos contienen (Jude *et al.*, 2009).

Una de las estructuras hifales presimbióticas consiste en profusas ramificaciones laterales y/o apicales que proliferan de la hifa germinativa, denominadas estructuras en forma de abanico (Anexo I), las cuales se han observado a distancias de 1,6 mm de raíces de cebolla (*Allium cepa* L.) en hifas de *G. mosseae*, mientras que *Acaulospora laevis* Gerd. & Trappe comenzó a desarrollar estas estructuras a mayor distancia de la raíz (3,4 mm) (Powell, 1976; Giovannetti *et al.*, 1996). Aunque estas estructuras se forman en la mayoría de los casos y probablemente favorecen el establecimiento inicial de la simbiosis (Bécard y Piché, 1989), también puede observarse la colonización directa sin la ocurrencia de dichas estructuras (Powell, 1976) (Anexo I). La ausencia de ramificaciones no es sinónimo de ausencia de señales radicales (Jude *et al.*, 2009), sin embargo, se carece de estudios que comparen la composición molecular de las señales radicales que inducen ambos patrones de colonización.

Al entrar en contacto con la raíz, el hongo forma un apresorio a partir del cual se desarrolla la fase intraradical (Anexo I). Este se forma por una hifa simple y se desarrolla 2-3 días después de la unión de la hifa a la superficie radical, a menudo emerge de una hifa central dentro de la estructura ramificada en forma de abanico (Giovannetti *et al.*, 1993a).

Fase simbiótica: Una vez que se establece la simbiosis se desarrolla el micelio extrarradical (Anexo I), donde las hifas corredoras van a formar el esqueleto de la red fúngica extrarradical desarrollando ramificaciones laterales con ángulos entre 30 y 60° y cuyo diámetro se incrementa con el desarrollo de este micelio. La arquitectura estructural de la red fúngica parece estar bajo la influencia de la cepa de HMA y el sustrato, pues se ha observado que la presencia o ausencia de ciertos nutrientes modifica la morfología del micelio extrarradical (Bago *et al.*, 2004).

Las hifas corredoras sirven como conducto, transportando los nutrientes del suelo hacia las plantas hospederas y los carbohidratos a las hifas extrarradicales en desarrollo, y son capaces de formar infecciones secundarias múltiples (Anexo I) sobre una raíz dada o crecer algunos centímetros hacia la matriz del suelo para infectar otras raíces. El resultado de este evento es la formación de puentes hifales entre raíces adyacentes de una misma planta, de dos plantas individuales de la misma especie o de plantas individuales de dos especies diferentes (Jude *et al.*, 2009).

También pueden observarse hifas cortas, finas y de pared delgada que se desarrollan a partir de la hifa corredora, las cuales típicamente se septan y son más transitorias. Además, sus ramificaciones hifales secundarias forman ángulos rectos con la hifa parental (Nicolson, 1959). Posteriormente, éstas fueron denominadas estructuras ramificadas de absorción (BAS, siglas en inglés) (Anexo I), cuya función hipotética es la absorción de nutrientes del suelo (Bago *et al.*, 1998a).

Por último, tiene lugar la esporulación que representa el completamiento del ciclo de vida de un HMA. Las esporas pueden formarse sobre una hifa principal repetidamente ramificada o sobre ramificaciones laterales cortas (Mosse, 1959). En relación a la primera, Bago *et al.*, (1998b) observaron estructuras hifales que parecían ser sitios preferentes para la formación de esporas, denominándolas cola de caballo (Anexo I). Los tipos de esporulación sobre las ramificaciones cortas y finas varían de una especie a otra, pero parecen ser relativamente uniformes a nivel de especie (Jude *et al.*, 2009). También se ha informado la producción de esporas viables a partir de micelio desarrollado de hifas intrarradicales y vesículas dentro de fragmentos radicales precolonizados (Diop *et al.*, 1994).

1.3. Señalización y regulación en la simbiosis MA

La formación de la simbiosis MA es un complejo desarrollo de eventos que requiere la coordinación de la expresión génica de ambas partes. El uso de herramientas moleculares y de las técnicas de arreglo de ADN ha permitido un progreso considerable en el estudio de las vías o rutas conducentes a la formación de esta simbiosis, especialmente con relación a la planta hospedera (García-Garrido y Vierheilig, 2009).

1.3.1. Señales en la etapa presimbiótica

Los exudados radicales constituyen las primeras señales de la planta durante el establecimiento de esta simbiosis, estimulando la germinación de la espora (Schreiner y Koide, 1993) y el crecimiento hifal (Giovannetti *et al.*, 1993b; Pinior *et al.*, 1999).

Numerosos estudios han demostrado que las concentraciones de fósforo (P) en los tejidos vegetales afectan la colonización radical por los HMA, pero los mecanismos exactos involucrados aún se desconocen (Smith y Read, 2008). Se ha observado que los exudados radicales de las plantas crecidas en sustratos con limitación de P estimulan el crecimiento y ramificación hifal (Vierheilig *et al.*, 1998; Nagahashi y Douds, 2000) y la colonización radical (Pinior *et al.*, 1999). En contraste, los exudados radicales provenientes de las plantas con altos contenidos de P estimulan el crecimiento hifal pero en menor extensión, mientras que no aumentan la colonización radical (Tawarayama *et al.*, 1996; 1998). Estos resultados indican que los exudados radicales están involucrados, al menos parcialmente, en la regulación de la colonización radical por los HMA.

Entre los compuestos que forman parte de los exudados radicales, los flavonoides parecen jugar un papel importante en el comienzo del intercambio de señales entre los simbioses, manifestando varios de ellos un claro efecto estimulador sobre el crecimiento y la ramificación hifal, así como sobre la colonización radical (Morandi, 1996; Larose *et al.*, 2002). A este nivel, se ha observado un efecto específico de género y especie de HMA (Scervino *et al.*, 2005a,b,c). Este efecto, además, parece ser dependiente de la estructura química de la molécula involucrada y, en algunos casos, se incrementa en presencia de CO₂ (Bécard *et al.*, 1992). No obstante, como los patrones de

flavonoides son relativamente específicos para cada grupo de plantas, su desempeño como compuestos señales generales en la simbiosis MA ha sido cuestionado (Becárd *et al.*, 1995).

Estudios recientes han reconocido un grupo perteneciente a los sesquiterpenos, las fitohormonas estrigolactonas, identificados claramente como factores de ramificación de las hifas de los HMA y estimuladores de la germinación de las esporas (Akiyama *et al.*, 2005; Parniske, 2008), sugiriéndose una función como compuesto señal generalizado para el establecimiento de la simbiosis MA en todas las plantas hospederas, posiblemente muy limitada a este tipo de simbiosis particular, al no demostrarse efecto alguno sobre los hongos ectomicorrízicos ni patogénicos (Steinkellner *et al.*, 2007). La producción de estrigolactonas disminuye en plantas crecidas a altas concentraciones de P y por tanto la colonización radical (Yoneyama *et al.*, 2007).

También se conoce la existencia de factores de señalización de origen fúngico, los factores Myc, que son percibidos por las plantas hospederas antes del contacto directo (Bécárd *et al.*, 2004). Uno de los indicios es la producción de polipéptidos nuevos (Simoneau *et al.*, 1994; Repetto *et al.*, 2003), así como las alteraciones en la actividad hidrolítica de β -1,3-glucanasa y quitinasa (Vierheilig *et al.*, 1994) y en los niveles de glucosinolatos (Vierheilig *et al.*, 2000a) observadas en raíces, seguido a la inoculación con HMA. Recientemente, se encontró un factor difusible proveniente de diferentes HMA crecidos “*in vitro*” que induce la expresión radical del gen específico de la simbiosis con *Rhizobium: MtENOD11* y estimula la formación de raíces laterales en *Medicago truncatula* Gaertn, creándose nuevos sitios potenciales de infección (Olah *et al.*, 2005).

1.3.2. Regulación en la fase simbiótica mediada por mecanismos de defensa

Durante las interacciones planta-HMA se pueden distinguir dos tipos de respuesta defensiva en la planta: una respuesta inicial, generalizada, en los primeros estadios de carácter leve y transitorio, y una segunda respuesta tardía, localizada, más fuerte y restringida a las células que contienen arbusculos (García-Garrido y Ocampo, 2002).

En las raíces micorrizadas son activados tres elementos de la vía de transducción de señales de defensa: la explosión oxidativa (Salzer *et al.*, 1999; Fester y Hause, 2005), la activación del

metabolismo de los compuestos flavonoides (Volpin *et al.*, 1994; Lambais, 2000) y la acumulación de ácido salicílico (AS) (Blilou *et al.*, 2000a;b).

La inducción de la expresión de genes defensivos pudiera ser el resultado del reconocimiento del elicitor fúngico y la activación de las vías de transducción de señales. El nivel relativamente bajo de activación de estos genes, su naturaleza transitoria y su localización alrededor de los arbusculos pudiera deberse a un mecanismo inducido en la planta que suprime o regula la respuesta defensiva activada, permitiendo el crecimiento del hongo en la raíz (García-Garrido y Vierheilig, 2009). Se desconoce cómo el hongo lleva a cabo esta supresión funcional. No obstante, existe evidencia experimental que sugiere que los arbusculos pueden jugar un papel central (Harrison, 2005), siendo probablemente mantenida por la constante formación de nuevos arbusculos (García-Garrido y Vierheilig, 2009).

Se han considerado dos posibles mecanismos para atenuar las respuestas defensivas en la simbiosis MA: la degradación de moléculas elicitoras exógenas producidas por el HMA y/o la prevención de elicitores endógenos liberados de la pared celular vegetal, y la regulación mediada por alteraciones en la vía de transducción de señales conducentes a la respuesta defensiva (García-Garrido y Vierheilig, 2009).

En relación al primero, se ha sugerido que las hidrolasas como quitinasas, quitosanasas y β -1,3-glucanasas, pueden jugar una función regulatoria al ser inducidas diferencialmente durante el desarrollo de la simbiosis (Salzer *et al.*, 2000; Pozo *et al.*, 2002). Se propone que, en el estadio inicial de colonización, las quitinasas de la planta expresadas constitutivamente son las responsables de la degradación de elicitores y, por tanto, de la atenuación del sistema defensivo vegetal, mientras que las isoformas de quitinasa específicas de la micorrización funcionan de forma similar en estadios tardíos (Salzer *et al.*, 2000). No obstante, Lambais (2000) sugirió que el nivel de fósforo pudiera regular al factor responsable de la ruptura de moléculas elicitoras fúngicas y que éste no está relacionado a la actividad quitinasa en la raíz.

Sin embargo, también debe considerarse la prevención de la formación de elicitores endógenos como mecanismo mediador de la regulación defensiva, si se tiene en cuenta que los HMA producen

cantidades bajas de enzimas que degradan la pared celular vegetal (García-Romera *et al.*, 1991a; García-Garrido *et al.*, 1992a). En contraste, las plantas hospederas activan genes de enzimas específicas de la micorrización que degradan la pared celular vegetal (Maldonado-Mendoza *et al.*, 2005) alterando su estructura sin debilitarla, lo cual permite el crecimiento del hongo pero evita la lisis y la consecuente producción de elicitores endógenos (García-Garrido y Vierheilig, 2009).

El segundo mecanismo consiste en el bloqueo de componentes de la vía de transducción de señales que activan la respuesta defensiva, constituyendo posibles candidatos el AS y las especies reactivas del oxígeno (ROS, siglas en inglés), los cuales han sido implicados como segundos mensajeros en las asociaciones MA. Respecto al AS, se han detectado incrementos transientes en raíces de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y de arroz (*Oryza sativa* L.) micorrizadas, mientras que su aplicación exógena no afectó la formación del apesorio pero retardó el establecimiento de la simbiosis (Blilou *et al.*, 2000a;b). También se demostró que plantas transgénicas de tabaco con niveles reducidos de AS presentan elevados porcentajes de colonización por HMA y plantas con altos contenidos de AS, en cambio, exhiben reducidos niveles de colonización radical (Herrera-Medina *et al.*, 2003).

1.3.3. Otras vías de regulación

Activación de un programa de genes simbióticos: Estudios moleculares han revelado que varios tipos de genes son inducidos durante la simbiosis MA. Algunos de estos ejemplos son genes tempranos de nodulinas (van Rhijn *et al.*, 1997), el gen de leghemoglobina *VFLb 29* (Frühling *et al.*, 1997) y genes relacionados con acuoporinas (Porcel *et al.*, 2006); los cuales también son inducidos en la interacción bacteria-leguminosas.

Resultados de análisis fisiológicos, bioquímicos y genéticos de diversos mutantes afectados simbióticamente (SYM⁻) muestran que varios genes están involucrados en la percepción de señales del hongo y/o en la vía de transducción de estas señales. Los primeros genes identificados codifican para proteínas kinasas similares a receptores de simbiosis (*SYMRK*) (Endre *et al.*, 2002). Otros de los genes son los *DMI*, cuyos productos actúan en la regulación de las oscilaciones rápidas en los niveles de calcio citoplasmático (Catoira *et al.*, 2000).

La penetración del hongo en la epidermis radical y la colonización de la corteza son dos eventos claves en el desarrollo de esta simbiosis, siendo mediados por otros genes *SYM* (Parniske, 2004). En el primer evento se ha observado la participación del gen *LjSym15* (Demchenko *et al.*, 2004) y la planta regula este proceso, quizás, mediante las enzimas hidrolíticas. En el segundo se ha demostrado que los genes *SYMRK* y *LjSym4* juegan un papel esencial (Demchenko *et al.*, 2004). Además, se ha comprobado que los genes *SYM* del hospedero son requeridos para la formación de los arbusculos y su recambio, entre ellos: *PsSym36*, *PsSym33* y *PsSym40* (Guinel y Geil, 2002; Jacobi *et al.*, 2003).

Regulación hormonal: Algunos autores han sugerido que las interacciones micorrízicas pudieran ser reguladas hormonalmente (Ludwig-Müller, 2000; Hause *et al.*, 2007). Esto se sustenta en el hecho que las fitohormonas regulan el crecimiento vegetal y la morfogénesis, donde los procesos morfológicos y citológicos de adaptación son esenciales.

Niveles incrementados de citokininas y giberelinas han sido detectados en plantas micorrizadas (van Rhijn *et al.*, 1997; Ginzberg *et al.*, 1998), encontrándose además producción de éstas por los HMA (Barea y Azcón-Aguilar, 1982). La aplicación exógena de diferentes dosis de ácido giberélico afecta la morfología de los arbusculos y puede inhibir la colonización (El Ghachtouli *et al.*, 1996). En cuanto a las citokininas, se ha propuesto una participación importante en la supresión de las respuestas defensivas de la planta y en la regulación de la formación micorrízica.

Por su parte, el contenido de ácido indol-3-butírico, libre y conjugado, mostró un incremento en hojas y raíces de maíz (*Zea Mayz* L.) micorrizado (Fitze *et al.*, 2005), facilitando la colonización mediante el incremento en la formación de raíces laterales e indicando una compleja regulación del metabolismo de las auxinas en plantas micorrizadas, que incluye la regulación de la síntesis y el transporte de esta fitohormona.

En hifas de HMA se han detectado niveles de ácido absícico superiores al de las raíces (Esch *et al.*, 1994), y se especula que pudiera controlar el flujo de agua y sales minerales del suelo a las hifas o de otras estructuras fúngicas, tales como los arbusculos, a las células radicales (Ruíz-Lozano, 2003).

Otro estudio demostró que el mismo desempeña un papel esencial en el establecimiento de una

simbiosis MA funcional y sugirió que el etileno juega una función antagónica regulando la acción de éste (Herrera-Medina *et al.*, 2007).

Experimentos recientes mostraron una correlación positiva entre jasmonatos endógenos en raíz y la colonización MA (Hause *et al.*, 2002), observándose el incremento en estadios tardíos y acompañado por la expresión de genes que codifican para una enzima involucrada en la síntesis de jasmonato y para una proteína inducida por éste, cuya expresión génica se localizó en células radicales que contenían arbusculos. Asimismo, la reducción en los niveles de ácido jasmónico (AJ) estaba acompañada por un retardo en la colonización, lo cual apunta a una función específica en el mantenimiento de la homeostasis planta-HMA (Hause *et al.*, 2007).

Estudios realizados por Besmer y Koide (1999) y por Geil y Guinel (2002) sugieren dos papeles potenciales para el etileno, principalmente a nivel de la interfase corteza-epidermis: la modulación de la vía de transducción de señales mediadas por calcio en las células vegetales, y una implicación en la respuesta defensiva de la planta; aunque no existe evidencia directa de su función específica en esta simbiosis.

Autorregulación micorrízica: En los últimos años se han acumulado evidencias de que una vez que las plantas son colonizadas por los HMA, para limitar el costo energético de la simbiosis, se suprimen colonizaciones radicales posteriores por estos hongos (García-Garrido y Vierheilig, 2009). Esto ocurre por alteraciones en el patrón de exudación radical, ya sea de los compuestos flavonoides (Vierheilig, 2004) o de las estrigolactonas (Lendzemo *et al.*, 2007). El P ha sido excluido como factor regulatorio de este efecto supresor (Vierheilig *et al.*, 2000b). Asimismo, el incremento sistémico de niveles de AJ en raíces micorrizadas (Vierheilig y Piché, 2002) pudiera contribuir a la autorregulación micorrízica.

1.4. Estudios enzimáticos en plantas micorrizadas

Enzimas involucradas en la penetración del hongo en raíces: Se plantea que la penetración del HMA a través de los pelos radicales o de las células epidérmicas de la raíz ocurre, probablemente, por la combinación de procesos mecánicos (presión ejercida por la hifa de penetración) y enzimáticos (acción de enzimas que degradan la pared celular vegetal) (Smith y Read, 2008). Esta

hipótesis se sustenta en los resultados obtenidos al evaluar la actividad de varias de estas enzimas en raíces micorrizadas y en los propios hongos.

En raíz de lechuga (*Lactuca sativa* L.) colonizada por *G. mosseae* se encontraron incrementos de las actividades endo-polimetilgalacturonasa y pectin esterasa, aunque no se detectaron cambios en las actividades exo-polimetilgalacturonasa ni pectato y pectin liasas (García-Romera *et al.*, 1991b). También se ha observado aumento de la actividad endo-glucanasa (celulasa) en micelio externo de *G. fasciculatum* (Thaxter) Gerd. & Trappe y en raíces de lechuga inoculadas con este hongo (García-Garrido *et al.*, 1992b).

La inoculación de varias especies de *Glomus* en soya (*Glycine max* L.) indujo diferencias en los niveles de actividad de las enzimas que degradan la pared celular vegetal mencionadas (García-Garrido *et al.*, 2000), siendo posible que la variación en los niveles de colonización del tejido radical pudiera estar relacionada con la capacidad del hongo para producir estas enzimas. Sin embargo, no se detectó un alto grado de polimorfismo isoenzimático de endo-xiloglucanasa en raíces colonizadas ni en micelio externo entre distintas especies de *Glomus* (García-Garrido *et al.*, 2000).

Enzimas relacionadas con los mecanismos de defensa en plantas: Entre los sistemas enzimáticos involucrados en los mecanismos defensivos en las plantas, que han sido estudiados en la interacción de éstas con los HMA, se destacan las hidrolasas como quitinasa y β -1,3-glucanasa y enzimas de la vía de los fenilpropanoides como la fenilalanina amonio liasa (PAL).

Las quitinasas catalizan la hidrólisis de la quitina y las β -1,3-glucanasas hidrolizan los enlaces β -O-glicosídicos de las cadenas poliméricas de β -1,3-glucano. Ambos sustratos constituyen moléculas de superficie en los HMA. La concentración de estas enzimas pudiera ser particularmente alta en la interface arbuscular donde la pared celular del hongo es delgada y la quitina no está altamente polimerizada (Bonfante-Fasolo *et al.*, 1990; Balestrini y Bonfante-Fasolo, 2005).

En estadios tempranos de la colonización micorrízica de diferentes especies vegetales, incluyendo el tomate, se ha observado inducción transitoria de actividad quitinasa y β -1,3-glucanasa, incrementos en la transcripción de los genes que codifican para éstas e inducción de nuevas isoformas (Spanu *et*

al., 1989; Volpin *et al.*, 1994; Blee y Anderson, 1996; Pozo *et al.*, 2002; Pérez, 2010). También se ha informado la expresión de quitinasa ácida clase III y β -1,3-glucanasa en estadios tardíos de la micorrización (Dumas-Gaudot *et al.*, 1996; Salzer *et al.*, 2000). Como se aprecia, existe controversia respecto a la inducción de estas dos enzimas, sin embargo, hasta el momento se han estudiado muy pocas especies de HMA.

La PAL pertenece a la clase de las liasas y cataliza el primer paso en la biosíntesis de los fenilpropanoides (Lister *et al.*, 1996), entre los que se encuentran la lignina, suberina, fitoalexinas, flavonoides y compuestos fenólicos en general. La inducción transitoria de actividad de esta enzima fue reportada en raíces de alfalfa (*Medicago sativa* L.) inoculadas con *G. intraradices*, que al manifestarse posterior al incremento de quitinasa, se asoció a la penetración del hongo en la raíz y no a las señales previas (Volpin *et al.*, 1994).

Además, se encontró acumulación de transcritos de ARNm en las células que contenían arbusculos en la interacción *G. intraradices*-frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Blee y Anderson, 1996) y en estadios tempranos de la colonización radical de alfalfa por *G. versiforme* Daniels & Trappe (Harrison y Dixon, 1993), así como en arroz inoculado con *G. mosseae* donde coincidió con la formación del apesorio y la penetración de la epidermis radical (Blilou *et al.*, 2000b).

Otra enzima cuya actividad se relaciona a la defensa en plantas es la polifenol oxidasa (PPO), que cataliza reacciones de oxido-reducción de compuestos fenólicos con la participación del O₂ (Mayer, 2006). Aunque existen muy pocos trabajos sobre esta enzima en plantas micorrizadas, los resultados son interesantes. Incrementos en su actividad y una nueva isoenzima PPO fueron detectados en 3 especies de *Ziziphus zizyphus* L. inoculado con *G. fasciculatum* (Mathur y Vyas, 1995). Pérez *et al.*, (2004) encontraron incrementos en esta actividad en estadios tempranos de la colonización durante la interacción del tomate con *Rhizophagus clarus*, syn. *G. clarum* (Nicolson & Schenck) Walker & Schüßler y *Claroideoglossum claroideum*, syn. *G. claroideum* (Schenck & Sm.) Walker & Schüßler, no así con *G. fasciculatum* ni *A. scrobiculata*; mientras que en estadios tardíos de la colonización sólo *R. clarus* y *A. scrobiculata* incrementaron esta actividad.

Recientemente, Pérez (2010) demostró que la capacidad de los HMA para inducir respuestas defensivas en plantas, así como la presencia de estructuras fúngicas intrarradicales, permiten definir las diferencias en la actividad simbiótica entre cuatro cepas; particularmente en la rapidez en que superan la fase de estrés biótico en el cultivo del tomate cv. 'AMALIA' y comienzan a comportarse como simbioses; por lo que utilizó estas variables como criterio de selección de cepas más asociativas y eficientes en términos de bioprotección. Este autor encontró que en las dinámicas de las actividades enzimáticas evaluadas, por lo general, se obtienen dos incrementos, el primero entre los 15 y 18 días y el segundo hacia los 30 y 33 días, momentos que se corresponden con las dos fases descritas para este tipo de interacción.

Sistemas de defensa antioxidantes: Los sistemas biológicos poseen otros mecanismos defensivos bien regulados, en específico para minimizar los efectos tóxicos de las ROS, los que pueden ser enzimáticos y no enzimáticos. Estos mecanismos atrapan e inactivan eficientemente las ROS, lográndose el balance entre la producción y la destrucción de las mismas (Polle, 1997).

Entre los principales antioxidantes enzimáticos se encuentran las enzimas que remueven oxidantes tóxicos como las superóxido dismutasas (SOD), las peroxidasas (POX), las catalasas (CAT) y la glutatión reductasa (GR) (Mittler, 2002; Matsumura *et al.*, 2007). Los mecanismos específicos que modulan la expresión de los genes antioxidantes en el estrés oxidativo son poco comprendidos aún, especialmente de los genes que codifican las distintas isoenzimas de una misma proteína, las cuales tienen un patrón de expresión diferencial, su regulación es compleja y se localizan en varios tejidos, tipos celulares y organelos (Scandalios *et al.*, 1997).

La metaloproteína SOD constituye una de las defensas primarias de mayor importancia, llevando a cabo la dismutación de los radicales superóxido (O_2^-) a H_2O_2 y O_2 (Fridovich, 1995). La CAT es un tetrámero que contiene el grupo Fe-porfirina y cataliza la dismutación del H_2O_2 a agua y O_2 en los peroxisomas. La acción combinada de estas dos enzimas resulta muy eficiente al evitar la formación de los radicales hidroxilo ($OH\cdot$) (Scandalios, 1994).

Las enzimas POX son una subclase de oxidoreductasas que usan como agente oxidante el H_2O_2 , las cuales han sido utilizadas para detectar variabilidad intra e interespecífica. Se conocen varios tipos,

entre ellas la guayacol-peroxidasa (GPX) y la ascorbato peroxidasa (APX). En particular la GPX cataliza la oxidación de compuestos fenólicos, mientras que la APX oxida el ascorbato, constituyendo la más importante que opera tanto en el citosol como en los cloroplastos (Asada, 1992; Passardi *et al.*, 2004).

Otra enzima antioxidante que participa en la regulación de los niveles de glutatión y ascorbato, oxidado y reducido, mediante su participación clave en el ciclo glutatión-ascorbato, es la GR, que se localiza fundamentalmente en los cloroplastos y sus funciones están muy interconectadas con el resto de las enzimas (Noctor y Foyer, 1998).

Los sistemas antioxidantes no enzimáticos pueden ser metabolitos lipofílicos como los carotenoides, los tocoferoles y los polifenoles; o hidrofílicos como el glutatión y el ascorbato, que pueden secuestrar directamente las ROS o servir como sustratos para los sistemas de protección enzimáticos (Foyer, 1993).

Los carotenoides están asociados a las membranas, protegiéndolas de la peroxidación lipídica y participan en la regeneración del tocoferol (vitamina E) (Baroli y Niyogi, 2000). Los tocoferoles se encuentran libres en la matriz lipídica de las membranas y aparentemente juegan un papel en el control de la fluidez y la estabilidad de las mismas, pudiendo también inhibir la peroxidación lipídica (Foyer *et al.*, 1994).

El ascorbato, soluble y abundante en los cloroplastos, tiene un papel central en la prevención del daño oxidativo mediante la inactivación directa de algunas ROS, tales como oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), O_2^- y $\text{OH}\cdot$, en la regeneración del α -tocoferol y como sustrato de la enzima ascorbato peroxidasa (Noctor y Foyer, 1998). El glutatión, al inactivar el $^1\text{O}_2$ y el $\text{OH}\cdot$, protege los grupos tiol de las enzimas del estroma de los cloroplastos y también se asocia a la regeneración del α -tocoferol y del ascorbato a través del ciclo glutatión-ascorbato (Asada, 1994; Foyer *et al.*, 1994).

Actividad antioxidante durante la micorrización: Evidencias directa e indirecta indican que los niveles de H_2O_2 se incrementan en la simbiosis MA, detectándose alrededor de las hifas de penetración, en las células radicales que contienen arbusculos intactos y colapsados y en la

superficie de las hifas intercelulares; sugiriendo una relación entre la acumulación de este compuesto y la senescencia arbuscular (Salzer *et al.*, 1999; Fester y Hause, 2005).

Aunque no se conoce el significado molecular de la acumulación citoplasmática localizada de ROS, se especula que los compuestos oxidativos producidos durante el proceso de colonización pudieran activar las respuestas defensivas de la planta, similar a la explosión oxidativa que tiene lugar en las interacciones patogénicas. Esto conlleva a alteraciones en la producción de enzimas antioxidantes, cuya acumulación en las células que contienen arbusculos pudiera deberse a una regulación localizada de los mecanismos de defensa (García-Garrido y Vierheilig, 2009).

Estudios con *Allium porrum* L. colonizado por *G. mosseae* (Spanu y Bonfante-Fasolo, 1988) y con maíz inoculado con *G. intraradices* (Fries *et al.*, 1996) mostraron incrementos ligeros y transitorios de actividad POX en estadios tempranos de la colonización, la que decreció con el establecimiento total de la simbiosis. En raíces de frijol micorrizadas se detectó un patrón similar de actividad GPX (Lambais, 2000; Lambais *et al.*, 2003). En la interacción tabaco-*G. mosseae* se ha observado inducción temprana de las actividades APX y CAT durante la formación del apresorio y la penetración fúngica radical (Blilou *et al.*, 2000a).

Sin embargo, se han encontrado aumentos en la actividad POX en estadios avanzados de la simbiosis (Mathur y Vyas, 1995; Rodríguez *et al.*, 2001). Estos mismos autores detectaron nuevas isoenzimas POX en raíces de *Ziziphus* y tomate inoculado con *G. fasciculatum* y *R. clarus*, respectivamente, no así en la interacción tomate-*G. fasciculatum*. En contraste, en las interacciones maíz-*G. intraradices* y tomate-*G. mosseae* se manifestaron sólo diferencias en la intensidad de las bandas en los patrones de actividad POX (Fries *et al.*, 1996; Pozo, 1999).

Respecto a la SOD, en las esporas del hongo *G. mosseae* se ha encontrado actividad CuZn-SOD y en las raíces de trébol (*Trifolium pratense* L.) inoculadas con este hongo se han observado isoenzimas nuevas de Mn-SOD y CuZn-SOD (Palma *et al.*, 1993). Además, se detectó una isoforma de Mn-SOD específica de raíces de tomate micorrizado con *G. mosseae* y *G. intraradices* (Pozo *et al.*, 2002). Contradictoriamente, el patrón de isoenzimas SOD de raíces de guisante (*Pisum sativum* L.) inoculado con *G. mosseae* no se alteró (Arines *et al.*, 1994), mientras que en raíces de cebolla y

trébol se observó la inducción de una isoenzima nueva de CuZn-SOD en la interacción con *G. mosseae*, pero no con *G. intraradices* (Martin *et al.*, 1998).

En resumen, los niveles de actividad enzimática y/o patrones de isoenzimas en la simbiosis MA difieren en el tiempo y dependen de las combinaciones planta-hongo, aunque en la mayoría de los casos los estudios se limitan a la inoculación de una especie, siendo pocos los que utilizan dos especies o más, y más escasos aun los que comparan especies distintas de *Glomus*.

1.5. Significado de las micorrizas en el sistema suelo-planta

Las micorrizas desempeñan diversas acciones positivas en los ecosistemas, por lo que poseen una función relevante en la sostenibilidad (Jeffries y Barea, 2001). Entre estas acciones se destacan:

- Incremento de la absorción y translocación de nutrientes: El efecto beneficioso más y mejor estudiado que ejercen las micorrizas sobre las plantas es, sin duda, el que conduce a una mejora del crecimiento y rendimiento así como de su estado nutricional (Baar, 2008). Se ha confirmado que el micelio externo de estos hongos puede absorber diversos nutrientes de micro-hábitats distantes de la superficie de la raíz y transferírselos a las plantas con las que se asocian; entre los que se destacan el P (Smith y Read, 2008), el N (Gobert y Plassard, 2008) y el K (Harley y Wilson, 1959). Debido a esto y al uso más eficiente que hacen de los nutrientes (Rivera *et al.*, 2007), las plantas micorrizadas presentan generalmente una mayor biomasa que sus respectivas plantas control.
- Protección frente a estreses abióticos: La simbiosis micorrízica contribuye a incrementar la resistencia/tolerancia de las plantas a la sequía (Ruiz-Lozano *et al.*, 2008), a la salinidad (Jahromi *et al.*, 2008), a estados de deficiencia en nutrientes (Rivera *et al.*, 2007) y al exceso de metales pesados (Regvar y Vogel-Mikus, 2008).
- Aumento de la actividad fotosintética: La presencia del hongo en la raíz estimula la fotosíntesis, demostrándose que las plantas dirigen de un 3 a un 20% o más de fotosintatos al sistema radical (Smith y Read, 2008).
- Contribución al manejo de patógenos: Diversos autores han informado que los HMA son capaces de reducir la severidad de enfermedades producidas por especies fúngicas (Fritz *et al.*, 2006; Noval

et al., 2007), algas fundamentalmente del género *Phytophthora* (Poza *et al.*, 2002; Yamamizo *et al.*, 2006) y nematodos formadores de agallas (Li *et al.*, 2006).

- Mejora del enraizamiento de las plantas: Esta actividad está basada en la producción por los hongos de hormonas, vitaminas u otras sustancias fitoactivas.
- Mejora de la estructura del suelo: Las hifas de los HMA están implicadas en la formación de agregados estables del suelo, un aspecto clave de la calidad de éste. El micelio extrarradical y las propias raíces actúan como nexo de unión de las partículas orgánicas e inorgánicas del suelo, facilitado por la liberación de glomalina y proteínas relacionadas a ésta (Rillig y Mummey, 2006; Miransari *et al.*, 2008).
- Favorecimiento de la diversidad de las comunidades de plantas y la sucesión vegetal: Cada planta muestra un nivel de compatibilidad mayor con determinados ecotipos de hongos micorrizógenos, por lo que la conservación de la diversidad de los mismos en los ecosistemas beneficia la diversidad y sucesión de las plantas (Clark *et al.*, 2009).

Es importante aclarar algunos términos relacionados con la simbiosis micorrízica, como son la infectividad y la eficacia simbiótica, por su trascendencia en este trabajo. La infectividad refleja la capacidad de los HMA para colonizar el sistema radical y está caracterizada por las variables del hongo: colonización micorrízica, intensidad y abundancia arbuscular. Donde, la colonización indica la presencia del hongo en el sistema radical, la intensidad expresa en qué medida el hongo coloniza la corteza radical (crecimiento intrarradical u ocupación fúngica) y la abundancia arbuscular indica la frecuencia de arbusculos presentes en la raíz.

La eficacia simbiótica se refiere a la magnitud en que los HMA benefician a las plantas colonizadas en los distintos aspectos antes mencionados en este acápite. Particularmente en este estudio, manifiesta la capacidad de los hongos para promover el crecimiento y desarrollo vegetal y está caracterizada por las variables de crecimiento de las plantas (altura, masa seca, área foliar) y nutricionales (contenidos totales de N, P y K).

1.6. El cultivo del tomate. Respuestas de su interacción con los HMA

El cultivo del tomate (*Solanum lycopersicon* L.) requiere para su crecimiento temperaturas entre 10 y 26°C, humedad relativa baja y alta luminosidad. Se siembra preferentemente en suelos franco-arenosos, retentivos, con buen drenaje y alto contenido de materia orgánica, profundos y con pH entre 5,8 y 6,5. Se encuentra entre las hortalizas de mayor consumo a nivel mundial con una producción anual de más de 92,9 millones de toneladas (FAOSTAT, 2012). La extensión de su cultivo responde a una demanda creciente, derivada de su papel fundamental en los hábitos alimentarios de un amplio sector de la población.

En Cuba, constituye la hortaliza principal, tanto por el área que ocupa como por su producción. El tomate comprende el 50% del total de áreas dedicadas al cultivo de las hortalizas y anualmente se siembran más de 63 000 ha. La producción anual alcanza 802 600 ton (FAOSTAT, 2012).

El cv. de tomate 'AMALIA' se caracteriza por sus elevados rendimientos (28-64 ton ha⁻¹) y buen comportamiento frente a enfermedades del follaje como plagas y virus. Las plantas son ligeramente abiertas, de crecimiento determinado, con un ciclo entre 90 y 120 días (Álvarez *et al.*, 1997).

En Cuba existen evidencias de los beneficios de la inoculación con los HMA para el tomate, destacándose el incremento en los rendimientos y el ahorro de cantidades de nitrógeno a suplementar. Estos resultados se obtuvieron en suelos Ferralítico Rojo Lixiviado (Mujica y Medina., 2008), Hidromórfico Gley Nodular Ferruginoso y Pardos Mullidos con carbonatos (Rivera *et al.*, 2003; 2007).

Por su parte, Dell' Amico *et al.*, (2002) observaron un efecto positivo de la cepa *R. clarus* sobre el crecimiento y las relaciones hídricas de las plantas de tomate afectadas por un ciclo de sequía y recuperación, lo cual se manifestó a través del incremento en el área foliar, la apertura estomática, la actividad fotosintética y la conductividad hidráulica de las raíces.

Asimismo, Pérez *et al.*, (2010) encontraron que la cepa *G. hoi-like* resultó eficaz en la bioprotección del tomate frente a los patógenos *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) Jones & Grout., *Oidiopsis taurica* (Salm.) Lev. y *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, al reducir la severidad de los daños provocados por los mismos, en condiciones de suelo Ferralítico Rojo Lixiviado.

Materiales Y Métodos

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplimentar los objetivos propuestos se llevó a cabo el plan experimental que se muestra en la Figura 1.

Material vegetal

Se utilizó como hospedero el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L., syn. *Lycopersicon esculentum* Mill.) (Código Internacional de Nomenclatura Botánica), cv. 'AMALIA', el cual fue obtenido por el Departamento de Mejoramiento Genético del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) (Álvarez *et al.*, 1997).

Hongos micorrizógenos arbusculares (HMA)

Se utilizaron seis cepas con distintas características morfológicas (Anexo II): dos ecotipos de *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe, *Glomus intraradices* Schenck & Smith, *Acaulospora scrobiculata* Trappe, *Glomus hoi-like* y *Glomus* sp1. Las mismas proceden de la colección de HMA del Laboratorio de Micorrizas del INCA y fueron aisladas de distintas localidades del país.

Los inóculos de los HMA fueron producidos en condiciones controladas usando *Sorghum bicolor* L. como planta trampa (INCA, 2001). La concentración del producto activo y la pureza fueron certificadas por el Laboratorio de Control de la Calidad de Micorrizas del INCA.

2.1. Caracterización y selección de hongos micorrizógenos arbusculares en las fases del establecimiento de la simbiosis con tomate

El experimento I se realizó con el objetivo de caracterizar algunas cepas de HMA de la colección del INCA, en función de las variables del hongo colonización micorrízica e intensidad, el crecimiento de las plantas y variables bioquímicas relacionadas con el proceso simbiótico (actividad de enzimas involucradas en los procesos de defensa y patrones de isoenzimas con elevado polimorfismo según Triest (1992) y Vázquez *et al.*, (2000)). Además, seleccionar dos cepas diferentes o contrastantes en estructura, procedencia y funcionamiento, basado en la caracterización realizada durante las dos fases del establecimiento de la simbiosis con tomate.

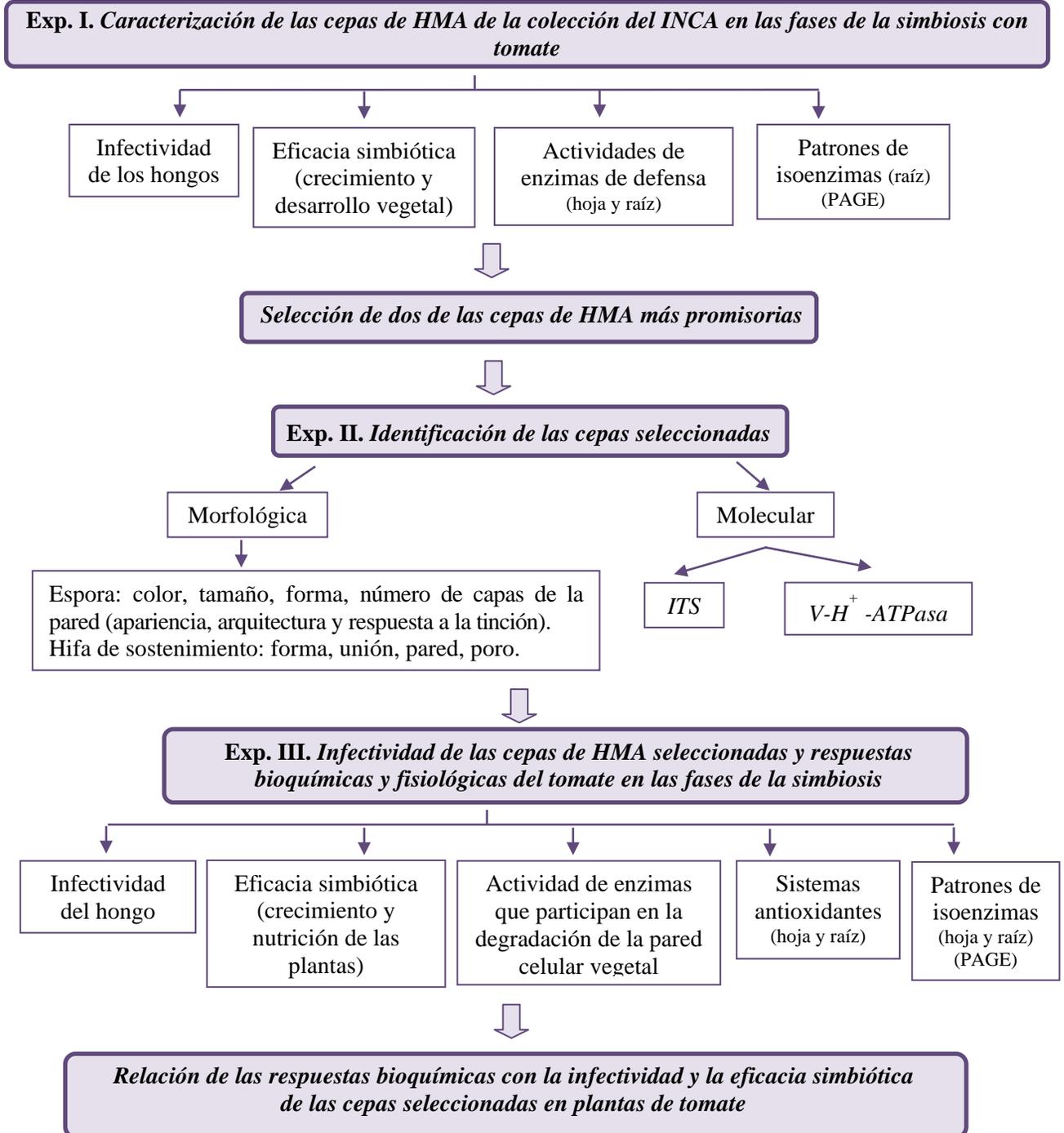


Figura 1. Esquema de trabajo.

Condiciones de siembra y crecimiento de las plantas: Las semillas de tomate fueron desinfectadas utilizando una solución comercial de hipoclorito de sodio (10%) durante 10 min (Ortega y Rodés, 1986) y luego de decantar esta solución se lavaron varias veces con abundante agua destilada estéril. Posteriormente, se sembraron cinco semillas en macetas de 300 mL de capacidad, conteniendo como sustrato una mezcla estéril de suelo Ferralítico Rojo Lixiviado (Hernández *et al.*, 2006) y cachaza, en proporción 3:1 (v/v), cuyas características químicas se muestran en la Tabla 2. La esterilización se efectuó en autoclave a 121°C durante dos horas, en ciclos de tres días seguidos.

Tabla 2. Características químicas del sustrato utilizado en el experimento I: suelo Ferralítico Rojo Lixiviado-cachaza (3:1)

pH (H ₂ O)	MO (%)	N (%)	P ₂ O ₅ (mg L ⁻¹)	K ₂ O	Ca ²⁺ (cmol kg ⁻¹)	Mg ²⁺	Na ⁺
7,8	3,7	0,69	159	0,87	26,2	1,4	0,32

Determinaciones (Paneque, 2002): pH H₂O (conductividad), Materia orgánica MO (Walkley y Black), N (MO x 0,05), P (Oniani), Cationes (Maslova).

El experimento se realizó en diciembre. Las plantas crecieron en casa de cristal, a una temperatura promedio de 25±3°C, humedad relativa de 75-80% y fotoperiodo natural. A los siete días de germinadas las semillas se realizó un raleo dejando una planta por maceta.

Obtención y desinfección de las esporas e inoculación: Las esporas se obtuvieron a partir de inóculos certificados, para su extracción se procedió según el protocolo descrito por Gerdemann y Nicholson (1963), modificado por Herrera *et al.*, (1995). Luego se lavaron con agua destilada y se vertieron en placa Petri para su conteo y selección, con el uso del microscopio estéreo 70x (Stemi 2000-C). Se depositaron 200 esporas en tubos eppendorf de 1,5 mL, con 300 µL de solución Ringer para conservarlas hasta el momento de la desinfección. Un litro de la solución Ringer contenía NaCl 7,5g, KCl 0,75g, CaCl₂ 0,1g y NaHCO₃ 0,1g.

La desinfección de las esporas se realizó mediante una modificación del protocolo propuesto por Mosse (1962). Para lo cual, se sumergieron en una solución de cloramina T al 2% durante 10 min y, posteriormente, se lavaron tres veces con agua destilada estéril. A continuación, se les añadió una solución de cloramina T al 5% por 10 min y se lavaron cinco veces con agua destilada estéril. Este método permite un porcentaje de germinación de las esporas de 95%. La inoculación se realizó

añadiendo 200 esporas desinfectadas, de cada una de las seis cepas, por maceta, en el momento de la siembra y con el propósito de eliminar contaminantes superficiales de las esporas.

Muestreo y evaluación: La toma de muestras se efectuó a los 18 y 32 días después de la germinación, tiempos definidos teniendo en cuenta el estudio de Pérez (2010). El material vegetal fue separado en hojas, tallos y raíces; estas últimas fueron cuidadosamente lavadas dividiéndose en tres grupos. Una porción se empleó para la determinación de las variables del hongo, otra para las actividades enzimáticas, mientras que la tercera se utilizó para la determinación de los patrones isoenzimáticos.

Diseño experimental

El experimento se desarrolló tres veces en los años 2000-2002 siguiendo un diseño completamente aleatorizado, por lo que se muestran los resultados de la media de los tres. Los tratamientos estuvieron conformados por 15 plantas y se evaluaron tres grupos de 5 de ellas en cada periodo de muestreo (n=9).

2.1.1. Cuantificación de la colonización micorrízica e intensidad

Para la determinación de las variables del hongo se tomaron aproximadamente 200 mg de raíces secundarias en cada muestra, las cuales fueron secadas en estufa a 70°C hasta masa constante, para ser teñidas según la metodología descrita por Phillips y Hayman (1970). La evaluación se realizó en microscopio estéreo 70x (Stemi 2000-C) y luego se utilizó el método de los interceptos, desarrollado por Giovanetti y Mosse (1980), para la determinación del porcentaje de colonización micorrízica. La intensidad o Densidad Visual se determinó según la metodología descrita por Trouvelot *et al.*, (1986), a través de la evaluación de la ocupación fúngica de cada intercepto asignándosele un nivel a los porcentajes de ocupación según establece dicha metodología.

2.1.2. Evaluación del crecimiento de las plantas

Se determinó la altura de las plantas de tomate, la masa fresca aérea, radical y total, así como la masa seca aérea, radical y total. Las masas frescas se determinaron por pesada en balanza técnica digital (Acom JW-1, nivel de precisión 0,001), mientras que las masas secas se determinaron en material sometido a secado a 70°C en estufa hasta masa constante. El cálculo de la masa total se

realizó mediante la sumatoria de las masas de las partes aéreas y radicales evaluadas, por planta. Se calculó la tasa relativa del crecimiento (TRC) de acuerdo con Beadle (1993). Este indicador es la medida principal del análisis de crecimiento y se define como la ganancia de biomasa por unidad de biomasa y tiempo, según la siguiente ecuación:

$$\text{TRC} = (\ln W_2/W_1) / (t_2-t_1)$$

donde: W_1 y W_2 así como t_1 y t_2 son las masas secas y los tiempos al inicio y final del periodo considerado, respectivamente, y se expresó en $\text{g g}^{-1} \text{ día}^{-1}$.

2.1.3. Determinación en raíces y hojas de la actividad de enzimas relacionadas con los mecanismos de defensa en plantas

Preparación de los extractos de proteínas: Se procedió a la extracción de proteínas en raíces y hojas, mediante el método descrito por Solórzano (2002), para lo cual se empleó la solución amortiguadora acetato de sodio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,2), en una relación 1:1 g/mL, y se procesaron tres repeticiones para cada tratamiento. El sobrenadante obtenido se guardó a -20°C para la cuantificación de las actividades enzimáticas.

La concentración de proteínas se determinó por el método descrito por Bradford (1976). La lectura de absorbancia se realizó a 595 nm en espectrofotómetro. Se preparó una curva patrón de seroalbúmina bovina de 6 concentraciones entre $0,05\text{-}0,5 \text{ g L}^{-1}$ a partir de una solución de 1 g L^{-1} .

Los procedimientos de determinación de las actividades enzimáticas fueron estandarizados previamente para las condiciones de ensayo (Solórzano, 2002), donde se estableció para cada caso: concentración de sustrato y de preparado enzimático óptimos y condiciones de temperatura, pH y períodos de incubación adecuados. Todas las lecturas de absorbancia se realizaron en espectrofotómetro (Ultrospec Plus Spectrophotometer, Pharmacia LKB).

Actividad Guayacol-Peroxidasa (GPX) (E.C. 1.11.1.7): Se realizó según el método continuo descrito por Frick (1976), que utiliza como sustratos el guayacol y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y como solución amortiguadora el acetato de sodio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,2). La absorbancia se leyó a 470 nm durante dos min a intervalos de 15 seg en espectrofotómetro. A partir de las lecturas obtenidas se determinó la variación de densidad óptica (DO) en el tiempo (Δt). Para el cálculo de la actividad enzimática se empleó la fórmula:

$$AE = \frac{\Delta DO \cdot V_{ens} \cdot Dil}{\Delta t \cdot k \cdot V_{enz}}$$

donde: k- coeficiente de extinción molar del guayacol ($5,57 \cdot 10^3 \mu\text{mol mL}^{-1}$); Vens- volumen del ensayo; Venz- volumen de extracto enzimático; y Dil- dilución de la muestra.

Actividad Polifenol oxidasa (PPO) (E.C. 1.10.3.1 y 1.10.3.2): Se procedió según el método continuo referido por Alexander (1964), donde el sustrato empleado fue el pirogalol y la solución amortiguadora fosfato de sodio 1 mol L^{-1} (pH 6,8). La absorbancia se monitoreó a 420 nm durante 2 min a intervalos de 15 seg en espectrofotómetro. Al igual que en la actividad GPX, se determinó la variación de DO en el tiempo y se calculó la actividad enzimática de la misma forma, expresándose como $(\Delta DO/\Delta t) \text{ min}^{-1} \text{ mL}_{enz}^{-1}$ al no contarse con el coeficiente de extinción del pirogalol.

Actividad Quitinasa (E.C. 3.2.1.14): Se cuantificó según el método discontinuo reportado por Boller *et al.*, (1983), para lo cual se empleó como sustrato la quitina coloidal preparada a partir de quitina y la solución amortiguadora tetraborato de sodio $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 9,1). La curva patrón se realizó empleando n-acetil-glucosamina (1 g L^{-1}) a partir de 5 concentraciones entre $0,1-1 \text{ g L}^{-1}$. La absorbancia se leyó a 585 nm en espectrofotómetro.

Actividad β -1,3-glucanasa (E.C. 3.2.1.39): Se procedió según el método discontinuo propuesto por Somogyi (1952), el cual utiliza como sustrato la laminarina (β -1,3 glucano) y la solución amortiguadora acetato de sodio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,2). Se cuantificaron los azúcares reductores producidos mediante las lecturas de absorbancia a 660 nm en espectrofotómetro. La curva patrón se realizó con el uso de glucosa como estándar (1 g L^{-1}) y a partir de ésta se prepararon 5 soluciones con concentraciones entre $0,086$ y $2,78 \text{ mmol L}^{-1}$.

Actividad Fenilalanina amonio liasa (PAL) (E.C. 4.3.1.5): Fue cuantificada según el método discontinuo propuesto por Paynet *et al.*, (1971), que utiliza como sustrato la fenilalanina y la solución amortiguadora borato de sodio 1 mol L^{-1} (pH 8,8). El producto formado se cuantificó mediante las lecturas de absorbancia a 275 nm en espectrofotómetro, siendo utilizado el ácido cinámico para preparar la curva patrón con diluciones de concentración entre $0,01-0,55 \text{ g L}^{-1}$.

El cálculo de las actividades quitinasa, β -1,3-glucanasa y PAL se realizó según la fórmula:

$$AE = \frac{DO.Cot.Vens.Dil}{t.Venz}$$

donde: t- tiempo de incubación del ensayo; Vens- volumen de ensayo; Venz- volumen de enzima; Dil- dilución de la muestra; la cotangente (Cot)= $\frac{\sum \text{conc de DO en curva patrón}}{\sum \text{DO}}$

$$\sum \text{DO}$$

En todos los casos, las actividades enzimáticas se expresaron como $\mu\text{moles de producto formado min}^{-1} \text{ mL}_{\text{enz}}^{-1}$ (UAE), mientras la actividad específica se determinó dividiendo la actividad enzimática por la concentración de proteína y se expresó como UAE mg^{-1} proteína.

2.1.4. Determinación en raíces de patrones isoenzimáticos polimórficos mediante geles de poliacrilamida (PAGE)

Preparación de los extractos de proteínas y condiciones de separación: La extracción de proteínas en raíces se realizó según la metodología propuesta por Solórzano (2002) con la modificación de la solución amortiguadora de extracción por Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 7,2) y se procesaron tres réplicas para cada tratamiento. Los sobrenadantes obtenidos correspondientes a los extractos de proteínas se liofilizaron.

Para la separación de las proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida se procedió según el método descrito por Solórzano (2002) con las siguientes modificaciones: se preparó el gel concentrador a 4% de poliacrilamida para todos los sistemas enzimáticos a analizar, mientras que la concentración en el gel separador varió en dependencia de la isoenzima a determinar: 7,5% para peroxidasas (POX), 10% para superóxido dismutasa (SOD) y esterasas (EST) y 8,5% para anhidrasa carbónica (AC).

Las muestras fueron resuspendidas en una solución que contenía Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 6,8), glicerol y azul de bromofenol, para ajustar las concentraciones de proteína a 1 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, de las cuales se aplicaron 20 μL de cada muestra repitiéndose tres veces para cada isoenzima.

Las electroforesis se desarrollaron en un equipo de electroforesis vertical minigel (BIORAD), con la solución amortiguadora Tris -Glicina (pH 8,3). Las corridas se realizaron con una intensidad de 25 miliAmperes, durante 90-120 min a 4°C.

Tinción de POX (E.C. 1.11.1.7): Se efectuó mediante el método descrito por Barreto y Simón (1979), que emplea para la tinción benzidina hidroclicónica, H₂O₂ y ácido acético glacial. Las isoformas aparecieron como bandas azules sobre un fondo blanco.

Tinción de SOD (E.C. 1.15.1.1): Se realizó según la metodología informada por Wendel y Weeden (1989), para lo cual se sumergió el gel en una solución que contenía riboflavina, ácido etileno-diamino tetra-acético (EDTA, siglas en inglés), nitro azul de tetrazolio (NBT, siglas en inglés) y solución amortiguadora Tris-HCl 1 mol L⁻¹ (pH 7,4). Se expuso el gel embebido en la mezcla a luz blanca artificial y tras la aparición de las bandas se incubó en la oscuridad a 37°C durante 4 horas. Se observaron bandas blancas sobre un fondo violeta pálido.

Tinción de EST (E.C. 3.1.1.1 y E.C. 3.1.1.2): Se procedió según la metodología descrita por Iglesias (1986), donde primero se incubó el gel en solución de ácido bórico 3% durante 30 min. Para el revelado se utilizó α naftil acetato, β naftil acetato, sal RR azul rápida y solución amortiguadora fosfato de sodio 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,8). El gel se incubó en la oscuridad a 37°C durante 4 horas hasta la aparición de bandas carmelitas.

Tinción de AC (E.C. 4.2.1.1): Se realizó la tinción según Iglesias (1986), con β naftil acetato (0,5 mg), sal RR azul rápida y solución amortiguadora Tris-HCl 0,5 mol L⁻¹ (pH 7,19). El gel se incubó en la oscuridad a 37°C durante cuatro horas hasta la aparición de bandas rojizas.

En todos los geles fue establecida la posición relativa de cada banda según su R_f, que se obtuvo al dividir la distancia media de migración obtenida, entre la distancia de migración del frente de corrida, según la cual cada banda se caracterizó por un valor numérico.

Se empleó una cámara Nikon F90X y una película Konica (100 Asa) para tomar las fotos de los patrones obtenidos en las PAGEs, posteriormente, las fotos fueron escaneadas en escáner Acer Slim6.

2.2. Identificación de las cepas de HMA seleccionadas

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el primer experimento, se procedió a la identificación de las dos cepas seleccionadas entre las propuestas al comenzar el trabajo (Exp. II).

Aislamiento y selección de las esporas de HMA: Las esporas de las cepas fueron extraídas mediante tamizado húmedo (300 y 38 μm) y centrifugación en gradiente de sacarosa (Dalpé y Hamel, 2007), procediéndose al aislamiento manual de esporas jóvenes homogéneas según su apariencia al microscopio estéreo 70x (Olympus SZ-PT), con auxilio de micropipeta.

2.2.1. Caracterización morfológica

Se examinaron 100 esporas de cada cepa para analizar sus propiedades morfológicas: color, tamaño y forma de las esporas; número, estructura, grosor y tinciones de las capas de la pared, según terminología propuesta por Walker (1983) y Stürmer y Morton (1997); características de la hifa de sostenimiento: forma, número de capas de la pared y grosor, poro. Para ello se realizaron preparaciones permanentes con diferentes soluciones de montaje: alcohol polivinílico- ácido láctico-glicerol (PVLG, siglas en inglés; Omar *et al.*, 1979), PVLG con solución de Melzer (1:1, v/v) y PVLG con Azul de algodón (0,15% en ácido láctico) (1:1, v/v). La clasificación de colores se realizó según el código de la carta de colores de la Colección Internacional del Cultivo de Hongos Micorrizógenos Arbusculares y Vesículo-Arbusculares (INVAM, 2011). Se analizaron, además, las estructuras intrarradicales; para lo cual se utilizaron preparaciones a partir de raicillas inoculadas de *Allium porrum* L. teñidas con fuscina ácida (0,01% en lacto-glicerol) (Kormanik y McGraw, 1982).

Se utilizó un microscopio compuesto Nikon Eclipse 800, equipado con contraste de interferencia diferencial Nomarski y las fotografías se tomaron con una cámara digital Nikon CoolPix 4500. Las mediciones de tamaño y grosor se realizaron con el micrómetro ocular calibrado, con aumentos 400x y 600x.

2.2.2. Caracterización molecular mediante los marcadores ITS y V-H⁺-ATPasa

Obtención de los extractos de ADN de las esporas: Las esporas se lavaron con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente. La extracción de ADN se realizó con la utilización de micro-pistilo plástico, en tubos eppendorf de 0,5 mL que contenían 157 esporas de la cepa *G. hoi*-like a las cuales

se les añadieron 15 μL de la solución amortiguadora de extracción del juego de reactivos PreManUltra (Applied Biosystems), mientras que para la cepa *G. mosseae*1 se partió de 26 esporas en 25 μL . Las esporas maceradas se incubaron a 90°C por 10 min, seguido por incubación a temperatura ambiente por 2 min y centrifugación a 15 000 rpm (International Equipment Company Micromax) por 5 min. El sobrenadante se colectó y diluyó (1:10) en Tris-HCl 10 mmol L⁻¹ (pH 8). Todas las amplificaciones se realizaron en termociclador (Biometra TProfessional). Las polimerasas y los cebadores fueron proveídos por Invitrogen. Las secuencias de todos los cebadores utilizados aparecen en el Anexo III.

Análisis de ITS del ADN ribosomal: Se realizó una amplificación cuya mezcla de reacción contenía 1x de solución amortiguadora Fermentas *Taq* (20 mmol L⁻¹ Tris (pH 8,4) y 50 mmol L⁻¹ KCl), 0,25 mmol L⁻¹ de cada dNTP, 1 mmol L⁻¹ de cada cebador (GLO2A y GLO2R), 0,4 unidades de Fermentas *Taq* polimerasa, 3 mmol L⁻¹ de MgCl₂ y 1 μL de ADN genómico 1-5 ng μL^{-1} , en un volumen final de 10 μL . Se ejecutó el programa: 3 min a 94°C, 38 ciclos de 30 seg a 94°C, 60 seg a 50°C, 90 seg a 72°C, con un ciclo final de 7 min a 72°C, todo según protocolo de Sokolski *et al.*, (2010). Los productos de la PCR se clonaron con el uso del juego de reactivos TOPO TA Cloning® (Invitrogen), empleando el vector pCR®4-TOPO® y la cepa de *Escherichia coli* (TOP10). La selección de las colonias se realizó con kanamicina primero y con ampicilina después. Luego se procedió a determinar y crecer las colonias con el inserto apropiado (650 pb), purificándose los plásmidos con el juego de reactivos GenElute™ Plasmid Miniprep (Sigma). Los dos protocolos se desarrollaron según instrucciones del fabricante para ADNr ITS.

Análisis de V-H⁺-ATPasa: Se utilizaron cinco cebadores nuevos diseñados y gentilmente proveídos por el laboratorio de Micorrizas del Institute Agriculture & Agri-food Canada (AAC). Los cebadores GmossATPup1058 y GmossATPlo2722 fueron diseñados a partir de la secuencia del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (NCBI, siglas en inglés) AY193825, mientras GlomusATPup1150, GlomusATPlo2557 y Gi_HA_F_v2 se basaron en múltiples secuencias de la colección de *Glomus* de AAC.

La mezcla de reacción de las PCRs contenía 1x de solución amortiguadora Titanium *Taq* (3,5 mmol L⁻¹ MgCl₂), 0,1 mmol L⁻¹ de cada dNTP, 0,08 μmol L⁻¹ de cada cebador, 0,5x Titanium *Taq* polimerasa y 1 μL de ADN genómico 1-5 ng μL⁻¹, en un volumen final de 10 μL. Las amplificaciones se realizaron de la siguiente forma: 3 min a 94°C, a continuación 40 ciclos de 30 seg a 94°C, 45 seg a 58°C, 2 min a 72°C y el último ciclo fue seguido por una extensión final de 7 min a 72°C, según protocolo propuesto por Sokolski *et al.*, (2010).

En la primera amplificación para la cepa *G. hoi*-like se utilizaron los cebadores GmossATPup1058 y GimcATPlo2663 (mezcla equimolar de los cebadores GmossATPlo2663, GintraATPlo2663 y GcoroATPlo2663, Sokolski *et al.*, 2010). El producto resultante se usó para llevar a cabo tres PCR anidadas independientes, dos de ellas se realizaron bajo las condiciones descritas, una con el empleo de los cebadores GmossATPup1104, GintraATPup1104 (Sokolski *et al.*, 2010) y GimcATPlo2663, y la otra con GlomusATPup1150 y GimcATPlo2663. En la tercera PCR se utilizaron los cebadores GlomusATPup1150 y GlomusATPlo2557 y se modificó la temperatura para la unión del cebador a las cadenas de ADN, que fue de 52°C.

Para la cepa *G. mosseae*1 se realizaron tres PCRs directamente a partir del ADN extraído, en las cuales se utilizaron las siguientes combinaciones de cebadores: GmossATPup1058 y GmossATPlo2722 en la primera, GmossATPup1104, GintraATPup1104 y GmossATPlo2722 en la segunda, y GmossATPup1058 y GimcATPlo2663 en la tercera.

Los productos de las PCR, en ambos casos, fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa (1,5%) en TAE que contenían bromuro de etidio (0,05 μL mL⁻¹) y se usó solución amortiguadora de corrida TAE 1x (Tris 40 mmol L⁻¹ (pH 7,8), ácido acético y EDTA). Se añadió 1 μL del marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) 1 μg μL⁻¹. Las corridas se realizaron a 60 voltios por 60 min en equipo de electroforesis horizontal (BIORAD). Los fragmentos de ADN fueron visualizados y fotografiados bajo luz ultravioleta.

Análisis de las secuencias: Para la secuenciación de los fragmentos de *ITS* se utilizaron los cebadores M13F y M13R, mientras que para *V-H⁺-ATPasa*, además de los cebadores antes

mencionados, se emplearon GlomusATPup1912, GlomusATPlo1915, GlomusATPup1996, GlomusATPlo1996 (Sokolski *et al.*, 2010) y Gi_HA_F_v2.

La secuenciación se efectuó con el juego de reactivos “Cycle Sequencing BigDye Terminator” 3.1, en un secuenciador automático ABI 3100-Avant (Applied Biosystems/Hitachi), en el laboratorio de Micología de AAC. Las secuencias se editaron manualmente en SeqMan (DNASTAR, 2011) y se compararon con las bases de datos del NCBI a través del BLAST. Se seleccionó el modelo de trabajo en cada caso. El valor del parámetro Gamma y el logaritmo de verosimilitud se estimaron por el método estadístico de máxima verosimilitud. Se utilizó el programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) para alinear las secuencias seleccionadas y construir los árboles filogenéticos correspondientes mediante el método de distancia del vecino más cercano. Se empleó el método de bootstrap con 1000 repeticiones como prueba de filogenia. En los árboles filogenéticos se utilizó la nomenclatura y clasificación de los HMA propuesta por Schüßler y Walker (2010). En el caso de *ITS* se representan las secuencias obtenidas de los distintos clones procesados para cada cepa, tres para *G. hoi-like* y cinco para *G. mosseae*1; además, para esta última especie se elaboró primero un árbol filogenético (Anexo IV) con todas las secuencias de *G. mosseae* provenientes del NCBI que mostraron un 98% de homología con los clones de INCAM-2 y a partir de éste se seleccionó una de cada rama independiente obtenida (tres en total).

2.3. Infectividad de las cepas de HMA seleccionadas y respuestas bioquímicas y fisiológicas del tomate en las fases de la simbiosis. Relación entre las mismas

En el experimento III se evaluó la infectividad (colonización, intensidad y abundancia arbuscular) y la eficacia (crecimiento y nutrición de las plantas), en tomate, de las dos cepas diferentes o contrastantes, para establecer su relación con la actividad y los patrones isoenzimáticos de enzimas relacionadas con la simbiosis (degradan la pared celular vegetal, sistemas de defensa antioxidante y nutrición).

Condiciones de siembra, crecimiento de las plantas e inoculación: Para la siembra y el crecimiento de las plantas se procedió de la forma descrita en el acápite 2.1. Las características químicas del sustrato empleado se muestran en la Tabla 3. En este experimento sólo se estudiaron

las dos cepas de HMA seleccionadas e identificadas, y se utilizó otra variante de inóculo que contenía todos los propágulos característicos de estos microorganismos (esporas, micelio y raíces precolonizadas), siendo aplicados a razón de 4g por maceta en el nicho de siembra de las semillas. Esto garantiza obtener respuestas más cercanas a las que se manifiestan en condiciones naturales y elimina las posibles afectaciones que pudo provocar la ausencia de la micorrizosfera en el experimento I. Los inóculos micorrízicos contenían un promedio de 50 esporas por gramo de inóculo.

Tabla 3. Características químicas del sustrato utilizado en el experimento III: suelo Ferralítico Rojo Lixiviado-cachaza (3:1)

pH (H ₂ O)	MO (%)	N (%)	P ₂ O ₅ (mg L ⁻¹)	K ₂ O	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺
				(cmol kg ⁻¹)			
7,9	3,5	0,58	120	0,71	29,5	5,5	0,16

Determinaciones (Paneque, 2002): pH H₂O (conductividad), Materia orgánica MO (Walkley y Black), N (MO x 0,05), P (Oniani), Cationes (Maslova).

Muestreo y evaluación: La toma de muestras y el procesamiento del material vegetal se realizó de forma similar a lo descrito en el acápite 2.1.

Diseño experimental

En este experimento se utilizó el mismo diseño y réplicas por tratamiento que se describen en el acápite 2.1, realizándose tres veces en diciembre de los años 2004-2006.

2.3.1. Cuantificación de la colonización micorrízica e intensidad

Estructuras fúngicas totales: El porcentaje de colonización micorrízica y la intensidad de la colonización se determinaron de acuerdo a las metodologías descritas en el acápite 2.1.1.

Estructuras fúngicas vivas: Se evaluó la porción viva del hongo mediante la tinción histoquímica de la actividad succinato deshidrogenasa (SDH, E.C. 1.3.99.1), según Tisserant *et al.*, (1993), y se realizaron los cálculos de las dos variables del hongo anteriormente mencionadas, además de la abundancia arbuscular, mediante el procedimiento propuesto por Trouvelot *et al.*, (1986).

2.3.2. Evaluación del crecimiento y nutrición de las plantas

Las variables altura y masa seca de los órganos de las plantas (hojas, tallos, raíces y total (g planta⁻¹)) se determinaron como se describe en el acápite 2.1.2. También, se evaluó el área foliar de las

plantas muestreadas, por tratamiento, mediante el empleo de un sistema de análisis de imagen (Delta-T Devices, UK).

El estado nutricional de las plantas se evaluó en hojas, tallos y raíces mediante la determinación de los contenidos de N, P y K, por digestión húmeda ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{Se}$). Para la determinación del N se procedió según el método de Nessler, el P por la formación de azul de molibdeno y el K por fotometría de llama (Paneque, 2002). Se calculó el contenido total de cada nutriente por órgano y en la planta en total y se expresó en mg planta^{-1} .

Contenido total del nutriente = $(\% \text{ nutriente} * \text{MS}) / 100$

donde: %-porcentaje de cada nutriente por órgano, MS-masa seca del órgano correspondiente.

2.3.3. Determinación de la actividad de enzimas que degradan la pared celular vegetal

Preparación de los extractos de proteínas y actividades enzimáticas endohidrolíticas: Para la extracción de proteínas en raíces se procedió según el método descrito por Solórzano (2002), en el cual se modificó la solución amortiguadora de extracción por fosfato sódico -ácido cítrico (fosfato-citrato, 50 mmol L^{-1} , pH 5); se procesaron tres repeticiones en cada tratamiento. El sobrenadante obtenido se guardó a -20°C para la cuantificación de las actividades enzimáticas. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976) como se describe en el acápite 2.1.3. Los procedimientos de determinación de las actividades enzimáticas fueron estandarizados previamente para las condiciones de ensayo. Las lecturas de absorbancia de las evaluaciones correspondientes a este experimento se realizaron en un espectrofotómetro Genesys 10 UV, Thermo.

Actividad Endo-glucanasa (EG, E.C. 3.2.1.4): Se utilizó Carboximetil celulosa (CMC-RBB, Loewe) como sustrato y la solución amortiguadora fosfato-citrato 50 mmol L^{-1} (pH 5). Se leyó la absorbancia del sustrato degradado a 600 nm. La actividad de la enzima se definió como la absorbancia en función del tiempo de incubación multiplicado por 10^{-2} , según protocolo del fabricante. La actividad específica (Unidades) se definió como AE mg^{-1} proteína.

Actividad Endo-polimetilgalacturonasa (endo-PMG, E.C. 3.2.1.15): Se evaluó por viscosimetría, según metodología propuesta por Rejón-Palomares (1996) y se empleó como sustrato pectina 0,5% y la solución amortiguadora fosfato-citrato 50 mmol L^{-1} (pH 5). La pérdida de la viscosidad de la

mezcla de reacción se valoró con un viscosímetro Cannon-Fenske a 37°C. La actividad relativa (AR) se calculó mediante las siguientes relaciones matemáticas:

$$\%_{30} = \frac{(T_0 - T_{30})}{T_0} \cdot 100 \quad T_{50} = \frac{(50 \cdot T_{30} \cdot V_{ens})}{\%_{30}} \quad AR = \frac{1}{T_{50}} \cdot 1000$$

donde: T_0 y T_{30} son las viscosidades de la mezcla de reacción a los tiempos 0 y 30 min; $\%_{30}$ es la pérdida de viscosidad de la mezcla de reacción a 30 min de reacción; T_{50} es la viscosidad que alcanza la mezcla de reacción a la mitad del tiempo necesario para la pérdida total de su viscosidad y V_{ens} - volumen de ensayo.

La actividad específica (Unidades) se definió como $AR \text{ mg}^{-1}$ proteína a los 30 min.

2.3.4. Determinación en hojas y raíces de las alteraciones asociadas al sistema antioxidante

Estas evaluaciones se realizaron al finalizar el experimento (32 días), momento en el cual las variables del hongo presentaron valores elevados, para obtener una respuesta bioquímica antioxidante al proceso de micorrización.

Preparación de los extractos para estudiar el sistema antioxidante: La extracción se realizó a partir de 1g de hojas o de raíces con la solución amortiguadora fosfato potásico 50 mmol L^{-1} (pH 7,8) en proporción 1:1 (g/mL), el cual contenía polivinil pirrolidona 5% (m/v), EDTA $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, Triton X-100 0,1% (v/v) y fenilmetilsulfonilfluoruro $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Para la enzima ascorbato peroxidasa (APX) se añadió ácido ascórbico 1 mmol L^{-1} a la solución de extracción empleada, ya que es inestable en ausencia del sustrato y se omitió el EDTA, mientras que para la glutatión reductasa (GR) se usó la misma solución amortiguadora con 10 mmol L^{-1} de β -mercaptoetanol. El procedimiento seguido fue el descrito por Solórzano (2002) y se procesaron tres repeticiones en cada tratamiento, siendo guardado el sobrenadante a -20°C hasta su uso posterior. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976) como se describe en el acápite 2.1.3. Los procedimientos para realizar estas determinaciones fueron estandarizados, previamente, para las condiciones de ensayo (Mazorra, 2008).

2.3.4.1. Actividades enzimáticas

Actividad SOD: Se analizó mediante la reducción del NBT según el método de Beyer y Fridovich (1987). En el ensayo se emplearon de 25 a 100 μL del sobrenadante en una mezcla de reacción de 4 mL que contenían la solución amortiguadora fosfato potásico 0,1 mol L^{-1} (pH 7,8), metionina, EDTA y NBT. La reacción se inició con la adición de riboflavina y la exposición bajo luz blanca (40 watt, lámpara fluorescente) durante 5 min y luego se detuvo en la oscuridad. La cantidad de NBT se estimó por la lectura de la absorbancia a 560 nm. Una unidad de actividad SOD se definió como la cantidad de extracto que disminuyó en un 50% la reducción del NBT que se inhibe por la enzima. Se emplearon 25, 40, 60, 80 y 100 μL de extracto para estimar el 50% de inhibición de la reducción del NBT.

Actividad Catalasa (CAT) (E.C. 1.16.1.6): Se utilizaron 10 μL del sobrenadante con la solución amortiguadora fosfato de potasio 50 mmol L^{-1} (pH 7,0) y H_2O_2 , en un volumen de 1,5 mL. La descomposición del H_2O_2 se evaluó cada 10 segundos durante 1 minuto, estimando su contenido a partir de la lectura de la absorbancia a 240 nm (coeficiente de extinción del H_2O_2 43,6 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Una unidad de actividad CAT fue definida como la cantidad de enzima que descompone 1 μmol de H_2O_2 por min a 25°C (Aebi, 1984).

Actividad APX (E.C. 1.11.1.11): Este ensayo se realizó en un volumen de 1 mL de mezcla de reacción que contenía la solución amortiguadora fosfato potásico 50 mmol L^{-1} (pH 7), ácido ascórbico y H_2O_2 como sustratos y el extracto enzimático. El monitoreo de la oxidación del ascorbato dependiente del H_2O_2 se evaluó 10 veces en un intervalo de 100 seg por la lectura de su absorbancia a 290 nm (coeficiente de extinción del ascorbato 2,8 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Una unidad de APX se definió como la cantidad de enzima necesaria para descomponer 1 μmol de ácido ascórbico por min a 25°C (Amako *et al.*, 1994).

Actividad GR (E.C. 1.6.4.2): Se determinó mediante el procedimiento de Carlberg y Mannervik (1985). La mezcla de reacción de 1 mL contenía la solución amortiguadora N-2- hidroxietilpiperazina-N'-ácido etanosulfónico 0,1 mol L^{-1} (pH 7,8), EDTA, MgCl_2 , glutation oxidado,

NADPH y 30 μL de extracto. La velocidad de oxidación del NADPH se monitoreó por la lectura de la absorbancia a 340 nm por 2 min (coeficiente de extinción $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Se usaron dos blancos como controles, uno sin el extracto y otro sin el glutatión oxidado. Una unidad de GR se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de NADPH por min a 25°C .

2.3.4.2. Daño oxidativo a los lípidos

El daño oxidativo a los lípidos o peroxidación lipídica (DOL) se estimó mediante la determinación del contenido de malondialdehído (MDA), como describieron previamente Halliwell y Gutteridge (1989). Para el análisis, se añadieron 100 μL del sobrenadante a 1 mL de la mezcla de reacción que contenía ácido tricloroacético 15%, ácido tiobarbitúrico 0,375% e hidroxitolueno butilado 0,01%, preparado en HCl 0,25 N, y se agitó bien la mezcla. Posteriormente, las mezclas se calentaron a 95°C durante 15 min en tubos eppendorf de 1,5 mL, con orificios en la tapa para permitir la salida de los vapores, se enfriaron en hielo durante 15 min y luego se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min. Se leyó la absorbancia a 532 nm frente a un blanco de agua ultra pura (mili-Q). Se realizó una curva patrón de MDA en el rango de 0,1-10 nmol L^{-1} . Se estimó el DOL por el contenido de MDA y se expresó como MDA g^{-1} de masa fresca vegetal.

2.3.5. Determinación en hojas y raíces de patrones de isoenzimas relacionadas con la simbiosis mediante geles de poliacrilamida (PAGE)

Se utilizaron los mismos extractos de proteínas obtenidos en el acápite anterior (2.3.4), para todas las isoenzimas, excepto para los sistemas fosfatasa ácida (APS) y EST que se prepararon como aparece en el acápite 2.1.4. La separación de las proteínas y la detección de POX, SOD y EST se realizaron según las metodologías descritas en el acápite 2.1.4.

Tinción de PPO: Para la tinción de estas isoenzimas se procedió según Standford y Galston (1970). El revelado se realizó en la solución amortiguadora fosfato sódico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5) con L-prolina y dihidroxi-fenilalanina. Se observaron bandas carmelita oscuro sobre un fondo carmelita más claro.

Tinción de APS (E.C. 3.1.3.2): El revelado de las isoformas se realizó según la metodología informada por Álvarez *et al.*, (2006), con el empleo de la solución amortiguadora citrato $0,5 \text{ mol L}^{-1}$

(pH 5,5), β naftil fosfato de sodio y sal K negra rápida. Se agitó bien la mezcla antes de añadirse al gel, que se incubó en la oscuridad durante 4 horas hasta la aparición de las bandas rojizas.

Se empleó una cámara digital SONY modelo DSC-R1 para realizar las fotos de los patrones obtenidos en las PAGE.

2.3.6. Relación de las actividades enzimáticas y los patrones de isoenzimas con la infectividad y la eficacia simbiótica de las cepas de HMA seleccionadas en plantas de tomate

Se desarrollaron Análisis de Componentes Principales en los distintos grupos de variables (del hongo, de crecimiento y nutrición de las plantas, actividades enzimáticas y patrones isoenzimáticos), procediendo según el tipo de variable, para establecer la relación entre las mismas y seleccionarlas de acuerdo a su contribución a las dos primeras componentes. Sólo se procesaron las isoenzimas polimórficas, con las que se creó una matriz de valores binarios, siendo [1] las bandas presentes y [0] las ausentes. A partir de las variables seleccionadas por grupo, se llevaron a cabo correlaciones bivariadas utilizando el coeficiente de Pearson para las variables continuas y para las discretas (electroforesis) se analizaron los intervalos de confianza para establecer la relación.

Análisis estadístico

Los datos del porcentaje de colonización micorrízica fueron transformados por la función $\arcsen\sqrt{x}$ de acuerdo con Lerch (1977). Se comprobó la normalidad y la homogeneidad de varianza (Prueba de Brown-Forsythe) de todos los datos de las variables evaluadas, siendo procesados estadísticamente mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) de Clasificación Simple, y se compararon las medias según la prueba de rangos múltiples de Duncan para $p < 0,05$.

Se realizó un Análisis de Componentes Principales a las actividades enzimáticas evaluadas en el experimento I, así como un análisis de conglomerados jerárquicos a partir de los patrones isoenzimáticos de este mismo experimento, para lo cual se creó una matriz de valores binarios donde a las bandas presentes se les asignó [1] y a las ausentes [0]. Se utilizó el método del vecino más cercano y distancia Euclideana. Todos los análisis estadísticos se ejecutaron con el paquete SPSS Versión 19 para Windows (SPSS Inc. 1989, 2010).

Resultados

III. RESULTADOS

3.1. Caracterización y selección de hongos micorrizógenos arbusculares en las fases del establecimiento de la simbiosis con tomate

3.1.1. Cuantificación de la colonización micorrízica e intensidad

En la Tabla 4 se muestran los resultados de las variables del hongo estudiadas, donde no se observó presencia fúngica en las raíces de las plantas control. Los tratamientos inoculados presentaron valores relativamente bajos, en ambas variables, lo cual pudiera atribuirse al método de inoculación utilizado en este experimento. En los dos periodos evaluados se encontró que tanto la colonización como la intensidad presentaron diferencias significativas dependientes de la cepa de HMA involucrada. Las plantas inoculadas con *G. hoi-like* presentaron los valores superiores en ambas variables a los 32 días, lo cual indica que es la cepa más infectiva para las condiciones de desarrollo del experimento. Le siguió el tratamiento con *A. scrobiculata* al mostrar valores inferiores a *G. hoi-like* en este periodo, a pesar de que a los 18 días no se observaron diferencias significativas en las dos variables entre estos tratamientos.

No obstante, la variable intensidad evaluada a los 32 días resulta más útil para determinar la infectividad cuando se estudian varias cepas, pues fue la que permitió diferenciar estadísticamente el comportamiento de las mismas en este trabajo. Según este análisis, *G. intraradices* y *Glomus* sp1 constituyen las cepas menos infectivas para las condiciones de estudio, al mostrar los niveles más bajos de intensidad. Las plantas tratadas con ambas cepas de *G. mosseae* presentaron una infectividad superior a las inoculadas con las cepas antes mencionadas e inferior a los tratamientos con *G. hoi-like* y *A. scrobiculata*.

3.1.2. Evaluación del crecimiento de las plantas

En la mayoría de las variables del crecimiento evaluadas (Tabla 5), a los 18 días, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos inoculados y el control, con valores superiores en las plantas micorrizadas. A los 32 días se hicieron más evidentes las diferencias entre los tratamientos inoculados por efecto de la micorrización con las distintas cepas de HMA. Las plantas colonizadas por *G. hoi-like*, *G. intraradices* y ambas cepas de *G. mosseae* presentaron mayor altura y masa fresca

Tabla 4. Porcentajes de colonización micorrízica e intensidad en raíces de tomate inoculadas con HMA a los 18 y 32 días

Tratamiento	Colonización micorrízica (%)		Intensidad (%)	
	18 días	32 días	18 días	32 días
Control	0 d	0 d	0 e	0 d
G. hoi-like	14 a	29 a	0,45 a	0,88 a
G. mosseae1	10 bc	15 bc	0,36 bc	0,64 c
<i>G. mosseae2</i>	9 bc	15 bc	0,30 c	0,61 c
<i>Glomus</i> sp1	8 c	13 c	0,17 d	0,37 d
<i>G. intraradices</i>	7 c	13 c	0,23 d	0,41 d
<i>A. scrobiculata</i>	12 ab	18 b	0,39 ab	0,80 b
ES	0,1	0,3	0,01	0,01

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas según Duncan $p < 0,05$ ($n=9$).

Tabla 5. Crecimiento de las plantas de tomate control e inoculadas con HMA a los 18 y 32 días

Tratamiento	Altura (cm)		Masa fresca Total (g planta ⁻¹)		Masa seca Total (g planta ⁻¹)	
	18 días	32 días	18 días	32 días	18 días	32 días
Control	6,36 b	15,15 d	0,42 c	6,69 b	0,05 b	0,68 d
G. hoi-like	8,96 a	20,00 a	2,29 a	13,75 a	0,22 ab	1,47 a
G. mosseae1	8,00 a	20,12 a	1,94 a	13,64 a	0,25 ab	1,54 a
<i>G. mosseae2</i>	8,02 a	18,50 ab	2,14 a	12,52 a	0,25 ab	1,07 bc
<i>Glomus</i> sp1	8,82 a	16,30 c	1,31 b	8,33 b	0,14 b	0,95 c
G. intraradices	8,50 a	18,50 ab	2,22 a	13,36 a	0,38 a	1,30 ab
<i>A. scrobiculata</i>	8,12 a	17,05 bc	1,97 a	7,02 b	0,20 ab	0,79 d
ES	0,23	0,44	0,11	0,64	0,03	0,08

Letras diferentes en la columna indican diferencias significativas según Duncan $p < 0,05$ ($n=9$).

Tabla 6. Tasa relativa del crecimiento (TRC) de las plantas de tomate, calculada a los 32 días

Tratamiento	TRC (g g ⁻¹ día ⁻¹)
Control	0,60 c
G. hoi-like	0,70 a
G. mosseae1	0,69 a
<i>G. mosseae2</i>	0,67 b
<i>Glomus</i> sp1	0,65 b
G. intraradices	0,69 a
<i>A. scrobiculata</i>	0,67 b
ES	0,01

Diferencias significativas entre valores según Duncan $p < 0,05$ ($n=9$).

total. No obstante, teniendo en cuenta la importancia y el significado de las variables masa seca total y tasa relativa del crecimiento, se tomó como base el comportamiento de éstas para agrupar y/o diferenciar las cepas analizadas según su eficacia en promover el crecimiento y desarrollo del cultivo bajo las condiciones de estudio (Tablas 5 y 6). Se pudieron distinguir dos grupos estadísticamente diferentes: uno compuesto por las cepas *G. hoi-like*, *G. mosseae1* y *G. intraradices* con mayor eficacia simbiótica, y el otro por *A. scrobiculata*, *Glomus sp1* y *G. mosseae2*, con menor eficacia simbiótica.

3.1.3. Determinación en raíces y hojas de la actividad de enzimas relacionadas con los mecanismos de defensa en plantas

3.1.3.1. Actividades enzimáticas en raíces

Actividad de las enzimas Guayacol-Peroxidasa (GPX) y Polifenol oxidasa (PPO)

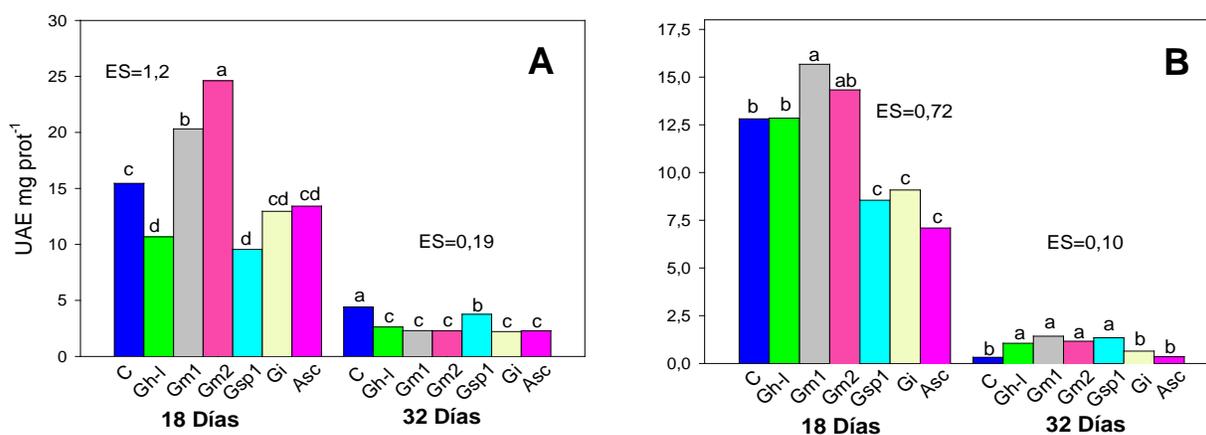


Figura 2. Actividad específica de las enzimas guayacol-peroxidasa (A) y polifenol oxidasa (B) en raíces de tomate inoculadas con HMA. C- control, Gh-l- *G. hoi-like*, Gm1- *G. mosseae1*, Gm2- *G. mosseae2*, Gsp1- *Glomus sp1*, Gi- *G. intraradices*, Asc- *Acaulospora scrobiculata*. Diferencias significativas entre valores del mismo grupo según Duncan $p < 0,05$ ($n=9$).

La actividad GPX (Fig. 2A), a los 18 días, presentó los valores superiores en las raíces inoculadas con las dos cepas de *G. mosseae*, aunque sobresale *G. mosseae2* con una mayor actividad. Los tratamientos con las cepas *G. hoi-like* y *Glomus sp1* mostraron una actividad menor; mientras que, la inoculación con *G. intraradices* y *A. scrobiculata* no afectó la actividad GPX. A los 32 días, se observó un drástico decremento en todos los tratamientos, con una reducción generalizada de la

actividad enzimática por efecto de la micorrización, que fue menos acentuada en las raíces colonizadas por *Glomus* sp1.

A los 18 días, las raíces colonizadas por *G. mosseae*1 mostraron valores más elevados de actividad PPO (Fig. 2B), mientras que en los tratamientos con *Glomus* sp1, *G. intraradices* y *A. scrobiculata* estos valores fueron inferiores. Esta actividad también disminuyó drásticamente con el avance de la colonización, pero a diferencia de GPX (Fig. 2A), las plantas inoculadas con *G. hoi-like*, *Glomus* sp1 y con ambas cepas de *G. mosseae* presentaron valores superiores a las plantas controles sin inocular. Los tratamientos con *G. intraradices* y *A. scrobiculata* no difirieron del control.

Actividad de las enzimas Quitinasa y β -1,3- glucanasa

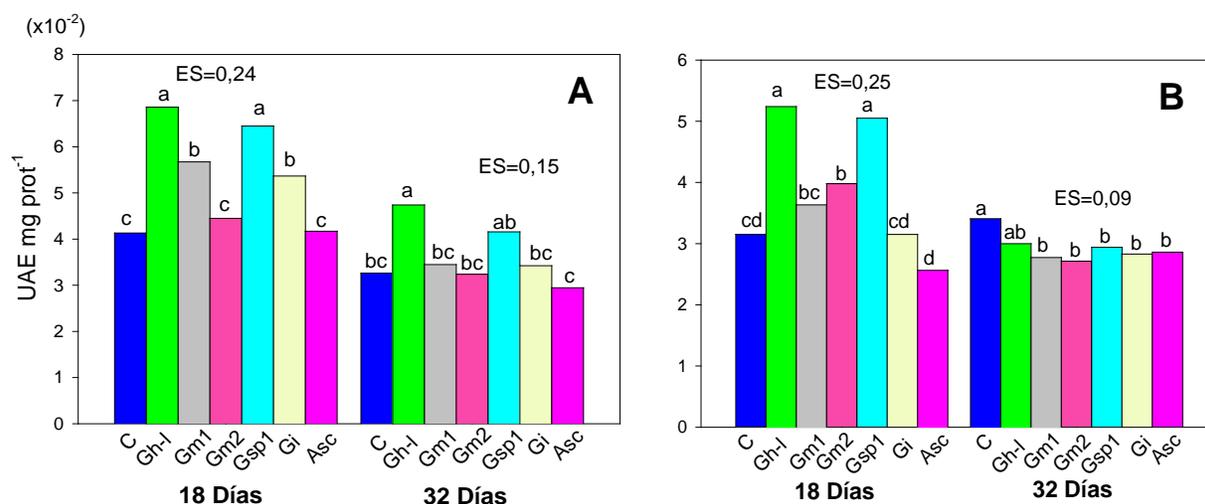


Figura 3. Actividad específica de las enzimas quitinasa (A) y β -1,3- glucanasa (B) en raíces de tomate inoculadas con HMA. C- control, Gh-1- *G. hoi-like*, Gm1- *G. mosseae*1, Gm2- *G. mosseae*2, Gsp1- *Glomus* sp1, Gi- *G. intraradices*, Asc- *Acaulospora scrobiculata*. Diferencias significativas entre valores del mismo grupo según Duncan $p < 0,05$ ($n=9$).

La Figura 3A muestra la actividad quitinasa radical en las plantas de tomate inoculadas con las seis cepas de HMA. A los 18 días, los tratamientos con *G. hoi-like* y *Glomus* sp1 manifestaron los valores superiores, seguidos por *G. mosseae*1 y *G. intraradices*, los que presentaron diferencias significativas del control. A los 32 días, sólo el tratamiento con *G. hoi-like* mantuvo valores estadísticamente elevados.

Las raíces de las plantas tratadas con las cepas *G. hoi-like* y *Glomus* sp1 exhibieron los valores más elevados de actividad β -1,3-glucanasa en el primer periodo evaluativo (Fig. 3B), seguidos por el

tratamiento con *G. mosseae*2. En el segundo periodo de evaluación los tratamientos inoculados presentaron valores inferiores al control, excepto el tratamiento con *G. hoi-like* que no mostró diferencias significativas respecto a éste.

Actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL)

En la Figura 4 se aprecia el comportamiento de la actividad fenilalanina amonio liasa (PAL) en raíz. A los 18 días las plantas inoculadas con *G. hoi-like* mostraron los valores más elevados, mientras que las plantas tratadas con *Glomus* sp1 presentaron valores inferiores al control. A los 32 días, los tratamientos con *G. hoi-like* y *A. scrobiculata* manifestaron valores estadísticamente superiores al control.

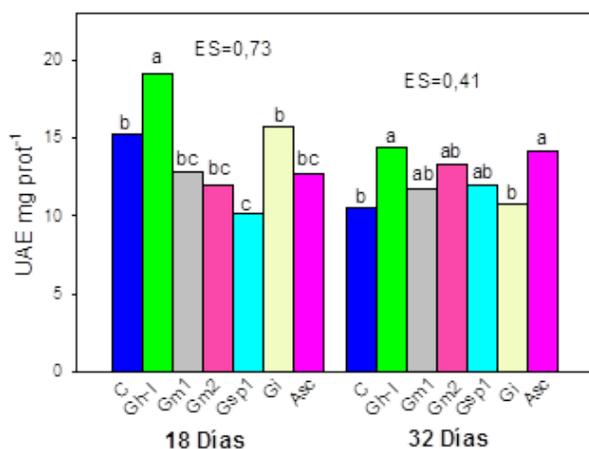


Figura 4. Actividad específica de la enzima fenilalanina amonio liasa en raíces de tomate inoculadas con HMA. C- control, Gh-1- *G. hoi-like*, Gm1- *G. mosseae*1, Gm2- *G. mosseae*2, Gsp1- *Glomus* sp1, Gi- *G. intraradices*, Asc- *Acaulospora scrobiculata*. Diferencias significativas entre valores del mismo grupo según Duncan $p < 0,05$ ($n=9$).

La integración de las actividades enzimáticas de defensa analizadas en raíz sugiere que las cepas estudiadas exhiben estrategias diferentes para desarrollar la colonización intrarradical del tomate cv. 'AMALIA', bajo las condiciones de estudio, y apuntan a *G. hoi-like* y *G. mosseae*1 entre las más promisorias.

3.1.3.2. Actividades enzimáticas en hojas

Actividad de las enzimas Guayacol-Peroxidasa (GPX) y Polifenol oxidasa (PPO)

En la Figura 5 se aprecian las actividades GPX y PPO en hojas de tomate inoculado con las distintas cepas de HMA. Se observaron incrementos por efecto de la inoculación en ambas enzimas, en los dos periodos evaluados, con diferencias estadísticas dependientes de la cepa involucrada; excepto en la actividad GPX, a los 18 días, para *G. mosseae*1 y en la actividad PPO, a los 32 días, para *G. hoi-like*. En la mayoría de los casos, los tratamientos con *G. mosseae*2 y *G. intraradices* alcanzaron

valores elevados mientras que los de *A. scrobiculata* fueron bajos. Las plantas inoculadas con *G. hoi-like* manifestaron aumentos sólo a los 18 días.

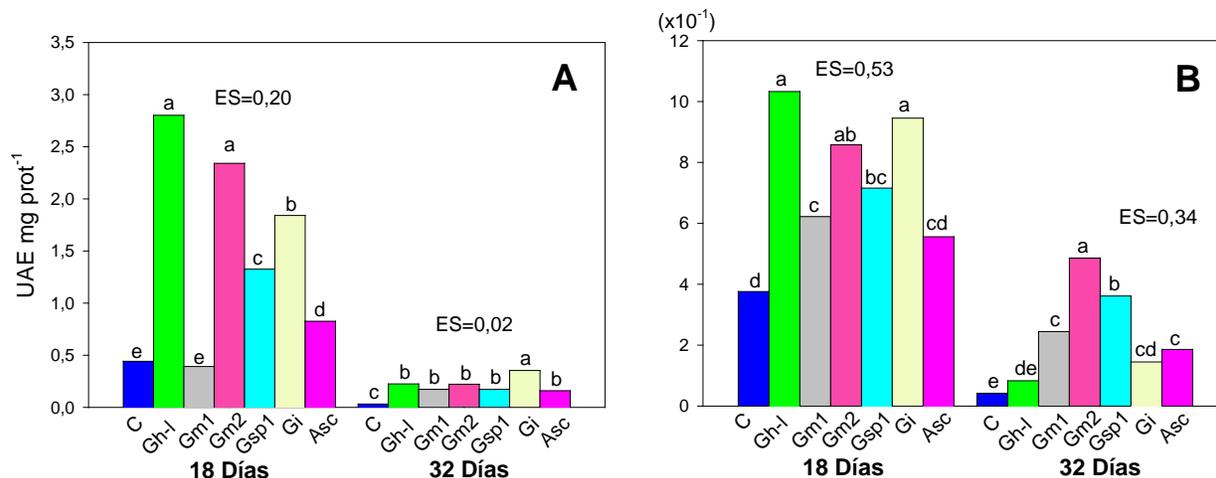


Figura 5. Actividad específica de las enzimas guaiacol-peroxidasa (A) y polifenol oxidasa (B) en hojas de tomate inoculadas con HMA. C- control, Gh-1- *G. hoi-like*, Gm1- *G. mosseae*1, Gm2- *G. mosseae*2, Gsp1- *Glomus* sp1, Gi- *G. intraradices*, Asc- *Acaulospora scrobiculata*. Diferencias significativas entre valores del mismo grupo según Duncan $p < 0,05$ ($n=9$).

Actividad de las enzimas Quitinasa y β -1,3- glucanasa

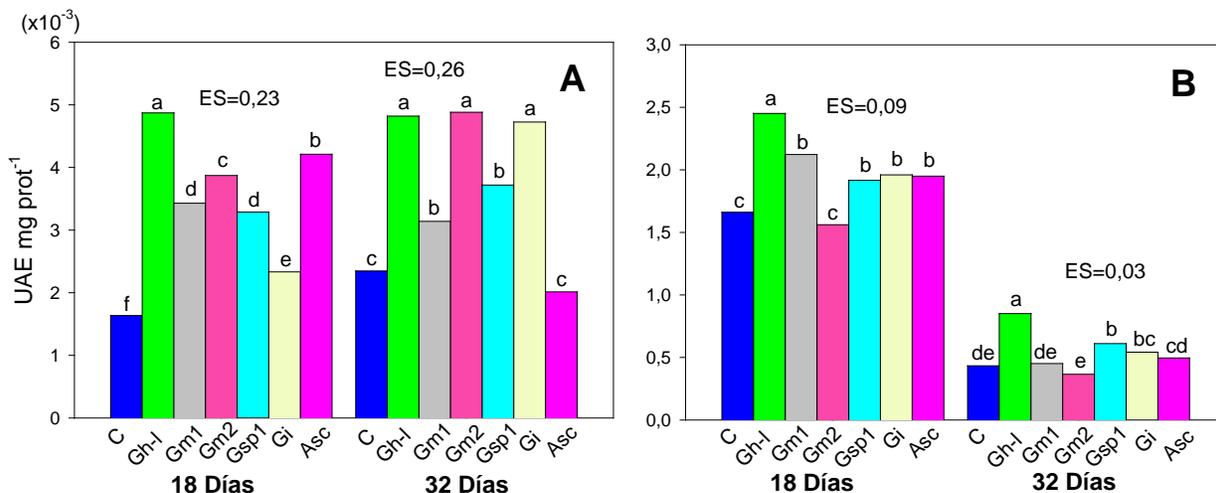


Figura 6. Actividad específica de las enzimas quitinasa (A) y β -1,3- glucanasa (B) en hojas de tomate inoculadas con HMA. C- control, Gh-1- *G. hoi-like*, Gm1- *G. mosseae*1, Gm2- *G. mosseae*2, Gsp1- *Glomus* sp1, Gi- *G. intraradices*, Asc- *Acaulospora scrobiculata*. Diferencias significativas entre valores del mismo grupo según Duncan $p < 0,05$ ($n=9$).

Las actividades quitinasa y β -1,3 glucanasa (Fig. 6), en hojas, de la mayoría de las plantas inoculadas también mostraron incrementos significativos con diferencias según la cepa de HMA implicada; exceptuando el tratamiento con *A. scrobiculata* a los 32 días en la actividad quitinasa y, en la actividad β -1,3 glucanasa, las plantas tratadas con *G. mosseae*2 a los 18 días, así como con *A.*

scrobiculata y con las dos cepas de *G. mosseae*, a los 32 días, las cuales no mostraron diferencias del control. Además, se destacó por sus valores elevados en todas las evaluaciones la cepa *G. hoi-like*.

Actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL)

Respecto a la actividad PAL en hojas (Fig. 7), a los 18 días se observaron decrementos en la mayoría de los tratamientos micorrizados, a excepción de los inoculados con *G. hoi-like* y *G. intraradices* que no difirieron del control. En cambio, a los 32 días, se detectaron aumentos significativos en todos los tratamientos inoculados que fueron más pronunciados en las plantas tratadas con *A. scrobiculata* y *G. mosseae1*.

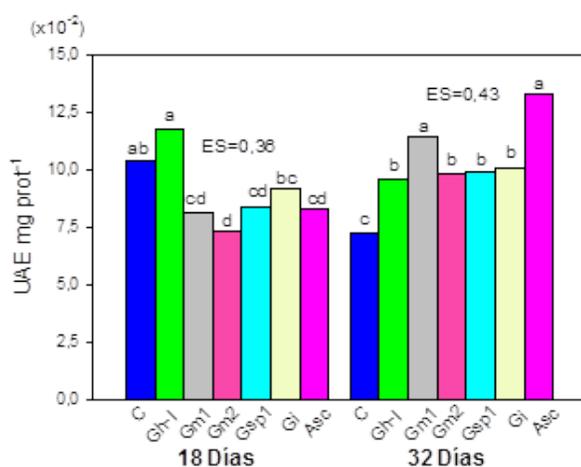


Figura 7. Actividad específica de la enzima fenilalanina amonio liasa en hojas de tomate inoculadas con HMA. C- control, Gh-1- *G. hoi-like*, Gm1- *G. mosseae1*, Gm2- *G. mosseae2*, Gsp1- *Glomus sp1*, Gi- *G. intraradices*, Asc- *Acaulospora scrobiculata*. Diferencias significativas entre valores del mismo grupo según Duncan $p < 0,05$ ($n=9$).

En el análisis de componentes principales, realizado a partir de todas las actividades específicas de las enzimas de defensa analizadas anteriormente (Fig. 8), se observa que las dos primeras componentes explican más del 60% de la variabilidad de los datos. Al componente uno contribuyen las actividades quitinasas de raíz, en ambos periodos de evaluación, y las PPO y β -1,3 glucanasa de hojas, a los 18 y 32 días, respectivamente. Al componente dos aportan la β -1,3 glucanasa de raíz, a los 32 días, y la PAL y PPO de hoja, a los 18 y 32 días, respectivamente.

La representación gráfica del comportamiento integral de los tratamientos en estas variables permitió la separación del control y de las plantas inoculadas con *G. hoi-like* en dos grupos completamente independientes. El resto de los tratamientos mostró asociación entre ellos quedando separados en otro grupo. Este resultado demuestra el comportamiento diferenciado de las plantas inoculadas con *G. hoi-like* respecto a las demás, en las actividades enzimáticas determinadas.

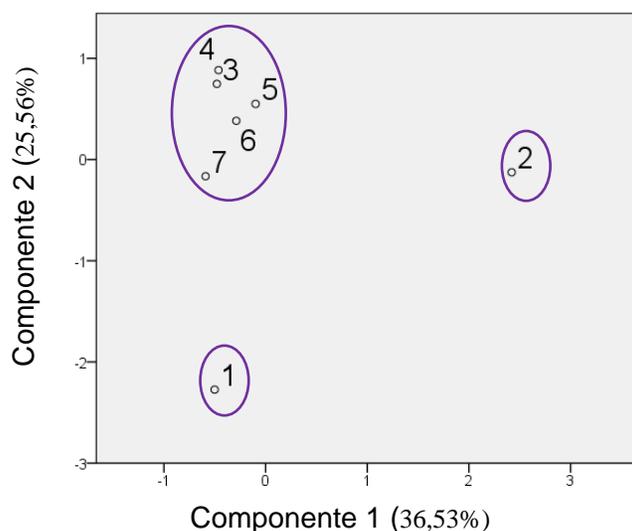


Figura 8. Distribución de los tratamientos según el análisis de las actividades enzimáticas de defensa, evaluadas en hojas y raíces, a los 18 y 32 días. Matriz de pesos de las componentes 1 y 2. Análisis de Componentes Principales. 1- control, 2- *G. hoi-like*, 3- *G. mosseae1*, 4- *G. mosseae2*, 5- *Glomus sp1*, 6- *G. intraradices*, 7- *Acaulospora scrobiculata*. Quit- quitinasa, Gluc- β -1,3-glucanasa, GPX- guayacol peroxidasa, PPO- polifenol oxidasa, PAL- fenilalanina amonio liasa

	Componente	
	1	2
Gluc hoja 18d	,769	-,251
Quit hoja 18d	,652	,384
PAL hoja 18d	,435	-,850
GPX hoja 18d	,783	,167
PPO hoja 18d	,869	,270
Gluc raíz 18d	,765	-,158
Quit raíz 18d	,860	-,158
PAL raíz 18d	,487	,304
GPX raíz 18d	-,376	,621
PPO raíz 18d	,049	,094
Gluc hoja 32d	,856	-,450
Quit hoja 32d	,719	,280
PAL hoja 32d	,054	,601
GPX hoja 32d	,573	,446
PPO hoja 32d	-,007	,829
Gluc raíz 32d	-,316	-,918
Quit raíz 32d	,864	-,365
PAL raíz 32d	,471	-,569
GPX raíz 32d	-,354	-,717
PPO raíz 32d	,500	,448

3.1.4. Determinación en raíces de patrones isoenzimáticos polimórficos mediante geles de poliacrilamida (PAGE)

Isoenzimas de Peroxidasas (POX)

En la Figura 9 se aprecian los patrones de isoenzimas POX en raíces. A los 18 días se observaron seis isoformas constitutivas en todos los tratamientos, con la diferencia que en el inoculado con *G. intraradices* la intensidad de las bandas fue menor. A los 32 días, se detectaron siete isoformas, pero sólo cuatro de ellas (No. 2, 3, 5 y 8) aparecieron en todos los tratamientos. En los inoculados con *G. hoi-like* y *G. mosseae2* se detectó también la isoenzima constitutiva No. 7, que no se observó en las raíces controles a esta edad del cultivo; mientras que las cepas *G. mosseae1* y *A. scrobiculata* indujeron, además de éstas, dos isoenzimas nuevas (No. 1 y 6).

Isoenzimas de Superóxido dismutasa (SOD)

Se observaron cuatro isoenzimas de SOD en las raíces de tomate en los dos periodos evaluados (Fig. 10). Tres de ellas (No. 2, 3 y 4) se consideran constitutivas, mientras que la No. 1 constituye una

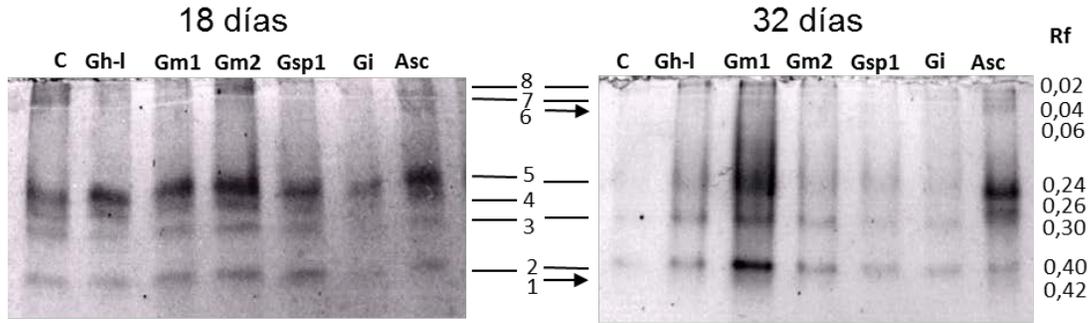


Figura 9. Patrones isoenzimáticos de peroxidasas en raíces de tomate inoculadas con HMA. C- control, Gh-l- *G. hoi-like*, Gm1- *G. mosseae1*, Gm2- *G. mosseae2*, Gsp1- *Glomus sp1*, Gi- *G. intraradices*, Asc- *Acaulospora scrobiculata*. Las flechas indican las isoformas inducidas por la micorrización y las líneas las isoformas constitutivas. Rf representa la movilidad relativa de cada isoforma. PAGE, 25 mA.

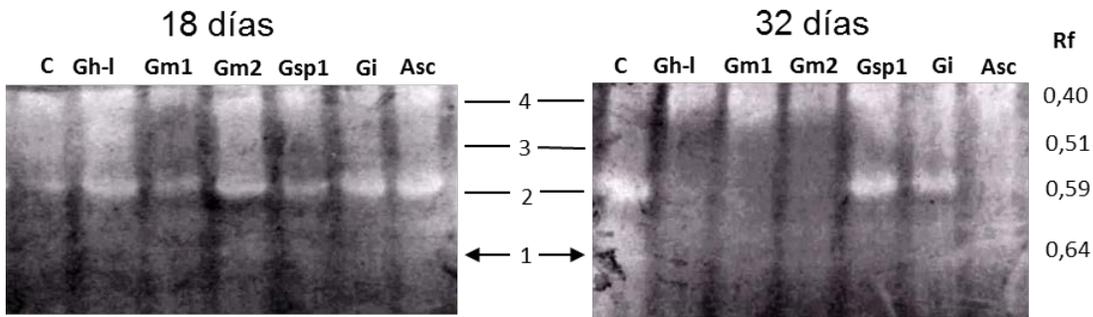


Figura 10. Patrones isoenzimáticos de superóxido dismutasa en raíces de tomate inoculadas con HMA. C- control, Gh-l- *G. hoi-like*, Gm1- *G. mosseae1*, Gm2- *G. mosseae2*, Gsp1- *Glomus sp1*, Gi- *G. intraradices*, Asc- *Acaulospora scrobiculata*. Las flechas indican las isoformas inducidas por la micorrización y las líneas las isoformas constitutivas. Rf representa la movilidad relativa de cada isoforma. PAGE, 25 mA.

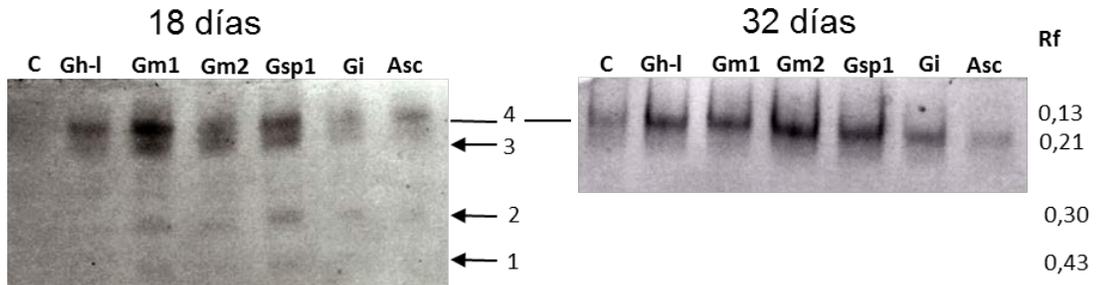


Figura 11. Patrones isoenzimáticos de estererasas en raíces de tomate inoculadas con HMA. C- control, Gh-l- *G. hoi-like*, Gm1- *G. mosseae1*, Gm2- *G. mosseae2*, Gsp1- *Glomus sp1*, Gi- *G. intraradices*, Asc- *Acaulospora scrobiculata*. Las flechas indican las isoformas inducidas por la micorrización y las líneas las isoformas constitutivas. Rf representa la movilidad relativa de cada isoforma. PAGE, 25 mA.

isoforma específica de la simbiosis para las condiciones de estudio. A los 18 días, las isoenzimas constitutivas aparecieron en todos los tratamientos, excepto en los inoculados con *G. mosseae*1 y *Glomus* sp1. La isoforma nueva (No. 1) se detectó en todas las raíces inoculadas y se observó como una zona de actividad con baja intensidad.

A los 32 días, sólo se encontró la isoforma No. 4 en todos los tratamientos. La cepas *G. hoi-like* y ambas *G. mosseae* provocaron represión de las isoenzimas No. 2 y 3 e inducción de la isoforma nueva (No. 1), la que apareció también en el gel como una zona de actividad, pero con menor intensidad que en el primer periodo de evaluación. En el tratamiento con *A. scrobiculata* no se observó la No. 2.

Isoenzimas de Esterasas (EST)

En los dos patrones de las isoenzimas EST (Fig. 11) se observó una isoforma constitutiva (No. 4). A los 18 días, además, se indujo una isoforma (No. 3) en todos los tratamientos micorrizados, la No. 2 apareció en los inoculados con *G. hoi-like*, *G. intraradices* y ambos *G. mosseae*, mientras que la No. 1 fue inducida en las plantas tratadas con *G. mosseae*1, *Glomus* sp1 y *G. intraradices*. A los 32 días, sólo se detectó la isoforma constitutiva (No. 4) en todos los tratamientos, aunque presentó menor intensidad en las raíces controles y en las inoculadas con *A. scrobiculata*, seguido por *G. intraradices*.

Isoenzimas de Anhidrasa carbónica (AC)

En la Figura 12 se aprecian los patrones isoenzimáticos de AC. A los 18 días, no se observó actividad en las raíces controles. Sin embargo, se observaron tres isoformas, de las cuales la No. 2 apareció en todos los tratamientos micorrizados, la No. 1 fue inducida por las cepas *Glomus* sp1 y *A. scrobiculata*, mientras que *G. hoi-like* y ambos *G. mosseae* indujeron la isoenzima No. 3. A los 32 días, sólo se detectó la isoenzima No. 3 en todos tratamientos, excepto en el inoculado con *A. scrobiculata*, por lo que constituye una isoforma constitutiva, la cual presentó muy baja intensidad en las plantas controles.

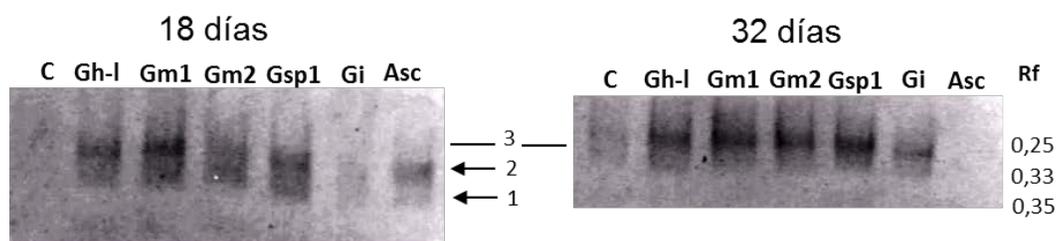


Figura 12. Patrones isoenzimáticos de anhidrasa carbónica en raíces de tomate inoculadas con HMA. C- control, Gh-l- *G. hoi-like*, Gm1- *G. mosseae1*, Gm2- *G. mosseae2*, Gsp1- *Glomus sp1*, Gi- *G. intraradices*, Asc- *Acaulospora scrobiculata*. Las flechas indican las isoformas inducidas por la micorrización y las líneas las isoformas constitutivas. Rf representa la movilidad relativa de cada isoforma. PAGE, 25 mA.

El análisis de conglomerados jerárquicos realizado (Fig. 13) permitió establecer la relación entre las seis cepas de HMA, en su interacción con las plantas de tomate cv. ‘AMALIA’, sobre la base de los sistemas isoenzimáticos analizados, tomando una distancia estadística igual a 4,10 como punto de corte. Se reflejó un comportamiento homogéneo de las cepas *G. hoi-like* y *G. mosseae2*. Los tratamientos con *Glomus sp1* y *G. intraradices* también mostraron similitud en su comportamiento. Mientras que *G. mosseae1* se diferenció del resto de las cepas del género *Glomus*. Por su parte, las plantas controles y las inoculadas con *A. scrobiculata* manifestaron patrones completamente distintivos entre sí y respecto al resto de los tratamientos.

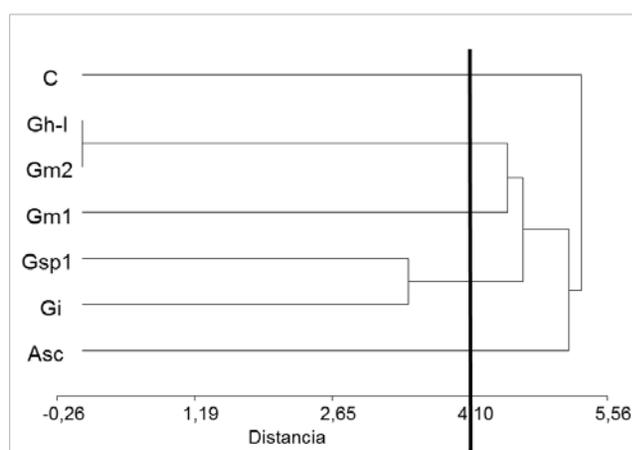


Figura 13. Asociación entre los tratamientos (plantas de tomate cv. ‘AMALIA’ inoculadas con HMA y el control), de acuerdo a los patrones de isoenzimas. C- control, Gh-l- *G. hoi-like*, Gm1- *G. mosseae1*, Gm2- *G. mosseae2*, Gsp1- *Glomus sp1*, Gi- *G. intraradices*, Asc- *Acaulospora scrobiculata*. Método de distancia del vecino más cercano (NJ, siglas en inglés). Punto de corte- 4,10.

La integración de las distintas variables evaluadas en este experimento permitió seleccionar las cepas *G. hoi-like* y *G. mosseae1* para continuar el trabajo, las cuales presentan diferencias funcionales. Este criterio se basa en el comportamiento diferencial que exhiben en las actividades enzimáticas y en los patrones isoenzimáticos determinados, en los desiguales niveles de infectividad

que manifiestan bajo las condiciones de estudio, superior y medio, respectivamente, y en la alta eficacia simbiótica que muestran en plantas de tomate cv. 'AMALIA'.

3.2. Identificación de las cepas de HMA seleccionadas

3.2.1. Caracterización morfológica

G. hoi-like (INCAM-4). La observación al microscopio óptico de las preparaciones realizadas reveló que las esporas son de color hialino a amarillo muy pálido (0/0/40/0); presentan diversas formas: ovoide, elipsoide, piriforme a irregular 20-48X(24)54-72 μm , raramente globosa, 24-54 μm de diámetro (Fig. 14(1) A-C, F-H). La pared de las esporas está compuesta por dos capas (C1 y C2) (Fig. 14(1) C-E): C1 es hialina, permanente, de flexible a semi-flexible, con espesor de 0,8-1,0 μm , de superficie suave, se separa fácilmente de C2 cuando las esporas son aplastadas. C2 es de color hialino a amarillo muy pálido, rígida, de espesor entre 0,8-1,7 μm . La reacción de ambas capas con la solución de Melzer es negativa (Fig. 14(1) C). C1 se tiñe de azul claro con Azul de algodón (Fig. 14(1) D-E).

La hifa de sostenimiento posee el mismo color de las esporas, es cilíndrica a ligeramente ensanchada, recta o curva, el grosor en la base de la espora es 4-10 μm (Fig. 14(1) A-C, H). La pared de la hifa de sostenimiento es de color hialino a amarillo muy pálido, el espesor en la base de la espora es 1,6–2,0 μm , está compuesta por dos capas continuas con las de la pared de la espora. El poro usualmente está abierto, en ocasiones cerrado por un septo curvo localizado a 6-8 μm de la base de la espora o, a veces, está ocluido por un engrosamiento de C2 (Fig. 14(1) A-C, H).

En el suelo las esporas aparecen en forma de agregados en su mayoría (Fig. 14(1) D, F-G), entre 3 y 12 esporas ramifican de una hifa común, raramente se encuentran en forma simple. En la Figura 14(2) se observan las estructuras fúngicas intrarradicales de esta especie, donde se aprecia que forman arbuscúlos, vesículas de diversas formas que pueden ser globosa (23-38 μm), de ovoides a irregulares (18-25X20-60 μm) (Fig. 14(2) B y D) y enrollamientos hifales elipsoides intracelulares (Fig. 14(2) C).

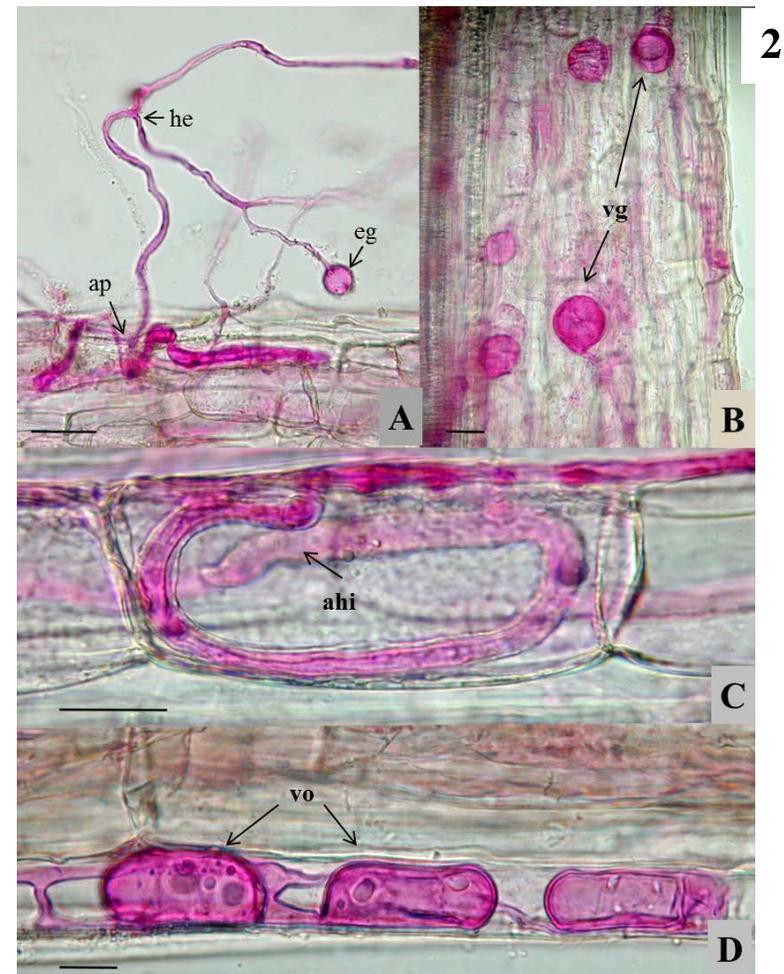
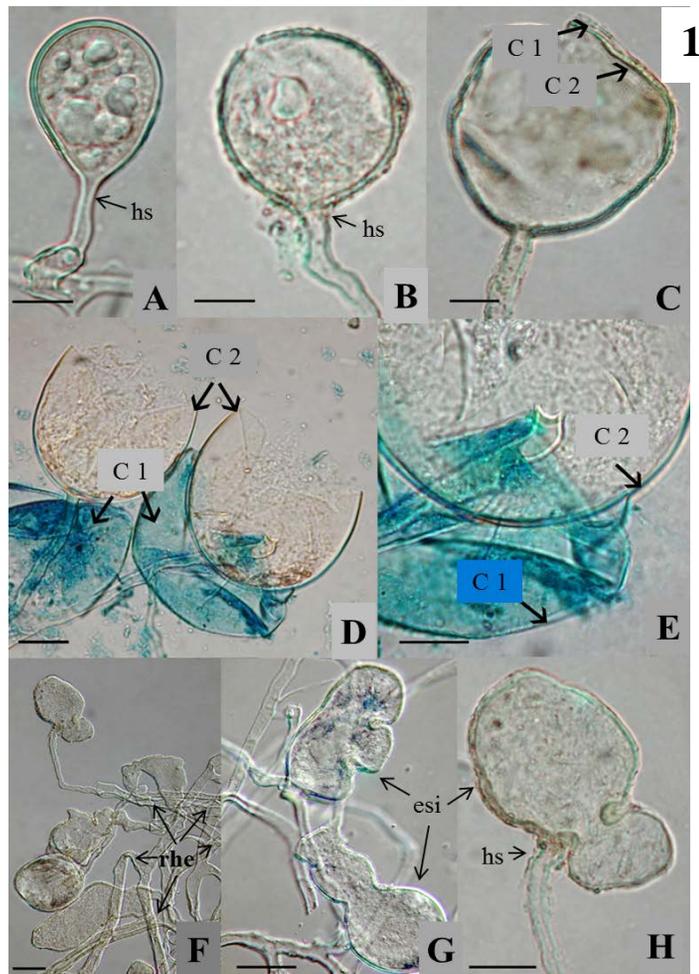


Figura 14. (1) Imágenes de esporas de *Glomus hoi*-like (INCAM-4), a partir de cultivo en maceta. A-B. Esporas joven y madura, respectivamente, con unión de la hifa, PVLG. C. Espora madura ligeramente aplastada que muestra las capas de la pared (C1 y C2), no reactivas con PVLG+Melzer. D-E. Espora madura con la C1 teñida con Azul de algodón diferenciada de C2. F-H. Esporas de forma irregular con hifa de sostenimiento, PVLG. (2) Estructuras fúngicas intrarradicales de *Glomus hoi*-like en *Allium porrum* teñidas con fuscina ácida. A. Espora germinada con hifa corredora y detalle de punto de entrada con apresorio. B-D. Vesículas intrarradicales. C. Arrollamiento hifal intracelular en la corteza radical. Microscopio de contraste de interferencia diferencial (DIC). C= capa de la pared de la espora, hs= hifa de sostenimiento, rhe= red de hifas externas, esi= esporas irregulares (1). eg= espora germinada, he= hifa externa, ap= apresorio, vg y vo= vesículas globosas y ovoides, respectivamente, ahi= arrollamiento hifal intracelular (2). Barras de escala (1): Figs. A-C= 10µm; Figs. D-H= 20µm. Barras de escala (2)= 20µm.

Al confrontar las características morfológicas de la cepa INCAM-4 con las que aparecen descritas en el catálogo INVAM (2011) y con las referidas en la clave de identificación para especies de *Glomeromycota* que forman esporas glomoides hialinas y/o ligeramente coloreadas (Blaszkowski *et al.*, 2010a), no se observó coincidencia con ninguna de las descripciones existentes; por lo que al parecer es una especie nueva y se requieren estudios moleculares para su constatación. En el Anexo V aparece la comparación realizada entre esta especie y otras similares que fueron recopiladas tras una minuciosa revisión de la literatura internacional.

***G. mosseae*1 (INCAM-2).** Las esporas son de color amarillo a ámbar (0/30/100/0)-(0/20/80/0), poseen forma globosa o subglobosa y tamaño entre 100-250 μm (Fig. 15A-B). La pared de las esporas está compuesta por tres capas (Fig. 15D-E): la C1 es hialina, mucilaginoso, aparece frecuentemente degradada en esporas maduras, de espesor entre 1,5-2,5 μm . C2 es hialina, rígida, con espesor de 0,8–1,6 μm . C3 es de color amarillo, laminada y presenta un espesor de 3,2–6,4 μm . La reacción con la solución de Melzer es positiva (C1-rojizo; C3-amarillo claro). C1 se tiñe de azul oscuro en forma discontinua o de parches con Azul de algodón (Fig. 15F).

La hifa de sostenimiento posee el mismo color de las esporas, presenta forma de embudo, es en su mayoría curva, el ancho en la base de la espora es 21-30 μm (Fig. 15A-C). La pared de la hifa de sostenimiento es del mismo color de la pared de la espora (hialino y amarillo), el espesor en la base de la espora es entre 6–7,5 μm , está compuesta por dos capas continuas con C1 y C3 de la espora (Fig. 15A-C). El poro está cerrado al presentar un septo curvo localizado de 0-32 μm de la base de la espora (Fig. 15C). Las esporas se encuentran en forma simple en el suelo (Fig. 15A-B).

Las características morfológicas de la cepa INCAM-2 se corresponden con las de la especie *Funneliformis mosseae*, syn. *Glomus mosseae*, según nomenclatura de Schüßler y Walker (2010).

3.2.2. Caracterización molecular mediante los marcadores *ITS* y *V-H⁺-ATPasa*

***G. hoi*-like (INCAM-4).** El análisis filogenético de las secuencias obtenidas de ambos genes ubicó a esta especie en el género *Glomus* familia *Glomeraceae* (Schüßler y Walker, 2010) y reveló que no posee similitud alguna con las especies conocidas en esta familia (Fig. 16). Además, no se

encontraron secuencias provenientes de aislamientos no identificados estrechamente relacionadas a la misma. La comparación de las secuencias de *ITS* obtenidas con las que aparecen en la base de datos del NCBI, indicó entre un 83 y un 85% de similitud con algunos *Glomus* sp. aún no cultivados (Anexo VI); mientras que para *V-H⁺-ATPasa* apenas manifestó un 80% de homología con las especies *F. caledonium* (Nicolson & Gerd.) Trappe & Gerd. y *G. multiforum* Tadych & Blaszkowski (Anexo VI).

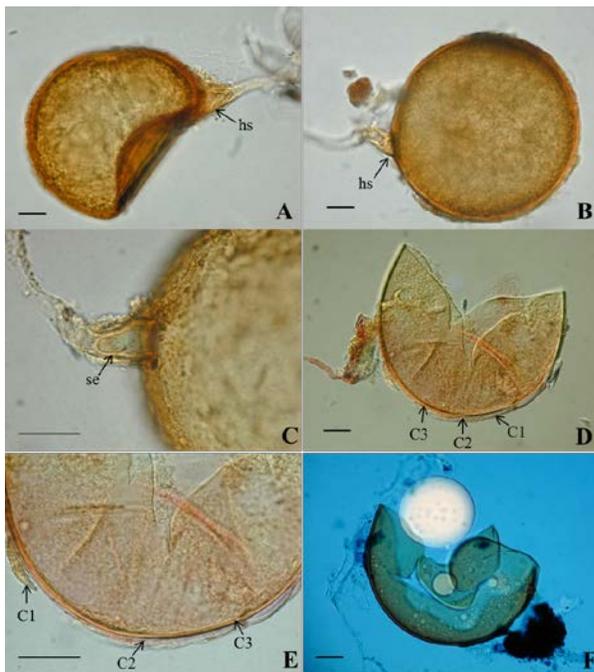


Figura 15. Imágenes de esporas de *Glomus mosseae* l (INCAM-2), a partir de cultivo en maceta. A-B. Esporas maduras con unión de la hifa, PVLG. C. Unión de la hifa de sostenimiento con detalle de septo curvo. D-E. Esporas jóvenes aplastadas que muestran las capas de la pared (C1, C2 y C3) y su tinción con PVLG+Melzer. F. Tinción azul oscuro discontinua con Azul de algodón. Microscopio de contraste de interferencia diferencial (DIC). C= capa de la pared de la espora, hs= hifa de sostenimiento, se= septo curvo. Barras de escala = 20µm.

La secuencia resultante de *V-H⁺-ATPasa* posee 1305 pb, mientras que las tres de *ITS* tienen 537, 546 y 549 pb, las cuales fueron inscritas en la base de datos del NCBI. El número de acceso para *V-H⁺-ATPasa* es JF510464 y para los tres clones analizados de *ITS* son JF692724, JF692725 y JF692726.

Los resultados expuestos respaldan la caracterización morfológica realizada y condujeron a la descripción de la cepa INCAM-4, procedente de la colección de HMA del INCA, como una especie nueva, a la cual se le denominó *Glomus cubense* en referencia a Cuba, donde fue encontrada. Los especímenes de referencia se depositaron en el Herbario Nacional de Cuba (Instituto de Ecología y Sistemática, CITMA, La Habana, Cuba) y en el Herbario Nacional Micológico de Canadá, Ottawa, con código DAOM 241198.

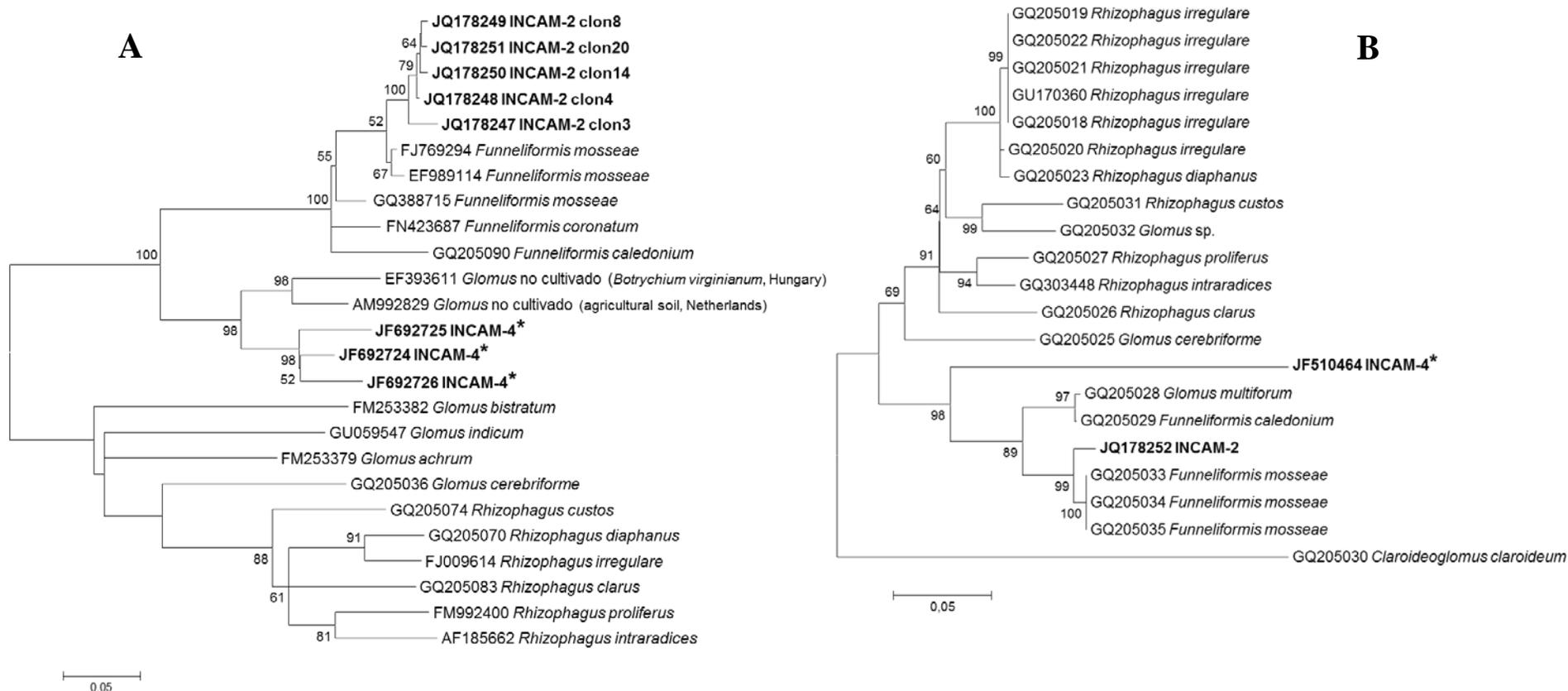


Figura 16. Árboles filogenéticos construidos mediante el método de distancia del vecino más cercano (NJ). Se utilizaron las secuencias nucleotídicas de *ITS* del ADN ribosomal (A) y de *V-H⁺-ATPasa V0V1* (B) obtenidas de las cepas *INCAM-4* e *INCAM-2* y otras relacionadas provenientes del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos. Como raíz se utilizó una secuencia de la especie *Claroideoglomus claroideum* (B). Los modelos de trabajo empleados fueron Jukes-Cantor (A) y Reversible de tiempo general plus Gamma (B). Como prueba de filogenia se utilizó el método de bootstrap con 1000 repeticiones, los porcentajes se indican en los nodos (>50%). La escala (0,05) indica la sustitución de nucleótido por sitio. Se utilizó el Programa MEGA 5.0. *especie nueva.

***G. mosseae*1 (INCAM-2).** Los árboles filogenéticos obtenidos (Fig. 16) sustentan la caracterización morfológica de esta cepa y corroboraron que, en efecto, es *Funneliformis mosseae*, syn. *Glomus mosseae*, al presentar un 98% de homología con varios ecotipos de la misma especie registrados en las bases de datos del NCBI, para los dos genes analizados. Además, la comparación de las secuencias de *ITS* mostró un 90 y un 88% de similitud con las de *F. caledonium* y *F. coronatum* Giovann., respectivamente, y la de *V-H⁺-ATPasa*, un 93% de homología con las de *F. caledonium* y *G. multiforum* (Anexo VI).

La secuencia resultante de *V-H⁺-ATPasa* posee 1641 pb, mientras que las de *ITS* presentan 524 (3 clones), 521 y 517 pb. Las mismas fueron inscritas en el NCBI bajo los números de acceso JQ178252 para *V-H⁺-ATPasa*, y para los cinco clones analizados del ADNr *ITS* fue del JQ178247 a JQ178251.

3.3. Infectividad de las cepas de HMA seleccionadas y respuestas bioquímicas y fisiológicas del tomate en las fases de la simbiosis. Relación entre las mismas

3.3.1. Cuantificación de la colonización micorrízica e intensidad

Estructuras totales del hongo

Tanto los valores de colonización micorrízica, como los de intensidad, fueron superiores en el tratamiento con *G. cubense*, al utilizar azul de tripan para la tinción de las raíces, el cual tiñe tanto las estructuras fúngicas vivas como las muertas (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentajes de colonización micorrízica e intensidad en raíces de tomate inoculadas con HMA. Actividad total

Tratamiento	Colonización micorrízica (%)		Intensidad (%)	
	18 días	32 días	18 días	32 días
<i>F. mosseae</i>	15 b	28 b	1,25 b	2,40 b
<i>G. cubense</i>	27 a	39 a	3,09 a	4,29 a
ES	1,42	1,82	0,4	0,78

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas según Duncan $p < 0,05$ ($n = 9$).

Estructuras vivas del hongo

Al evaluar las estructuras micorrízicas vivas (Tabla 8) también se destacó el tratamiento con *G. cubense* en la mayoría de las variables analizadas. Sólo en el caso de la abundancia arbuscular no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 8. Comportamiento de las variables del hongo en raíces de tomate inoculadas a los 32 días. Actividad succinato deshidrogenasa (SDH)

Tratamiento	Colonización (%)	Intensidad (%)	Abundancia arbuscular (%)
<i>F. mosseae</i>	22,83 b	1,93 b	5,07
<i>G. cubense</i>	37,78 a	3,69 a	6,11
ES	1,74	0,92	0,56

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas según Duncan $p < 0,05$ ($n=9$).

El análisis integral de las variables del hongo, por las dos evaluaciones realizadas, confirma la mayor infectividad de la cepa *G. cubense* respecto a *F. mosseae*, encontrada en el experimento I.

3.3.2. Evaluación del crecimiento y nutrición de las plantas

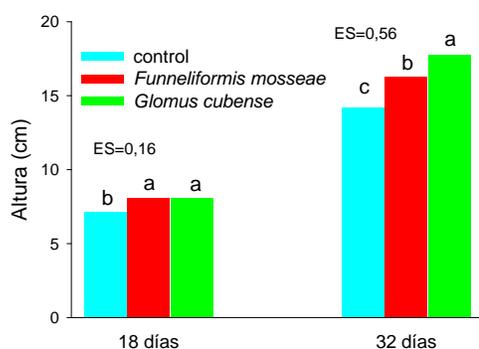


Figura 17. Altura de las plantas de tomate inoculadas con HMA. Diferencias significativas entre valores del mismo grupo según Duncan $p < 0,05$ ($n=9$).

A los 18 días (Fig. 17), la altura de las plantas inoculadas con las dos cepas estudiadas no mostró diferencias estadísticas, siendo superior a la de las controles. A los 32 días, el tratamiento con *G. cubense* presentó los valores superiores, seguido por el tratamiento con *F. mosseae*. De forma similar, las plantas inoculadas con *G. cubense* presentaron un área foliar mayor en el segundo periodo evaluativo (Fig. 18) y a continuación las plantas inoculadas con *F. mosseae*.

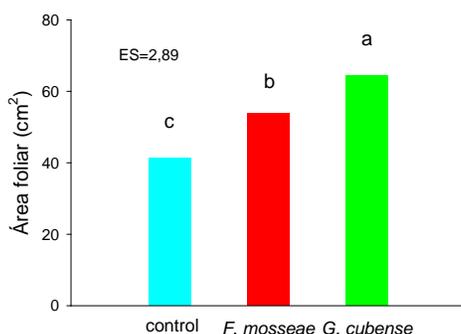


Figura 18. Área foliar de las plantas de tomate inoculadas con HMA al finalizar el experimento (32 días). Diferencias significativas entre valores según Duncan $p < 0,05$ ($n=9$).

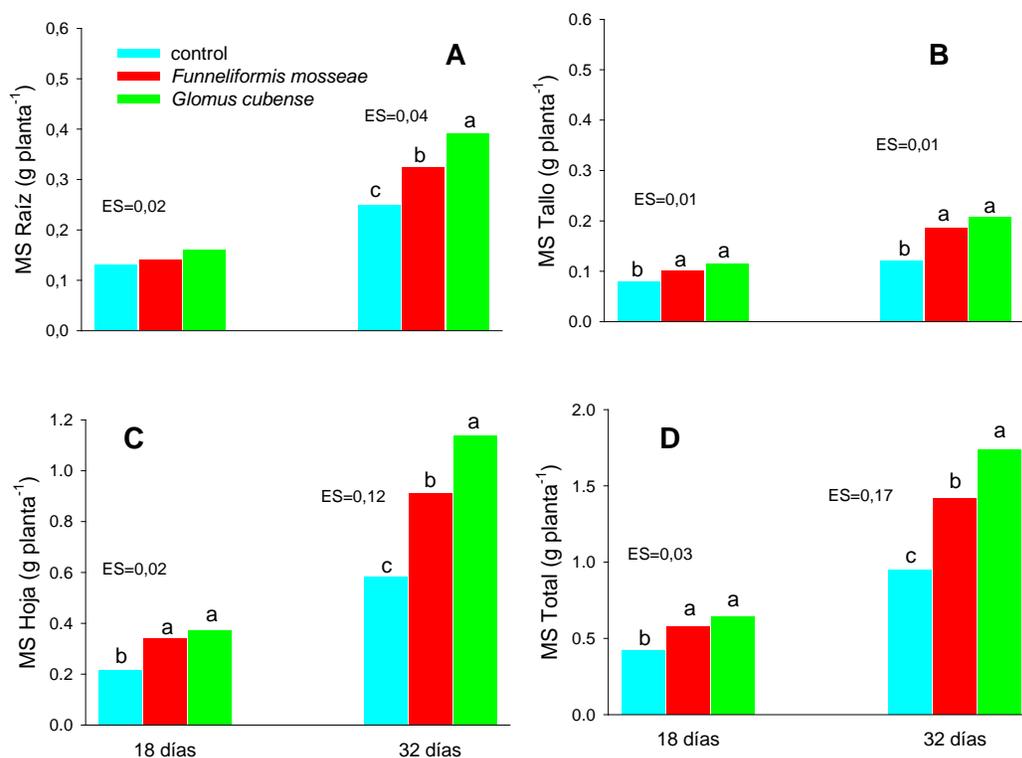


Figura 19. Valores de masa seca por órganos y total de plantas de tomate inoculadas con HMA. Diferencias significativas entre valores del mismo grupo según Duncan $p < 0,05$ ($n=9$).

La masa seca por órganos y total de las plantas manifestó una tendencia similar en la mayoría de los casos (Fig. 19), destacándose a los 32 días el tratamiento con *G. cubense* y en segundo lugar el inoculado con *F. mosseae*. En resumen, el comportamiento de las variables de crecimiento determinadas demuestran los beneficios de la simbiosis MA, así como la mayor eficacia simbiótica de la cepa *G. cubense* para las condiciones de estudio.

En cuanto al contenido total de N (Fig. 20), se detectaron marcadas diferencias entre los tratamientos en los distintos órganos evaluados y en la planta en total, fundamentalmente a los 32 días, donde se destacó por sus valores superiores el tratamiento con *G. cubense*, seguido por el inoculado con *F. mosseae* que también presentó valores elevados respecto al control. Los contenidos totales de P y K (Figs. 21 y 22) manifestaron una tendencia similar a la del N.

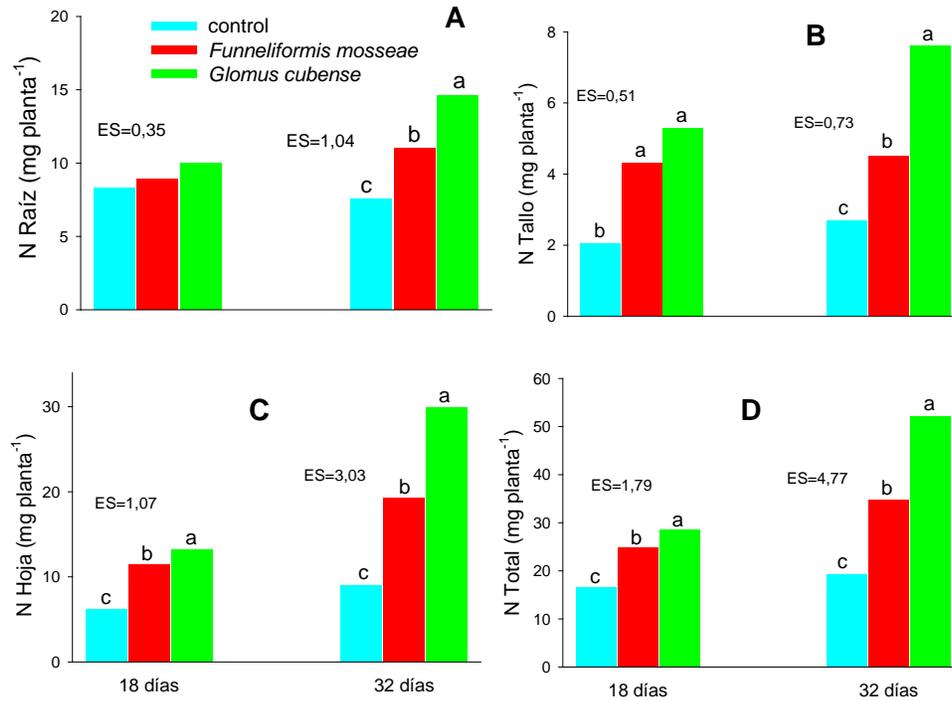


Figura 20. Efecto de la micorrización en el contenido total de N en raíces (A), tallos (B), hojas (C) y total de las plantas (D) de tomate. Diferencias significativas entre valores del mismo grupo según Duncan $p < 0,05$ ($n=9$).

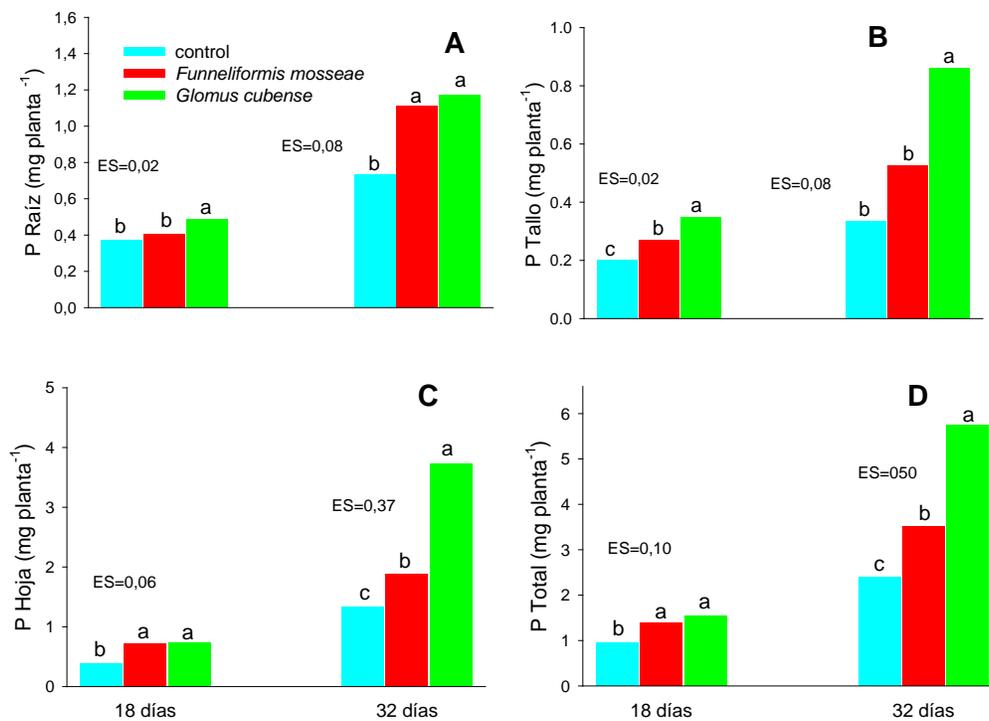


Figura 21. Efecto de la micorrización en el contenido total de P en raíces (A), tallos (B), hojas (C) y total de las plantas (D) de tomate. Diferencias significativas entre valores del mismo grupo según Duncan $p < 0,05$ ($n=9$).

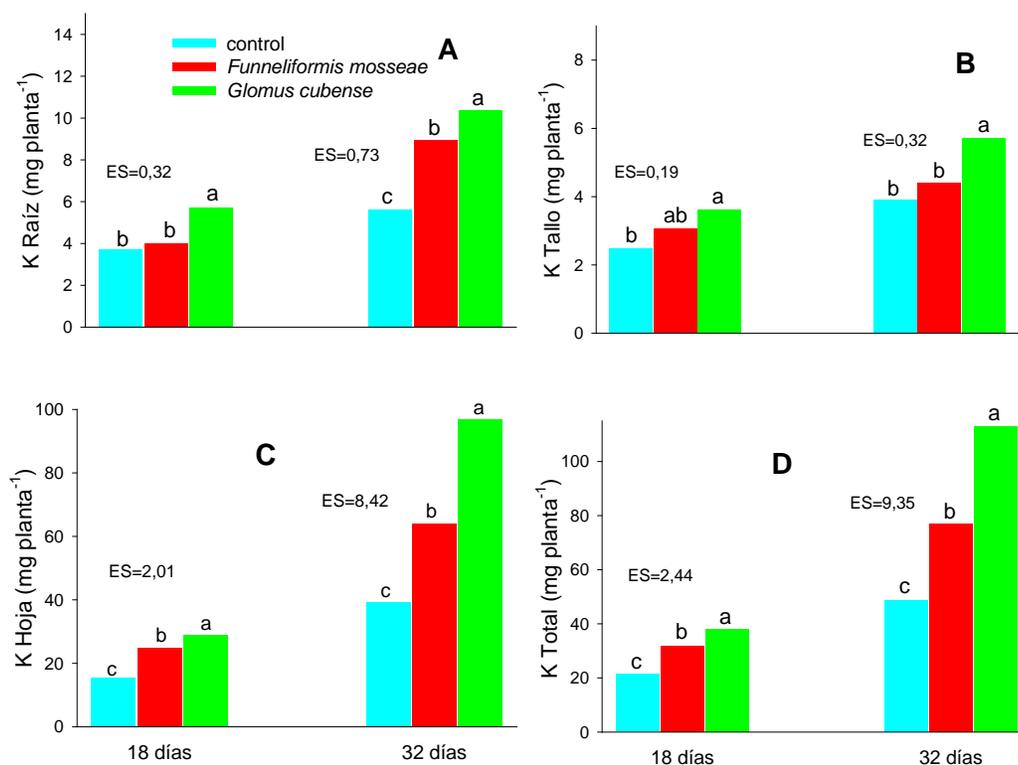


Figura 22. Efecto de la micorrización en el contenido total de K en raíces (A), tallos (B), hojas (C) y total de las plantas (D) de tomate. *Diferencias significativas entre valores del mismo grupo según Duncan $p < 0,05$ ($n=9$).*

El mayor contenido de los nutrientes en las plantas inoculadas con *G. cubense* sugiere que esta cepa es más eficaz en la absorción, translocación y/o intercambio de nutrientes, a pesar de presentar las raíces colonizadas por ambos HMA, similar abundancia de arbusculos que constituyen la estructura donde tiene lugar el intercambio de nutrientes y fotosintatos entre los simbioses.

3.3.3. Determinación de la actividad de enzimas que degradan la pared celular vegetal

Actividad de la enzima Endo-glucanasa (EG)

A los 18 días se observó incremento de la actividad EG (Fig. 23A) por efecto de la micorrización con las dos cepas en estudio, siendo mayor en las raíces tratadas con *G. cubense*. A los 32 días sólo el tratamiento inoculado con *G. cubense* mostró valores superiores al control.

Actividad de la enzima Endo-polimetilgalacturonasa (endo-PMG)

El comportamiento de la actividad endo-PMG (Fig. 23B) fue prácticamente igual al de la EG, siendo más pronunciado el aumento detectado a los 18 días en el tratamiento inoculado con *G. cubense*.

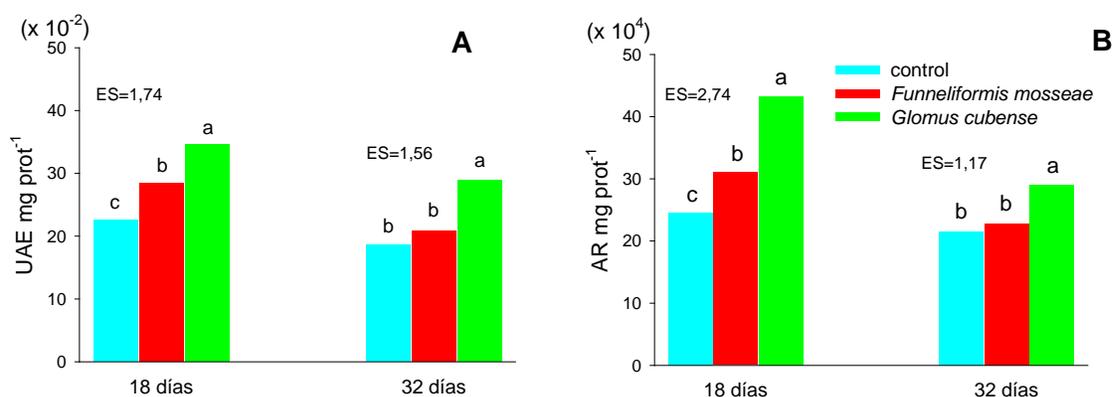


Figura 23. Actividad de las enzimas endo-glucanasa (A) y endo-polimetilgalacturonasa (B) en raíces de tomate inoculadas con HMA. *Diferencias significativas entre valores del mismo grupo según Duncan $p < 0,05$ ($n=9$).*

3.3.4. Determinación en hojas y raíces de las alteraciones asociadas al sistema antioxidante

3.3.4.1. Actividades enzimáticas

Actividad de la enzima SOD

La actividad de SOD en hoja (Fig. 24A) fue menor en los tratamientos micorrizados, presentando las plantas inoculadas con *G. cubense* los valores inferiores. Por el contrario, en raíz (Fig. 24B), los tratamientos inoculados exhibieron los valores superiores y entre ellos sobresalió el micorrizado con *F. mosseae*.

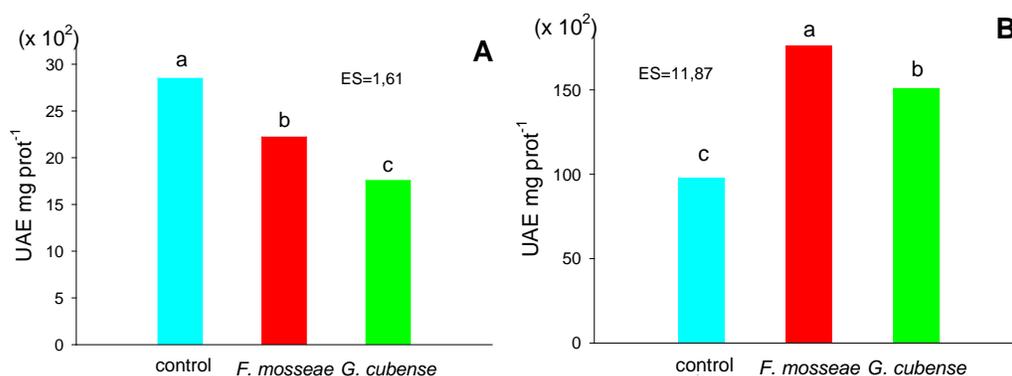


Figura 24. Actividad de la enzima superóxido dismutasa en hoja (A) y raíz (B) de plantas de tomate inoculadas con HMA a los 32 días. *Diferencias significativas entre valores según Duncan $p < 0,05$ ($n=9$).*

Actividad de la enzima Catalasa (CAT)

La actividad catalasa (Fig. 25) mostró un comportamiento similar al de la SOD, tanto en hoja como en raíz, pero las raíces tratadas con *G. cubense* manifestaron los valores más elevados (Fig. 27B).

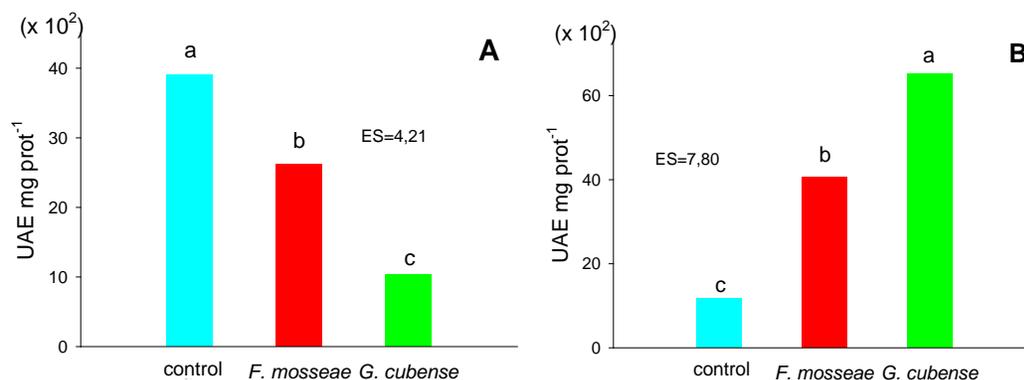


Figura 25. Actividad de la enzima catalasa en hoja (A) y raíz (B) de plantas de tomate inoculadas con HMA a los 32 días. *Diferencias significativas entre valores según Duncan $p < 0,05$ ($n=9$).*

Actividad de la enzima Ascorbato peroxidasa (APX)

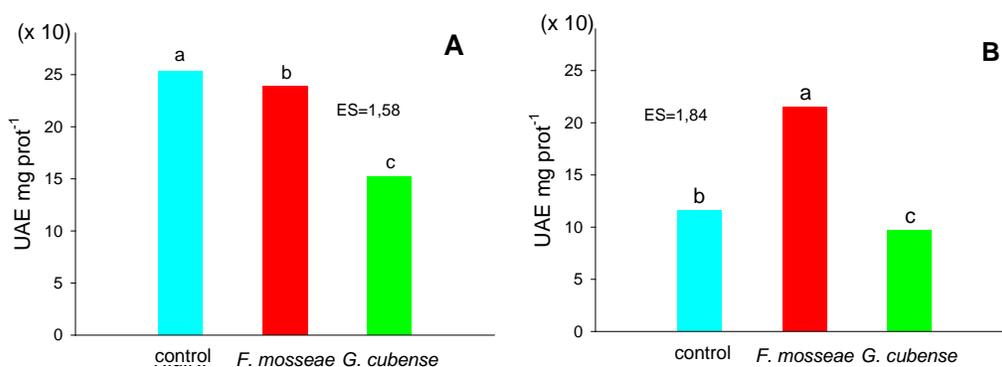


Figura 26. Actividad de la enzima ascorbato peroxidasa en hoja (A) y raíz (B) de plantas de tomate inoculadas con HMA a los 32 días. *Diferencias significativas entre valores según Duncan $p < 0,05$ ($n=9$).*

La actividad APX en hoja (Fig. 26A) mostró la misma tendencia que las actividades SOD y CAT. Sin embargo, en raíz (Fig. 26B) el tratamiento con *F. mosseae* superó al control, mientras que en el inoculado con *G. cubense* se observó una actividad inferior.

Actividad de la enzima Glutation reductasa (GR)

En hoja, la actividad GR (Fig. 27A) mantuvo el mismo comportamiento observado para el resto de las actividades antioxidantes. En raíz (Fig. 27B), el tratamiento con *G. cubense* mostró valores inferiores al control y el inoculado con *F. mosseae* no manifestó diferencias significativas con estos dos tratamientos.

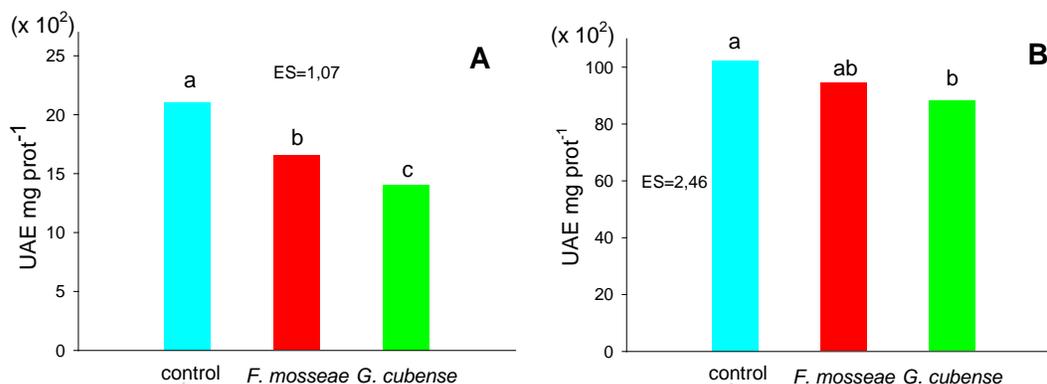


Figura 27. Actividad de la enzima glutatión reductasa en hoja (A) y raíz (B) de plantas de tomate inoculadas con HMA a los 32 días. *Diferencias significativas entre valores según Duncan $p < 0,05$ ($n=9$).*

3.3.4.2. Daño oxidativo a los lípidos (DOL)

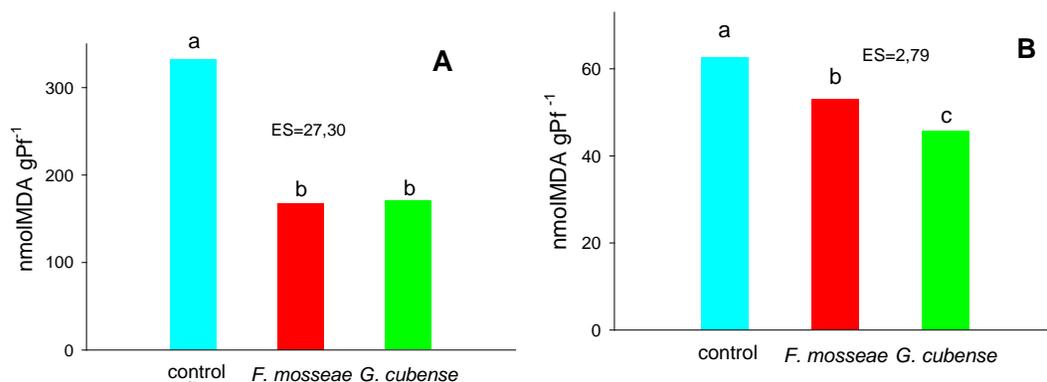


Figura 28. Daño oxidativo a los lípidos en hoja (A) y raíz (B) de plantas de tomate inoculadas con HMA a los 32 días. *Diferencias significativas entre valores según Duncan $p < 0,05$ ($n=9$).*

El contenido de MDA en hoja (Fig. 28A) mostró una reducción de alrededor de un 50% en ambos tratamientos inoculados respecto al control. En raíz (Fig. 28B) fue significativamente menor en los tratamientos micorrizados, siendo más pronunciada la disminución en las tratadas con *G. cubense*, aunque esta disminución no fue tan marcada como en hoja.

Resumiendo las respuestas antioxidantes en los órganos, las observadas en raíces resultaron más específicas a la inoculación con una u otra cepa, en comparación con las de hojas, por lo que pudieran ser de mayor utilidad para establecer las diferencias con un mayor grado de especificidad en la interacción de las plantas con las distintas cepas de HMA. Además, los resultados sugieren que la colonización por la cepa *G. cubense* posiblemente ocasiona una menor situación de estrés a las plantas de tomate que *F. mosseae*, lo cual se deduce del comportamiento de las actividades antioxidantes y del daño oxidativo a los lípidos, principalmente en raíz.

3.3.5. Determinación en hojas y raíces de los patrones de isoenzimas relacionadas con la simbiosis mediante geles de poliacrilamida (PAGE)

Isoenzimas de POX

En hojas (Fig. 29A), a los 18 días se observaron 8 isoformas de POX, de las cuales las No. 2 y 4 solo aparecieron en el tratamiento con *F. mosseae*, la No. 8 fue inducida por *G. cubense*, la No. 9 se indujo por la micorrización con las dos cepas y la No. 10 no se detectó en las plantas inoculadas con *G. cubense*. A los 32 días también se encontraron 8 isoformas, pero solo 6 coincidieron con las anteriores, donde las No. 1, 4 y 5 fueron inducidas por ambos HMA, mientras la No. 8 no se observó en el tratamiento con *G. cubense*. Las isoenzimas No. 1, 4, 5 y 9 parecen ser específicas de la simbiosis micorrízica y se indujeron con las dos cepas en estudio. El resto, constituyen isoenzimas constitutivas.

En raíces (Fig. 29B), se encontró un total de 10 bandas con actividad POX. A los 18 días, las No. 3 y 7 fueron inducidas por la micorrización con ambas cepas, pero de estas, sólo la No. 7 parece ser específica de la simbiosis. A los 32 días se observaron dos isoformas nuevas, la No. 1, inducida por los dos HMA en estudio, y la No. 5, sólo por *F. mosseae*. Además, la isoenzima No. 10 no se detectó en los tratamientos inoculados.

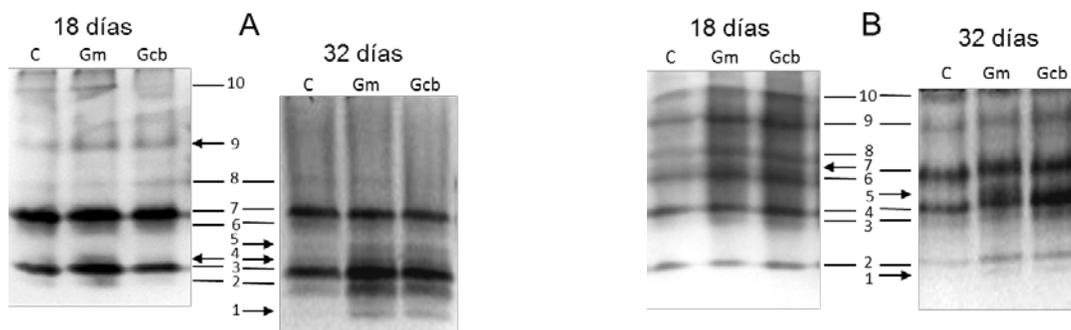


Figura 29. Patrones isoenzimáticos de peroxidases en hoja (A) y raíz (B) de plantas de tomate inoculadas con HMA. C- control, Gm- *F. mosseae*, Gcb- *G. cubense*. Las flechas indican las isoformas inducidas por la micorrización y las líneas las isoformas constitutivas. PAGE, 25 mA.

Isoenzimas de PPO

En hojas sólo aparecieron tres isoenzimas de PPO en todos los tratamientos (Fig. 30A) y la única diferencia encontrada fue la inducción de la No. 1 en las plantas inoculadas en el segundo periodo

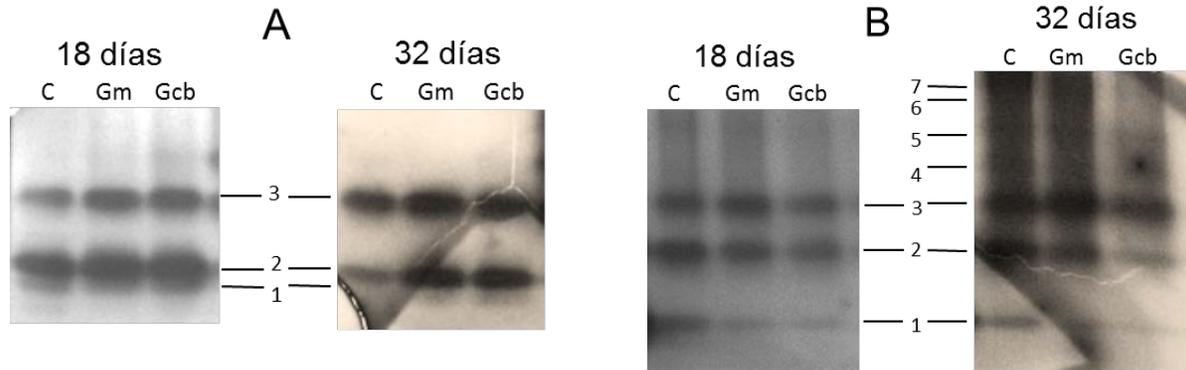


Figura 30. Patrones isoenzimáticos de polifenol oxidasas en hoja (A) y raíz (B) de plantas de tomate inoculadas con HMA. C- control, Gm- *F. mosseae*, Gcb- *G. cubense*. Las líneas indican las isoformas constitutivas. PAGE, 25 mA.

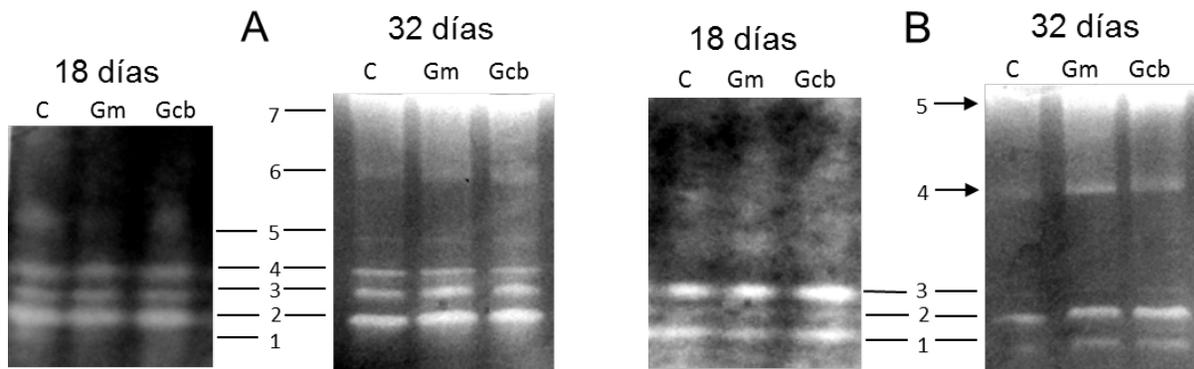


Figura 31. Patrones isoenzimáticos de superóxido dismutasa en hoja (A) y raíz (B) de plantas de tomate inoculadas con HMA. C- control, Gm- *F. mosseae*, Gcb- *G. cubense*. Las flechas indican las isoformas inducidas por la micorrización y las líneas las isoformas constitutivas. PAGE, 25 mA.

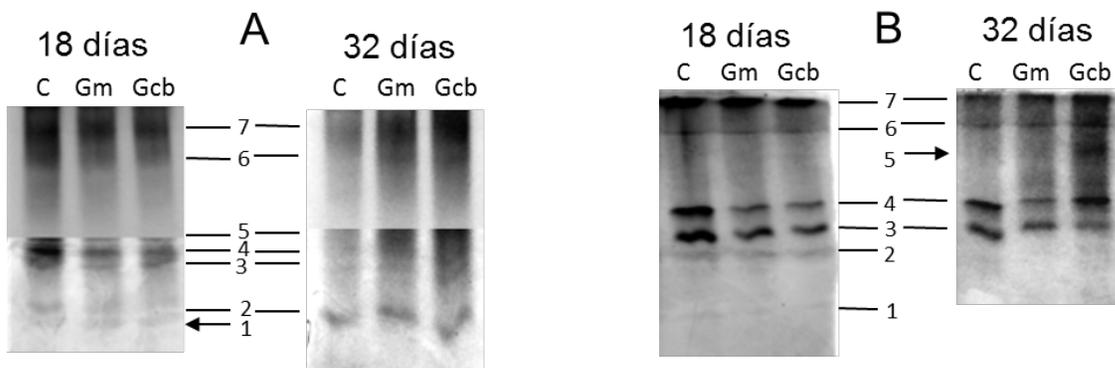


Figura 32. Patrones isoenzimáticos de esterases en hoja (A) y raíz (B) de plantas de tomate inoculadas con HMA. C- control, Gm- *F. mosseae*, Gcb- *G. cubense*. Las flechas indican las isoformas inducidas por la micorrización y las líneas las isoformas constitutivas. PAGE, 25 mA.

evaluado. En raíces, a los 18 días se observó el mismo patrón de tres bandas en todos los tratamientos (Fig. 30B). En cambio, a los 32 días, se detectaron 7 isoformas, donde la No. 4 no se apreció en los tratamientos inoculados, mientras las No. 6 y 7 no se observaron en las plantas tratadas con *G. cubense*.

Isoenzimas de SOD

A los 18 días, en hojas (Fig. 31A), la isoforma de SOD No. 1 apareció solamente en el tratamiento control y la No. 5 no fue detectada en las plantas inoculadas con *F. mosseae*. A los 32 días no se encontraron diferencias entre los tratamientos en la cantidad de isoenzimas presentes. En raíces (Fig. 31B), se observaron 3 isoformas en el primer periodo evaluado sin diferencias entre los tratamientos, mientras que en el segundo se encontraron dos isoenzimas (No. 4 y 5) específicas de la simbiosis con las dos cepas y una (No. 3) inducida sólo por *G. cubense*.

Isoenzimas de EST

En hojas (Fig. 32A), a los 18 días, la isoforma No. 1 fue inducida por ambos HMA y, a los 32 días, las isoenzimas 6 y 7 no se observaron en el tratamiento control. En el sistema radical (Fig. 32B), en el primer periodo evaluado, la isoforma No. 1 no se detectó en el tratamiento con *F. mosseae*, y en el segundo, *G. cubense* indujo la No. 5, siendo específica de esta interacción en particular.

Isoenzimas de Fosfatasas ácidas (APS)

Ocho isoformas con actividad APS se aprecian en raíz (Fig. 33), de las cuales la No. 6 no se detectó en las plantas inoculadas, a los 18 días, mientras a los 32 días, la No. 5 fue inducida sólo por *G. cubense* y la No. 8, por ambos HMA inoculados.

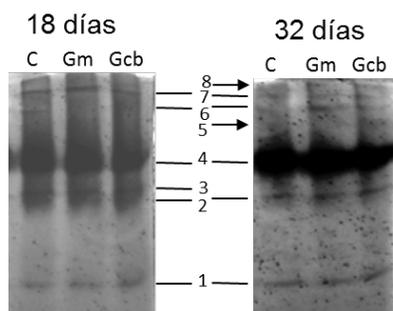


Figura 33. Patrones isoenzimáticos de fosfatasa ácida en raíces de tomate inoculadas con HMA. C- control, Gm- *F. mosseae*, Gcb- *G. cubense*. Las flechas indican las isoformas inducidas por la micorrización y las líneas las isoformas constitutivas. PAGE, 25 mA.

3.3.6. Relación de las actividades enzimáticas y los patrones de isoenzimas con la infectividad y la eficacia simbiótica de las cepas de HMA seleccionadas en plantas de tomate

En los análisis de componentes principales realizados en cada grupo de variables para seleccionarlas de acuerdo a su contribución a las componentes, las dos primeras componentes explicaron el 100% de la variabilidad de los datos, incluso hubo casos donde la primera componente explicó prácticamente toda la variabilidad, lo cual indica la alta relación existente entre las variables de esos grupos (Anexo VII), por lo que se seleccionaron de una a cuatro variables representativas del comportamiento de cada componente según el grupo.

Todas las variables del hongo determinadas mostraron una alta correlación muy significativa y positiva entre ellas (Anexo VII Tabla I), con independencia del periodo y de la evaluación realizada. Este análisis y los resultados del ANOVA de estas variables (Tablas 7 y 8), constituyeron criterios consistentes para la selección de la colonización micorrízica y la intensidad correspondientes a las estructuras fúngicas totales (vivas y muertas), así como la abundancia arbuscular estimada a través de la actividad SDH (estructuras vivas), todo a los 32 días. Es de destacar que para la selección influyó el hecho de que la técnica de tinción con azul de tripan (AT) es la utilizada rutinariamente en el laboratorio de Micorrizas del INCA, por lo que este trabajo demuestra la factibilidad y suficiencia de su aplicación en condiciones similares de estudio.

Al analizar los resultados del ANOVA de las variables de crecimiento (Figs. 17-19) sólo se consideraron las evaluaciones realizadas a los 32 días, seleccionándose la altura, el área foliar y la masa seca total según el análisis de componentes (Anexo VII Tabla II). El análisis de componentes principales realizado a las variables nutricionales (Anexo VII Tabla III) y teniendo en cuenta los resultados del ANOVA (Figs. 20-22), se seleccionaron el N total, el P total y el K total, a los 32 días. Respecto a las actividades específicas de las enzimas que degradan la pared celular vegetal y de los sistemas antioxidantes (Anexo VII Tabla IV), se seleccionaron las variables SOD en hoja y APX, CAT, y EG, en raíz, a los 32 días, así como Endo-PMG a los 18 días.

En cuanto a las isoenzimas de POX (Anexo VII Tabla V), fueron seleccionadas las isoformas: No. 2 de hoja, a los 18 días, y la No. 5, a los 32 días; en raíz, la No. 3 a los 18 días y la No. 5 a los 32 días.

Para las isoenzimas de PPO y APS, en raíz (Anexo VII Tabla VI), se seleccionaron la isoforma de PPO No. 6 a los 32 días, y la de APS No. 6 a los 18 días. En hoja se tomó la única isoforma polimórfica de PPO observada (Fig. 30A). El análisis de componentes principales de los patrones de las isoenzimas de SOD y EST obtenidos (Anexo VII Tabla VII), permitieron seleccionar las de SOD de raíz No. 3 y 5 a los 32 días, y las de EST No. 1 a los 18 días y la No. 7 a los 32 días.

En las correlaciones de las variables del hongo sobresale la relación alta y muy significativa con la actividad de las enzimas SOD_{hoja} , $CAT_{raíz}$ y $EG_{raíz}$, a los 32 días, así como $Endo-PMG_{raíz}$ a los 18 días, siendo negativa con la SOD_{hoja} y positiva con las otras (Tabla 9). Esto significa que cuando la colonización micorrízica, la intensidad y la abundancia arbuscular son superiores, la actividad SOD_{hoja} disminuye, mientras que la $CAT_{raíz}$, la $EG_{raíz}$ y la $Endo-PMG_{raíz}$ aumentan.

El análisis de los intervalos de confianza realizado a las isoenzimas seleccionadas reveló que los valores superiores en las variables del hongo (colonización, intensidad y abundancia arbuscular) se relacionan con la presencia de las isoformas de POX_{hoja} No. 5 a los 32 días, $POX_{raíz}$ No. 3 a los 18 días, $POX_{raíz}$ No. 5 a los 32 días, PPO_{hoja} No. 1 a los 32 días, $SOD_{raíz}$ No. 3 y 5 a los 32 días y $EST_{raíz}$ No. 7 a los 32 días, y con la ausencia de las isoformas $PPO_{raíz}$ No. 6 a los 32 días y $APS_{raíz}$ No. 6 a los 18 días (Anexo VIII Tabla A).

Tabla 9. Correlación de Pearson entre las variables del hongo y los sistemas antioxidantes y la actividad de enzimas que degradan la pared celular vegetal

	SOD hoja 32d	APX raíz 32d	CAT raíz 32d	Endo-PMG 18d	EG 32d
Colonización (AT) 32d	-0,969**	,094	0,975**	,910**	,844**
Intensidad (AT) 32d	-,980**	-,073	0,984**	,945**	,909**
Ab. arbuscular 32d	-,942**	,206	0,940**	,854**	,774**

**la correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

Marcadas en negrita las relaciones muy significativas más altas y relevantes.

De forma similar, las variables de crecimiento de las plantas correlacionadas exhibieron una relación muy significativa y positiva con la actividad $CAT_{raíz}$ y $EG_{raíz}$, a los 32 días, y $Endo-PMG_{raíz}$, a los 18 días; mientras que fue negativa con SOD_{hoja} , a los 32 días (Tabla 10). Estos resultados revelan que el incremento de las actividades $CAT_{raíz}$, $EG_{raíz}$ y $Endo-PMG_{raíz}$ y el decremento de SOD_{hoja} se corresponden con valores elevados en la masa seca total, la altura y el área foliar de las plantas de

tomate. Los resultados de la relación entre estas variables y las isoformas analizadas (Anexo VIII Tabla B), coincidieron con lo encontrado para las variables del hongo.

Tabla 10. Correlación de Pearson entre las variables de crecimiento de las plantas y los sistemas antioxidantes y la actividad de enzimas que degradan la pared celular vegetal

	SOD hoja 32d	APX raíz 32d	CAT raíz 32d	Endo-PMG 18d	EG 32d
MS total 32d	-,970**	-,036	,973**	,941**	,893**
Altura 32d	-,938**	-,050	,950**	,912**	,873**
A foliar 32d	-,928**	-,095	,959**	,945**	,900**

**la correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

Marcadas en negrita las relaciones muy significativas más altas y relevantes.

En cuanto a las variables nutricionales correlacionadas, también se observó una alta relación muy significativa y positiva con CAT_{raíz} y EG_{raíz}, a los 32 días, y con Endo-PMG_{raíz} a los 18 días; mientras que fue negativa con SOD_{hoja} a los 32 días (Tabla 11). Respecto a las isoenzimas analizadas (Anexo VIII Tabla C), se encontró igual relación entre éstas y los contenidos totales de N, P y K en las plantas a los 32 días, que para las variables del hongo y de crecimiento de las plantas. Los valores de Rf de las isoformas mencionadas aparecen en el Anexo VIII (Tabla D).

Tabla 11. Correlación de Pearson entre las variables de nutrición de las plantas y los sistemas antioxidantes y la actividad de enzimas que degradan la pared celular vegetal

	SOD hoja 32d	APX raíz 32d	CAT raíz 32d	Endo-PMG 18d	EG 32d
N total 32d	-0.965**	-0.184	0.989**	0.985**	0.955**
P total 32d	-0.930**	-0.336	0.968**	0.992**	0.988**
K total 32d	-0.957**	-0.218	0.985**	0.986**	0.963**

**la correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

Marcadas en negrita las relaciones muy significativas más altas y relevantes.

La mayoría de las isoformas analizadas mostró relación con las variables del hongo y de crecimiento y nutrición de las plantas. En cambio, las correlaciones de Pearson permitieron delimitar a un nivel más específico las actividades enzimáticas que manifestaron una relación muy significativa con los distintos grupos de variables estudiadas, donde sobresalen SOD_{hoja}, CAT_{raíz} y EG_{raíz}, a los 32 días, y Endo-PMG_{raíz}, a los 18 días. Por ello, estos últimos pudieran considerarse los marcadores bioquímicos de mayor utilidad para caracterizar la infectividad y la eficacia simbiótica de los HMA.

Discusión

IV. DISCUSIÓN

4.1. Caracterización y selección de hongos micorrizógenos arbusculares en las fases del establecimiento de la simbiosis con tomate

Es conocido que no existe una especificidad estricta entre las especies vegetales y los distintos HMA. Sin embargo, algunos de estos hongos benefician en mayor grado a un determinado hospedero en comparación con otros y, fundamentalmente, muestran un cierto grado de adaptación para establecer la simbiosis micorrízica y funcionar bajo determinadas condiciones edafoclimáticas, lo cual determina la compatibilidad funcional y la eficacia de la misma (Morgan *et al.*, 2005; Rivera *et al.*, 2007). Este hecho pudiera estar influenciado, entre otros factores, por la diversidad taxonómica (Schüßler y Walker, 2010) y funcional (Smith y Read, 2008) de estos hongos.

Numerosos trabajos hacen énfasis en las diferencias estructurales y, principalmente, funcionales entre géneros, especies e incluso ecotipos de HMA (Scervino *et al.*, 2005; 2007; 2009); sin embargo, se dispone de menos información acerca de las diferencias en los niveles de infectividad. Los resultados del estudio de la colonización micorrízica evidenciaron que las cepas de HMA evaluadas colonizaron las raíces de tomate, aunque, el crecimiento intrarradical de las mismas presentó variaciones durante el periodo estudiado, lo cual es indicativo de diferencias en el grado de infectividad. De acuerdo a esta consideración y fundamentalmente, sobre la base de los porcentajes de intensidad a los 32 días, las seis cepas se distribuyeron en cuatro grupos bien definidos con diferentes niveles de infectividad (Tabla 4).

Estos resultados concuerdan con los de Lambais *et al.*, (2003), quienes encontraron diferencias en las tasas de colonización radical de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) siendo mayor la infectividad de *Rhizophagus clarus*, syn. *G. clarum* (Nicolson & Schenck) Walker & Schüßler en comparación con *G. intraradices*. Por su parte, Lambais y Mehdy (1996) observaron diferencias en la infectividad de dos cepas de *G. intraradices* al colonizar raíces de soya (*Glycine max* L.); sin embargo en el presente trabajo se aprecia el mismo nivel de infectividad para dos cepas de la misma especie, aunque en este caso es *G. mosseae*. En contraste, Pozo *et al.*, (2002) detectaron porcentajes

similares de colonización en tomate inoculado con *G. mosseae* y *G. intraradices*; aunque un estudio posterior bajo las mismas condiciones reveló que la cepa de *G. intraradices* presenta una intensidad superior a la de *G. mosseae* (López-Ráez *et al.*, 2010). Estas discrepancias pudieran atribuirse al hecho de que son pocos los estudios que evalúan más de dos cepas, además de que en la mayoría de los casos se determina la infectividad solo mediante la variable colonización, como en los trabajos de Noval *et al.*, (2007), Wu *et al.*, (2008), Arriagada *et al.*, (2009), Azcón *et al.*, (2009), Mummey *et al.*, (2009), Mazzoncini *et al.*, (2010), Breuillin *et al.*, (2010) y López-Ráez *et al.*, (2011).

En cambio, en esta tesis se demuestra que la intensidad posee mayor utilidad para discernir las diferencias en la infectividad de estos hongos al nivel deseado. Esto se hace más evidente cuando se evalúan varias cepas, como es el caso.

Estudios similares informaron valores de colonización e intensidad superiores a los encontrados aquí, lo que pudiera atribuirse a los diferentes métodos de inoculación utilizados: depósito de 2g por maceta en cada nicho de siembra (Fundora *et al.*, 2008) y recubrimiento de las semillas (Pérez, 2010), según la metodología que aparece en INCA (2001). Ambos métodos benefician la colonización debido a que propician la proximidad entre el hongo y las raicillas una vez germinadas las semillas y por la presencia en el inóculo de propágulos como hifas infectivas y raíces precolonizadas (Fernández *et al.*, 1999; Smith y Read, 2008), además de contener íntegramente la micorrizosfera característica de los HMA (Miransari, 2011). De acuerdo a este análisis, existe desventaja en el método utilizado en este experimento de la tesis (acápite 2.1), donde el inóculo consistió sólo en esporas que, en adición, fueron desinfectadas.

La selección del método de inoculación en este experimento se basó en el objetivo propuesto de conocer las respuestas diferenciales de la planta a la inoculación con distintos hongos micorrizógenos sin la influencia de la micorrizosfera, lo que se justificó con las variaciones encontradas en la mayoría de las variables, las cuales revelaron diferencias entre cepas que no fueron detectadas por trabajos anteriores como el de Pérez (2010). Pero no se debe obviar que la desinfección realizada a las esporas eliminó parte de la microbiota asociada a su pared exterior, la cual

desempeña un papel fundamental en la estimulación de la germinación, en el desarrollo del tubo germinativo y la ramificación hifal, y por tanto, en el establecimiento y funcionamiento de la simbiosis. De hecho, algunos autores consideran esta interacción tripartita con la intervención de hongos micorrizógenos, plantas y microorganismos asociados (Artusson *et al.*, 2006; Bonfante-Fasolo y Anca, 2009).

Uno de los beneficios que se le atribuye a los HMA es su capacidad para promover el crecimiento y desarrollo vegetal, lo que se confirma en esta tesis, así como el rendimiento de los cultivos (Rivera *et al.*, 2007; Smith y Read, 2008). A pesar de que los HMA desarrollan asociaciones no específicas con sus plantas hospederas, se plantea que algunas combinaciones planta-hongo pueden resultar en una simbiosis más efectiva (Feddermann *et al.*, 2010).

El comportamiento de la masa seca total y de la TRC al finalizar el experimento (Tablas 5 y 6), periodo en el que se había alcanzado el estadio simbiótico, permitió separar las seis cepas evaluadas en dos grupos con diferente eficacia simbiótica, donde sobresalen en el grupo de mayor eficacia *G. hoi-like*, *G. mosseae*1 y *G. intraradices*. Trabajos realizados en campo han constatado el buen comportamiento de estas cepas sobre el cultivo del tomate bajo las condiciones de pH y fertilidad del sustrato utilizado, destacándose *G. hoi-like* como la más promisoría (Terry *et al.*, 2005; Rivera *et al.*, 2007; Mujica y Medina, 2008), lo cual se corrobora aquí al manifestar esta cepa la mayor infectividad y una alta eficacia.

No obstante, no se apreció una correspondencia total entre la infectividad de las cepas y la eficacia simbiótica, al encontrarse ubicadas en el grupo de mayor eficacia cepas con los tres niveles de infectividad, pero no se debe obviar que este estudio abarca sólo la etapa inicial del ciclo del tomate y del proceso simbiótico. Resalta la cepa *A. scrobiculata*, la que a pesar de mostrar una infectividad elevada no se consideró eficaz en las condiciones de estudio.

En este sentido, se ha señalado que la respuesta a la micorrización puede variar entre especies de plantas y cultivares con independencia de los niveles de infectividad, y que esta respuesta puede estar influenciada por factores abióticos como el pH del suelo. En el caso de *A. scrobiculata* se

recomienda para suelos con pH ácido y baja fertilidad (Rivera *et al.*, 2003), condiciones éstas diferentes a las del sustrato empleado en este trabajo. También se reconoce que los HMA varían en su habilidad, no sólo para colonizar una raíz, sino para tomar del suelo y transferir a la planta nutrientes como el P y el K (Mohammadi *et al.*, 2008; Fernández, 2012), constituyendo éste uno de los aspectos clave que determina la eficacia de la simbiosis, el cual pudo influir de manera negativa en el comportamiento de las plantas inoculadas con *A. scrobiculata*.

En el caso de *G. intraradices*, que mostró una alta eficacia a pesar de su menor infectividad, para las condiciones de estudio, se ha encontrado que es menos asociativa y eficaz que *G. mosseae* (Fundora *et al.*, 2008; Mujica y Medina, 2008). Se ha observado que la ocupación fúngica de estos hongos tiende a disminuir en etapas posteriores del cultivo, hacia los 46 días (Pérez, 2010), relacionándose con la floración masiva y fructificación. Los resultados obtenidos influyeron negativamente en su selección para continuar el trabajo, pues al ser baja su infectividad y disminuir la colonización con posterioridad, es poco probable que mantenga una elevada eficacia en la etapa final del ciclo del tomate.

Por su parte, los ecotipos de *G. mosseae*, aun cuando presentaron el mismo nivel de infectividad, manifestaron diferencias funcionales en la interacción con el tomate, particularmente en su crecimiento y desarrollo. Esto confirma lo informado por Öpik *et al.*, (2008b) para aislados de *G. intraradices* con diferente origen geográfico, los que mostraron una colonización radical variable en velocidad y extensión, así como en su efecto sobre la biomasa vegetal.

En la literatura internacional está bien documentada la acción positiva de los HMA en la bioprotección vegetal contra diversos patógenos, constituyendo la inducción de mecanismos bioquímicos de defensa una de las vías que explica la ocurrencia de este fenómeno (García-Garrido y Ocampo, 2002; Noval *et al.*, 2007; Pozo *et al.*, 2009; López-Ráez *et al.*, 2010; Martínez-Medina *et al.*, 2010). Los resultados de las actividades enzimáticas y los patrones de isoenzimas permitieron distinguir las alteraciones provocadas por las distintas cepas, constituyendo un valioso complemento de los criterios de infectividad y eficacia simbiótica para la selección de *G. hoi-like* y *G. mosseae1*, los cuales sobresalieron por su comportamiento promisorio en todas las variables determinadas.

En este punto, es importante destacar que la formación de las micorrizas representa una invasión masiva a las raíces de las plantas, a pesar de su naturaleza simbiótica, aunque la proliferación del hongo está restringida a tejidos específicos de la raíz (Barea *et al.*, 1991). El hecho de que la planta responda con aumentos transientes de los niveles de enzimas relacionadas con la defensa (Vierheilig *et al.*, 2008), indica la ocurrencia de una fase de estrés biótico al inicio del establecimiento de la simbiosis, que generalmente se corresponde con cierta inhibición o retardo en el crecimiento vegetal, dada la demanda de fotosintatos por parte del HMA (Smith y Read, 2008).

Con el avance de la colonización y la formación de los arbusculos, las respuestas enzimáticas son subsecuentemente reprimidas, lo cual apunta a un estadio simbiótico al hacerse efectivos los beneficios que reporta a la planta, superando los perjuicios (Smith y Read, 2008). El paso de un estadio al otro depende de la eficiencia micorrízica, que a su vez está determinada por la relación planta-HMA-suelo (Rivera *et al.*, 2007).

Al analizar el comportamiento de las actividades enzimáticas GPX y PPO en raíz (Fig. 2) y los resultados de las variables del hongo (Tabla 4) y el crecimiento de las plantas (Tabla 5), se evidenció relación entre las mismas. En el primer periodo de evaluación, las plantas mostraron respuestas a la invasión por los HMA con mayores alteraciones en las actividades GPX y PPO, por encontrarse aún el proceso simbiótico en fase de estrés biótico. Luego se observó una disminución generalizada de la actividad enzimática (fundamentalmente GPX), lo que al parecer facilitó la colonización intraradical por los HMA estudiados, hecho que se demostró con los incrementos de la colonización e intensidad en los tratamientos inoculados, indicando que en el segundo periodo de evaluación ya se había arribado a la fase simbiótica.

La disminución abrupta de estas actividades a los 32 días, incluso en las plantas controles, pudiera asociarse también con el inicio de la fase de floración primaria, en la que el metabolismo primario demanda la mayor cantidad de energía y metabolitos de reserva por parte del vegetal (Sam e Iglesias, 1993; Nuez, 1995). Así, por economía celular, el metabolismo secundario se mantiene en niveles basales. Pérez (2010) encontró disminución de estas actividades entre los 30 y 36 días.

Ambas enzimas participan en el reforzamiento de las paredes celulares, mediante la polimerización oxidativa de polifenoles con la producción de lignina, la formación de estructuras papilares y el entrecruzamiento de proteínas de la pared (Hiraga *et al.*, 2001; Mayer, 2006). Existen evidencias de la incapacidad de estos hongos para degradar estos compuestos y por tanto, penetrar las paredes reforzadas con los mismos. De hecho, no se ha detectado actividad peroxidasa en células con arbusculos (Gianinazzi *et al.*, 1996), ni se ha observado lignificación en dichas células (Harrison, 1999). Lo cual refuerza la importancia de la disminución de las actividades GPX y PPO para el establecimiento de la simbiosis MA.

De esta forma, los incrementos de ambas actividades en las raíces micorrizadas con las cepas de *G. mosseae*, a los 18 días (Fig. 2), pudieron determinar los bajos valores de las variables del hongo observados (Tabla 4), mientras que la disminución posterior de la actividad GPX pudo haber favorecido el avance de la colonización. Este comportamiento permitió categorizar estas cepas en niveles intermedios de infectividad, aunque mostraron diferencias en sus eficacias, considerándose la cepa *G. mosseae1* de mayor eficacia simbiótica para las condiciones de estudio (Tablas 5 y 6). Este resultado sugiere que la actividad superior de GPX detectada al inicio en las raíces inoculadas con *G. mosseae2*, entre otras causas, pudo marcar la diferencia encontrada entre estos dos ecotipos de la misma especie.

El incremento de actividad POX, transitorio y localizado en raíz, en estadios tempranos de la colonización, ha sido asociado con el control del desarrollo del hongo en los tejidos superficiales de la raíz y con la respuesta del tejido radical a la invasión, en principio, de un organismo extraño (Spanu y Bonfante-Fasolo, 1988; Fries *et al.*, 1996). Los resultados de la actividad GPX, observados en este estudio, apoyan esta teoría.

Respecto al resto de las enzimas analizadas en este experimento, la cepa *G. hoi-like* mostró los valores superiores de las actividades quitinasa, β -1,3- glucanasa y PAL (Figs. 3 y 4), lo cual sugiere que la interacción de esta cepa con las plantas de tomate está más favorecida para las condiciones experimentales. La cepa *G. mosseae1* manifestó un comportamiento diferente, aunque también

presentó valores elevados de actividad quitinasa y β -1,3- glucanasa a los 18 días (Figs. 3). Estos resultados corroboran los de Pérez (2010), quien observó que estas dos cepas mostraron una rápida transición de la fase de estrés biótico a la simbiótica.

Según trabajos previos y en concordancia con lo encontrado en este estudio, se deduce que en el estadio de estrés biótico la actividad de las quitinasas y β -1,3-glucanasas pudiera estar asociada de forma directa al desarrollo del hongo dentro de la raíz y a su morfogénesis, así como a la emisión de señales como parte del reconocimiento entre los simbioses. Esto se sustenta en el hecho de que la quitina y los glucanos, sustratos respectivos de ambas enzimas, están presentes en la pared celular de los HMA, difiriendo en cantidad y forma de acuerdo a la estructura del hongo. El contenido de β -1,3 glucanos en las hifas extrarradicales es mayor, siendo menos abundantes en las hifas intercelulares e indetectables en los arbusculos (Gollotte *et al.*, 1997). Se ha observado que la organización macromolecular de la quitina se va modificando, desde más compleja en la hifa extrarradical, hasta más simple en el arbusculo (Bonfante-Fasolo *et al.*, 1990; Balestrini y Bonfante-Fasolo, 2005).

Lo expuesto sugiere el papel de estas enzimas en el desarrollo de la simbiosis, lo cual se confirma con los resultados de la tesis. La actividad superior de ambas enzimas en el primer periodo evaluativo (Fig. 3), al parecer, favoreció la diseminación intrarradical de *G. hoi-like*, según los elevados porcentajes de colonización e intensidad obtenidos (Tabla 4). El incremento de la acción lítica asociada a las estructuras fúngicas, por las enzimas quitinasa y β -1,3-glucanasa pudo contribuir a simplificar la pared del hongo, formándose más rápido las distintas estructuras en esta interacción, hasta llegar a los arbusculos donde es muy fina para facilitar el intercambio entre los simbioses, lo que conllevó a una alta eficacia de esta cepa para las condiciones de estudio (Tablas 5 y 6). La cepa *G. mosseae1* también provocó aumentos de dichas actividades enzimáticas, pero inferiores a los de *G. hoi-like* (Fig. 3), lo que pudo condicionar su menor desarrollo intrarradical, siguiendo el análisis anterior, que se evidenció con el nivel intermedio de infectividad alcanzado.

En su estudio, Pérez (2010) demostró que las enzimas relacionadas con la defensa en plantas no están involucradas de forma independiente, sino que es el funcionamiento en conjunto de las mismas

el que determina la respuesta de defensa del tomate frente a la infección por distintos patógenos. De forma similar, en el presente trabajo, fue la respuesta combinada de las enzimas evaluadas la que determinó, en última instancia, el comportamiento de las plantas inoculadas con cada cepa en particular en términos de infectividad y eficacia simbiótica.

Por ejemplo, para la cepa *Glomus* sp1, al parecer las bajas actividades de GPX y PPO al inicio, con ligeros incrementos al final del estudio, en combinación con elevadas actividades de quitinasa y β -1,3-glucanasa en estadio temprano, así como el decremento de la PAL en estadio tardío (Fig. 4), permitieron su clasificación entre las de menor infectividad y eficacia bajo las condiciones estudiadas. En este caso, los incrementos de actividad quitinasa y β -1,3-glucanasa pudieran estar más bien asociados al intercambio de señales planta-HMA que se produce durante el reconocimiento, según planteamientos de García-Garrido y Vierheilig (2009), y conduce al tránsito rápido o lento de la fase de estrés biótico a la de simbiote.

En el segundo periodo evaluativo, la disminución generalizada de la actividad β -1,3-glucanasa (Fig. 3B) pudiera ser consecuencia de la atenuación de las respuestas de defensa informada (García-Garrido y Vierheilig, 2009). La actividad quitinasa en esta etapa se ha relacionado con la formación y degradación de arbusculos (Lambais, 2000; Franken *et al.*, 2007), siendo superior en las raíces inoculadas con *G. hoi*-like en el presente trabajo, lo cual es indicativo de la mayor compatibilidad funcional de esta cepa para las condiciones de estudio.

En la simbiosis MA se ha descrito la activación del metabolismo de los fenilpropanoides y se asocia a la penetración del hongo en la raíz, con la consecuente elicitación de respuestas defensivas similares a las desarrolladas durante las interacciones patogénicas (Volpin *et al.*, 1994; Hause y Fester, 2005). En el presente estudio se observó aumento de la actividad PAL, fundamentalmente en las raíces inoculadas con *G. hoi*-like (Fig. 4), las que al alcanzar una mayor colonización e intensidad y mostrar estas plantas una alta eficacia simbiótica, se infiere que también presentaban un contenido superior de estructuras de intercambio características de este tipo de simbiosis.

Esta especulación se basa en la acumulación de transcritos de esta enzima observada sólo en las células con arbusculos (Blee y Anderson, 1996). Además, el hecho de que las raíces tratadas con *A. scrobiculata* también mostraron una elevada actividad PAL a los 18 días, apoya esta teoría, presentando esta cepa una alta colonización e intensidad en este periodo (Tabla 4). En estadio posterior no se observó el incremento de actividad, manifestando la cepa una colonización inferior a *G. hoi-like*, todo lo cual pudo condicionar su alta infectividad y baja eficacia simbiótica.

En resumen, las respuestas de las actividades de las enzimas relacionadas con los mecanismos defensivos de las plantas, en raíces de tomate, influyeron en la ubicación de la cepa *G. hoi-like* en el grupo de las de mayor infectividad y eficacia simbiótica, bajo las condiciones de estudio.

La determinación de las actividades enzimáticas en las hojas (Figs. 5-7) demostró que las cepas de HMA evaluadas en este trabajo indujeron respuesta sistémica en las plantas de tomate cv. 'AMALIA', con diferencias dependientes de la cepa involucrada. Este resultado sugiere que probablemente estas plantas posean mejores condiciones fisiológicas para enfrentar una situación de estrés dada y en lo principal, el ataque de patógenos foliares, como reveló Pérez (2010), similar a lo que se ha descrito para patógenos radicales (Vierheilig *et al.*, 2008; Martínez-Medina *et al.*, 2010).

Trabajos previos apuntan hacia la existencia de respuesta sistémica en zonas no micorrizadas de la raíz (Cordier *et al.*, 1998; Pozo *et al.*, 2002), aunque éstas no involucraron a las enzimas analizadas en este estudio. Pozo y Azcón-Aguilar (2007) concluyeron en estudios posteriores que, incluso en tejido foliar, se llega a manifestar resistencia inducida provocada por la micorrización arbuscular (MIR), la cual al parecer es efectiva contra patógenos necrótofos, no así contra los biótropos. Los resultados de Pozo *et al.*, (2009) y Pérez (2010) apoyan esta hipótesis.

La mayoría de las investigaciones realizadas indican que la inducción de actividad de las enzimas relacionadas con los procesos defensivos en las plantas micorrizadas es localizada en la raíz, débil y transiente (García-Garrido y Ocampo, 2002; Vierheilig *et al.*, 2008). No obstante, Pozo (1999) y Pérez (2010) detectaron respuesta sistémica en el patrón de isoenzimas POX y en la actividad GPX, respectivamente, en la interacción tomate-HMA, siendo distinto el efecto según el hongo inoculado.

El análisis integral de las actividades enzimáticas locales y sistémicas realizado (Fig. 8) refleja las diferencias en la respuesta del tomate de acuerdo a la cepa de HMA inoculada y evidencia los múltiples mecanismos de intercambio de señales entre los simbiontes informados (Harrison, 2005; Parniske, 2008). Estas diferencias funcionales no resultan sorprendentes si se tienen en cuenta las diferencias morfológicas y de procedencia entre las seis cepas evaluadas (Anexo II). Cabe resaltar el comportamiento completamente distintivo de las plantas tratadas con *G. hoi-like* entre los tratamientos inoculados, en estas variables.

Por su parte, la determinación de actividad enzimática no brinda información precisa sobre la participación de las enzimas con igual función (isoenzimas) en un proceso u otro, sin embargo, autores como Pozo *et al.*, (2002) han detectado la inducción diferencial de isoformas con actividad quitinasa y β -1,3-glucanasa en la interacción del tomate con dos especies de *Glomus*. Por estas razones resulta interesante analizar los patrones de isoenzimas que inducen cada una de las cepas evaluadas en este trabajo.

En cuanto a los patrones isoenzimáticos determinados en raíz, la aparición de isoenzimas POX (Fig. 9) dependió del tiempo y de la cepa de HMA, y mostró relación con las variables del hongo evaluadas (Tabla 4). El patrón isoenzimático prácticamente homogéneo a los 18 días estuvo en correspondencia con las pocas diferencias observadas en la colonización radical del tomate por las cepas analizadas. Las mayores diferencias en ambas variables del hongo, observadas a los 32 días, presentaron concordancia con los patrones de isoenzimas diferenciados inducidos por las distintas cepas. Así, las cepas de menor infectividad (*Glomus* sp1 y *G. intraradices*) mostraron el mismo patrón que las plantas control en esta variable. Esto pudiera relacionarse con las funciones que esta enzima desempeña en la planta y su vinculación con los complejos procesos que ocurren a la entrada de un microorganismo, tanto a nivel de reconocimiento como de posible reacción defensiva.

En su estudio, Pozo (1999) encontró sólo diferencias cuantitativas en el patrón de POX al inocular raíces de tomate con *G. mosseae* y *G. intraradices*. El análisis de un mayor número de cepas (6), incluida una que no pertenece al género *Glomus*, mostró resultados similares en este trabajo a los 18

días (Fig. 9), lo cual indica que ésta parece ser una respuesta generalizada a la micorrización en la fase de estrés biótico. En cambio, a los 32 días, dos de las cepas evaluadas (*G. mosseae*1 y *A. scrobiculata*) indujeron isoformas nuevas (Fig. 9), lo que ha sido informado también para *G. fasciculatum* (Thaxter) Gerd. & Trappe (Mathur y Vyas, 1995; Pérez *et al.*, 2004); sugiriendo una respuesta específica a la inoculación con cada cepa en particular en la fase simbiótica.

Los resultados de este trabajo respecto a los patrones de isoenzimas SOD para las seis cepas evaluadas (Fig. 10), concuerdan con lo informado para *G. mosseae* y *G. intraradices* (Palma *et al.*, 1993; Pozo *et al.*, 2002) y apoyan la teoría de que este tipo de simbiosis involucra una mayor actividad SOD en estadios iniciales, similar a lo observado en plantas sometidas a situaciones de estrés, incluso abiótico (Allen, 2006; Roldán *et al.*, 2008). Esto pudiera deberse a la alta actividad metabólica asociada a la colonización intracelular, fundamentalmente en la fase de estrés biótico (Parniske, 2008), por lo que resulta esperada la mayor aparición de isoenzimas y la inducción generalizada de una isoforma nueva (No. 1) en los tratamientos inoculados, encontradas a los 18 días. Este análisis sugiere la posible participación de la isoforma específica de la simbiosis en la protección de algunas enzimas frente a la oxidación y en contrarrestar el incremento local de la presión de O₂ que origina la entrada del hongo en la raíz, lo cual se infiere de la importancia de este sistema enzimático en los mecanismos de defensa antioxidante de las plantas (Matsumura *et al.*, 2007).

En cambio, a los 32 días (Fig. 10), la aparición de un menor número de isoenzimas y la variabilidad en los patrones según la cepa implicada, indican una respuesta más específica a la colonización por cada HMA. Resalta la no aparición de la isoforma nueva (No. 1) en los tratamientos con *Glomus* sp1 y *G. intraradices*, los que presentan una menor infectividad. Las cepas de *G. mosseae* provocaron la represión de algunas isoformas constitutivas (No. 2 y 3), al parecer, para facilitar la colonización radical dados los valores de intensidad (Tabla 4) y la infectividad intermedia que manifiestan. En las plantas inoculadas con *A. scrobiculata* no se detectaron las isoformas No. 1 y 2, pudiendo asociarse a la alta infectividad y baja eficacia simbiótica que exhiben (Tablas 5 y 6). Los resultados apuntan a

una probable relación de la SOD en estadio tardío con el establecimiento de la simbiosis y la compatibilidad funcional.

Dentro del amplio grupo de las ESTs se encuentra la enzima pectin esterasa, cuya actividad ha sido detectada en raíces micorrizadas y en esporas y micelio externo de estos hongos (García - Romera *et al.*, 1991b; Smith y Read, 2008); lo cual sugiere la posible participación de esta enzima en los procesos de penetración de los HMA durante la colonización radical. En el presente estudio, la inducción de tres isoenzimas específicas de la micorrización en la fase de estrés biótico y la ausencia de las mismas luego del establecimiento de la simbiosis funcional (Fig. 11) confirman lo planteado anteriormente. Estas isoformas nuevas pudieran ser EST no específicas, como ha sido propuesto por Fries *et al.*, (1996), o pudieran tener actividad pectinolítica (pectin esterasas), interviniendo en la hidrólisis, desorganización y/o relajación de la pared de las células radicales de las plantas de tomate, según consideraciones de García-Garrido *et al.*, (2002) y García *et al.*, (2008), como parte del componente enzimático involucrado en la penetración de los HMA.

Al considerar la función que realiza la enzima AC, no resulta sorprendente la ausencia o baja actividad observada en las raíces controles (Fig. 12). Las isoformas inducidas por efecto de la micorrización parecen estar asociadas al incremento de la actividad metabólica del carbono en las raíces colonizadas, y su función, probablemente esté relacionada con el metabolismo carbonado no fotosintético. Bago *et al.*, (2002) encontraron fijación de CO₂ altamente eficiente en la oscuridad en *G. intraradices*, y lo asociaron con los ciclos de los ácidos tricarboxílicos y de la urea, además, detectaron la ocurrencia de otros procesos metabólicos que involucran al carbono, tales como la glicólisis y la síntesis de trehalosa y betaínas. Este trabajo constituye el primero donde se analiza esta enzima en raíces micorrizadas, por lo que resulta de interés realizar estudios posteriores para esclarecer su relación con el proceso simbiótico, dadas las diferencias encontradas.

Las diferencias detectadas en los patrones isoenzimáticos apuntan hacia el uso potencial de los sistemas POX, SOD y EST como marcadores bioquímicos que permiten caracterizar los HMA. Según este análisis es factible explorar otros sistemas isoenzimáticos relacionados con el proceso

simbiótico, con énfasis en los mecanismos de defensa, la penetración del hongo en raíces y la nutrición. La asociación obtenida (Fig. 13), a partir del análisis de conglomerados jerárquicos, de las distintas cepas estudiadas es un reflejo de las diferencias y semejanzas que existen en las estrategias desarrolladas para la colonización radical del tomate por las mismas. Esto está estrechamente relacionado con las alteraciones particulares a nivel molecular que inducen, evidenciándose el establecimiento de una comunicación genómica específica entre los simbioses (Parniske, 2008), lo que determina el grado de compatibilidad celular y funcional (Harrison, 2005), así como la eficiencia de la simbiosis (Rivera *et al.*, 2007). No se debe obviar que la mayoría de las cepas pertenecen a un género común, exhibiendo en algunos casos un patrón similar de colonización. No obstante, este análisis permitió separar las cepas evaluadas de acuerdo a la repuesta de las raíces inoculadas con cada una de ellas. Resalta el comportamiento diferencial de los dos ecotipos de *G. mosseae*, mostrando la cepa 2 una gran similitud con *G. hoi-like* mientras que la cepa 1 presentó un comportamiento distintivo entre las de su mismo género.

Los resultados de este experimento demuestran que las enzimas analizadas se afectan local y sistémicamente por la colonización de distintas cepas de HMA, bajo las condiciones de estudio, e indican que estos sistemas constituyen herramientas útiles en la caracterización bioquímica de estos hongos en su interacción con el tomate y, posiblemente, con otros cultivos. La integración de las variables evaluadas permitió seleccionar las cepas *G. hoi-like* y *G. mosseae1*, dada su elevada eficacia simbiótica en plantas de tomate cv. 'AMALIA', los diferentes niveles de infectividad que presentan y el comportamiento distintivo en las actividades enzimáticas y los patrones isoenzimáticos analizados.

4.2. Identificación de las cepas de HMA seleccionadas

Si bien para la identificación de los HMA, en un inicio, se consideró únicamente la morfología de las esporas, constituyendo la base de las primeras clasificaciones propuestas (Gerdemann y Trappe, 1974; Morton y Benny, 1990); luego se comprobó que este criterio resulta insuficiente, pues no revela la gran diversidad genética existente dentro de los Glomales, tanto a nivel de familia como de

género (Redecker, 2002), siendo errada la filogenia y taxonomía establecidas. No obstante, en la actualidad, es imprescindible y valiosa la caracterización morfológica en la identificación de nuevas especies (Schüßler y Walker, 2010), la que abarca el análisis de las esporas a partir de suelo, de las estructuras intrarradicales y de su cultivo *in vitro*, si se logra obtener.

Las principales propiedades morfológicas distintivas de *G. cubense* (Fig. 14-1) que permitieron su identificación como una especie nueva, son sus esporas pequeñas de color hialino a amarillo muy pálido, mayormente de forma irregular, su arquitectura única de la pared de la espora, compuesta por una capa externa permanente de flexible a semi-flexible, cuya reacción positiva a la tinción con Azul de algodón la diferencia y separa claramente, y una capa interna rígida que no reacciona con solución de Melzer. La comparación realizada entre éstas y las características de las paredes de las esporas de varias especies similares (Anexo V) sustenta lo anterior.

Bajo el microscopio estéreo, *G. cubense* se asemeja a las especies de *Glomeromycota*, descritas por Blaszkowski *et al.*, (2010a) en la clave de identificación de esporas pequeñas hialinas y/o ligeramente coloreadas. Sin embargo, bajo el microscopio óptico, sólo seis de las especies actualmente descritas comparten características muy similares a las de *G. cubense*. Entre éstas, *G. cerebriforme* McGee (McGee, 1986) y *G. perpusillum* Blaszk. & Kovacs (Blaszkowski *et al.*, 2009a) se diferencian por una pared compuesta por una capa externa laminada y una interna flexible que reacciona con la solución de Melzer. *G. bistratum* Blaszk., Redecker, Koegel, Symanczik, Oehl & Kovacs (Blaszkowski *et al.*, 2009b), *G. indicum* Blaszk., Wubet & Harikumar (Blaszkowski *et al.*, 2010a), *G. minutum* Blaszk., Tadych & Madej (Blaszkowski *et al.*, 2000) y *G. pallidum* Hall (Hall 1977; Oehl *et al.*, 2003) se distinguen por una capa interna laminada con una externa de semi-flexible a rígida como pared.

Dentro de las otras especies que presentan similitud con *G. cubense*, *G. microaggregatum* Koske, Gemma & Olexia (Koske *et al.*, 1986) difiere por su pigmentación muy oscura (amarilla a amarilla-ámbar) y el grosor de la pared (hasta 4 µm), la cual está compuesta por capas externa rígida e interna flexible. Las especies *G. fragile* Berk. & Broome (Trappe & Gerd.) y *G. canadense* (Thaxter) Trappe & Gerd. (Gerdemann y Trappe, 1974), difieren en la arquitectura de la capa interna de la pared

que es más gruesa y laminada. También con semejanza a *G. cubense*: las esporas jóvenes de *G. viscosum* Nicolson (Walker *et al.*, 1995) se diferencian porque usualmente son globosas y la pared está compuesta por 3 capas; las esporas glomoides de *Paraglomus* spp. son hialinas a crema pálido, aparecen en forma simple en el suelo y no en agregados y sus paredes difieren fenotípicamente (Błaszowski *et al.*, 2010a); mientras *Ambispora* spp. se distingue por sus esporas hialinas de diámetro mucho mayor (Walker *et al.*, 2007).

Respecto a *F. mosseae*, presenta características morfológicas (Fig. 15) muy particulares que permiten diferenciarla del resto de las especies conocidas: esporas de gran tamaño, con predominio de color amarillo oscuro a ámbar, cuya pared consta de tres capas (C1 hialina mucilaginoso, C2 hialina y C3 laminada), donde C1 se tiñe de rojizo con la solución de Melzer, la unión de la hifa de sostenimiento a la espora es en forma de embudo, presenta un septo curvo y el poro está ocluido (Nicolson y Gerdemann, 1968). Sin embargo, la especie *F. coronatum* Giovann. (Giovaneti *et al.*, 1991) muestra elevada similitud en la observación al microscopio óptico, con la salvedad de la coloración ámbar más oscura de sus esporas, la unión de la hifa de sostenimiento a la espora en forma de embudo más marcada en la mayoría de la población, y que su pared tiene sólo dos capas, aunque en ocasiones es difícil la distinción debido a que en esporas maduras de *F. mosseae* la C1 generalmente aparece degradada. Las esporas de *F. caledonium* (Nicolson & Gerd.) Trappe & Gerd. (Nicolson y Gerdemann, 1968; Gerdemann y Trappe, 1974) también se asemejan, pero esta especie tiene una pared de cuatro capas con estructuras y fenotipos distintivos que la diferencian de *F. mosseae*. Además, la unión de la hifa de sostenimiento a la espora es cilíndrica y en ocasiones ligeramente constreñida.

Lo expuesto evidencia la importancia de realizar la caracterización molecular para constatar la identidad de ambas cepas, con lo cual se integran los criterios morfológico y molecular (taxonomía polifásica). El análisis molecular realizado demostró la efectividad de la aplicación conjunta de dos marcadores (*ITS* y *V-H⁺-ATPasa*) que se complementan, para identificar los HMA. Esto coincide con trabajos recientes donde se combinaron los *ITS* y *SSU* (Błaszowski *et al.*, 2008; 2009b; 2010a;

Cano *et al.*, 2009; Palenzuela *et al.*, 2011), lo que resulta pertinente cuando uno de los marcadores no separa la especie descrita al nivel requerido. Asimismo, se han combinado los tres genes (*SSU*, *ITS* y *LSU*) para discernir entre especies muy cercanas filogenética y morfológicamente (Stockinger *et al.*, 2009; 2010).

Entre los ADNr, los *ITS*, pese a ciertas limitaciones para los miembros estrechamente relacionados de *Glomus* (Blaszkowski *et al.*, 2008; Stockinger *et al.*, 2009; Sokolski *et al.*, 2010), se encontró que resuelven gran parte de las especies conocidas de este género (Stockinger *et al.*, 2010). Esto justifica su selección en este estudio, demostrando ser eficaz para ambas cepas (Fig. 16), y concuerda con trabajos recientes (Cano *et al.*, 2009; Blaszkowski *et al.*, 2009b; 2010a), donde se describen nuevas especies a partir de este marcador. Los cebadores de *ITS* específicos de *Glomus*: GLO2A-GLO2R (Sokolski *et al.*, 2010), fueron ensayados con éxito en la identificación de *Rhizophagus custos*, syn. *G. custos* (Cano & Dalpé) Walker & Schüßler (Cano *et al.*, 2009), y en la de las dos cepas evaluadas aquí, lo cual avala su utilidad para este género.

En contraste, el gen *SSU* no se considera apropiado para la resolución de especies del género *Glomus* (Cano *et al.*, 2009; Stockinger *et al.*, 2010), aunque algunos autores lo han aplicado con éxito (Palenzuela *et al.*, 2008; 2010; Blaszkowski *et al.*, 2009a; 2010b). Es de resaltar que la base de datos del NCBI para este gen abarca un elevado número de secuencias de *Glomeromycota*, dado su amplio uso en los trabajos de filogenia y ecología (Schüßler *et al.*, 2001b; Öpik *et al.*, 2008a,b; 2009). Esto ofrece ventajas, pero, a la vez, presenta algunos inconvenientes: varias de estas secuencias pertenecen a aislados de HMA no cultivados ni identificados, y aparecen numerosas secuencias provenientes de otros organismos incluyendo plantas. Por estas razones, en ocasiones, los árboles filogenéticos resultantes no son concisos ni representan las especies más cercanas filogenética y morfológicamente, como se observa en las publicaciones de Blaszkowski *et al.*, (2009b; 2010b). Por su parte, el *LSU* posee un poder de resolución a nivel de especie intermedio, entre el de *ITS* y el de *SSU*.

No se debe obviar que los ADNr poseen la desventaja de su gran variabilidad intra-específica e intra-espora, lo cual implica necesariamente realizar el protocolo de la clonación que es largo y muy

engorroso en términos de manipulación, dificultando el procedimiento de identificación de las especies de HMA.

Resulta útil disponer de un marcador de fácil aplicación, como es el *V-H⁺-ATPasa*, que permita discriminar entre especies cercanas de *Glomerales*, si se considera que este orden constituye el de mayor representación en los ecosistemas y, en la mayoría de los casos, las diferencias morfológicas entre algunas de las especies son muy sutiles (Öpik *et al.*, 2008a,b; Stockinger *et al.*, 2009; 2010). Esto valida la ventaja de su uso, en comparación con los marcadores ribosómicos, por lo que es conveniente continuar trabajando en el diseño de nuevos cebadores que funcionen en un mayor número de especies.

4.3. Infectividad de las cepas de HMA seleccionadas y respuestas bioquímicas y fisiológicas del tomate en las fases de la simbiosis. Relación entre las mismas

Las condiciones de desarrollo del experimento permitieron establecer las diferencias entre las cepas analizadas en las variables del hongo, estimadas por ambas evaluaciones (Tablas 7 y 8), en el crecimiento (Figs. 17-19) y en la nutrición (Figs. 20-22) de las plantas, que fueron determinadas para caracterizar la infectividad y la eficacia simbiótica de las cepas evaluadas. Se demuestra la ventaja de la micorrización respecto a las plantas no inoculadas, lo cual está en correspondencia con lo encontrado por otros autores (Baar, 2008; Smith y Read, 2008) y se explica por la peculiaridad de las asociaciones micorrízicas de establecer un flujo bidireccional a través de los arbusculos.

En este trabajo se destacó el tratamiento con *G. cubense*, pese a que las plantas inoculadas con *F. mosseae* presentaron similar abundancia arbuscular. Esto valida la pertinencia del término sistema eficientemente micorrizado para definir aquellos cultivos donde la simbiosis micorrízica resulta en un incremento notorio del rendimiento, dado el mayor crecimiento y mejor estado nutricional (Rivera *et al.*, 2007).

Durante el intercambio vía arbusculo, la planta transfiere fotosintatos hacia el hongo y éste nutrientes minerales hacia la planta favoreciendo su crecimiento y desarrollo, aunque este comportamiento no se da por igual en todas las asociaciones planta-HMA, sino que depende en gran

medida del hongo implicado (van Aarle y Olsson, 2008). Los resultados de este estudio respecto a las variables antes mencionadas, principalmente en la fase simbiótica (32 días), demuestran la mayor eficacia de *G. cubense* en comparación con *F. mosseae*. Esto pudiera atribuirse a las diferencias en la capacidad para tomar los nutrientes del suelo y transferirlos a la planta, observadas entre las distintas especies y géneros de HMA (Mohammadi *et al.*, 2008; Fernández, 2012).

Resaltan diferencias en los resultados de las variables determinadas en común en los experimentos I y III de este trabajo (ej: Tabla 4 vs Tabla 7, Fig. 9 vs Fig. 29B). Esto se atribuye fundamentalmente a las diferencias en el inóculo empleado, que en el primer experimento consistió en esporas desinfectadas, mientras en el tercero estuvo conformado por todos los propágulos característicos de estos hongos (esporas, micelio extrarradical y raíces micorrizadas). En apoyo a esta teoría, un estudio *in vitro* demostró que el micelio constituye el propágulo más infectivo (Voets *et al.*, 2010).

También es de destacar que la presencia o no de la micorrizosfera en el inóculo pudiera modificar la respuesta de la planta a la micorrización. Los mecanismos para el establecimiento de la interacción tripartita entre las bacterias de la micorrizosfera y sus hospederos fúngico y vegetal, se desarrollan a través del intercambio de señales para facilitar la comunicación inter-organismo. Éstos involucran la liberación de moléculas activas incluyendo compuestos volátiles y el contacto físico entre bacterias y el HMA (Bonfante-Fasolo y Anca, 2009). Además, las bacterias asociadas pueden afectar varios aspectos del hongo, como son la germinación y la morfología de la espora, el crecimiento presimbiótico, la colonización de las raíces y la expresión de diversos genes (Miransari, 2011).

Por otro lado, la elevada actividad de las dos enzimas (EG y Endo-PMG) que degradan la pared celular vegetal (Fig. 23), durante la fase de estrés biótico, parece tener una marcada influencia sobre los patrones de colonización radical que exhiben los HMA. Este hecho se evidencia a través de la correspondencia directa entre las actividades y la infectividad de las dos cepas (Tablas 7 y 8), bajo las condiciones de estudio. Esto concuerda con lo informado por Morales Vela *et al.*, (2007) y García *et al.*, (2008), quienes encontraron coincidencia entre el máximo de actividades pectinolíticas y celulásicas con la mayor formación de puntos de entrada y el desarrollo de arbusculos. Todos estos

resultados sugieren la participación de estas enzimas en la colonización y en la proliferación del hongo en la raíz.

La superioridad de ambas actividades enzimáticas en el tratamiento con *G. cubense* indica su mayor compatibilidad con el tomate respecto a *F. mosseae*. Estos incrementos parecen favorecer que las estructuras fúngicas de penetración atraviesen la pared celular vegetal y colonicen la raíz, además de facilitar la formación de los arbusculos y de la matriz interfacial, donde los polímeros celulosa, xiloglucano y pectina, se encuentran distribuidos de forma amorfa sin polimerizar (Balestrini *et al.*, 1996). Las actividades inferiores en el estadio simbiótico pudieran justificarse por el control que ejerce la planta sobre la producción y/o la actividad de estas enzimas (Balestrini y Bonfante-Fasolo, 2005), evitando así la rotura indiscriminada de la pared celular, así como el avance indiscriminado del hongo en la raíz. No obstante, *G. cubense* muestra valores superiores que se corresponden con la mayor infectividad que manifiestan en comparación con *F. mosseae*.

Las actividades enzimáticas antioxidantes en hojas revelaron que hubo respuesta sistémica (Figs. 24-28A), que consistieron en decrementos de las mismas por efecto de la micorrización. Tendencias similares observaron Roldán *et al.*, (2008) y Kohler *et al.*, (2008; 2009), al estudiar el efecto de los HMA sobre plantas sometidas a estrés abiótico.

El análisis conjunto de los sistemas antioxidantes en raíz de tomate (Figs. 24-28B), sugiere una posible respuesta coordinada de los distintos sistemas enzimáticos inducida por *G. cubense* que, al parecer, genera un menor daño oxidativo celular que *F. mosseae*. Esto pudiera ser consecuencia de la modulación de las respuestas defensivas en la planta que tiene lugar durante la formación de la micorriza y ocurre por el “diálogo” molecular que se establece entre los simbiontes mediado por múltiples señales (Harrison, 2005; Parniske, 2008). Se ha observado la producción localizada de compuestos oxidativos en la simbiosis MA (Salzer *et al.*, 1999; Fester y Hause, 2005), los que al acumularse pudieran ser altamente tóxicos para las células, por lo que se requiere la actividad de enzimas antioxidantes a fin de lograr el balance entre la producción y la destrucción de los mismos (García-Garrido y Vierheilig, 2009), siendo más eficiente este proceso, al parecer, en las plantas

inoculadas con *G. cubense*, en este estudio.

Los patrones isoenzimáticos foliar y radical determinados (Figs. 29-33) manifestaron polimorfismo, confirmando la utilidad encontrada en el experimento I para algunos de ellos. En la mayoría de los casos se detectaron isoenzimas específicas de la micorrización. Tendencias similares han informado otros autores en raíz (Fries *et al.*, 1996; Pozo, 1999; Pozo *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2004), sugiriendo que el polimorfismo enzimático entre diferentes cepas de HMA puede estar relacionado a su eficiencia en colonizar la raíz y a su influencia sobre el crecimiento vegetal. En este experimento se destacó el sistema POX en ambos aspectos, seguido por SOD y APS de raíz a los 32 días, que presentaron dos isoformas nuevas.

Los patrones isoenzimáticos de APS (Fig. 33) se corresponden con los resultados de los contenidos totales de P en las plantas (Fig. 21), apareciendo un mayor número de isoformas a los 32 días y en particular, la cepa *G. cubense* indujo más isoformas nuevas que *F. mosseae*. Esto indica una mayor contribución en la nutrición fosfórica de las plantas inoculadas con *G. cubense*, lo que se hace más evidente en la fase simbiótica. La fosfatasa ácida está involucrada en la mayoría de las transformaciones intracelulares de P, y en la simbiosis MA participa en la escisión de los polifosfatos que se translocan por las hifas antes de ser transferidos a la célula vegetal vía arbusculo, por lo que esta actividad es superior en el micelio intrarradical de los HMA respecto al extrarradical (van Aarle y Olsson, 2008).

La correlación de Pearson realizada a las variables del hongo, determinadas mediante la evaluación de las estructuras totales y las vivas (Anexo VII Tabla I), probó que ambos protocolos son eficaces y demuestran por igual las diferencias en la infectividad entre cepas, para las condiciones de estudio, por lo que resulta suficiente la evaluación de uno de ellos. La literatura consultada carece de este tipo de análisis comparativo, siendo muy pocos los trabajos que determinan estas variables considerando las estructuras vivas al utilizar la actividad SDH, como son los de Marulanda *et al.*, (2003; 2007).

Los análisis de componentes principales (Anexo VII), en conjunto con los resultados de los ANOVA, permitieron reducir el número de las variables a utilizar en las correlaciones posteriores, a modo de simplificar el análisis. Para las variables del hongo y de crecimiento y nutrición de las plantas resultaron más útiles las evaluaciones a los 32 días, lo cual es coherente pues en etapas iniciales se manifiestan en menor medida las diferencias en la infectividad de las cepas, así como tampoco se reflejan de forma clara los beneficios de la simbiosis en términos de crecimiento, desarrollo y nutrición vegetal. En cambio, los indicadores bioquímicos determinados mostraron variabilidad en los dos periodos evaluados, lo que concuerda con la elevada actividad metabólica y las alteraciones en diversos compuestos observadas desde estadios muy tempranos de la colonización MA en estudios previos (Harrison, 2005; Requena *et al.*, 2007).

Las correlaciones realizadas (Tablas 9-11) y los análisis de los intervalos de confianza (Anexo VIII) revelan la mayor utilidad práctica de las actividades enzimáticas respecto a los patrones de isoenzimas. No obstante, se proponen como marcadores bioquímicos de la infectividad y/o la eficacia simbiótica, para las condiciones de estudio, cuatro de las actividades determinadas ($CAT_{raíz}$, $Endo-PMG_{raíz}$, $EG_{raíz}$ y SOD_{hoja}), e isoenzimas específicas de POX, PPO, SOD, EST y APS. Estos resultados no son sorprendentes si se consideran las funciones de estas enzimas y su participación en el establecimiento de la simbiosis MA.

El comportamiento de las enzimas evaluadas ha sido estudiado en plantas micorrizadas, observándose que distintas especies e, incluso, ecotipos de la misma especie, pueden inducir una respuesta diferente en la planta (Lambais y Mehdy, 1996; García-Garrido *et al.*, 2002; Lambais *et al.*, 2003; Pérez, 2010). Sin embargo, la literatura internacional adolece de trabajos donde se relacionen estas variables mediante procedimientos estadísticos, sólo García-Garrido *et al.*, (2000) informaron correlación entre la actividad endo-xiloglucanasa de micelio externo y de las raíces, asociadas con el porcentaje de colonización y el crecimiento de las plantas. Aunque, no se ha detectado un elevado polimorfismo de esta enzima ni de celulasas (Morales Vela *et al.*, 2007), lo que concuerda con lo encontrado aquí para esterasas en raíz (Fig. 32B, Anexo VII Tabla VII). La

similitud observada en las características bioquímicas y electroforéticas de las enzimas que degradan la pared celular vegetal, producidas en las raíces micorrizadas, sugiere que su función consiste sólo en la ruptura específica y selectiva de los componentes de la pared para facilitar la penetración del hongo. Además, un estudio con mutantes demostró que el incremento de actividad de estas enzimas también depende de las características fenotípicas simbióticas de la planta (capacidad de penetración, intensidad de arbusculos, etc) (Morales Vela *et al.*, 2007).

La relación alta y positiva de la actividad Endo-PMG_{raíz}, a los 18 días, con las variables del hongo (Tabla 9), pudiera atribuirse a que la pectina, sustrato de esta enzima, es el componente mayoritario de las paredes de las células del meristemo apical, siendo esta la zona preferencial donde ocurren las infecciones primarias, las cuales son propias de este periodo. García *et al.*, (2008) encontraron que la inhibición de esta actividad dificulta la formación de las penetraciones primarias causando un retraso tanto en el comienzo de la colonización de la raíz como en el desarrollo posterior del hongo dentro de la misma. En el caso de la actividad EG_{raíz} a los 32 días, que también manifiesta una alta relación con estas variables, pudiera deberse a que su sustrato (celulosa) es el principal componente de las paredes de las células más alejadas del meristemo apical, donde tienen lugar fundamentalmente las infecciones secundarias, además de su contribución a la formación activa de los arbusculos. Ambos procesos son característicos de la fase simbiótica.

No obstante, la actividad de estas enzimas por parte del hongo debe ser muy baja, de forma que sólo desacople los mecanismos de ensamblaje de los componentes de la pared sin llegar a destruirla ni afectar la viabilidad de la célula vegetal (García *et al.*, 2008), lo cual se corresponde con lo presentado en este trabajo (Fig. 23) y sustenta la relación positiva de Endo-PMG y EG con las variables que definen la eficacia simbiótica (Tablas 10 y 11). La correlación observada con el P, contrasta con lo informado por Maldonado-Mendoza *et al.*, (2005), quienes plantean que la inducción de los genes que codifican la xiloglucano endotransglucosidasa, enzima que interviene en la expansión y reestructuración de la pared celular, es independiente del estatus del P en la planta micorrizada. Incluso, las enzimas determinadas aquí mostraron correlación con el N_{total} y el K_{total} (Tabla 11). Aunque, la

relación positiva de estas enzimas con los contenidos de nutrientes pudiera explicarse de forma indirecta, ya que los incrementos de estas actividades estimulan la colonización radical por los HMA y, por tanto, conducen a mejoras en el estado nutritivo de las plantas.

Varios trabajos señalan una relación entre la actividad de enzimas antioxidantes, como las analizadas aquí, y los niveles de P en el suelo y, consecuentemente, en la planta, dado el conocido efecto positivo de la micorrización en la toma de nutrientes (Smith y Read, 2008). En particular, Lambais *et al.*, (2003) observaron que la actividad CAT está altamente regulada en la simbiosis MA y es dependiente de la nutrición fosfórica. Los resultados del presente estudio sustentan lo anterior, al observarse correlación entre algunos de los sistemas antioxidantes evaluados con los contenidos totales de N, P y K (Tabla 11).

Asimismo, se ha informado que la nutrición fosfórica puede ser esencial para el control de la inducción de POX (Mathur y Vyas, 1995; Fries *et al.*, 1998; Lambais *et al.*, 2003), lo que pudiera justificar la relación encontrada en este estudio entre el contenido de P_{total} y las isoformas de POX, PPO y SOD (Anexo VIII Tabla C), las cuales están involucradas en funciones comunes. Tanto las POX como las PPO participan en la polimerización oxidativa de polifenoles, contribuyendo al reforzamiento de las paredes celulares durante la penetración del hongo, y parecen estar involucradas en la eliminación de ROS liberadas en los procesos oxidativos (Mittler, 2002; Mayer, 2006), evento en el que participa activamente la SOD (Fridovich, 1995). Estas respuestas defensivas se manifiestan en la simbiosis MA (García-Garrido y Ocampo, 2002; Fester y Hause, 2005), siendo evidentes en los resultados de este trabajo.

De forma similar, pudiera explicarse la relación encontrada entre los sistemas de defensa antioxidantes y los contenidos de N y K (Tabla 11), pues el beneficio en la toma de nutrientes por el hongo y su transferencia a la planta vía arbusculo no se restringe al P, sino que ha sido descrito con igual profundidad para el K y principalmente para el N (Gobert y Plassard, 2008; Smith y Read, 2008). Cabe resaltar que la ramificación hifal es un factor importante a considerar en la habilidad de los HMA para tomar nutrientes del suelo (Jacobsen *et al.*, 1992). Además, estos hongos pueden

diferir en su capacidad para desarrollar un sistema de hifas externo con independencia de su capacidad para colonizar la corteza radical (Graham *et al.*, 1982; Smith y Read, 2008).

En la eficacia nutricional de los HMA juegan un papel importante las propiedades morfológicas y la distribución espacial del micelio externo en el suelo, así como las diferencias en la toma de nutrientes vía hifa, en la capacidad de translocación y en la actividad metabólica de cada hongo en particular, según consideraciones de García-Garrido *et al.*, (2000), Breuillin *et al.*, (2010) y Chen *et al.*, (2010). Esto se refleja a través de las actividades enzimáticas y las isoformas específicas propuestas como marcadores bioquímicos de la eficacia simbiótica de los HMA en este trabajo.

4.4. Consideraciones generales

Los resultados del trabajo evidencian la mayor infectividad de la cepa *G. cubense* respecto a *F. mosseae* en las condiciones del sustrato empleado, lo cual es consecuencia del “diálogo” molecular que se establece entre los simbioses e involucra respuestas bioquímicas y fisiológicas diferenciales en las plantas de tomate cv. ‘AMALIA’, las que son específicas de cada cepa. La determinación de tales respuestas en las dos fases de la simbiosis demostró la mayor eficacia de *G. cubense* y permitió establecer marcadores bioquímicos de la infectividad y la eficacia simbiótica en la interacción tomate-HMA.

En la Fig. 34 se resume el comportamiento de las actividades enzimáticas (relacionadas con la defensa y algunas que degradan la pared celular vegetal) determinadas en hoja y raíz de tomate inoculado con dos cepas de HMA, y su relación con las variables de infección del hongo. Además, en el esquema se vincula la respuesta de las enzimas con las señales mediadas por las ROS y las vías del AS y el AJ, informadas previamente en la simbiosis MA (Fester y Hause, 2005; Pozo y Azcón-Aguilar, 2007; García-Garrido y Vierheilig, 2009).

Durante la fase de estrés biótico (Fig. 34A), la presión que ejerce el apresorio formado en el extremo de la hifa de penetración sobre las células epidérmicas de la raíz, origina la explosión oxidativa con la producción de ROS y entre ellas el H₂O₂ (Fester y Hause, 2005). Dicha molécula actúa como señal promoviendo la vía del AS, la cual conduce a la activación de genes de defensa (Pozo y Azcón-

Aguilar, 2007), los que codifican para los cinco sistemas enzimáticos evaluados en este periodo, entre otros. También a la penetración del hongo en la raíz se asocia un componente enzimático constituido por enzimas que degradan la pared celular vegetal (García-Garrido y Vierheilig, 2009), entre las que se destacan la EG y la Endo-PMG.

La respuesta integral de las actividades enzimáticas analizadas en raíz en la fase inicial, al parecer, condicionaron la mayor infectividad de la cepa *G. cubense* (Fig. 34A). En este tratamiento resaltan los incrementos superiores de las actividades EG y Endo-PMG, enzimas que relajan y desorganizan los componentes de la pared celular vegetal (García *et al.*, 2008), y de las actividades quitinasa y β -1,3-glucanasa, las cuales contribuyen a la morfogénesis y al desarrollo del hongo dentro de la raíz (Balestrini y Bonfante-Fasolo, 2005). Por el contrario, las raíces inoculadas con *F. mosseae* mostraron incremento de las actividades GPX y PPO (Fig. 34A), enzimas cuya acción conduce al reforzamiento de las paredes celulares (Hiraga *et al.*, 2001; Mayer, 2006), siendo estos hongos incapaces de penetrar dichas paredes (Harrison, 1999) y por tanto, pudiera afectarse el desarrollo intrarradical de esta cepa.

La fase simbiótica se caracteriza por la ocurrencia de infecciones secundarias, la activación de la vía del AJ, la formación y remoción de arbusculos y la acumulación de H_2O_2 en las células con arbusculos (Fester y Hause, 2005; Pozo y Azcón-Aguilar, 2007) (Fig. 34B). La combinación del comportamiento de las actividades enzimáticas en este periodo también pudo influir en la mayor infectividad de *G. cubense*. En este caso, las principales diferencias consistieron en el incremento de las actividades EG y Endo-PMG en las raíces inoculadas con esta cepa, lo cual probablemente favoreció las infecciones secundarias en esta interacción, y el incremento de la actividad quitinasa que en esta fase estimula la formación y degradación de arbusculos (Franken *et al.*, 2007).

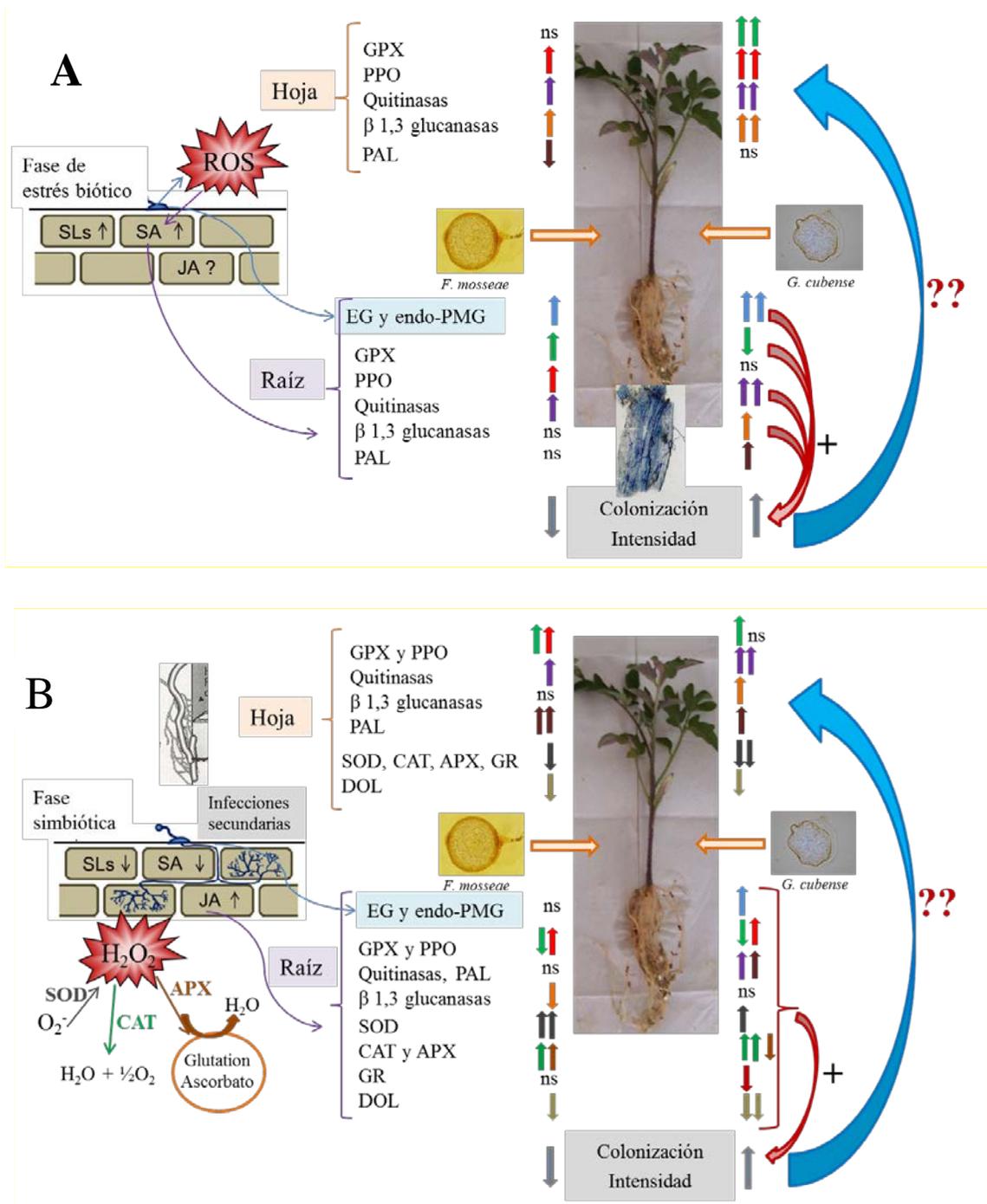


Figura 34. Esquema que relaciona la infectividad de las cepas de HMA *Glomus cubense* y *Funneliformis mosseae* con la respuesta bioquímica (actividades enzimáticas) que inducen en hoja y raíz de las plantas de tomate cv. 'AMALIA', en las fases de estrés biótico (A) y simbiótica (B).

Respecto a las enzimas de defensa antioxidante (Fig. 34B), la actividad SOD superior en las raíces tratadas con *F. mosseae* sugiere una mayor producción de radical O_2^- y/o de H_2O_2 , lo cual supone un

mayor daño oxidativo celular en esta interacción pues la acumulación de tales compuestos pudiera resultar tóxica para las células. La transformación o eliminación del H_2O_2 tiene lugar por la acción de las enzimas CAT y APX en este tratamiento, dado el incremento de ambas actividades. En cambio, en las raíces inoculadas con *G. cubense*, el incremento superior de actividad CAT y el decremento de actividad APX indican que el balance en la concentración de H_2O_2 se logra solamente por la acción de la enzima CAT. La micorrización disminuyó el daño oxidativo a los lípidos, el cual fue inferior en el tratamiento con *G. cubense*. El análisis anterior apunta a una posible respuesta coordinada de los distintos sistemas enzimáticos antioxidantes inducida por *G. cubense* que, al parecer, genera un menor daño oxidativo celular que *F. mosseae*.

Por otro lado, la colonización radical por ambas cepas indujo respuesta sistémica de las enzimas relacionadas con la defensa en las dos fases de la simbiosis con las plantas de tomate (Fig. 34), al parecer, mediadas por señales difusibles desconocidas hasta el momento.

Los resultados expuestos influyeron positivamente en la proliferación intrarradical de *G. cubense* en las plantas de tomate cv. 'AMALIA', manifestando valores superiores de las variables colonización e intensidad. Asimismo, pudieron influir de alguna manera en la mayor eficacia simbiótica de esta cepa de HMA, lo cual se reflejó en el comportamiento destacado de las variables de crecimiento y nutrición vegetal.

Conclusiones Y Recomendaciones

5.1. CONCLUSIONES

1. Se identifica y describe una nueva especie de HMA: *Glomus cubense*, por sus características distintivas en morfología y en las secuencias de los genes *ITS* del ADN ribosomal y *V-H⁺-ATPasa*, y se demuestra que la cepa INCAM-2 es *Funneliformis mosseae*, syn. *Glomus mosseae*.
2. Cepas de HMA con distintos niveles de infectividad y eficacia inducen respuestas bioquímicas diferenciales, durante las fases de la simbiosis con plantas de tomate cv. 'AMALIA'.
3. Las cepas *G. cubense* y *F. mosseae* se destacan por presentar diferencias en la infectividad, en la actividad de las enzimas de defensa y en los patrones isoenzimáticos, además de sus elevadas eficacias simbióticas en plantas de tomate cv. 'AMALIA', en condiciones de suelo Ferralítico Rojo Lixiviado y fertilidad química de media a alta.
4. Las actividades catalasa, endo-polimetilgalacturonasa y endo-glucanasa, de raíz, y la superóxido dismutasa de hoja, además de isoenzimas específicas de peroxidasa, polifenol oxidasa, superóxido dismutasa, esterasa y fosfatasa ácida, constituyen marcadores bioquímicos de la infectividad y la eficacia simbiótica de los HMA en plantas de tomate cv. 'AMALIA'.

5.2. RECOMENDACIONES

1. Utilizar los nuevos cebadores del marcador molecular *V-H⁺-ATPasa*, informados en este trabajo, en la identificación de especies de la familia *Glomeraceae*, y continuar trabajando en el diseño de nuevos cebadores que funcionen en un mayor número de especies.
2. Trabajar en el diseño de cebadores para el monitoreo de las cepas de HMA promisorias en los sistemas agrícolas donde se aplican, utilizando otros marcadores moleculares con capacidad para detectar alto grado de polimorfismo intra-específico.
3. Realizar estudios conducentes a la validación de los marcadores bioquímicos determinados en el presente trabajo, empleando otras cepas, cultivos y condiciones de sustrato.

Referencias Bibliográficas

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
2. Akiyama, K.; Matsuzaki, K.; Hayashi, H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: 824-827.
3. Alexander, A.G. 1964. Sucrose enzyme relationship in immature sugar cane. *J. Agric. of Univ. of P. Rico.* 4813: 165-231.
4. Allen, M. 2006. Water dynamics of mycorrhizas in arid soils. *In: Gadd, G.M. (Ed.) Fungi in Biogeochemical Cycles.* Cambridge University Press. p.74-97.
5. Álvarez, M.; Armas G. de; Martínez, B. 1997. Amalia y Mariela, dos nuevas variedades de tomate para consumo fresco. *Cultivos Tropicales* 18(1): 83.
6. Álvarez, M.; Lara, R.M.; Rodríguez, J.; Fernández, R.; Cuartero, J. 2006. Incorporación del gen *Mi* a variedades de tomate mediante el marcador *Aps-1*. *Cultivos Tropicales* 27(3): 69-73.
7. Alves da Silva, G.; Lumini, E.; Costa, L.; Bonfante P.; Bianciotto, V. 2006. Phylogenetic analysis of *Glomeromycota* by partial LSU rDNA sequences. *Mycorrhiza* 16: 183-189.
8. Amako, K.; Chen, G.X.; Asada, K. 1994. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant and Cell Physiology* 35: 497-504.
9. Arines, J.; Quintela, M.; Vilarino, A.; Palma, J.M. 1994. Protein patterns and superoxide dismutase activity in non-mycorrhizal and arbuscular mycorrhizal *Pisum sativum* L. plants. *Plant Soil* 166: 37-45.
10. Arriagada, C.; Pacheco, P.; Pereira, G.; Machuca, A.; Alvear, M.; Ocampo, J.A. 2009. Effect of arbuscular mycorrhizal fungal inoculation on *Eucalyptus globulus* seedlings and some soil enzyme activities under application of sewage sludge amendment. *J Soil Sci Plant Nut.* 9(2): 89-101.
11. Artursson, V.; Finlay, R.D.; Jansson, J.K. 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Appl Environ Microb.* 8: 1-10.
12. Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase- A hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* 85: 235-241.
13. Asada, K. 1994. Production and action of reactive oxygen species in photosynthetic tissues. *In: Foyer, C.; Mullineaux, P. (Eds). Causes of Photo-oxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants.* Boca Raton: CRC Press. p.77-105.
14. Azcón, R.; Perálvarez, M. del C.; Biró, B.; Roldán, A.; Ruíz-Lozano, J.M. 2009. Antioxidant activities and metal acquisition in mycorrhizal plants growing in a heavy-metal multicontaminated soil amended with treated lignocellulosic agrowaste. *Appl Soil Ecol.* 41: 168-177.
15. Baar, J. 2008. From production to application of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural systems: requirements and needs. *In: Varma, A. (Ed.) Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology Eco-Physiology, Structure and Systematics.* 3^{ed}. Berlin: Springer-Verlag. p.361-374.
16. Bago, B.; Azcón-Aguilar, C.; Goulet, A.; Piché, Y. 1998a. Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 139: 375-388.
17. Bago, B.; Azcón-Aguilar, C.; Piché, Y. 1998b. Architecture and developmental dynamics of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions. *Mycologia* 90: 52-62.
18. Bago, B.; Cano, C.; Samson, J.; Coughlan, A.P.; 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.
19. Bago, B.; Pfeffer, P.E.; Zipfel, W.; Lammers, P.; Shachar-Hill, Y. 2002. Tracking metabolism and imaging transport in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 244: 189-197.
20. Balestrini, R.; Bonfante-Fasolo, P. 2005. The interface compartment in arbuscular mycorrhizae: A special type of plant cell wall? *Plant Biosyst.* 139: 8-15.

21. Balestrini, R.; Hahn, M.G.; Faccio, A.; Mendgen, K.; Bonfante, P. 1996. Differential localization of carbohydrate epitopes in plant cell walls in the presence and absence of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiol.* 111: 203-213.
22. Barea JM.; Azcón-Aguilar, C. 1982. Production of plant growth-regulating substances by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Appl Environ Microb.* 43: 810-813.
23. Barea, J.M.; Azcón-Aguilar, C.; Ocampo, J.A.; Azcón, R. 1991. Morfología, anatomía y citología de las micorrizas vesículo-arbusculares. In: Olivares, J.; Barea, J.M. (Eds.). Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes. II. Fijación de N y Micorrizas. Madrid: CSIC. p. 149-173.
24. Barea, J.M.; Pozo, M.J.; Azcón, R.; Azcón-Aguilar, C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *J Exp Bot.* 56: 1761-1778.
25. Baroli, I.; Niyogi, K.K. 2000. Molecular genetics of xanthophylls-dependent photoprotection in green algae and plants. *Phil Trans R Soc Lond.* 355: 1385-1394.
26. Barreto, A.; Simón, P.J. 1979. Utilización de las isoenzimas como marcadores genéticos en *Saccharum*. *Cultivos Tropicales* 1: 111-129.
27. Beadle, C.L. 1993. Growth analysis. In: Hall, D.O.; Scurlock, J.M.O.; Bolhar-Nordentrampf, H.R.; Leegood, R.C.; Long, S.P. (Eds.). Photosynthesis and Production in Changing Environment. London: Chapman & Hall. p. 36-45.
28. Bécard, G.; Douds, D.D.; Pfeffer, P. 1992. Extensive in vitro hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols. *Appl Environ Microb.* 58: 821-825.
29. Becard, G.; Kosuta, S.; Tamasloukht, M.; Sejalon-Delmas, N.; Roux, C. 2004. Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. *Can J Bot.* 82: 1186.
30. Becard, G.; Piche, Y. 1989. Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Appl Environ Microb.* 55: 2320-2325.
31. Bécard, G.; Taylor, L.P.; Douds, D.D.; Pfeffer, P.; Doner, I.W. 1995. Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses. *Mol Plant Microbe In.* 8: 252-258.
32. Besner, Y.L.; Koide, R.T. 1999. Effect of mycorrhizal colonization and phosphorus on ethylene production by Snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) flowers. *Mycorrhiza* 9: 161-166.
33. Beyer, W.F.; Fridovich, I. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry* 161: 559-566.
34. Błaszowski, J.; Czerniawska, B.; Wubet, T.; Schäfer, T.; Buscot, F.; Renker, C. 2008. *Glomus irregulare*, a new arbuscular mycorrhizal fungus in the *Glomeromycota*. *Mycotaxon* 106: 247-267.
35. Błaszowski, J.; Kovács, G.M.; Balázs, T. 2009a. *Glomus perpusillum*, a new arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycologia* 101(2): 247-255.
36. Błaszowski, J.; Kovács, G.M.; Balázs, T.; Orłowska, E.; Sadravi, M.; Wubet, T. 2010b. *Glomus africanum* and *G. iranicum*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *Mycologia* 102(6): 1450-1462.
37. Błaszowski, J.; Ryszka, P.; Oehl, F.; Koegel, S.; Wiemken, A.; Kovács, G.M.; Redecker, D. 2009b. *Glomus achrum* and *G. bistratum*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*) found in maritime sand dunes. *Botany* 87(3): 260-271.
38. Błaszowski, J.; Tadych, M.; Madej, M. 2000. *Glomus minutum*, a new species in Glomales (*Zygomycetes*) from Poland. *Mycotaxon* 76: 187-195.
39. Błaszowski, J.; Wubet, T.; Harikumar, V.S.; Ryszka, P.; Buscot, F. 2010a. *Glomus indicum*, a new arbuscular mycorrhizal fungus. *Botany* 88: 132-143.
40. Blee, K.A.; Anderson, A.J. 1996. Defense-related transcript accumulation in *Phaseolus vulgaris* L. colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. Schenk and Smith. *Plant Physiol.* 110: 675-688.
41. Blilou, I.; Bueno, P.; Ocampo, J.A.; Garcia-Garrido, J. 2000a. Induction of catalase and ascorbate peroxidase activities in tobacco roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal *Glomus mosseae*. *Mycol Res.* 104: 722-725.
42. Blilou, I.; Ocampo, J.A.; Garcia-Garrido, J. 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*. *J Exp Bot.* 51: 1969-1977.

43. Boller, T.; Geheri, A.; Mauch, F. y Vogeli, U. 1983. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties and possible function. *Planta* 157: 22-31.
44. Bonfante-Fasolo, P.; Anca, I.A. 2009. Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions. *Annu Rev Microbiol.* 63: 363-83.
45. Bonfante-Fasolo, P.; Faccio, A.; Perotto, S.; Schubert, A. 1990. Correlation between chitin distribution and cell wall morphology in the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Mycol Res.* 94: 157-65
46. Börstler, B.; Raab, P.A.; Thiéry, O.; Morton, J.B.; 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 Phytol.* 180: 452-465.
47. Brachmann, A.; Parniske, M. 2006. The most widespread symbiosis on Earth. *Plos Biol.* 4: 239.
48. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 73: 248-250.
49. Breuillin, F.; Schramm, J.; Hajirezaei, M.; Ahkami, A.; Favre1, P.; Druge, U.; Hause, B.; *et al.* 2010. Phosphate systemically inhibits development of arbuscular mycorrhiza in *Petunia hybrida* and represses genes involved in mycorrhizal functioning. *Plant J.* 64: 1002-1017.
50. Brundrett, M. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil* 320: 37-77.
51. Cano, C.; Bago, A.; Dalpé, Y. 2009. *Glomus custos* sp. nov., isolated from a naturally heavy metal-polluted environment in southern Spain. *Mycotaxon* 109: 499-512.
52. Carlberg, I.; Mannervik, B. 1985. Glutathione reductase. *Methods in Enzymology* 113, 484-489.
53. Catoira, R.; Galera, C.; de Billy, F.; Varma-Penmetsa, R.; Journet, E.P.; Mailliet, F.; *et al.* 2000. Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. *Plant Cell* 12: 1647-1666.
54. Chen, A.; Gu, M.; Sun, Sh.; Zhu, L.; Hong, Sh.; Xu, G. 2010. Identification of two conserved cis-acting elements, MYCS and PIBS, involved in the regulation of mycorrhiza-activated phosphate transporters in eudicot species. *New Phytol.* 189(4):1157-69
55. Clark, N.M.; Rillig, M.C.; Nowak, R.S. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungal abundance in the Mojave Desert: Seasonal dynamics and impacts of elevated CO₂. *J Arid Environ.* 73: 834-843.
56. Cordier, C.; Pozo, J.M.; Barea, J.M.; Gianinazzi, S.; Gianinazzi-Pearson, V. 1998. Cell defence responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora nicotianae* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol Plant Microbe In.* 10: 1017-1028.
57. Cornejo, P.; Azcón-Aguilar, C.; Barea, J.M.; Ferrol, N. 2004. Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Lett.* 241: 265-270.
58. Corradi, N.; Kuhn, G.; Sanders, I.R. 2004. Monophyly of β -*tubulin* and *H⁺-ATPase* gene variants in *Glomus intraradices*: consequences for molecular evolutionary studies of AM fungal genes. *Fungal Genet Biol.* 41: 262-273.
59. Dalpé, Y.; Adriano de Souza, F.; Declerck, S. 2005. Life cycle of *Glomus* species in monoxenic culture. *In: Declerck, S.; Strullu, D.G.; Fortin, J.A. (Eds.). In vitro culture of mycorrhizas.* Berlin: Springer-Verlag. p. 49-65.
60. Dalpé, Y.; Hamel, C. 2007. Arbuscular mycorrhizae. 355-377, in: *Manual of Soil Sampling and Methods of Analysis.* 4th Edition, Canadian Society of Soil Science Lewis Publishers of CRC Press.
61. DeBellis, T.; Widden, P. 2006. Diversity of the small subunit ribosomal RNA gene of the arbuscular mycorrhizal fungi colonizing *Clintonia borealis* from a mixed-wood boreal forest. *FEMS Microbiol Ecol.* 58: 225-235.
62. Dell' Amico, J.M.; Rodríguez, P.; Torrecillas, A.; Morte, A.; Sánchez-Blanco, M.J. 2002. Influencia de la micorrización en el crecimiento y las relaciones hídricas de plantas de tomate sometidas a un ciclo de sequía y recuperación. *Cultivos Tropicales* 23(1): 29-34.
63. Demchenko, K.; Winzer, T.; Stougaard, J.; Parniske, M.; Pawlowski, K. 2004. Distinct roles of *Lotus japonicas* SYMRK and SYM15 in root colonization and arbuscule formation. *New Phytol.* 163: 381-392.

64. Diop, T.A.; Plenchette, C.; Strullu, D.G. 1994. *In vitro* culture of sheared mycorrhizal roots. *Symbiosis* 17: 217-227.
65. DNASTAR. Consultado [enero-marzo del 2011]. Disponible en: www.dnastar.com/
66. Dumas-Gaudot, E.; Slezack, S.; Dassi, B.; Pozo, M.J.; Gianinazi-Pearson, V.; Gianinazzi, S. 1996. Plant hydrolytic enzymes (chitinases and β 1,3 glucanase) in root reactions to pathogenic and symbiotic microorganisms. *Plant soil* 185: 211-221.
67. El Ghachtouli, N.; Martin-Tangury, J.; Paynot, M.; Gianinazzi, S. 1996. First report of the inhibition of arbuscular mycorrhizal infection of *Pisum sativum* by specific and irreversible inhibition of polyamine biosynthesis or by gibberellic acid treatment. *FEBS Lett.* 385: 189-192.
68. Endre, G.; Kereszt, A.; Kevei, Z.; Mihacea, S.; Kalo, P.; Kiss, G.B. 2002. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417: 962-966.
69. Esch, H.; Hundeshagen, B.; Schneider-Poetsch, H.J.; Bothe, H. 1994. Demonstration of abscisic acid in spores and hyphae of the arbuscular-mycorrhizal fungus *Glomus* and in the N_2 -fixing cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Plant Sci.* 99: 9-16.
70. FAOSTAT. [Consultado octubre, 2012]. Disponible en: <http://faostat.fao.org/>
71. Feddermann, N.; Roger Finlay, R.; Boller, T.; Elfstrand, M. 2010. Functional diversity in arbuscular mycorrhiza-the role of gene expression, phosphorous nutrition and symbiotic efficiency. *Fungal Ecol.* 3: 1-8.
72. Fernández, F.; Dell'Amico, J.M.; Fernández, K.; de la Providencia. I.; Rodríguez, Y. 2006. Funcionamiento de un inoculante líquido a base del hongo micorrízico arbuscular *Glomus* sp1 (INCAM-4) en arroz (*Oryza sativa* var. J-104) en suelo salino. *Cultivos Tropicales* 27(2): 27-33.
73. Fernández, F.; Rodríguez, E.L.; Gómez, R. 1999. Caracterización de la efectividad de un nuevo inoculante micorrizógeno en Poaceas. *Cultivos Tropicales* 20(2): 9-14.
74. Fernández, K. 2012. Establecimiento de un sistema de cultivo *in vitro* para la micorrización rápida de plantas de *Solanum tuberosum* L. cv. Desiré. [Tesis de Doctorado] Universidad de la Habana, INCA. 100 p.
75. Fester, T.; Hause, G. 2005. Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. *Mycorrhiza* 15: 373-379.
76. Fitze, D.; Wiepning, A.; Kalforf, M.; Ludwing-Müller, J. 2005. Auxins in the development of an arbuscular mycorrhizal symbiosis in maize. *Plant Physiol.* 162: 1210-1219.
77. Foyer, C.H. 1993. Ascorbic acid. In: Alscher, R.G.; Hess, J.L. (Eds) Antioxidants in Higher Plants. Boca Raton: CRC Press. p. 31-58.
78. Foyer, C.H.; Descourvières, P.; Kunert, K.J. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17: 507-523.
79. Franken, P.; Donges, K.; Grunwald, U.; Kost, G.; Rexer, K.H.; Tamasloukht, MB. Waschke, A.; Zeuske, D. 2007. Gene expression analysis of arbuscule development and functioning. *Phytochemistry* 68: 68-74.
80. Frick, F. 1976. Oxidative enzymes. In: Heitefuss, R.; Williams, P.H. (Eds.). Physiological Plant Pathology. Encyclopedia of Plant Pathology. New Series 4: 617-627.
81. Fridovich, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 64: 97-112.
82. Fries, LL.M.; Pacovsky, R.S.; Safir, G.R. 1996. Expression of isoenzymes altered by both *Glomus intraradices* colonization and formononetin application in corn (*Zea mays* L.) roots. *Soil Biol Biochem.* 28: 981-988.
83. Fries, LL.M.; Pacovsky, R.S.; Safir, GR. 1998. Influence of phosphorus and formononetin on isozyme expression in the *Zea mays*-*Glomus intraradices* symbiosis. *Physiol Plantarum* 103: 172-180.
84. Fritz, M.; Jakobsen, I.; Lyngkjaer, M.F.; Thordal-Christensen, H.; Pons-Kuhnemann, J. 2006. Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. *Mycorrhiza* 16: 413-419.
85. Frühling, M.; Roussel, H.; Gianinazzi-Pearson, V.; Puhler, A.; Perlick, A.M. 1997. The *Vicia faba* leghemoglobin gene *VfLb29* is induced in root nodules and in roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum*. *Mol Plant Microbe In.* 10: 124-131.
86. Fundora, L.R.; Rodríguez, Y.; Mena, A.; González, P.J.; Rodríguez, P.; González-Peña, D. 2008. Estabilidad de la eficiencia de la cepa *Glomus mosseae* en la respuesta del tomate a condiciones de estrés hídrico fuera de su periodo óptimo. *Cultivos Tropicales* 29(2): 47-53.

87. García, M.; Morales-Vela, G.; García-Garrido, J.M.; García-Romera, I.; Ocampo, J.A. 2008. Enzimas que intervienen en la formación y desarrollo de la simbiosis arbuscular. *En: Heredia, A.G. (Ed.) Tópicos sobre diversidad, ecología y usos de los hongos microscópicos en Iberoamérica.* Xalapa: Instituto de Ecología, A.C. p. 230-248
88. García-Garrido JM, Ocampo JA. 2002. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J Exp Bot.* 53: 1377-1386.
89. García-Garrido, J.M.; Cabello, M.N.; García-Romera, I.; Ocampo, J.A. 1992b. Endoglucanase activity in lettuce plants colonized with the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum*. *Soil Biol Biochem.* 24(10): 955-959.
90. García-Garrido, J.M.; García-Romera, I.; Ocampo, J.A. 1992a. Cellulase production by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd) Gerd. and Trappe. *New Phytol.* 121: 221-226.
91. García-Garrido, J.M.; Ocampo, J.A.; García-Romera, I. 2002. Enzymes in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *In: Burns, R.; Dick, R. (Eds.) Enzymes in the environment: Activity, Ecology, and Applications.* New York: Marcel Dekker. p. 125-151.
92. García-Garrido, J.M.; Tribak, M.; Rejón-Palomares, A.; Ocampo, J.A.; García-Romera, I. 2000. Hydrolytic enzymes and ability of arbuscular mycorrhizal fungi to colonize roots. *J Exp Bot.* 51(349): 1443-1448.
93. García-Garrido, J.M.; Vierheilig, H. 2009. From a germinating spore to an established arbuscular mycorrhiza: Signalling and regulation. *In: Khasa, D.; Piché, Y.; Coughlan, A. (Eds.). Advances in mycorrhizal science and technology.* Ottawa: NRC Research Press. p. 15-37.
94. García-Romera, I.; García-Garrido, J.M.; Martínez-Molina, E.; Ocampo, JA. 1991b. Production of pectolytic enzymes in lettuce root colonized by *Glomus mosseae*. *Soil Biol Biochem.* 23(6): 597-601.
95. García-Romera, I.; García-Garrido, J.M.; Ocampo, J.A. 1991a. Pectolytic enzymes in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus-mosseae*. *FEMS microbial let.* 78(2-3): 343-346.
96. Geil, R.D.; Guinel, F.C. 2002. Effects of elevated substrate-ethylene on colonization of *Allium porrum* (leek) roots by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Can J Bot.* 80: 114-119.
97. Gerdemann, J.W.; Nicholson, T.H. 1963. Spore of mycorrhizae endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br. Mycol. Soc.* 46: 235-244.
98. Gerdemann, J.W.; Trappe, J.M. 1974. Endogonaceae in the Pacific Northwest. *Mycologia Memoir.* 5: 1-76.
99. Gianinazzi-Pearson, V.; Dumas-Gaudot, E.; Gollotte, A.; Tahiri-Alaoui, A.; Gianinazzi, S. 1996. Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 133: 45-57.
100. Ginzberg, I.; David, R.; Shaul, O.; Elad, Y.; Winer, S.; Ben-Dor, B.; Badani, H.; *et al.* 1998. *Glomus intraradices* colonization regulates gene expression in tobacco plants. *Symbiosis* 24: 145-157.
101. Giovannetti, M.; Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular infection in roots. *New Phytol.* 84: 489-500.
102. Giovannetti, M. 2000. Spore germination and pre-symbiotic mycelial growth. *In: Kapulnik Y.; Douds D.D. Jr. (Eds.) Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function.* Netherlands: Kluwer Academic Press. p. 47-68.
103. Giovannetti, M.; Avio, L.; Salutini, L. 1991. Morphological, cytochemical, and ontogenetic characteristics of a new species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *Can J Bot.* 69: 161-167.
104. Giovannetti, M.; Sbrana, C.; Avio, L.; Citernesi, A.S.; Logi, C. 1993a. Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during preinfection stages. *New Phytol.* 125: 587-594.
105. Giovannetti, M.; Sbrana, C.; Silvia, A.; Avio, L. 1996. Analysis of factors involved in fungal recognition response to host-derived signals by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 133: 65-71.
106. Giovannetti, M.A.; Sbrana, L.; Citernesi, C.; *et al.* 1993b. Factors affecting appressorium development in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *New Phytol.* 123: 115-22.
107. Gobert, A.; Plassard, C. 2008. The beneficial effect of mycorrhizae on N utilization by the host-plant: Myth or reality? *In: Varma, A. (Ed.) Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-*

- Function, Biotechnology Eco-Physiology, Structure and Systematics. 3^{ed}. Berlin: Springer-Verlag. p. 209-240.
108. Gollotte, A.; Cordier, C.; Lemoine, M.C.; Gianinazzi-Pearson, V. 1997. Role of fungal wall components in interactions between endomycorrhizal symbionts. *In*: Shenck, H.E.A.; Herrmann, R.; Jeon, K.W.; Schwemmler, N.E.M. (Eds.). Eukaryotism and Symbiosis. Berlin: Springer. p. 412-428.
 109. Gollotte, A.; van Tuinen, D.; Atkinson, D. 2004. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. *Mycorrhiza* 14: 111-117.
 110. Graham, J.H.; Linderman, R.G.; Menge, J.A. 1982. Development of external hyphae by different isolates of mycorrhizal *Glomus* sp. in relation to root colonization and growth of *Troyer citrange*. *New Phytol.* 91: 183-189.
 111. Guinel, F.C.; Geil, R.D. 2002. A model for the development of the rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses in legumes and its use to understand the roles of ethylene in the establishment of these two symbioses. *Can J Bot.* 80: 695-720.
 112. Hall, IR. 1977. Species and mycorrhizal infections of New Zealand *Endogonaceae*. *Trans Br Mycol Soc.* 68(3): 341-356.
 113. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. 1989. Free Radicals in Biology and Medicine. Ed 2, Oxford, Clarendon Press, U.K.
 114. Harley, J.L.; Wilson, J.M. 1959. The Absorption of Potassium by Beech Mycorrhiza. *New Phytol.* 281-298.
 115. Harrison, M. 1999. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 50: 361-389.
 116. Harrison, M. 2005. Signalling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Microbiol.* 59: 19-42.
 117. Harrison, M.J.; Dixon, R.A. 1993. Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe In.* 6: 643-654.
 118. Hause, B.; Fester, T. 2005. Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Planta.* 221: 184-196.
 119. Hause, B.; Maier, W.; Miersch, O.; Kramell, R.; Strack, D. 2002. Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiol.* 130: 1213-1220.
 120. Hause, B.; Mrosk, C.; Isayenkov, S.; Strack, D. 2007. Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochem.* 68: 101-110.
 121. Helgason, T.; Fitter, A.H.; Young, J.P.W. 1999. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing *Hyacinthoides non-scripta* (bluebell) in a seminatural woodland. *Mol Ecol.* 8: 659-666.
 122. Hernández, A.; Pérez, J.M.; Bosch, D.; Rivero, L. 2006. Nueva Versión de Clasificación Genética de los Suelos de Cuba. La Habana: AGRINFOR. 64 p.
 123. Herrera, R.A.; Ferrer, R.L.; Furrázola, E.; Orozco, M.O. 1995. Estrategia de funcionamiento de las micorrizas VA en un bosque tropical. Biodiversidad en Iberoamérica. Ecosistemas, Evolución y Procesos sociales. (Eds. Maximina Monasterio) programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. Subprograma XII, Diversidad Biológica, Mérida,
 124. Herrera-Medina, M.J.; Gagnon, H.; Piché, Y.; Ocampo, J.A.; Garcia-Garrido, J.M.; Vierheilig, H. 2003. Root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi is affected by the salicylic acid content of the plant. *Plant Sci.* 164: 993-998.
 125. Herrera-Medina, M.J.; Steinkellner, S.; Vierheilig, H.; Ocampo, J.A.; García-Garrido, J.M. 2007. Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytol.* 175: 554-564.
 126. Hiraga, S.; Sasaki, K.; Ito, H.; Ohashi, Y.; Matsui, H. 2001. A large family of class III peroxidases. *Plant Cell Physiol.* 42: 462-468.
 127. Iglesias L. 1986. Estudio de la variabilidad morfoagronómica y bioquímica en soya (*Glycine max* L. Merrill). [Tesis de Doctorado]. INCA. La Habana. 100 p.

128. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). 2001. Producto inoculante micorrizógeno. Inventor: F. M. Fernández Martín. A01N 63/00, A01N 63/04. Fecha de Solicitud: 1996.09.06. Cuba, Oficina Cubana de la Propiedad Intelectual (OCPI). Patente de Invención: CU 22641
129. INVAM. Consultado [25 de febrero del 2011]. Disponible en: <http://www.invam.caf.wvu.edu>
130. Jacobi, L.M.; Zubkova, L.A.; Barmicheva, E.M.; Tsyganov, V.E.; Borisov, A.Y.; Tikhonovich, I.A. 2003. Effect of mutations in the pea genes *Sym33* and *Sym40*. II. Dynamics of arbuscule development and turnover. *Mycorrhiza* 13: 9-16.
131. Jacobsen, I.; Abbot, I.K.; Robson, A.D. 1992. External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. *New Phytol.* 120: 371-380.
132. Jahromi, F.; Aroca, R.; Porcel, R.; Ruiz-Lozano, J.M. 2008. Influence of Salinity on the *In Vitro* Development of *Glomus intraradices* and on the *In Vivo* Physiological and Molecular Responses of Mycorrhizal Lettuce Plants. *Microb Ecol.* 55: 45-53.
133. Jansa, J.; Mozafar, A.; Banke, S.; McDonald, B.A.; Frossard, E. 2002. Intra- and intersporal diversity of ITS rDNA sequences in *Glomus intraradices* assessed by cloning and sequencing, and by SSCP analysis. *Mycol Res.* 106: 670-681.
134. Jeffries, P.; Barea, J.M. 2001. Arbuscular Mycorrhiza – a key component of sustainable plant-soil ecosystems. The Mycota. Berlin: Springer-Verlag. p. 95-113.
135. Jude, C.; Coughlan, A.P.; Fortin, J.A.; Piché, Y. 2009. Growth and branching of asymbiotic, presymbiotic, and extraradical AM fungal hyphae: clarification of concepts and terminology. In: Khasa, D.; Piché, Y.; Coughlan, A.P. (Eds) *Advances in Mycorrhizal Science and Technology*. Ottawa: NRC Research Press. p. 39-50.
136. Karandashov, V.; Kuzovkina, I.; Hawkins, H.J.; George, E. 2000. Growth and sporulation of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus caledonium* in dual culture with transformed carrot roots. *Mycorrhiza* 10: 23-28.
137. Kohler, J.; Hernández, J.A.; Caravaca, F.; Roldán, A. 2008. PGPR and AM fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water stressed plants. *Functional Plant Biology* 35: 141-151.
138. Kohler, J.; Hernández, J.A.; Caravaca, F.; Roldán, A. 2009. Induction of antioxidant enzymes is involved in the greater effectiveness of a PGPR versus AM fungi with respect to increasing the tolerance of lettuce to severe salt stress. *Environ and Exp Bot.* 65: 245-252.
139. Kormanik, P.P.; McGraw, A.C. 1982. Quantification of vesicular arbuscular mycorrhizae in plant roots. In: Schenck NC (ed) *Methods and principles of mycorrhizal research*. The American Phytopathological Society, St Paul, Minn.
140. Koske, R.E.; Gemma, J.N.; Olexia, P.D. 1986. *Glomus microaggregatum*, a new species in the *Endogonaceae*. *Mycotaxon* 26: 125-132.
141. Krüger, M.; Stockinger, H.; Krüger, C.; Schüßler, A. 2009. DNA-based species level detection of *Glomeromycota*: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 183: 212-223.
142. Lambais, M.R. 2000. Regulation of plant defense-related genes in arbuscular mycorrhizae. In: Podilla, G.K.; Douds, D.D. Jr. (Eds.). *Current Advances in Mycorrhizae Research*. Section II: Mycorrhizal fungi and plant defense. Minnesota (USA): APS Press. p. 45-59.
143. Lambais, M.R.; Mehdy, M.C. 1996. Soybean roots infected by *Glomus intraradices* strains differing in infectivity exhibit differential chitinase and β -1,3 glucanase expression. *New Phytol.* 134: 531- 538.
144. Lambais, M.R.; Ríos-Ruiz, W.F.; Andrade, R.M. 2003. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 160:421-428.
145. Larose, G.; Chenevert, R.; Moutoglis, P.; Gagné, S.; Piché, Y.; Vierheilig, H. 2002. Flavonoid levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. *J Plant Physiol.* 159: 1329-1339.
146. Lee, J.; Lee, S.; Young, P. 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Ecol.* 65: 339-349.
147. Lenzemo, V.W.; Kuyper, T.W.; Matusova, R.; Bouwmeester, H.J.; Van Ast, A. 2007. Colonization by arbuscular mycorrhizal fungi of sorghum leads to reduced germination and subsequent attachment and emergence of *Striga hermonthica*. *Plant Signal Behav.* 2(1): 58–62.

148. Lerch, G. 1977. La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas. La Habana: Científico-Técnica. 28 p.
149. Li, H.Y.; Yang, G.D.; Shu, H.R.; Yang, Y.T.; Ye, B.X.; Nishida, I.; Zheng, C.C. 2006. Colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* induces a defense response against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in the grapevine (*Vitis amurensis* Rupr.), which includes transcriptional activation of the class III chitinase gene VCH3. *Plant Cell*. 47: 154-163.
150. Li, T.; Li, L.; Sha, T.; Zhang, H.; Zhao, Z. 2010. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with two dominant xerophytes in a valley-type savanna, southwest China. *Appl Soil Ecol*. 44: 61-66.
151. Lister, C.E.; Lancaster, J.E.; Walker J.R.L. 1996. Phenylalanine Ammonia-lyase (PAL) activities and its relationship to Anthocyanin and Flavonoids Levels in New Zealand- grown Apple Cultivars. *J Am Soc Hort Sci*. 121: 281-285.
152. Logi, C.; Sbrana, C.; Giovannetti, M. 1998. Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host. *Appl Environ Microb*. 64: 3473-3479.
153. López-Ráez, J.A.; Charnikhova, T.; Fernández, I.; Bouwmeester, H.; Pozo, M.J. 2011. Arbuscular mycorrhizal symbiosis decreases strigolactone production in tomato. *J Plant Physiol*. 168: 294-297.
154. López-Ráez, J.A.; Verhage, A.; Fernández, I.; García, J.M.; Azcón-Aguilar, C.; Flors, V.; Pozo, M.J. 2010. Hormonal and transcriptional profiles highlight common and differential host responses to arbuscular mycorrhizal fungi and the regulation of the oxylipin pathway. *J Exp Bot*. 61(10): 2589-2601.
155. Ludwig-Müller, J. 2000. Hormonal balance in plants during colonization by mycorrhizal fungi. In: Kapulnik Y.; Douds D.D. Jr. (Eds.) *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Netherlands: Kluwer Academic Press. p. 263-285.
156. Maldonado-Mendoza, I.; Dewbre, G.R.; Blaylock, K.; Harrison, M. 2005. Expression of a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene, Mt- XTH1, from *Medicago truncatula* is induced systematically in mycorrhizal roots. *Gene* 345: 191-197.
157. Martin, J.; García-Romero, I.; Ocampo, J.A.; Palma, J.M. 1998. Superoxide dismutase and arbuscular mycorrhizal fungi: Relationship between the isoenzyme pattern and the colonizing fungus. *Symbiosis* 24: 247-257.
158. Martínez-Medina, A.; Pascual, J. A.; Pérez-Alfocea, F.; Albacete, A.; Roldán, A. 2010. *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices* modify the hormone disruption induced by *Fusarium oxysporum* infection in melon plants. *Phytopathology* 100: 682-688.
159. Marulanda, A.; Azcón, R.; Ruiz-Lozano, J.M. 2003. Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* L. plants under drought stress. *Physiol Plantarum* 119: 526-533.
160. Marulanda, A.; Porcel, R.; Barea, J.M.; Azcón, R. 2007. Drought Tolerance and Antioxidant Activities in Lavender Plants Colonized by Native Drought-tolerant or Drought-sensitive *Glomus* Species. *Microb Ecol*. 54: 543-552.
161. Mathur, N.; Vyas, A. 1995. Changes in isoenzyme patterns of peroxidase and polyphenoloxidase by VAM fungi in roots of *ziziphus* species. *J Plant Physiol*. 145: 498-500.
162. Matsumura, A.; Horii, S.; Ishii T., 2007. Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Intercropping with Bahiagrass on Growth and Anti-oxidative Enzyme Activity of Radish. *J Japan Soc Hort Sci*. 76(3): 224-229.
163. Mayer, A.M. 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry* 67: 2318-2331.
164. Mazorra, L.M. Los brasinoesteroides y su relación con la tolerancia de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) ante el choque por temperatura alta. [Tesis de Doctorado] La Habana: Universidad de la Habana, 2008. 99 p.
165. Mazzoncini M., Canali S., Giovannetti M., Castagnoli M., Tittarelli F., Antichi D., Nannelli R., Cristani C., Barberi P. 2010. Comparison of organic and conventional stockless arable systems: A multidisciplinary approach to soil quality evaluation. *Appl Soil Ecol*. 44: 124-132.
166. McGee, P.A. 1986. Further sporocarpic species of *Glomus* (*Endogonaceae*) from South Australia. *Trans Br Mycol Soc*. 87(1): 123-129.

167. Miransari, M. 2011. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. *Appl Microbiol Biot.* 89(4): 917-30
168. Miransari, M.; Bahrami, H.A.; Rejali, F.; Malakouti, M.J. 2008. Using arbuscular mycorrhiza to alleviate the stress of soil compaction on wheat (*Triticum aestivum* L.) growth. *Soil Biol Biochem.* 40: 1197-1206.
169. Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410.
170. Mohammadi, E.; Rezaee, D.; Prasad, R.; Varma, A. 2008. Mycorrhizal Fungi: What We Know and What Should We Know? In: Varma, A. (Ed.). *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology Eco-Physiology, Structure and Systematics.* 3^{ed}. Berlin: Springer-Verlag. p. 3-27.
171. Morales Vela, G.; Molinero-Rosales, N.; Ocampo, J.A.; García-Garrido, J.M. 2007. Endocellulase activity is associated with arbuscular mycorrhizal spread in pea symbiotic mutants but not with its ethylene content in root. *Soil Biol Biochem.* 39: 786-792.
172. Morandi, D. 1996. Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control. *Plant Soil.* 185: 241-251.
173. Morgan, J.A.W.; Bending, G.D.; White, P.J. 2005. Biological cost and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *J Exp Bot.* 56(17): 29-39.
174. Morton, J.B.; Benny, G.L. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Zygomycetes*): a new order, *Glomales*, two new suborders, *Glominae* and *Gigasporinae*, and two new families, *Acaulosporaceae*, with an emendation of *Glomaceae*. *Mycotaxon* 37: 471-491.
175. Morton, J.B.; Redecker, D. 2001. Two new families of *Glomales*, *Archaeosporaceae* and *Paraglomaceae*, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93: 181-195.
176. Mosse, B. 1953. Fructifications associated with mycorrhizal strawberry. *Nature* 171: 974.
177. Mosse, B. 1959. The regular germination of resting spores and some observations in the growth requirements of an *Endogone* sp. Causing vesicular–arbuscular mycorrhiza. *Trans Br Mycol Soc.* 42: 273-286.
178. Mosse, B. 1962. The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *Journal of General Microbiology* 27: 509-520.
179. Mosse, B. 1988. Some studies relating to independent growth of vesicular-arbuscular endophytes. *Can J Bot.* 66: 2533-40.
180. Mosse, B. 1995. Observations on the extraradical mycelium of a vesicular-arbuscular endophyte. *Trans Br Mycol Soc.* 42: 439-448.
181. Mosse, B.; Hepper, C.M. 1975. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. *Physiol Plant Pathol.* 5: 215-23.
182. Msiska, Z.; Morton, J.B. 2009. Phylogenetic analysis of the *Glomeromycota* by partial β -*tubulin* gene sequences. *Mycorrhiza* 19: 247-254.
183. Mujica, Y.; Medina, N. 2008. Respuesta del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) a la formulación líquida de cuatro cepas de *Glomus* en condiciones de campo. *Cultivos Tropicales* 29(3): 23-25.
184. Mummey, D.L.; Antunes, P.M.; Rillig, M.C. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi pre-inoculant identity determines community composition in roots. *Soil Biol Biochem.* 41: 1173-1179.
185. Nagahashi, G.; Douds, D.D. 2000. Partial separation of root exudate compounds and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. *Mycol Res.* 104: 1453-64.
186. Nicolson, T.H. 1959. Mycorrhizae in the gramineae. I. Vesicular–arbuscular endophytes, with special reference to the external phase. *Trans Br Mycol Soc.* 42: 421-438.
187. Nicolson, T.H.; Gerdemann, J.W. 1968. Mycorrhizal *Endogone* Species. *Mycologia* 60(2): 313-325
188. Nilsson, R.H.; Kristiansson, E.; Ryberg, M.; Hallenberg, N.; Larsson, K.H. 2008. Intraspecific ITS variability in the Kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evol Bioinform.* 4: 193-201.
189. Noctor, G.; Foyer, C.H. 1998. Ascorbate and Glutathione: keeping active oxygen under control. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 49: 249-279.

190. Noval, B.; Pérez, E.; Martínez, B.; León, O.; Martínez-Gallardo, N.; Délano-Frier, J. 2007. Exogenous systemin has a contrasting effect on disease resistance in mycorrhizal tomato (*Solanum Lycopersicum*) plants infected with necrotrophic or hemibiotrophic pathogens. *Mycorrhiza* 17(5): 449-460
191. Nuez, F. 1995. Desarrollo de nuevos cultivares. Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. *En*: Nuez, F. (Ed.). El cultivo del tomate. Ediciones Muni-Prensa. Madrid, Barcelona y México. p. 625-669.
192. Oehl, F.; Sieverding, E.; Ineichen, K.; Mäder, P.; Wiemken, A.; Boller, T. 2009. Distinct sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities from different agroecosystems in long-term microcosms. *Agr Ecosyst Environ.* 134: 257-268.
193. Oehl, F.; Wiemken, A.; Sieverding, E. 2003. *Glomus aureum*, a new sporocarpic arbuscular mycorrhizal fungal species from European grasslands. *J Appl Bot Food Qual.* 77: 111-115.
194. Olah, B.; Brière, C.; Bécard, G.; Dénarié, J.; Gough, C. 2005. Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signaling pathway. *Plant J.* 44: 195-207.
195. Oliveira, Ch.A.; Sá, N.M.H.; Gomes, E.A.; Marriel, I.E. 2009. Assessment of the mycorrhizal community in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) genotypes contrasting for phosphorus efficiency in the acid savannas of Brazil using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Appl Soil Ecol.* 41: 249-258.
196. Omar, M.B.; Bolland, L.; Heather, W.A. 1979. A permanent mounting medium for fungi. *Bulletin of the British Mycological Society* 13: 31.
197. Öpik, M.; Metsis, M.; Daniell, T.J.; Zobel, M.; Moora, M. 2009. Large-scale parallel sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest. *New Phytol.* 184: 424-437.
198. Öpik, M.; Moora, M.; Zobel, M.; Saks, Ü.; Wheatley, R.; Wright, F.; Daniel, T. 2008a. High diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreal herb-rich coniferous forest. *New Phytol.* 179: 867-876.
199. Öpik, M.; Saks, Ü.; Kennedy, J.; Daniell, T. 2008b. Global Diversity Patterns of Arbuscular Mycorrhizal Fungi-Community Composition and Links with Functionality. *In*: Varma, A. (Ed.) *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology Eco-Physiology, Structure and Systematic.* Berlin: Springer-Verlag. p. 89-111.
200. Ortega, E.; Rodés, R. 1986. Manual de prácticas de laboratorio de fisiología vegetal. Ciudad de la Habana: Pueblo y Educación. 196 p.
201. Palenzuela, J.; Barea, J.M.; Ferrol, N.; Azcón-Aguilar, C.; Oehl, F. 2010. *Entrophospora nevadensis*, a new arbuscular mycorrhizal fungus, from Sierra Nevada National Park (southeastern Spain). *Mycologia* 102: 624-632.
202. Palenzuela, J.; Barea, J.M.; Ferrol, N.; Oehl, F. 2011. *Ambispora granatensis*, a new arbuscular mycorrhizal fungus, associated with *Asparagus officinalis* in Andalucía (Spain). *Mycologia* 103 (2): 333-340
203. Palenzuela, J.; Ferrol, N.; Boller, T.; Azcón-Aguilar, C.; Oehl, F. 2008. *Otospora bareai*, a new fungal species in the *Glomeromycetes* from a dolomitic shrub land in Sierra de Baza National Park (Granada, Spain). *Mycologia* 100 (2): 296-305.
204. Palma, J.M.; Longa, M.A.; del Río, L.A.; Arines, J. 1993. Superoxide-dismutase in vesicular arbuscular-mycorrhizal red-clover plants. *Physiol Plantarum* 87: 77-83.
205. Paneque, V. 2002. Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos. La Habana: Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
206. Parniske, M. 2004. Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr Opin Plant Biol.* 7: 414-421.
207. Parniske, M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol.* 6: 763-775.
208. Passardi, F.; Penel, C.; Dunand, C. 2004. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci.* 9: 534-540.
209. Paynet, M.; Martin, C.; Girand, M. 1971. Activité phenylalanine ammiac lyase et hypersensibilite an virus de la mosaïque du tabac. *Acad. Sci. Paris.* 273: 537-539.

210. Pérez, E. 2010. Hongos micorrízicos arbusculares (HMA) para la bioprotección de patógenos en el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.). [Tesis de Doctorado] Universidad de la Habana, INCA. 100 p.
211. Pérez, E.; Rodríguez, Y.; Hernández, M.A.; de la Noval, B.M. 2004. Dinámica de inducción de algunos sistemas de defensa en la interacción HMA-tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) var. Amalia. II. Inducción y expresión de peroxidadas y polifenoloxidasas en raíces de tomate. *Cultivos Tropicales* 25(2): 45-52.
212. Phillips, J.M.; Hayman, D.E. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br Mycol. Soc.* 55: 158-161.
213. Piniór, A.; Wyss, U.; Piché, Y.; Vierheilig, H. 1999. Plants colonized by AM fungi regulate further root colonization by AM fungi through altered root exudation. *Can J Bot.* 77: 891-897.
214. Plenchette, C.; Fortin, J.A. 2009. The relative field mycorrhizal dependency concept and its usefulness in agronomy. In: Khasa, D.; Piché, Y.; Coughlan, A.P. (Eds) *Advances in Mycorrhizal Science and Technology*. Ottawa: NRC Research Press. p. 87-91.
215. Polle, A. 1997. Defense against photooxidative damage in plants. In: Scandalios, J. (Eds) *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. NY: Cold Spring Harbor Press. p. 785-813.
216. Porcel, R.; Aroca, R.; Azcón, R.; Ruiz-Lozano, J. 2006. PIP aquaporin gene expression in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants in relation to drought stress tolerance. *Plant Mol Biol.* 60: 389-404.
217. Powell, C. 1976. Development of mycorrhizal infections from Endogone spores and infected root segments. *Trans Br Mycol Soc.* 66: 439-445.
218. Pozo, M.; Azcón-Aguilar, C. 2007. Unraveling mycorrhiza induced resistance. *Curr Opin Plant Biol.* 10: 393-398.
219. Pozo, M.J. 1999. Inducción de enzimas hidrolíticas en raíces de tomate (*Lycopersicon esculentum*) como respuesta a la formación de MA y su implicación en el control biológico de *Phytophthora parasítica*. [Tesis de doctorado] Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. España. 140 p.
220. Pozo, M.J.; Cordier, C.; Dumas-Gaudot, E.; Gianinazzi, S.; Barea, J.M.; Azcon-Aguilar, C. 2002. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *J Exp Bot.* 53: 525-534.
221. Pozo, M.J.; Verhage, A.; García-Andrade, J.; García, J.M.; Azcón-Aguilar, C. 2009. Priming plant defence against pathogens by arbuscular mycorrhizal fungi. In: Azcón-Aguilar, C.; Barea, J.M.; Gianinazzi, S.; Gianinazzi-Pearson, V. (Eds.) *Mycorrhizas - Functional Processes and Ecological Impact*. Berlin: Springer-Verlag. p. 123-135.
222. Redecker, D. 2002. Molecular identification and phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil.* 244: 67-73.
223. Redecker, D.; Morton, J. B.; Bruns, T. D. 2000. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomales*). *Mol Phylogenet Evol.* 14: 276-284.
224. Redecker, D.; Raab, P. 2006. Phylogeny of the *Glomeromycota* (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. *Mycologia.* 98: 885-895.
225. Redecker, D.; Raab, P.; Oehl, F.; Camacho, F.J.; Courtecuisse, R. 2007. A novel clade of sporocarp-forming species of glomeromycotan fungi in the Diversisporales lineage. *Mycol Prog.* 6: 35-44.
226. Regvar, M.; Vogel-Mikus, K. 2008. Arbuscular mycorrhizal in metal hyperaccumulating plants. In: Varma, A. (Ed.) *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology Eco-Physiology, Structure and Systematic*. Berlin: Springer-Verlag. p. 261-280.
227. Rejón-Palomares, A.; García-Garrido, J.M.; Ocampo, J.A.; García-Romera, I. 1996. Presence of xyloglucan-hydrolyzing glucanases (xyloglucanases) in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Symbiosis* 21: 249-261.
228. Repetto, O.; Bestel-Corre, G.; Dumas-Gaudot, E.; Berta, G.; Gianinazzi-Pearson, V.; Gianinazzi, S. 2003. Targeted proteomics to identify cadmium-induced protein modifications in *Glomus mosseae*-inoculated pea roots. *New Phytol.* 157: 555-567.

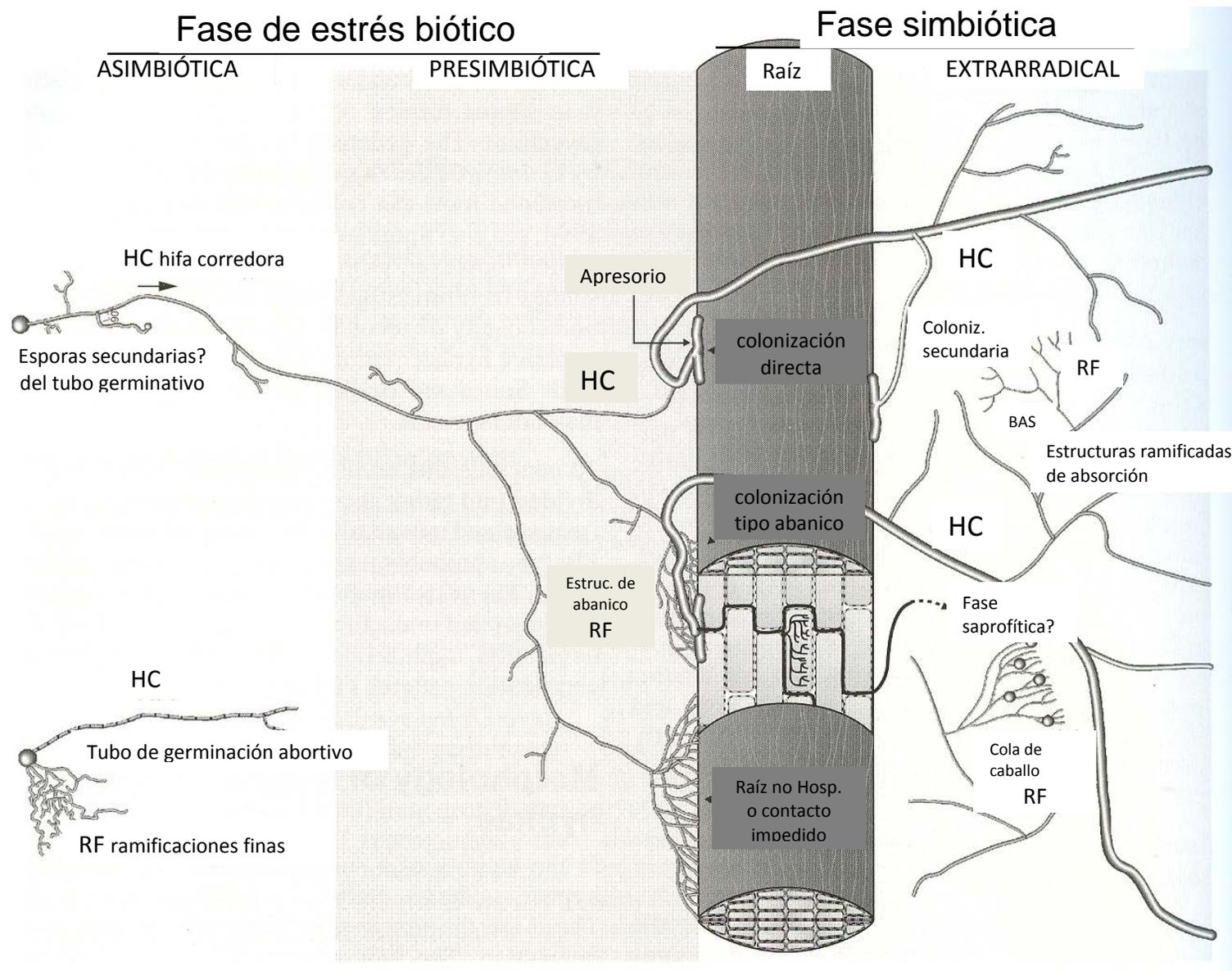
229. Requena, N.; Serrano, E.; Ocon, A.; Breuninger, M. 2007. Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry* 68: 33-40.
230. Rillig, M.C.; Mummey, D. L. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.* 171: 41-53.
231. Rivera, R.; Fernández, F.; Fernández, K.; Ruiz, L.; Sánchez, C.; Riera, M. 2007. Advances in the Management of Effective Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis in Tropical Ecosystems. In: Mycorrhizae in crop production. Hamel, Ch.; Plenchette, Ch. (Eds). Haworth Press, Binghamton, New York. p. 151-195.
232. Rivera-Espinosa, R.A.; Fernández-Suárez, K. 2003. El manejo eficiente de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible Estudio de caso: El Caribe. La Habana: Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). 171 p. ISBN: 959-7023-24-5
233. Rodríguez, Y.; Mena, A.; Marentes, F. L.; Fernández, K. 2008. Respuesta de enzimas antioxidantes y crecimiento de vitroplantas de papa micorrizadas *in vitro*. *Cultivos Tropicales* 29(1): 29-35.
234. Rodríguez, Y.; Pérez, E.; Solórzano, E.; Meneses, A.; Fernández, F. 2001. Peroxidase and polyphenoloxidase activities in tomato roots inoculated with *Glomus clarum* or *Glomus fasciculatum*. *Cultivos Tropicales* 22(1): 11-16.
235. Rodríguez-Echeverría, S.; de la Peña, E.; Moens, M.; Freitas, H.; van der Putten, W.H. 2009. Can root-feeders alter the composition of AMF communities? Experimental evidence from the dune grass *Ammophila arenaria*. *Basic Appl Ecol.* 10: 131-140.
236. Roldán, A.; Díaz-Vivancos, P.; Hernández, J.A.; Carrasco, L.; Caravaca, F. 2008. Superoxide dismutase and total peroxidase activities in relation to drought recovery performance of mycorrhizal shrub seedlings grown in an amended semiarid soil. *J Plant Physiol.* 165: 715-722.
237. Rosendahl, S. 2008. Communities, populations and individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *NewPhytol.* 178: 253-266.
238. Ruíz-Lozano, J.M. 2003. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza* 13: 309-317.
239. Ruíz-Lozano, J.M.; Porcel, R.; Aroca, R. 2008. Evaluation of the possible participation of drought-induced genes in the enhanced tolerance of arbuscular mycorrhizal plants to water deficit. In: Varma, A. (Ed.). Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology Eco-Physiology, Structure and Systematics. 3^{ed}. Berlin: Springer-Verlag. p. 185-205.
240. Salzer, P.; Bonanomi, A.; Beyer, K.; Vögeli-Lange, R.; Aeschbacher, R.; Lange, J.; Wiemken, A.; Kim, D.; Cook, D.; Boller, T. 2000. Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. *Mol Plant Microbe In.* 13: 763-777.
241. Salzer, P.; Corbire, H.; Boller, T. 1999. Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. *Planta* 208: 319-325
242. Sam, O.; Iglesias, L. 1993. La floración-fructificación de plantas de cinco variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sembradas en dos épocas. *Cultivos Tropicales* 14(2-3): 64-70.
243. Sanders, I. R.; Alt, M.; Groppe, K.; Boller, T.; 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 Phytol.* 130: 419-427.
244. Scandalios, J.G. 1994. Regulation and properties of plant catalases. In: Foyer, C.H.; Mullineaux, P.M. (Eds) Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in Plants. Boca Ratón: CRC Press. p. 275-315.
245. Scandalios, J.G.; Guan, L.M.; Polidoros, A. 1997. Catalase in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. In: Scandalios, J.G. (Eds) Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. NY: Harbor Press. p. 343-406.
246. Scervino, J.M.; Ponce, M.A.; Erra-Bassels, R.; Vierheilig, H.; Ocampo, J.A.; Godeas, A. 2005a. Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth of *Gigaspora* and *Glomus*. *Mycol Res.* 109: 789-794
247. Scervino, J.M.; Ponce, M.A.; Erra-Bassels, R.; Bompadre, J.; Vierheilig, H.; Ocampo, J.A.; Godeas, A. 2007. The effects of flavones and flavonols on colonization of tomato plants by arbuscular mycorrhizal fungi of the genera *Gigaspora* and *Glomus*. *Can J Microbiol.* 53: 702-700.

248. Scervino, J.M.; Ponce, M.A.; Erra-Bassels, R.; Vierheilig, H.; Ocampo, J.A.; Godeas, A. 2005b. Flavonoids exclusively present in mycorrhizal roots of white clover exhibit different effects on arbuscular mycorrhizal fungi than flavonoids exclusively present in non-mycorrhizal roots of white clover. *J Plant Interact.* 15: 22-30
249. Scervino, J.M.; Ponce, M.A.; Monica, I.D.; Vierheilig, H.; Ocampo, J.A.; Godeas, A. 2009. Development of arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of different patterns of *Trifolium repens* shoot flavonoids. *J Soil Sci Plant Nut.* 9(2): 102-115.
250. Scervino, J.M.; Ponce, M.A.; Erra-Bassels, R.; Vierheilig, H.; Ocampo, J.A.; Godeas, A. 2005c. Arbuscular mycorrhizal colonization of tomato by *Gigaspora* and *Glomus* species in presence of roots flavonoids. *J Plant Physiol.* 162: 625-633
251. Schreiner, R.P.; Koide, R.T. 1993. Mustards, mustard oils and mycorrhizas. *New phytol.* 123: 107-113.
252. Schüßler, A.; Schwarzott, D.; Christopher, W. 2001a. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycol Res.* 105(12): 1413-1421.
253. Schüßler, A.; Gehring, H.; Schwarzott, D.; Walker, Ch. 2001b. Analysis of partial *Glomales* SSU rRNA gene sequences: implications for primer design and phylogeny. *Mycol Res.* 105(1): 5-15.
254. Shüßler, A.; Walker, C. 2010. The *Glomeromycota*: a species list with new families and new genera. Gloucester: The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University. 58 p.
255. Simon, L.; Bousquet, J.; Levesque, R.C.; Lalonde, M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69.
256. Simoneau, P.; Louisy-Louis, N.; Plenchette, C.; Strullu, D.G. 1994. Accumulation of new polypeptides in Ri T-DNA-transformed roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*) during the development of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Appl Environ Microb.* 60: 1810-1813.
257. Smith, S.; Read, D. 2008. Mycorrhizal Symbiosis. 3^{ed}. London: Academic Press. 606 p. ISBN: 9780123705266
258. Sokolski, S.; Dalpé, Y.; Séguin, S.; Khasa, D.; Lévesque, C.A.; Piché, Y. 2010. Conspicuity of DAOM 197198, the model AM fungus, with *Glomus irregulare*: molecular evidence with three protein-encoding genes. *Botany* 88:829-838.
259. Solórzano, E. 2002. Proteínas de defensa y estudio enzimático en la interacción tomate-*Alternaria solani*. [Tesis de Doctorado]. Universidad Agraria de la Habana. 100 p.
260. Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determinations. *J. Biol. Chem.* 195: 19-23.
261. Spanu, P.; Boller, T.; Ludwing, A.; Wiemken, A.; Faccio, A.; Bonfante-Fasolo, P. 1989. Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization. *Planta* 177: 447-455.
262. Spanu, P.; Bonfante-Fasolo, P. 1988. Cell-wall-bound peroxidase activity in roots of mycorrhizal *Allium porrum*. *New Phytol.* 109: 119-124.
263. Standford, H.A.; Galston, A.W. 1970. Ontogeny and hormonal control of polyphenoloxidase isozymes in tobacco pith. *Plant Physiol.* 46: 1505-1512.
264. Steinkellner, S.; Lenzemo, V.; Langer, I.; Schweiger, P.; Khaosaad, T.; Toussaint, J.P.; Vierheilig, H. 2007. Flavonoids and Strigolactones in Root Exudates as Signals in Symbiotic and Pathogenic Plant-Fungus Interactions. *Molecules* 12: 1290-1306.
265. Stockinger, H.; Krüger, M.; Schüßler, A. 2010. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 187: 461-474.
266. Stockinger, H.; Walker, Ch.; Schüßler, A. 2009. 'Glomus intraradices DAOM197198', a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New Phytol.* 183: 1176-1187.
267. Stürmer, S.L.; Morton, J.B. 1997. Developmental patterns defining morphological characters in spores of four species in *Glomus*. *Mycologia* 89: 72-81.
268. Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*.
269. Tawarayama, K.; Hashimoto, K.; Wagatsuma, T. 1998. Effect of root exudate fractions from P-deficient and P-sufficient onion plants on root colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Mycorrhiza* 8: 67-70.

270. Tawarayama, K.; Watanabe, S.; Yoshida, E.; Wagatsuma, T. 1996. Effect of onion (*Allium cepa*) root exudates on the hyphal growth of *Gigaspora margarita*. *Mycorrhiza* 6: 57-59.
271. Terry, E.; Leyva, A.; Díaz, M.M. 2005. Uso combinado de microorganismos benéficos y productos bioactivos como alternativa para la producción de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Cultivos Tropicales* 26: 77-81.
272. Tindall, B.J.; Rosselló-Móra R.; Busse, H.J.; Ludwig, W.; Kampfer, P. 2010. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 249-266.
273. Tisserant, B.; Gianinazzi-Pearson, V.; Gianinazzi, S.; Gollotte, A. 1993. Plant histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycol Res.* 97: 245-250.
274. Triest, I. 1992. The role of isozymes in studies of plant populations: several considerations of data obtained in water plant. *Belg J Bot.* 125(2): 262-269.
275. Trouvelot, A.; Kough, J.; Gianinazzi-Pearson, V. 1986. Mesure du Taux de Mycorrhization VA d'un Systeme Radiculaire. Recherche de Methodes d'Estimation ayant une Signification Fonctionnelle. Proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae: Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae, Dijón, 1-5 July, 1985. (Gianinazzi-Pearson, V.; Gianinazzi, S. Eds.). INRA, Paris. p. 217-222.
276. van Aarle, I.M.; Olsson, P.A. 2008. Resource partitioning between extraradical and intraradical AM Fungal mycelium. In: Varma, A. (Ed.) *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology Eco-Physiology, Structure and Systematics*. 3^{ed}. Berlin: Springer-Verlag. p. 321-336.
277. van Rhijn, P.; Fang, Y.; Galili, S.; Shaul, O.; Atzmon, N.; Wininger, S.; Esheld, Y.; Lum, M.; Li, V.T.; Fujishige, N.; Kapulnik, Y.; Hirsch, A.M. 1997. Expression of early nodulin genes in alfalfa mycorrhizae indicates that signal transduction pathways used in forming arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium*-induced nodules may be conserved. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 5467-5472.
278. van Tuinen, D.; Jacquot, E.; Zhao, B.; Gallotte, A.; Gianinazzi-Pearson, V. 1998a. Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Mol Ecol.* 7: 879-887.
279. van Tuinen, D.; Zhao, B.; Gianinazzi-Pearson, V. 1998b. PCR in studies of AM fungi: from primers to application. In: Varma, A. (Ed.) *Mycorrhizal manual*. New York: Springer, Berlin. p. 387-399.
280. Vázquez, J.F.; Sánchez-Yélamo, M.D.; Carrillo J.M. 2000. 2 Marcadores morfológicos y bioquímicos. En: Nuez, F.; Carrillo J.M. (Eds.). *Los marcadores genéticos en la mejora vegetal*. España: Universidad Politécnica de Valencia. p. 23-89.
281. Vierheilig, H. 2004. Regulatory mechanisms during the plantarbuscular mycorrhizal fungus interaction. *Can J Bot.* 82: 1166-1176.
282. Vierheilig, H.; Alt, M.; Mohr, U.; Boller, T.; Wiemken, A. 1994. Ethylene biosynthesis and activities of chitinase and β -1,3-glucanase in the roots of host and non-host plants of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after inoculation with *Glomus mosseae*. *J Plant Physiol.* 143: 337-343.
283. Vierheilig, H.; Bago, B.; Albrecht, C.; Poulin, M.J.; Piché, Y. 1998. Flavonoids and arbuscular-mycorrhizal fungi. In: Manthey, J.A.; Buslig, B.S. (Eds.). *Flavonoids in the living system*. New York: Plenum Press. p. 9-33. ISBN 0306459051
284. Vierheilig, H.; Bennett, R.; Kiddle, G.; Kaldorf, M.; Ludwig-Müller, J. 2000a. Differences in glucosinolate patterns and arbuscular mycorrhizal status of glucosinolate-containing plant species. *New Phytol* 146: 343-352.
285. Vierheilig, H.; Maier, W.; Wyss, U.; Samson, J.; Strack, D.; Piché, Y. 2000b. Cyclohexenone derivative- and phosphate-levels in split-root systems and their role in the systemic suppression of mycorrhization in precolonized barley plants. *J Plant Physiol.* 157: 593-599.
286. Vierheilig, H.; Piché, Y. 2002. Signalling in arbuscular mycorrhiza: facts and hypotheses. In: Buslig, B.; Manthey, J. (Eds.) *Flavonoids in cell functions*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. p. 23-39. ISBN 0-306-47254-6

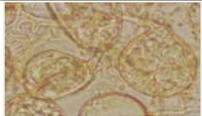
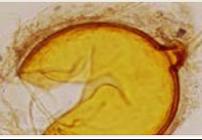
287. Vierheilig, H.; Steinkellner, S.; Khaosaad, T.; García Garrido, J.M. 2008. The biocontrol effect of micorrhization on soilborne fungal pathogens and the autoregulation of the AM symbiosis: One mechanism, two effects? *In: Varma, A. (Ed.) Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology Eco-Physiology, Structure and Systematic*. 3^{ed}. p 307-320.
288. Voets, L.; de la Providencia, I.; Fernández Kalyanne; Ijdo, M.; Cranebrouck, S.; Declerck, S. 2009. Extraradical mycelium network of arbuscular mycorrhizal fungi allows fast colonization of seedlings under *in vitro* conditions. *Mycorrhiza* 19: 347-356.
289. Volpin, H.; Elkind, Y.; Okon, Y.; Kapulnik, Y. 1994. A vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradix*) induces a defense response in alfalfa roots. *Plant Physiol.* 104: 683-689.
290. Walker, C. 1983. Taxonomic concepts in the *Endogonaceae*: Spore wall characteristics in species descriptions. *Mycotaxon* 18: 443-455.
291. Walker, C.; Giovannetti, M.; Avio, L.; Citernes, A.S.; Nicholson, T.H. 1995. A new fungal species forming arbuscular mycorrhizas: *Glomus viscosum*. *Mycol Res.* 99: 1500-1506.
292. Walker, C.; Vestberg, M.; Demircik, F.; Stockinger, H.; Saito, M.; Sawaki, H.; Nishimura, I.; Schüßler, A. 2007. Molecular phylogeny and new taxa in the *Archaeosporales* (*Glomeromycota*): *Ambispora fennica* gen. sp. nov., *Ambisporaceae* fam. nov., and emendation of *Archaeospora* and *Archaeosporaceae*. *Mycol Res.* 111: 137-153.
293. Wendel, J.F.; Weeden, N.F. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. *In: Soltis, E.; Soltis, P.M. (Eds.). Isozymes in Plant Biology*. Dioscorides Press. p. 5-34.
294. White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S. and Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. (Eds.). PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*. San Diego: Academic Press. p. 315-322. ISBN-10: 0123721806
295. Wu, Q.Sh.; Xia, R.X.; Zou, Y.N. 2008. Improved soil structure and citrus growth after inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi under drought stress. *Eur J Soil Biol.* 44: 122-128.
296. Yamamizo, C.; Kuchimura, K.; Kobayashi, A.; Katou, S.; Kawakita, K.; Jones, J.D.G.; Doke, N.; Yoshioka, H. 2006. Rewiring mitogen-activated protein kinase cascade by positive feedback confers potato blight resistance. *Plant Physiol.* 140: 681-692.
297. Yoneyama, K.; Xie, X.; Kusumoto, D.; Sekimoto, H.; Sugimoto, Y.; *et al.* 2007. Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystrigol, the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. *Planta* 227: 125-32.

Anexos



Esquema de las fases de la simbiosis micorrízica arbuscular. Tomado de Jude *et al.*, (2009)

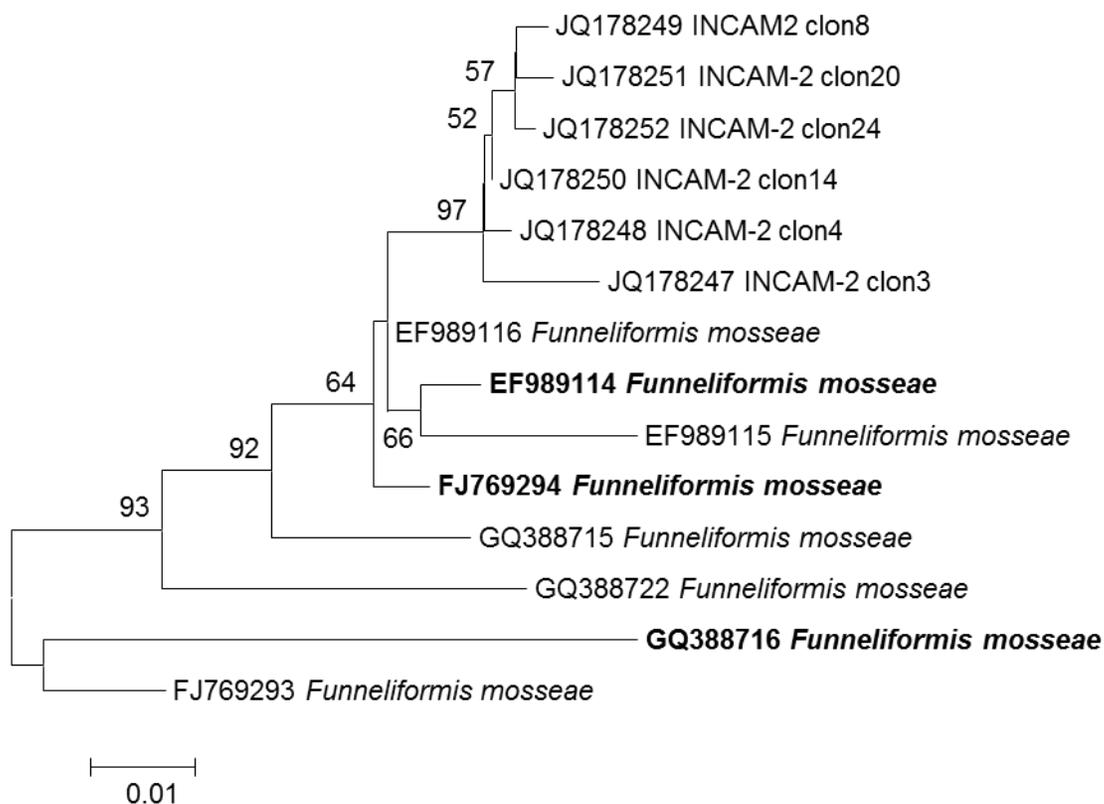
Principales características morfológicas y procedencia de las cepas de HMA estudiadas

Especie (clave)	Abrev.	Procedencia	Color de la espora	Forma de la espora	Tamaño de las esporas (µm)	No. capas de la Pared de la espora	Imagen
<i>Glomus hoi-like</i> (INCAM-4)	Gh-1	San José de las Lajas	Hialino a amarillo pálido	ovoide, elipsoide, piriforme to irregular	20-80	2	
<i>Glomus mosseae</i> 1 (INCAM-2)	Gm1	Güira	amarillo-ámbar	globosa, subglobosa	100-260	3	
<i>Glomus mosseae</i> 2 (INCAM-5)	Gm2	Rizosfera de Palma, Mayabeque	naranja pálido	globosa, subglobosa	100-260	3	
<i>Glomus</i> sp1 (INCAM-1)	Gsp1	Güira	amarillo	globosa	60-110	3	
<i>Glomus intraradices</i> (INCAM-9)	Gi	Tope de Collantes	pardo rojizo	globosa, subglobosa, irregular	70-130	3	
<i>Acaulospora scrobiculata</i> (INCAM-10)	Asc	Tope de Collantes	hialino	globosa, subglobosa	100-160	3	

Cebadores utilizados en la caracterización molecular de las dos cepas de HMA seleccionadas y sus referencias.

Cebador	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Referencia
GcoroATPlo2663	TGA CAA CTT TGC GAA CTT TTG	Corradi <i>et al.</i> , 2004
GmossATPlo2663	GGA CGA CTT TAC GAA CTT TTG	Sokolski <i>et al.</i> , 2010
GintraATPlo2663	TCA CAA CTT TAC GAA CTT TTG	Sokolski <i>et al.</i> , 2010
GmossATPup1104	AAC CTT CGA TGA ACC TTA CCT	Sokolski <i>et al.</i> , 2010
GintraATPup1104	GAC TTT TGA TGA ACC TTA CCT	Sokolski <i>et al.</i> , 2010
GlomusATPup1912	GCY GAT ATC GTT TTA TTA GC	Sokolski <i>et al.</i> , 2010
GlomusATPlo1915	CWG GWG CTA ATA AAA CGA TAT C	Sokolski <i>et al.</i> , 2010
GlomusATPup1996	TCT TAT GCW YTB TAY CGT ATC	Sokolski <i>et al.</i> , 2010
GlomusATPlo1996	TGA TAC GRT AVA RWG CAT AAG A	Sokolski <i>et al.</i> , 2010
GmossATPup1058	CGG TAC TTT GTT CTG ATA AGA C	Este trabajo*
GlomusATPup1150	WTC HGC YGA ACC TGG TGC	Este trabajo *
GlomusATPlo2557	CTK GHT TTW GAW GGC CAK AAT	Este trabajo *
GmossATPlo2722	CAA TCG CTC TTA TCG TAG GCT GT	Este trabajo *
Gi_HA_F_v2	YAR AGT WGC RAA RGG WGC WCC W	Este trabajo *
GLO2A-forward	CGT AAC AAG GTT TCC GTA GG	Sokolski <i>et al.</i> , 2010
GLO2R-reverse	GCG GGT ACT CCT ACC TGA TT	Sokolski <i>et al.</i> , 2010
M13-forward	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	Invitrogen
M13-reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Invitrogen

*Cebadores nuevos diseñados con el programa Oligo6 (Molecular Biology Insights 2010) y suministrados por el laboratorio de Micorrizas del Institute Agriculture & Agri-Food Canada, Ottawa, Canadá.



Árbol filogenético construido a partir de las secuencias de *ITS* del ADN ribosomal de *Funnelformis mosseae*, syn. *Glomus mosseae*, provenientes del NCBI/BLAST, que mostraron un 98% de homología con las secuencias de la cepa INCAM-2. Aparecen en negrita las seleccionadas.

Comparación entre *Glomus hoi*-like (INCAM-4) y las especies similares de HMA descritas en base al número de capas de la pared de la espora y sus principales características

Especies	C 1	C 2	C 3
<i>Glomus hoi</i> -like (INCAM-4)	P, F, SF	R	
Esporas hialinas de 3 capas			
<i>Glomus achrum</i> Błaszk., Redecker, Koegel, Schützek, Oehl & Kovacs	Mu	L	SF
<i>Rhizophagus diaphanus</i> Morton & Walker	Mu	L	SF
<i>Rhizophagus proliferus</i> Dalpé & Declerck	Mu	SF	L
<i>Paraglomus brasilianum</i> (Spain & Miranda) Morton & Redecker	E	SF	L
Esporas pigmentadas de 3 capas			
<i>Glomus pubescens</i> (Sacc. & Ellis) Trappe & Gerd	R	L	F
<i>Paraglomus occultum</i> (Walker) Morton & Redecker	R	L	F
Esporas hialinas de 2 capas			
<i>Glomus bistratum</i> Błaszk., Redecker, Koegel, Symanczik, Oehl & Kovacs	R	L	
<i>Glomus cerebriforme</i> McGee	L	F	
<i>Glomus indicum</i> Błaszk., Wubet & Harikumar	E	L	
<i>Glomus minutum</i> Błaszk., Tadych & Madej	R	L	
<i>Glomus perpusillum</i> Błaszk. & Kovacs	L	F	
<i>Paraglomus laccatum</i> (Błaszk.) Renker, Błaszk. & Buscot	E	L	
Esporas pigmentadas de 2 capas			
<i>Glomus canadense</i> (Thaxter) Trappe & Gerdemann	??	L	
<i>Glomus fragile</i> Berk. & Broome	??	L	
<i>Glomus microaggregatum</i> Koske, Gemma & Olexia	F, R	F, R	
<i>Glomus microcarpum</i> Tul. & Tul.	E	L	
<i>Glomus pallidum</i> Hall	E	L	
Esporas pigmentadas de 1 capa			
<i>Glomus arboreense</i> McGee	L		
<i>Glomus megalocarpum</i> Redecker	L		

Leyenda : C- capa de la pared de la espora, F- flexible, SF- semi-flexible, L- laminada, E- evanescente, R: rígida, Mu- mucilaginosa, P- permanente

Comparación y similitud de las secuencias de bases de *ITS* del ADN ribosomal de las cepas de HMA INCAM-2 e INCAM-4 con la información encontrada en la base de datos NCBI/Blast.

INCAM-4 JF692724	Score	Query coverage	% de Identidad	valor E
INCAM-4 JF692725	900	98%	98%	0.0
INCAM-4 JF692726	933	98%	98%	0.0
<i>Glomus</i> sp. EF393611	786	98%	85%	0.0
<i>Glomus</i> sp. AM992829	786	98%	83%	0.0
INCAM-2 clon 3 JQ178247				
INCAM-2 clon 4 JQ178248	918	100%	98%	0.0
INCAM-2 clon 14 JQ178250	915	100%	98%	0.0
INCAM-2 clon 20 JQ178251	913	100%	98%	0.0
INCAM-2 clon 8 JQ178249	909	100%	97%	0.0
<i>Funneliformis mosseae</i> FJ769294	907	100%	98%	0.0
<i>Funneliformis mosseae</i> EF989114	907	100%	98%	0.0
<i>Funneliformis mosseae</i> GQ388715	907	100%	98%	0.0
<i>Funneliformis caledonium</i>	894	100%	90%	0.0
<i>Funneliformis coronatum</i>	894	100%	88%	0.0

Comparación y similitud de las secuencias de bases de *V-H⁺-ATPasa* de las cepas de HMA INCAM-2 e INCAM-4 con la información encontrada en la base de datos NCBI/Blast.

INCAM-4 JF510464	Score	Query coverage	% de Identidad	valor E
<i>Glomus multiforum</i>	950	98%	80%	0.0
<i>Funneliformis caledonium</i>	944	98%	80%	0.0
INCAM-2 JQ178252				
<i>Funneliformis mosseae</i> GQ205035	2577	89%	98%	0.0
<i>Funneliformis mosseae</i> GQ205034	2577	89%	98%	0.0
<i>Funneliformis mosseae</i> GQ205033	2577	89%	98%	0.0
<i>Funneliformis caledonium</i>	2577	89%	93%	0.0
<i>Glomus multiforum</i>	2577	89%	93%	0.0

Tabla I. Correlación de Pearson entre las variables del hongo estudiadas por los dos métodos de tinción, azul de tripan (AT) y succinato deshidrogenasa (SDH) ($p \leq 0,01$ bilateral).

	Colonización (AT) 32d	Intensidad (AT) 18d	Intensidad (AT) 32d	Colonización (SDH) 32d	Intensidad (SDH) 32d	Ab. arbuscular (SDH) 32d
Colonización (AT) 18d	,978**	,976**	,964**	,985**	,980**	,955**
Colonización (AT) 32d		,930**	,957**	,988**	,962**	,990**
Intensidad (AT) 18d			,930**	,958**	,984**	,882**
Intensidad (AT) 32d				,963**	,952**	,929**
Colonización (SDH) 32d					,972**	,955**
Intensidad (SDH) 32d						,925**

Tabla II. Relación entre las variables de crecimiento de las plantas y selección de acuerdo a su contribución a la componente 1

	Componente 1
MS hoja 32d	,980
MS tallo 32d	,982
MS raíz 32d	,997
MS total 32d	1,000
Altura 32d	1,000
A foliar 32d	,998
% varianza explicada	99,21

Tabla III. Relación entre las variables de nutrición de las plantas (N, P y K) y selección de acuerdo a su contribución a la componente 1

	Componente 1	Componente 1	Componente 1
N hoja 18d	0.948	P hoja 18d	0.820
N tallo 18d	0.953	P tallo 18d	0.965
N raíz 18d	0.748	P raíz 18d	0.935
N total 18d	0.983	P total 18d	0.950
N hoja 32d	0.989	P hoja 32d	0.910
N tallo 32d	0.958	P tallo 32d	0.975
N raíz 32d	0.978	P raíz 32d	0.876
N total 32d	0.990	P total 32d	0.984
K hoja 18d	0.965	K hoja 18d	0.965
K tallo 18d	0.901	K tallo 18d	0.901
K raíz 18d	0.923	K raíz 18d	0.923
K total 18d	0.986	K total 18d	0.986
K hoja 32d	0.985	K hoja 32d	0.985
K tallo 32d	0.843	K tallo 32d	0.843
K raíz 32d	0.949	K raíz 32d	0.949
K total 32d	0.989	K total 32d	0.989
% varianza explicada	89.54	86.18	89.1

Tabla IV. Relación entre las actividades enzimáticas y el daño oxidativo a los lípidos y selección de acuerdo a su contribución a la(s) componente(s)

	Componente 1		Comp. 1		Componente 1	Componente 2
Endo-PMG 18d	,999	APX hoja 32d	,896	APX raíz 32d	-,107	,994
EG 18d	,981	GR hoja 32d	,995	GR raíz 32d	,983	,186
Endo-PMG 32d	,991	SOD hoja 32d	1,000	SOD raíz 32d	-,835	,550
EG 32d	,995	CAT hoja 32d	,992	CAT raíz 32d	-,984	-,213
% varianza explicada	98,28	DOL hoja 32d	,898	DOL raíz 32d	,977	,178
			91,39		71,96	28,04

Tabla V. Relación entre las isoenzimas de POX, en hoja y raíz, y selección de acuerdo a su contribución a la(s) componente(s)

	Dimensión			Dimensión	
	1	2		1	2
POX hoja 18d-2	,259	-,966	POX raíz 18d-3	-,993	-,121
POX hoja 18d-4	,259	-,966	POX raíz 18d-7	-,993	-,121
POX hoja 18d-8	,707	,707	POX raíz 32d-1	-,993	-,121
POX hoja 18d-9	,966	-,259	POX raíz 32d-5	-,601	,799
POX hoja 18d-10	-,707	-,707	POX raíz 32d-10	,993	,121
POX hoja 32d-1	,966	-,259	% varianza explicada	86,06	13,94
POX hoja 32d-4	,966	-,259			
POX hoja 32d-5	,966	-,259			
POX hoja 32d-8	-,707	-,707			
% varianza explicada	59,62	40,38			

Tabla VI. Relación entre las isoenzimas de PPO y APS, en raíz, y selección de acuerdo a su contribución a la(s) componente(s)

	Dimensión			Dimensión	
	1	2		1	2
PPO raíz 32d-4	,707	,707	APS raíz 18d-6	,966	,259
PPO raíz 32d-6	,966	-,259	APS raíz 32d-5	-,707	,707
PPO raíz 32d-7	,966	-,259	APS raíz 32d-8	-,966	-,259
% varianza explicada	78,87	21,13	% varianza explicada	78,89	21,13

Tabla VII. Relación entre las isoenzimas de SOD y EST, en hoja y en raíz, y selección de acuerdo a su contribución a la(s) componente(s)

	Dimensión			Dimensión	
	1	2		1	2
SOD hoja 18d-1	-1,000	,000	EST hoja 18d-1	1,000	,000
SOD hoja 18d-5	-,500	,866	EST hoja 32d-5	1,000	,000
SOD raíz 32d-3	,500	,866	EST hoja 32d-6	1,000	,000
SOD raíz 32d-4	1,000	,000	EST raíz 18d-1	-,500	,866
SOD raíz 32d-5	1,000	,000	EST raíz 32d-5	,500	,866
% varianza explicada	70	30	EST raíz 32d-7	1,000	,000
			% varianza explicada	75	25

Tabla A. Relación entre las variables del hongo y las isoenzimas seleccionadas mediante el análisis de los intervalos de confianza

	POX hoja 18d-2	POX hoja 32d-5	POX raíz 18d-3	POX raíz 32d-5	PPO hoja 32d-1	PPO raíz 32d-6	SOD raíz 32d-3	SOD raíz 32d-5	EST raíz 18d-1	EST raíz 32d-7	APS raíz 18d-6
Colonización (AT) 32d	2,05-36,95 26,7-29,3	0-0 28,48- 38,52	0-0 28,48- 38,52	1,48-26,52 36,4-41,6	0-0 28,48- 38,52	36,4-41,6 1,48-26,52	1,48-26,52 36,4-41,6	0-0 28,48- 38,52	26,7-29,3 2,05-36,95	0-0 28,48- 38,52	28,48- 38,52 0-0
Intensidad (AT) 32d	0,23-4,07 1,08-3,73	0-0 2,39-4,31	0-0 2,39-4,31	0,04-2,37 4,13-4,46	0-0 2,39-4,31	4,13-4,46 0,04-2,37	0,04-2,37 4,13-4,46	0-0 2,39-4,31	1,08-3,73 0,23-4,07	0-0 2,39-4,31	2,39-4,31 0-0
Ab. arbuscular 32d	0,32-5,81 4,69-5,44	0-0 5,06-6,13	0-0 5,06-6,13	0,27-4,8 5,5-6,75	0-0 5,06-6,13	5,5-6,75 0,27-4,8	0,27-4,8 5,5-6,75	0-0 5,06-6,13	4,69-5,44 0,32-5,81	0-0 5,06-6,13	5,06-6,13 0-0

Tabla B. Relación entre las variables de crecimiento de las plantas y las isoenzimas seleccionadas mediante el análisis de los intervalos de confianza

	POX hoja 18d-2	POX hoja 32d-5	POX raíz 18d-3	POX raíz 32d-5	PPO hoja 32d-1	PPO raíz 32d-6	SOD raíz 32d-3	SOD raíz 32d-5	EST raíz 18d-1	EST raíz 32d-7	APS raíz 18d-6
MS total 32d	0,99-1,7 1,37-1,47	0,89-1,02 1,43-1,73	0,89-1,02 1,43-1,73	0,97-1,4 1,58-1,9	0,89-1,02 1,43-1,73	1,58-1,90 0,97-1,40	0,97-1,4 1,58-1,9	0,89-1,02 1,43-1,73	1,37-1,47 0,99-1,7	0,89-1,02 1,43-1,73	1,43-1,73 0,89-1,02
Altura 32d	14,27-17,65 15,96-16,5	12,72-15,62 16,29-17,71	12,72-15,62 16,29-17,71	14,15-16,25 17,27-18,26	12,72-15,62 16,29-17,71	17,28-18,26 14,15-16,25	14,15-16,25 17,27-18,26	12,72-15,62 16,29-17,71	15,96-16,5 14,27-17,65	12,72-15,62 16,29-17,71	16,29-17,71 12,72-15,62
A foliar 32d	42,41-63,56 51,86-56,0	35,80-47,23 54,15-64,24	35,80-47,23 54,15-64,24	41,8-53,65 59,55-69,36	35,80-47,23 54,15-64,24	54,59-69,36 41,8-53,65	41,8-53,65 59,55-69,36	35,80-47,23 54,15-64,24	51,86-56,0 42,41-63,56	35,80-47,23 54,15-64,24	54,15-64,24 35,80-47,23

Tabla C. Relación entre las variables de nutrición de las plantas y las isoenzimas seleccionadas mediante el análisis de los intervalos de confianza

	POX hoja 18d-2	POX hoja 32d-5	POX raíz 18d-3	POX raíz 32d-5	PPO hoja 32d-1	PPO raíz 32d-6	SOD raíz 32d-3	SOD raíz 32d-5	EST raíz 18d-1	EST raíz 32d-7	APS raíz 18d-6
N total 32d	20,98-50,45 33,06-36,59	17,79-20,58 35,69-51,31	17,92-20,58 35,69-51,31	17,92-20,58 35,69-51,31	17,92-20,58 35,69-51,31	50,10-54,24 20,04-34,04	20,04-34,04 50,10-54,24	17,92-20,58 35,69-51,31	33,06-36,59 20,98-50,45	17,92-20,58 35,69-51,31	35,69-51,31 17,92-20,58
P total 32d	2,57-5,59 3,45-3,59	2,23-2,58 3,63-5,65	2,23-2,58 3,63-5,65	2,23-2,58 3,63-5,65	2,23-2,58 3,63-5,65	5,31-6,20 2,46-3,46	2,46-3,46 5,31-6,20	2,23-2,58 3,63-5,65	3,45-3,59 2,57-5,59	2,23-2,58 3,63-5,65	3,63-5,65 2,23-2,58
K total 32d	52,04-109,7 74,67-79,65	45,63-51,91 78,83-111,3	45,63-51,91 78,83-111,3	45,63-51,91 78,83-111,3	45,63-51,91 78,83-111,3	105,3-120,6 50,21-75,73	50,21-75,73 105,3-120,6	45,63-51,91 78,83-111,3	74,67-79,65 52,04-109,7	45,63-51,91 78,83-111,3	78,83-111,3 45,63-51,91

Tabla D. Valores de Rf de las isoenzimas relacionadas

	POX hoja 18d-2	POX hoja 32d-5	POX raíz 18d-3	POX raíz 32d-5	PPO hoja 32d-1	PPO raíz 32d-6	SOD raíz 32d-3	SOD raíz 32d-5	EST raíz 18d-1	EST raíz 32d-7	APS raíz 18d-6
Rf	0,51	0,43	0,38	0,32	0,50	0,04	0,53	0,03	0,54	0,08	0,11