

**DIVERSIDAD Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS  
MICORRÍICOS NATIVOS ASOCIADOS CON TOMATE DE CASCARA  
(*Physalis ixocarpa* Brot) EN ARTEAGA, COAHUILA, MÉXICO.**

**FLOR SILVESTRE HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**

**TESIS**

**Presentada como Requisito Parcial para**

**Obtener el Grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN HORTICULTURA**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

**Saltillo, Coahuila, México. Diciembre del 2014**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

DIVERSIDAD Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS  
MICORRÍZICOS NATIVOS ASOCIADOS CON TOMATE DE CASCARA  
(*Physalis ixocarpa* Brot) EN ARTEAGA, COAHUILA, MEXICO.

POR

FLOR SILVESTRE HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

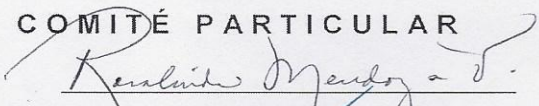
Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y aprobada  
como requisito parcial, para optar al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

EN HORTICULTURA

COMITÉ PARTICULAR

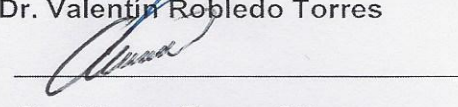
Asesor principal:

  
Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal

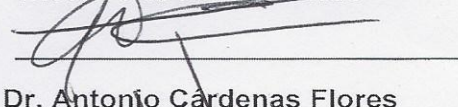
Asesor:

  
Dr. Valentín Robledo Torres


Asesor:

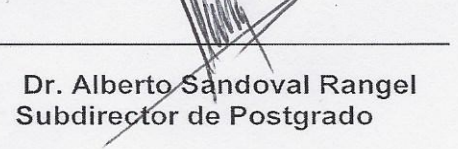
  
Dr. Alberto Flores Olivas

Asesor:

  
Dr. Antonio Cárdenas Flores

Asesor:

  
Dr. Adrien Gallou

  
Dr. Alberto Sandoval Rangel  
Subdirector de Postgrado

Saltillo, Coahuila, México. Diciembre del 2014

## AGRADECIMIENTOS

A mi **ALMA TERRA MATER** que me abrió las puertas para emprender una trayectoria de conocimientos para superarme en aspectos profesionales y personales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**).

A la Dra. **Rosalinda Mendoza Villarreal** por su tiempo, asesoría y amistad durante la realización de este Proyecto.

Al Dr. **Valentín Robledo Torres** por su asesoría y amistad durante la realización del Proyecto.

Al Dr. **Alberto Flores Olivas** por sus consejos y asesoría durante la realización del proyecto.

Al Dr. **Antonio Cárdenas Flores** por su apoyo en la realización de este proyecto.

Al Dr. **Adrien Gallou** por sus consejos y asesoría durante la realización de este proyecto.

Al Dr. **Luis Alonso Valdez Aguilar** por sus consejos y apoyo durante la realización de este proyecto.

A la T.A. **Martina De la Cruz Casillas** por su amistad y apoyo en la realización de este trabajo.

A la T.A. **Laura María Duron Ochoa** por su amistad y apoyo en la realización de este trabajo.

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo con profundo amor y respeto a mis padres **Alvaro Hernández del Angel** y **Alberta Hernández Cruz** quienes me han enseñado a nunca rendirme ante los problemas, por ayudarme cada día a cruzar con firmeza el camino de la superación, porque con su apoyo y aliento hoy he logrado uno de mis más grandes anhelos.

A mis hermanos **Pericles, Iracema, Alvaro, Ale y Fabiola** porque gracias a su cariño y apoyo he llegado a realizar uno de los anhelos más grandes de mi vida, fruto del inmenso apoyo, amor y confianza que en mí depositaron.

Al **Ing. Víctor Manuel** por su apoyo y comprensión que me brindo en todo momento, estimulando esta fase de mi vida de estudiante y alentando con su conducta y conocimientos el logro de mis aspiraciones.

Sabiendo que no existirá forma alguna de agradecer una vida de sacrificios, esfuerzos y amor, quiero que sientan que el objetivo alcanzado también es de ustedes y que la fuerza que me ayudo a conseguirlos fue su gran apoyo.

**COMPENDIO**

**DIVERSIDAD Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS  
MICORRÍICOS NATIVOS ASOCIADOS CON TOMATE DE CASCARA  
(*Physalis ixocarpa* Brot) EN ARTEAGA, COAHUILA, MÉXICO.**

**POR**

**FLOR SILVESTRE HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

**EN HORTICULTURA**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA**

**ANTONIO NARRO**

**Saltillo, Coahuila, México. Noviembre de 2014**

**Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal – Asesora-**

**Palabras clave:** color, diámetro, esporas, morfotipos, simbiosis, trigo.

Para evaluar diversidad y caracterizar a nivel morfológico hongos micorrícicos asociados a tomatillo silvestre y tomatillo domesticado, se realizó un muestreo de suelo por el método de zig- zag a una profundidad de 30 cm procediendo a la extracción y agrupación de esporas considerando forma, color y tamaño para establecer un cultivo monospórico (trigo) y asegurar la caracterización precisa; para ello se evaluaron parámetros como: diámetro, forma, número de capas, color, espesor, porcentaje de colonización, presencia y /o ausencia de vesícula y arbusculo. De acuerdo a la agrupación de esporas se inocularon 12 morfotipos de tomatillo silvestre y 9 de cultivado; de los cuales 10 morfotipos de silvestre (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S9, S10 y S11) y 2 de domesticado (C2 y C5) establecieron simbiosis. En referencia al porcentaje de colonización el morfotipo S1 presenta mayor porcentaje con un 57.81 % seguido de C2 con un 47.2 % y S9 con 43.08% siendo S11 el de menor porcentaje con un 27.16%. En lo que respecta a forma, presencia y /o ausencia de vesícula y arbusculo los morfotipos Silvestre y domesticado son iguales, mientras que en número de capas todos los morfotipos presentan una capa a excepción de S1 que presenta dos, los diámetros oscilan de 107-196  $\mu\text{m}$  y el espesor de 7- 12.8  $\mu\text{m}$ , el color más abundante es orange brown (0-60-100-10). El suelo de tomatillo silvestre alberga más morfotipos y presenta mayor potencial de inoculo que tomatillo cultivado.

**ABSTRACT**

**DIVERSITY AND MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF NATIVE MYCORRHIZAL FUNGI ASSOCIATED WITH HUSK TOMATO (*Physalis ixocarpa* Brot) IN ARTEAGA, COAHUILA, MÉXICO.**

**BY**

**FLOR SILVESTRE HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**

**MASTER IN SCIENCE**

**IN HORTICULTURE**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA**

**ANTONIO NARRO**

**Saltillo, Coahuila, México. Diciembre 2014**

**Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal – Adviser-**

**Key words:** color; diameter; morphotypes; spore; symbiosis; wheat.

To assess the diversity and to characterize morphologically the mycorrhizal fungi associated with wild and domesticated husk tomato plants cultivated in Arteaga, Coahuila, soil sampling was performed by the zigzag method at a depth of 30 cm; Spores were extracted and characterized considering their shape, color and size to establish a monosporic culture in wheat plants to ensure an accurate characterization; for this, diameter, shape, number of layers, color, thickness, percentage of colonization, presence and / or absence of vesicles and arbuscules were evaluated. According to the classification of spores, 12 morphotypes from wild husk tomato and nine from the domesticated husk tomato were inoculated. Ten out of the 12 wild husk tomato morphotypes (W1, W2, W3, W4, W5, W6, W7, W9, W10 and W11) and two out of the nine domesticated husk tomato morphotypes (D2 and D5) established symbiosis in wheat plants. Morphotype W1 had the highest colonization (57.81%) followed by D2 (47.2%) and W9 (43.08%); the lowest colonization was observed in morphotype W11 (27.16%). The wild and domesticated morphotypes were similar in shape, presence and / or absence of vesicle and arbuscle, whereas in all the morphotypes there was one spore layer, except for W1 that had two. Spore diameters ranged from 107 to 196  $\mu\text{m}$  and thickness from 7 to 12.8  $\mu\text{m}$ . Most frequent spore color was the orange brown (0-60-100-10). The soil in wild husk tomato contained more morphotypes and had a greater potential inoculum than the ones from the domesticated husk tomato.



# ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
Ojetivo General: .....	1
Objetivos específicos: .....	3
Hipótesis: .....	3
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
2.1 Micorrizas.....	4
2.2 Estructuras de las micorrizas arbusculares.....	5
2.3 Etapas en el establecimiento de las micorrizas .....	7
2.4 Taxonomía HMA .....	8
2.5 Clasificación taxonómica de los HMA (Morton & Redecker, 2001) .....	10
2.6 Clasificación de los hongos formadores de micorriza arbuscular (Schüßler and Walker ,2010).....	11
2.7 Fisiología de la simbiosis .....	12
2.8 Ecofisiología de los hongos MA. ....	15
2.9 Distribución espacial de los hongos formadores de micorrizas arbusculares .....	16
2.10 Relación HFMA – hospedero .....	18
2.11 Señales de reconocimiento en la fase asimbiótica .....	19
2.12 Señales de reconocimiento en la Fase Simbiótica.....	22
2.13 Respuestas de la planta (Respuestas de defensa).....	25
2.14 Atenuación de los mecanismos de defensa.....	27
2.15 Ventajas de las micorrizas en los agroecosistemas.....	30
2.16 Factores que afectan la colonización de micorrizas en campo .....	31
2.17 Poblaciones de HMA en ecosistemas naturales .....	35
2.18 Métodos de estudio de diversidad de HMA.....	37

<b>III. MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>39</b>
3.1 Muestreo de suelos y análisis fisicoquímico .....	39
3.2 Extracción, conteo y morfología de las esporas de hongos micorrícicos arbusculares .....	40
3.3 Establecimiento del cultivo monosporico .....	40
3.4 Caracterización morfológica de HMA que establecieron colonización con plantas de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L.) .....	41
3.5 El análisis estadístico.....	41
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>51</b>
<b>VII. ARTICULO.....</b>	<b>51</b>
<b>VIII. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>72</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Análisis físico-químico del suelo de los sitios experimentales en las que se desarrollaron (TS) y (TC). .....	43
<b>Cuadro 2.</b> La diversidad morfológica de los hongos micorrícicos asociadas al tomate de cáscara casero ( <i>Physalis ixocarpa</i> cv. Rendidora). .....	43
<b>Cuadro 3.</b> Diversidad morfológica de hongos micorrícicos arbusculares asociados a tomatillo silvestre (TS). .....	45
<b>Cuadro 4.</b> Caracterización morfológica de aislados de HMA. ....	46

## I. INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA); *Glomeromycota*; (Schüßler et al., 2001) forman simbiosis con la mayoría de las plantas terrestres, en casi cualquier ecosistema ( Smith y Read, 2008 ); y son de gran importancia debido a que mediante la simbiosis las plantas pueden obtener nutrientes minerales del suelo, mejoran la tolerancia a estreses bióticos y abióticos, y hay casos reportados de que reducen competencia entre plantas mediante la transferencia de carbono a través de la red extrarradical de hifas (Simard y Durall, 2004). Dado que la simbiosis es un proceso recíproco planta-hongo, es importante conocer también el papel de la comunidad de plantas en la estructura y diversidad de la comunidad de HMA (Burrows y Pfleyer, 2002). La compatibilidad de las plantas con HMA depende de mecanismos genéticos y señales bioquímicas específicas en todas las etapas del desarrollo simbiosis las cuales permiten el reconocimiento, la colonización y el intercambio de nutrientes (Kogel, 2008). La simbiosis HMA-planta requiere de procesos de reconocimiento y armonización en el espacio y el tiempo bastante complejo, lo que lleva al establecimiento de la simbiosis (Requena et al., 2007).

En México, la mayor parte de la investigación acerca de las asociaciones de HMA se ha realizado en el campo agrícola y están enfocados a la respuesta

de las plantas a la asociación simbiótica, dejando de lado el origen y la identidad de los HMA como parte del estudio (Varela y Trejo, 2001). La relación real, ya sea fuerte (Hijri et al., 2006) o débil, entre las propiedades del suelo y la distribución de especies de HMA en condiciones de campo (Carvalho et al., 2003) es poco conocida. Al comparar la diversidad HMA entre sitios perturbados y no perturbados atropogénicamente parece indicar que la diversidad de HMA y el número de propágulos micorrícicos disminuye con el aumento de la perturbación (Stahl et al., 1988), por lo tanto, algunas especies de HMA pueden ser más susceptibles a la alteración del suelo que otras (Kurle y Pflieger, 1996). El uso de herramientas moleculares revela la alta diversidad de hongos que forman micorrizas arbusculares lo que ha permitido una clasificación de estas asociaciones, sin embargo, algunos datos moleculares no revelan toda la información por lo que es necesario utilizar estudios integrales que involucren genética, anatomía , morfología y caracterización de simbiosis (Beck et al., 2007).

**Ojetivo General:**

Evaluar diversidad, caracterizar a nivel morfológico y determinar colonización de hongos formadores de micorrizas arbusculares (nativas) que esten asociados a poblaciones de tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot) de Arteaga, Coahuila, México.

**Objetivos específicos:**

1. Determinar características fisicoquímicas de suelo en donde se desarrolló tomatillo cultivado (variedad rendidora) y tomatillo silvestre de Arteaga, Coahuila.
2. Evaluar diversidad de morfotipos de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) asociados a tomatillo silvestre y tomatillo cultivado (variedad rendidora) a partir de esporas aisladas por tamizado húmedo.
3. Establecer cultivo monospórico y caracterizar a nivel morfológico los aislados de HMA que establezcan simbiosis exitosas en plantas de *Triticum aestivum L.*

**Hipótesis:**

1. Los suelos de crecimiento de plantas de tomate tienen diferencias físicas y químicas entre sí.
2. La cantidad de morfotipos de micorrizas aisladas y cultivadas en condiciones controladas (macetas en invernadero) de muestras de suelos donde predomina tomatillo silvestre y cultivado son diferentes.
3. Los morfotipos de micorrizas aislados y cultivados en condiciones controladas (macetas en invernadero) de muestras de tomatillo silvestre tendrán mayor capacidad de formar simbiosis exitosas.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Micorrizas

La palabra Micorriza es un término proveniente del griego mykos, hongo y rhizos, raíz, fue utilizado por primera vez en el año de 1885 por el botánico alemán Albert Berhhard Frank para hacer referencia a determinada asociación existente entre algunos hongos del suelo y las raíces de las plantas. En la actualidad se estima que el 90% de las plantas que crecen sobre la tierra están micorrizadas (Smith & Read, 2008).

La relación entre hongos formadores de micorrizas vesículo arbusculares (MVA) tiene un registro fósil de alrededor de 460 millones de años, similar al campo cuando las plantas colonizaron la tierra (Wang y Qiu, 2006). La coevolución entre ambos grupos pudo haber sido determinante en la evolución de rizomas a raíces y en la posterior diversificación de formas de éstas (Brundrett, 2002).

Existe una gran cantidad de estudios acerca de la relación entre HMA y las raíces de las plantas (Boomsma y Vyn, 2008). Aun así, es difícil encontrar estudios que se enfoquen a especies arbóreas de afinidad tropical y específicamente en ecosistemas semiáridos.

Las solanáceas tienen una gran diversidad de hábito, morfología y ecología, se

distribuyen por todos los continentes, la mayor diversidad de especies se hallan en América del Sur y América Central, pueden ocupar una gran variedad de ecosistemas desde los desiertos hasta los bosques tropicales. La diversidad de solanáceas es muy alta, existen pocos estudios acerca de la asociación de MA a tomate de árbol en la cual se ha determinado la presencia del género *Glomus* y *Acaulospora*, predominando *Acaulospora mellea* (Rivillas et al.,1995) en plantas de tomate de árbol.

## **2.2 Estructuras de las micorrizas arbusculares**

La descripción morfológica de estos hongos es de suma importancia al momento de investigar las diferentes especies existentes en la naturaleza.

Las estructuras del mico-simbionte que se extienden dentro de la raíz de la planta hospedadora y en el sustrato circundante, son características de cada tipo de micorriza y sirven para su diferenciación (Allen, 1991).

Apresorios: apéndices especializados del micelio externo de una hifa o tubo germinativo, imitando una bomba, ejerce presión sobre el tejido que se va a colonizar y facilita la penetración del hongo (Garcia-Garrido et al., 2002).

Arbúsculos: los HMA al ponerse en contacto con la raíz forman una estructura sobre las células epidérmicas vegetales conocida como “apresorio” y a partir de este cuerpo se producen las hifas que son filamentos tubulares, que penetran la epidermis radical hasta llegar a la endodermis sin atravesarla, allí comienza su ramificación para formar los arbúsculos, que tienen un tamaño comparable al de las mitocondrias y su vida aproximada es de 1 a 3 semanas, después de lo cual se colapsa y parte de él se reabsorbe hacia el citoplasma



hifal y el resto de componentes permanecen en la célula hospedera, rodeados por el plasmalema (Escobar, 1998).

Vesículas: son las estructuras de almacenamiento de los hongos, cuya formación de sustancias como lípidos es posterior a la de los arbusculos y tiene lugar a partir del hinchamiento de una hifa generalmente terminal. Esta estructura principalmente en las especies del género *Glomus* puede llegar a engrosar sus paredes y convertirse en esporas (Escobar, 1998).

Coils: circunvoluciones de hifas intracelulares, implicadas en la absorción inicial de compuestos carbonados por parte del hongo (Smith & Smith, 1997).

Células auxiliares: son estructuras globosas y espinosas, las cuales se forman en hifas gruesas del micelio extrarradical, alrededor de las raíces, son abundantes durante la colonización temprana y luego estas disminuyen cuando la esporulación aumenta (<http://invam.caf.wvu.edu>). las células auxiliares son propias de la familia Gigasporaceae.

Micelio intracelular: conjunto de hifas que crecen dentro de la pared de las células de la raíz (Castillo, 2009)

Micelio externo o extrarradical: componente importante en la simbiosis, formado por las hifas principales, gruesos y ramificados dicotómicamente, así como por hifas también ramificadas de 1º, 2º o 3er o más orden, siendo las encargadas de la exploración del suelo, la absorción del fósforo y otros nutrientes de lugares donde las raíces no pueden acceder por sí mismas y de su transporte hasta la raíz. También se encargan de la producción de esporas

extrarradicales. Pero cuando el sustrato se agota el citoplasma de las hifas finas se retrae hacia la hifa principal donde se forman septos. Este fenómeno puede ser un indicador de deficiente aireación y/o agotamiento de nutrientes del suelo, entre otros (Escobar, 1998).

Esporas: se forman sobre el micelio extraradical y/o intraradical según sea el caso y son estructuras de propagación de los HMA. Formadas en el término o no de una hifa, con características propias que constituyen la única estructura externa que puede permitir el reconocimiento morfológico más aproximado de las especies de la HMA.

### **2.3 Etapas en el establecimiento de las micorrizas**

El establecimiento de la simbiosis micorrízica va a depender de las interacciones entre los tres componentes más importantes del sistema: el hongo, las plantas y su entorno. Su presencia puede implicar que ocurran procesos de reconocimiento entre los simbioses, compatibilidad y especificidad, los cuales condicionan su expresión y conducen a la integración morfológica y funcional de las asociaciones (Sánchez, 1999).

En el proceso de la formación de la simbiosis se pueden distinguir diferentes fases: precolonización, penetración inicial del hongo, colonización de la raíz, colonización extraradical y desarrollo del micelio externo y de las estructuras reproductivas. Aparentemente los modelos de penetración y colonización del hongo son independientes no solo del hospedero si no también

del tejido a colonizar (Sánchez, 1999).

#### Primera etapa o de precolonización

Las raíces de las plantas susceptibles son infectadas con M.V.A., siempre y cuando esté presente una estructura infectiva del hongo, que luego entra en contacto con los pelos absorbentes de las raíces. Se consideran órganos o unidades infectivas: las esporas y otras estructuras del hongo u otra raíz ya infectada. Bajo condiciones favorables la infección puede ocurrir en un tiempo de 2 a 3 días (Sieverding, 1989).

#### Segunda etapa o de colonización y distribución

Una vez el hongo ha infectado la raíz, se distribuye en ella, creciendo intercelular e intracelularmente infectando toda la corteza de la raíz. Entrando a conformar el micelio interno, arbuscúlos y vesículas. La duración del proceso de infestación depende del ambiente, de la especie vegetal y por su puesto del hongo, tardando desde 10 días hasta varias semanas (Sieverding, 1989).

#### Tercera etapa o de estabilización o efectividad

Simultáneamente a la formación de estructuras internas, el hongo forma el micelio externo, órgano a través del cual el hongo absorbe los nutrientes y los transporta a la raíz de la planta, en este momento es cuando la simbiosis empieza a funcionar en forma benéfica para la planta (Sieverding, 1989).

Simultáneamente a la formación de estructuras internas, el hongo forma el micelio externo, órgano a través del cual el hongo absorbe los nutrientes y los transporta a la raíz de la planta, en este momento es cuando la simbiosis empieza a funcionar en forma benéfica para la planta (Sieverding, 1989).

#### Cuarta etapa o de reproducción

De 1-4 meses después de la tercera etapa, el hongo empieza a reproducirse formando esporas asexuales en el micelio externo. Las esporas son órganos de reproducción del hongo, que pueden perdurar latentes por largos periodos de tiempo en el suelo, especialmente en épocas en que no hay hospedero a su alcance (Sieverding, 1989).

#### **2.4 Taxonomía HMA**

Los estudios de taxonomía de micorrizas iniciaron en 1809 con Link quien los reconoce como hongos hipógeos o epigeos del orden Endogonales, género *Zigomicotina* por ser productores de zigosporas, clamidosporas no sexuales o esporangios. La taxonomía de micorrizas ha ido variando acorde los últimos descubrimientos de la tecnología moderna, es así que, basados en estudios moleculares, morfológicos y ecológicos, remueven a la micorrizas de *Zigomicotina* a un nuevo phylum: *Glomeromycota*, con tres nuevos órdenes: *Archaeosporales*, *Paraglomerales* y *Diversisporales* (Paillacho, 2010).

Según Morton y Benny (1990), durante muchos años los hongos formadores de micorrizas arbusculares se ubicaron en el orden Endogonales junto al género no micorrízico *Endogone*. Sin embargo, la luz de las consideraciones filogenéticas, se estableció que su condición simbiótica constituía criterios suficientes para agruparlos en un taxón particular, lo cual dio origen al orden *Glomales* y a un re-arreglo de familias.

A nivel de géneros, la taxonomía de estos hongos se fundamenta en características tales como formación y morfología de las esporas, modo de germinación y morfología del esporocarpo. Otros caracteres, como apariencia de las esporas (color, contenido, grosor de la pared, ornamentación y tipo de conexión entre las hifas), murografías (diagramas que ilustran la estructura de la pared de la spora y anatomía de la infección del hongo), se usan para la taxonomía a niveles de especies (no rutinaria entre los taxónomos), (Schenck y Pérez, 1990).

De otro lado, los caracteres morfológicos son a veces difíciles de distinguir, lo cual hace complicado el manejo de claves, por demás complejas. La morfología de algunas esporas M.A es muy similar, por lo que en ocasiones puede ser muy difícil distinguir una especie de otra (Azcon y Guerrero, 1996).

## **2.5 Clasificación taxonómica de los HMA (Morton & Redecker, 2001)**

Estudios posteriores en taxonomía de las especies de hongos micorrícicos arbusculares realizados por Morton y Redecker (2001) basados principalmente en el análisis del fragmento 18S del DNAr parecían mostrar la existencia de dos clados ancestrales de hongos micorrícicos arbusculares filogenéticamente distintos, que clasificaron como dos nuevas familias, Archaeosporaceae y Paraglomaceae.

Actualmente la biología molecular implica una alternativa en la identificación de las especies de los hongos formadoras de este tipo de micorriza, así como en la identificación de las moléculas orgánicas que

intervienen en la estimulación e inhibición de la germinación de esporas y establecimientos de los hongos micorrízicos arbusculares en la planta hospedante (Bago et al., 2000). Recientemente, con base en los avances en lo que se refiere a técnicas moleculares y relacionándolas con las características morfológicas de las esporas, se han realizado cambios significativos en la taxonomía de los hongos formadores de la asociación simbiótico micorriza-arbuscular. El uso de nuevas técnicas que involucran la secuenciación del ADN, las determinaciones de perfiles de ácidos grasos, reacciones inmunológicas hacia anticuerpos monoclonales específicos y junto con la caracterización morfológica de las esporas y hábitos de colonización de los HMA han permitido tener avances sustanciales en la taxonomía de estos hongos (Morton y Redecker, 2001).

## 2.6 Clasificación de los hongos formadores de micorriza arbuscular (Schüßler and Walker ,2010)

Phylum: *Glomeromycota*

Clase: *Glomeromycetes*

<i>Ordenes (4)</i>	<i>Familias (11)</i>	<i>Géneros (25)</i>
<i>Glomerales</i>	<i>Glomeraceae</i>	<i>Glomus, Funneliformis, Rhizophagus, Sclerocystis, Septoglomus</i>
	<i>Claroideoglomeraceae</i>	<i>Claroideoglomus</i>

<i>Diversisporales</i>	<i>Gigasporaceae</i>	<i>Cetraspora, Dentiscutata, Gigaspora, Intraornatospora, Paradentiscutata, Racocetra, Scutellospora</i>
	<i>Acaulosporaceae</i>	<i>Acaulospora</i>
	<i>Pacisporaceae</i>	<i>Pacispora</i>
	<i>Diversisporaceae</i>	<i>Corymbiglomus, Diversispora, Otospora, Redeckera, Tricispora</i>
	<i>Sacculosporaceae</i>	<i>Sacculospora</i>
<i>Paraglomerales</i>	<i>Paraglomeraceae</i>	<i>Paraglomus</i>
<i>Archaeosporales</i>	<i>Archaeosporaceae</i>	<i>Archaeosporaceae</i>
	<i>Ambisporaceae</i>	<i>Ambispora</i>
	<i>Archaeosporaceae</i>	<i>Archaeospora</i>

## 2.7 Fisiología de la simbiosis

Asumiendo que el papel principal que desempeña la simbiosis es de tipo nutricional, es importante conocer los aspectos fundamentales de los mecanismos de intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta, sobre todo si se considera la biotrofia estricta del hongo. En lo referente al metabolismo carbonado, el uso de  $^{14}\text{CO}_2$  permitió comprobar que la planta proporcionaba C orgánico procedente de la fotosíntesis al hongo (Ho y Trappe 1973). El hongo es capaz de absorber glucosa (Pfeffer et al. 1999), que es rápidamente transformada a trehalosa y glucógeno (Sachar – Hill et al. 1995), con menor capacidad osmótica, y también a lípidos de reserva (triacilglicéridos) (Bécard et al. 1991).

No obstante lo anterior, se ha puesto de manifiesto la existencia de una dualidad fisiológica entre las hifas internas (intrarradicales) y externas del hongo MA, presentando las primeras una significativa capacidad de metabolizar glucosa (y un poco menos fructosa) e incapaces de utilizar otros compuestos

carbonados. Por su parte, las hifas del micelio externo son incapaces de metabolizar glucosa y fructosa, pero por gluconeogénesis son capaces de metabolizar compuestos lipídicos, formados en el micelio intrarradical, y desde allí transportados al micelio extrarradical (Bago et al. 2002).

La importancia de las micorrizas en la nutrición mineral de las plantas es, sin duda, uno de los aspectos más estudiados de la simbiosis por su repercusión en el desarrollo vegetal. La mejora nutricional que ocasiona a la planta el establecimiento de la simbiosis se podría deber a varias causas, como son: i) el aumento del volumen de suelo explorado, al actuar las hifas del hongo como un sistema radical complementario altamente efectivo; esto se verifica sobre todo en nutrientes que difunden con dificultad en la solución del suelo (Barea 2000); ii) una mayor competitividad de las hifas del hongo con respecto a otros microorganismos del suelo que la presentada por las propias raíces ( Linderman 1992); iii) una mayor afinidad de los transportadores del hongo respecto de los de la planta ( Cress et al. 1979); iv) la posibilidad de absorber fuentes de nutrientes minerales no disponibles a la propia planta (Clark y Zeto 2000), entre otras como la actividad de absorción a potenciales hídricos menores.

Entre los nutrientes cuya absorción favorece la formación de micorrizas, está el P el cual es uno de los más importantes, por tratarse de una macronutriente, y además por que entre un 95 y un 99 % del fósforo presente en el suelo se encuentra de forma no disponible para la planta (Bielecki, 1973). En general, la micorriza permite una mayor absorción de P que una raíz simple (Jia et al., 2004), llegando en algunas especies a ser responsables del 100% de la absorción de P (Smith et al. 2004).



Respecto a los mecanismos implicados en la absorción, transporte y transferencia de P por las hifas del hongo en la planta, se puede señalar que la absorción de P como ión ortofosfato es un proceso rápido y eficiente. Esto debido a la existencia de transportadores de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  de alta afinidad en las hifas del hongo (Maldonado- Mendoza et al., 2001), aunque operan asociados a un simporte de  $\text{H}^+$  creado por distintas  $\text{H}^+$ -ATPasas (Requena et al., 2003). El  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  absorbido es rápidamente transformado en polifosfato en el micelio extrarradical (Ezawa et al., 2004). Los polifosfatos se acumulan fundamentalmente a nivel de vesículas intracitoplásmicas (Rasmussen et al., 2000), y en ellas son transportados hasta el micelio intrarradical mediante corrientes citoplasmáticas (Olsson et al., 2002). Ya en el micelio intrarradical, el polifosfato es hidrolizado por diversas fosfatasas alcalinas (Aono et al., 2004). El paso del  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  liberado hacia la matriz interfacial todavía no se ha descrito, aunque probablemente ocurre de forma pasiva, a favor de un gradiente de concentración. Si se ha descrito la existencia de varios transportadores de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , que se expresan específicamente en células colonizadas por arbusculos (Harrison et al., 2002), y que son responsables de la entrada de P en la célula hospedera.

Las hifas de los HMA presentan además la capacidad de absorber tanto  $\text{NO}_3^-$  como  $\text{NH}_4^+$  del suelo (Hawkins y George 2001), y se ha estudiado la posibilidad de que pueden también absorber cantidades importantes de N orgánico (Hawkins et al., 2000). Se ha descrito la existencia de un transportador de alta afinidad por  $\text{NH}_4^+$  expresado en las hifas extrarradicales de *Glomus*

*intrarradices* (López- Pedroza et al, 2006). Es probable que exista un sistema GS/GOGAT para la asimilación de N inorgánico por parte de hifas de micorrizas arbusculares además de una actividad nitrato reductasa (Bago et al, 2001).

Por otra parte, plantas micorrizadas en sistemas bicompartimentados, suplementadas con  $^{15}\text{N}$ - Gly como única fuente de N en el compartimiento de desarrollo exclusivo de hifas extrarradicales del hongo MA, alcanzaron hasta los 150 nmol de  $^{15}\text{N}$  por gramo de raíz, lo que demostraría la capacidad del micelio extrarradical de hongos MA de transportar el N en forma de aminoácidos (Hawkins y George, 2000). Existen además evidencias de que el ciclo de la urea estaría implicado en la formación de arginina en las hifas extrarradicales, la cual asociada a polifosfatos en las vacuolas sería el medio de transporte de N desde la zona extrarradical hacia las hifas intrarradicales, habiéndose encontrado altas concentraciones de arginina especialmente en el sistema vacuolar ( Govindarajulu et al., 2005). Se debe considerar separadamente las partes sintética (en el micelio extrarradical) y degradativa liberándose la arginina junto con los iones fosfato por hidrólisis de los polifosfatos en el micelio intrarradical, siendo poco probable la salida desde las hifas del hongo a la matriz interfacial, ya que con ello representaría una importante pérdida de C para el hongo, se ha demostrado la ausencia de un flujo carbonado desde el hongo a la planta (Fitter et al., 1998). La probable vía de degradación de la arginina sería a la ornitina, urea y, finalmente a  $\text{NH}_4^+$ , hipótesis que esta reforzada por el hecho de que se ha encontrado ornitina en cantidades importantes en las estructuras del hongo y actividad ureasa en las hifas (Bago

et al., 2001).

## **2.8 Ecofisiología de los hongos MA.**

A pesar de la universalidad de las micorrizas arbusculares hasta el momento no se ha prestado suficiente atención al papel que juegan sobre la diversidad, estabilidad y productividad de los ecosistemas terrestres. En cuanto a la autoecología de los hongos, se sabe que sus niveles poblacionales son altamente variables y dependientes de una serie de condiciones ecológicas, como son los niveles nutricionales y de pH de suelo, la temperatura, la humedad etc., y por diferentes prácticas agronómicas ( fertilización, prácticas fitosanitarias, labranza del suelo, etc...) cuando se trata de agroecosistemas (Gavito y Miller, 1998). Resulta por tanto difícil llegar a conclusiones respecto de los efectos que los distintos factores, así como sus interacciones, presentan sobre las poblaciones de hongos MA (Brundrett, 1991). Por otra parte existe una marcada estacionalidad tanto en la actividad de la simbiosis, como en la presencia de propágulos infectivos por parte del hongo (Kabir et al., 1997).

Otra importante función ecológica de la asociación micorrícica es la estabilización de la estructura del suelo, dado que las hifas del hongo pueden formar una red mediante la cual enlazan las partículas del suelo (Borie et al., 2000).

## **2.9 Distribución espacial de los hongos formadores de micorrizas arbusculares**

Conocer la distribución espacial de las especies es necesario para

entender el funcionamiento de los ecosistemas. Se puede estudiar a gran escala, distinguiendo entre diferentes biomas (taiga, tundra, tropical, mediterráneo, etc) o disminuyendo el punto de enfoque hasta hablar de hábitat o de nicho. A gran escala sabemos que las diferentes condiciones climáticas y edáficas dan lugar a dominancia de diferentes tipos de HM en cada bioma (Read, 1991).

Opik y colaboradores (2006) observaron que las comunidades de HMA difieren entre ecosistemas y que la diversidad de taxones disminuye del bosque tropical al pastizal, al bosque templado y a los ecosistemas degradados. Estos datos a gran escala sirven para conocer su distribución a nivel global; sin embargo, si el objetivo es estudiar como afecta la distribución a las interacciones entre las comunidades de HMA y plantas es necesario reducir la escala de estudio.

En los últimos años han aumentado las investigaciones que buscan definir los factores abióticos y bióticos que condicionan la estructura espacial de las comunidades de HMA. Se ha demostrado que factores abióticos como la humedad (Wolfe et al., 2006), la estructura (Lekberg et al., 2007) y composición química del suelo (Fitzsimons et al., 2008) se correlacionan con la distribución espacial de las comunidades de HMA. Sorprendentemente, los últimos estudios parecen indicar que es el nivel de N y no el de P el que más influye en la distribución de las HMA (Fitzsimons et al., 2008), mientras que cabría pensar que al ser el P la principal contribución a la planta por parte de las micorrizas, fuese este el que más afectase. Se ha demostrado que existe una correlación

negativa entre el N en el suelo y la presencia de HMA (Santos et al., 2006), mientras que existe una falta de respuesta de las MA a la disponibilidad de P (Fitzsimons et al., 2008).

Por otro lado Mummey y Rillig (2008) detectaron diferencias significativas en la diversidad y abundancia de HMA entre parches de suelo situados a distancias menores de 1 metro. Estas diferencias pueden condicionar la estructura de la vegetación ya que los HMA facilitan el establecimiento y supervivencia de las plántulas (Van der Heijden, 2004).

Conocer en profundidad la composición y distribución de las comunidades de HM es el primer paso para entender su ecología. Con los últimos estudios se están desvelando patrones de interacción complejos entre las comunidades de HMA y de plantas, por lo que es necesario realizar más muestreos en zonas estratégicas y desarrollar metodologías más sensibles para la detección de todas las especies de HMA (PCR a tiempo real, cebadores más específicos, etc).

## **2.10 Relación HMA – hospedero**

Las plantas presentan respuestas de defensa frente a la posible invasión de microorganismos que impiden o dificultan la entrada de éstos en sus células; sin embargo, aunque en la asociación con HMA, las plantas generan respuestas de defensa, éstas son débiles, localizadas en células específicas y no impiden la colonización del hongo (García-Garrido y Ocampo, 2002). Lo anterior puede estar asociado a mecanismos de regulación de las respuestas de las plantas o debido a la baja capacidad del hongo de inducir respuestas de

la planta (García- Garrido y Ocampo, 2002). Con el reconocimiento del HMA se activa el sistema de defensa de la planta mediante señales específicas, elicitores, que pueden ser producidos por el microorganismo (exógenos) o por la planta (endógenos). Una vez percibido el elicitador ocurre una serie de cambios bioquímicos que permiten una rápida respuesta de la célula del hospedero y llevan a la activación de genes relacionados con la respuesta de defensa de la planta (Somssich and Hahlbrock, 1998).

La compatibilidad de las plantas con los HMA depende de señales específicas bioquímicas y genéticas, en todas las fases de desarrollo de la simbiosis, que permiten el reconocimiento, la colonización y el intercambio de nutrientes (Kogel, 2008). La simbiosis HMA-planta requiere de un reconocimiento y una armonización de procesos en el espacio y en el tiempo bastante complejos, que lleven al establecimiento de la simbiosis (Requena et al., 2007).

### **2.11 Señales de reconocimiento en la fase asimbiótica**

La primera señal es dirigida por la planta al hongo por medio de exudados de la raíz, que se producen especialmente en plantas sometidas a estrés por Pi y que no están previamente micorrizadas (Paszkowski, 2006).

En la fase asimbiótica se presentan señales bioquímicas relacionadas con compuestos volátiles que forman parte de los exudados de las raíces. Uno de ellos es el CO<sub>2</sub>, que es fundamental para la germinación de esporas y el crecimiento de la hifa germinativa (Bécard y Piché, 1989). Estudios fisiológicos han mostrado que, aunque la espóra tiene capacidad de almacenar carbohidratos en forma de lípidos y azúcares, el CO<sub>2</sub> es una de las fuentes de carbono necesario para el crecimiento de la hifa (Bago et al., 2000). Sin

embargo, éste no es el único compuesto involucrado en esta fase. Los exudados de las raíces contienen diferentes tipos de compuestos y hormonas que favorecen la germinación de esporas, el crecimiento y ramificación de la hifa germinativa y la localización de las raíces del hospedero (Requena et al., 2007). Antes de que la hifa agote sus reservas debe ser capaz de localizar las raíces e iniciar la formación del apresorio (Bécard y Piché, 1989), ya que aunque los exudados de las raíces estimulan el crecimiento de hifas, no pueden mantener en forma indefinida su crecimiento, ni inducen la formación del apresorio. Por lo anterior se plantea la existencia de señales tigmotróficas o metabolitos secundarios producidos por la planta, requeridos para el establecimiento de la simbiosis (Requena et al., 2007).

Aunque la colonización de las raíces es controlada por la planta (Bonfante et al., 2000), el hongo debe ajustar su programa celular, lo cual se ha evidenciado con la identificación del gen *GmGn1*, posiblemente relacionado con señales de reconocimiento, el cual es sub-regulado bajo simbiosis (Requena et al., 2002). Este gen tiene similitud con *GTPasas*, que controlan apoptosis, sugiriendo que puede detener el crecimiento del hongo cuando no se encuentra un hospedero compatible o puede detectar la ausencia de señales de la planta, induciendo septación de la hifa germinativa (Requena et al., 2002). La comunicación plantahongo no sólo modifica la expresión de genes del hongo, sino que es capaz de inducir modificación transcripcional de proteínas del hongo (Requena et al., 2007).

Otros compuestos de los exudados de las raíces, los flavonoides, favorecen ramificación de hifas (Vierheilig y Piché, 2002); sin embargo, raíces

de maíz deficientes en producción de flavonoides, son colonizadas por HMA, mostrando que los flavonoides no son esenciales para este proceso (Siqueira et al., 1991). Uno de los compuestos de los exudados de las raíces, denominado “factor de ramificación”, que induce una amplia ramificación de hifas, fue identificado en *Lotus japonicus* como una strigolactona, la cual ha demostrado ser una señal de fundamental importancia en el desarrollo de la simbiosis (Akiyama et al., 2005).

Las strigolactonas han sido aisladas de raíces de un gran número de plantas, a pesar de los bajos niveles en que se encuentran y de la inestabilidad del compuesto, encontrándose mayor concentración en plantas capaces de establecer simbiosis y en concentraciones bajas de Pi (Akiyama and Hayashi, 2006). La primera respuesta de HFMA es la inducción de una fuerte actividad mitocondrial y el incremento en respiración, antes de iniciar una fuerte ramificación de hifas (Akiyama y Hayashi, 2006). Las strigolactonas también parecen actuar como atrayentes químicos, con efectos quimiotróficos a distancias cercanas a 910 $\mu$ m (Akiyama y Hayashi, 2006). Aparentemente, el estímulo producido por la strigolactona en el hongo es necesario para que el hongo produzca los factores Myc y active la expresión de genes *ENDO11* (Akiyama y Hayashi, 2006).

Hause y colaboradores (2007) presentan un resumen acerca del efecto de las hormonas en la micorrización de raíces, encontrándose que citoquininas y auxinas tienen un efecto positivo en el crecimiento del hongo, las giberelinas presentan respuestas tanto positivas como negativas en el hongo formador de



MA, el ácido jasmónico muestra respuestas positivas cuando se encuentra en bajas concentraciones y negativas cuando las concentraciones son altas, el etileno presenta respuestas negativas y el ácido salicílico (AS) no afecta la micorrización.

### **2.12 Señales de reconocimiento en la Fase Simbiótica**

La activación de expresión de genes *Endo* en el hospedero, producida por HMA, permite a la planta localizar las células en las cuales las hifas del hongo hacen contacto para la formación del apresorio (Kosuta et al., 2003). Esta señal, acompañada de factores Myc, activa una serie de cambios celulares que llevan a formar un aparato de prepenetración (APP), especie de canal por donde la hifa fúngica posteriormente va a ingresar a la célula (Genre et al., 2005). El proceso inicia con la localización del núcleo inmediatamente debajo del apresorio y su posterior movimiento a través de la célula, señalando la zona en la cual se debe formar el APP dentro de una columna de citoplasma, acompañada de un manojito de microtúbulos y microfilamentos que se localizan paralelos a la columna y asociado con una región densa de cisterna del retículo endoplasmático. Una vez penetra en la célula, la hifa sigue el camino definido por el citoesqueleto y las estructuras del retículo endoplasmático al interior de la columna. Paralelamente, se produce la expresión de genes *Endo* en las células epidermales (Genre et al., 2005). Esta señal es repetida en las células de la epidermis marcando el camino de colonización de las hifas. Una vez que el hongo alcanza las células corticales se producen señales específicas para la formación del arbusculo. En este punto la reorganización celular es más

drástica para permitir la ramificación de la hifa que genera el arbusculo y para la formación de la membrana peri-arbuscular, lugar de intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo. Se observa fragmentación de la vacuola, migración del núcleo, reorganización del citoesqueleto, modificación de plastidios y activación de genes relacionados con el transporte de Pi (Reinhardt, 2007). Una vez que el arbusculo finaliza su ciclo, la célula recupera su estructura original (Genre *et al.*, 2005). Los cambios morfológicos están acompañados de cambios bioquímicos, expresión de genes que permiten la reorganización celular, la formación de membranas, el intercambio de nutrientes (Breuninger and Requena, 2004) y la producción de proteínas (Mathesius, 2009).

Para que los cambios a nivel de célula ocurran se requiere de la activación de genes mediante una cascada de señales; este proceso es similar al que ocurre en la simbiosis leguminosas-rizobio, por lo que se le ha llamado vía común Sym (Catoira *et al.*, 2000). Esta similitud se observa a nivel molecular, citológico y genético (Parniske, 2000). Se ha encontrado que los factores Nod requeridos en la simbiosis leguminosa-rizobios también son requeridos en la asociación planta-HMA (Oldroyd and Downie, 2006). En *Medicago trunculata* se han encontrado tres (al menos) genes (Catoira *et al.*, 2000) y en *L. japonicum*, siete (al menos) genes, involucrados en esta vía Sym y presentes en las dos simbiosis (Kistner *et al.*, 2005). Oldroyd y Downie (2006), con base en la revisión de este proceso, proponen un modelo para la vía de señalización Sym, con la participación de receptores de quinasas específicos para rizobios (NFR1 y NFR5) asociados a la percepción de los factores Nod (en

HMA deben existir receptores similares para factores Myc, pero aún no se han identificado) y receptores DMI2/SYMRK que participan en las dos simbiosis. Una vez que se produce el reconocimiento de factores Nod (y posiblemente Myc) se genera una cascada de fosforilación en la membrana plasmática, posiblemente ligada a los cambios que sufre el calcio a nivel nuclear, con la participación de segundos mensajeros (productos de fosfolipasas C y D – PLC y PLD), los cuales, además de regular la fosforilación, activan los canales de cationes DMI1/Pollux y Castor.

Para la percepción de los factores Nod en la membrana plasmática se requiere la inducción de oscilaciones de Ca en el núcleo y la participación de una nucleoporina (NUP133) que permite la entrada del segundo mensajero al núcleo, para activar los canales de Ca en el interior y en el exterior de la membrana nuclear. Las bombas de Ca requieren ATP para su movilización en contra del gradiente de concentración y para mantener un nivel adecuado del elemento almacenado. Lo anterior genera la activación de proteína quinasa, dependiente de Ca y calmodulina (CCaMK), localizada en el núcleo, para regular la nodulación por medio de la activación de la expresión de genes nodulin. Genes de simbiosis temprana DMI3, codifican para la CCaMK, importante en la simbiosis, ya que regula la morfogénesis del nódulo y es requerida para la simbiosis con HMA, posiblemente para activar la respuesta de la planta (Oldroyd and Downie, 2006). En la asociación con HMA se activan genes que permiten la reorganización de la células del hospedero para la formación del APP y metabolismo (Reinhardt, 2007).

### 2.13 Respuestas de defensa de la planta

La existencia de plantas no hospederas es una de las evidencias de que los HMA pueden generar respuestas de defensa en las plantas y el uso de mutantes Myc- ha permitido observar la acumulación de calosa, producción de proteína PR1 y fenoles, como respuesta a los HMA. En estados tempranos, una vez se percibe el elicitor del hongo, se presentan señales de transducción y activación de genes de defensa (García-Garrido and Ocampo, 2002). *Glomus intraradices* produce un elicitor capaz de generar síntesis de fitoalexinas en soya y *Medicago truncatula* inmediatamente después del primer contacto con el HMA (Bonanomi et al., 2001). En *M. truncatula* se han reportado respuestas hipersensibles en células de ingreso de la hifa (Salzer et al., 1999) y necrosis y muerte celular en puntos de infección de *Gigaspora margarita* (Douds et al., 1998). En etapas de formación de apresorio y penetración de hifas se observan otro tipo de respuestas de defensa, como son el incremento de la actividad de catalasas y peroxidasas en tabaco (Blilou et al., 2000a), cebolla y frijol (Spanu and Bonfante-Fasolo, 1988), las cuales pueden estar acompañadas de acumulación de AS y expresión de genes que codifican para proteínas de transferencia de lípidos (LPT) y fenilalanina amonio lipasa (PAL), como ocurre en tabaco y arroz, mostrando que la inducción de estos genes (*Pal* y *Ltp*) está relacionada con respuestas de defensa de la planta (Blilou et al., 2000b). Plantas de tomate micorrizadas muestran alteraciones en patrones de isoenzimas y cambios bioquímicos de enzimas relacionadas con mecanismos de defensa, quitinasa, quitosanasas y  $\beta$ -1,3 glucanasas (Pozo et al., 1996,

1998).

La respuesta más fuerte se presenta en las etapas posteriores, la cual está localizada en las células que contienen arbuscúlos, posiblemente como un mecanismo de control de la dispersión de hifas y formación de arbuscúlos (García-Garrido and Ocampo 2002). Se encuentra una acumulación de mRNA de genes asociados con respuestas de defensa, dentro de los cuales es importante resaltar: las enzimas relacionadas con metabolismo de fenilpropanoides (flavonoides e isoflavonoides) (Harrison and Dixon, 1994); especies reactivas al oxígeno (ROS) (Blee and Anderson, 2000) e hidrolasas de plantas (Salzer et al., 2000). Los incrementos en flavonoides e isoflavonoides dependen de los genotipos de los simbiontes (Harrison and Dixon, 1994), y en la asociación con rizobios estimulan la simbiosis, por lo que se considera que con HMA puede ocurrir un proceso similar (Harrison, 1999).

Un aspecto importante es la presencia de transcriptores de catalasas y peroxidasas en células con arbuscúlos (Blee and Anderson, 2000), las cuales pueden estar asociadas al catabolismo del peróxido de hidrógeno o en reacciones cruzadas de proteínas-polisacáridos en la interfase arbusculo-membrana plasmática. Se considera que la expresión de enzimas quitinasas y  $\beta$ - 1,3-glucanasa durante la simbiosis, puede estar asociada con el control del crecimiento intrarradical del hongo (Salzer et al., 2000), observándose que la acumulación de  $\beta$ - 1,3-glucanasa, pero no de quitinasas, está inversamente relacionada con la concentración de Pi (Lambais and Mehdy, 1998).

La actividad enzimática y los patrones de acumulación de enzimas pueden formar parte de las respuestas de defensa de la planta. La inducción específica de genes de la familia quitinasa clase III en *M. truncatula* juega un papel en la supresión de respuestas de defensa de la planta en los estados tardíos de la simbiosis (Salzer et al., 2000). Finalmente, en fases tardías de la simbiosis se encuentran genes relacionados con senescencia y estrés como glutathione-S-transferase (Prp1), que pueden estar relacionados con degradación del arbusculo (Franken et al., 2000).

#### **2.14 Atenuación de los mecanismos de defensa**

Para que la asociación planta-HMA pueda establecerse se requiere una reducción de la respuesta de defensa de la planta. Dentro de los posibles mecanismos, considerados en la revisión realizada por García-Garrido y Ocampo (2002), se encuentran: la degradación de elicitores exógenos y/o prevención de elicitores endógenos; alteración de la vía de señales de transducción, y flujos de nutrientes y de hormonas.

Degradación de las moléculas elicitoras. Algunas hidrolasas se expresan durante la simbiosis y pueden actuar rompiendo las moléculas de los elicitores del HMA, (Salzer et al., 2000). Estas hidrolasas deben ser producidas por la planta y estar reguladas por los niveles de Pi, ya que la primera señal de reconocimiento hongo-planta se produce en condiciones de deficiencia de Pi (Akiyama et al., 2005). Este factor no ha sido identificado y por tanto la participación de quitinasas en la degradación del elicitor es objeto de controversia (Salzer and Boller, 2000). La prevención de la formación de

elicitores endógenos no parece ser el mecanismo de atenuación, debido a que los HMA producen cantidades muy bajas de enzimas capaces de degradar la pared celular del hospedero, las cuales son utilizadas para la penetración de la hifa (García-Garrido et al., 2000).

Alteración de la vía de señales de transducción. Mediante el bloqueo de alguno de los componentes, como el AS o ROS, implicados como segundos mensajeros en la simbiosis con HMA. La producción de compuestos oxidativos en la colonización se refleja en alteraciones en los patrones de enzimas antioxidantes como catalasa y peroxidasa (Lambais, 2000). La degradación de peróxido de hidrógeno por catalasas puede, potencialmente, ser un mecanismo para evadir la activación de genes de respuesta de defensa de las plantas; esta actividad está regulada por la capacidad de colonización del HMA y por las concentraciones de Pi (Lambais, 2000). En el tabaco se ha observado que los incrementos transitorios en las actividades de catalasas y peroxidasas se correlacionan con incrementos temporales de AS (Blilou et al., 2000a). Aunque no se conoce claramente el papel del AS en la simbiosis, los incrementos en la concentración no impiden la formación de apresorio, pero producen una reducción transitoria de la micorrización de raíces, sugiriendo que la regulación de respuestas de defensas de la planta puede darse a través de la vía del AS (Blilou et al., 2000b). Plantas de tabaco incapaces de acumular AS (NahG) presentaron mayor micorrización que plantas silvestres, y mutantes Nod- y Myc- de arveja, mostraron acumulación de AS a través del tiempo (Blilou et al., 2000b).

Flujos de nutrientes y hormonas. Los niveles de fosfatos y carbohidratos en la planta están, respectivamente, negativa y positivamente relacionados con la colonización de HMA (Jasper et al., 1979). Aunque el mecanismo preciso y las bases moleculares relacionadas con la posible inhibición de colonización en altos niveles de Pi se desconocen, es posible que exista un mecanismo de señalización que detecte los niveles de Pi, de forma tal que en plantas con altos niveles de fosfato se presente una sobrerregulación de los genes asociados con la defensa de la planta (Lambais, 2000). Por otra parte, las células con arbusculos son los mayores vertederos de sucrosa, debido a las necesidades metabólicas de estas células y a los requerimientos del hongo. En estas células se presenta correlación positiva de los incrementos en flujos de sucrosa, glucosa y fructosa con aumentos en la activación de genes de defensa (Blee and Anderson, 2000) y con resistencia sistémica (Herbers et al., 1996).

Los niveles de hormonas varían diferencialmente en la simbiosis, observándose reducción en los niveles de etileno (Vierheilig et al., 1994) e incremento en los de citoquininas (Ginzberg et al., 1998). Las citoquininas actúan como factores que suprimen la actividad quitinasa (Shinshi et al., 1987) y los niveles elevados de citoquininas en raíces micorrizadas pueden suprimir la inducción de algunos genes que codifican proteínas PR, específicamente de quitinasa y glucanasa. Sin embargo, el papel de las hormonas en la regulación de las respuestas de defensa, en simbiosis, no es muy claro (Shaul et al., 2000).

La respuesta de la planta se refleja en el tipo de colonización de las



células de la corteza radical, encontrándose dos tipos de estructuras: hifas tipo “Paris” e hifas tipo “Arum” (Genre et al., 2008). Por su parte, los HMA también presentan diferentes patrones de crecimiento intrarradical, encontrándose que *Glomus* coloniza abundantemente las raíces y ubica su micelio extrarradical muy cerca de la raíz, mientras que *Gigaspora* o *Scutelospora* presentan pequeños parches de colonización en las raíces y su micelio extraradical se expande ampliamente en la rizósfera (Parniske, 2004, 2008).

La reprogramación de la planta para lograr la compatibilidad con el HFMA, que sigue después de las señales de reconocimiento, probablemente explica la supresión de las defensas de las plantas, indicando que es la comunicación planta – hongo lo que prima en este tipo de interacción (Oldroyd et al., 2009).

El control de la simbiosis está regulado por la planta, prácticamente en todas las fases de desarrollo. Es la planta la que genera la primera señal de reconocimiento y permite la entrada de HFMA a sus células, generando respuestas de defensa a niveles suficientemente bajos para no impedir el ingreso del hongo. Sin embargo, aún se desconoce si HFMA generan señales que facilitan el debilitamiento de las respuestas de defensa de la planta.

### **2.15 Ventajas de las micorrizas en los agroecosistemas**

En los ecosistemas y agroecosistemas, los HMA, son de gran importancia debido a que mediante la simbiosis las plantas pueden obtener nutrientes minerales del suelo, mejorar su tolerancia a estreses bióticos y abióticos, reducir competencia entre plantas mediante la transferencia de

carbono a través de la red de hifas extraradical (Simard y Durall, 2004) y modular la diversidad y productividad de plantas (Van Der Heijden *et al.*, 1998). Dado que la simbiosis es un proceso recíproco planta-hongo, es importante conocer también el papel de la comunidad de plantas en la estructura y diversidad de la comunidad de HMA (Burrows y Pflieger, 2002). Los beneficios de la simbiosis en el hospedero se observan en supervivencia, productividad (cantidad y calidad) (Goverde *et al.*, 2000), morfología de planta y capacidad reproductiva (Xiaohong y Koide, 1994). Diferencias en crecimiento micelial y estrategias de toma de fósforo observadas entre especies de HMA pueden jugar un papel importante (Smith *et al.*, 2000), y podría incluso significar que una amplia diversidad de HMA, puede estar relacionada con un incremento en la eficiencia de extracción de nutrientes y por lo tanto en los beneficios al hospedero (Kernaghan, 2005) y explicaría la presencia de diversos HMA en suelos y en raíces (Lodge, 2000).

La fisiología de la planta micorrizada cambia completamente cuando se asocia al hongo. Mediante el micelio externo, el contacto entre las raíces y el medio se incrementa considerablemente. La inoculación con hongos formadores de micorrizas son conocidos por incrementar el crecimiento de muchas especies de plantas. Es atribuido un incremento en la toma de nutrientes, especialmente los de difusión limitada tales como: P, Zn, Cu, etc.; producción de sustancias promotoras de crecimientos, tolerancia a estrés hídricos; salinidad, estrés por trasplante; resistencia a plantas por fitopatógenos e interacción sinérgica con otros microorganismos benéficos del suelo (Boby, et

al; 2008). Las plantas micorrizadas crecen mejor que las no micorrizadas en suelos infértiles, por producir un incremento en la nutrición mineral a través de las hifas, quienes ayudan a explorar un mayor volumen de suelo que los pelos radiculares de las mismas plantas (Rajan et al., 2000). El incremento en la nutrición mineral aumenta los contenidos de clorofilas y como consecuencia una alta tasa fotosintética (Feng et al., 2002). Los HMA interactúan con una amplia diversidad de microorganismos del suelo en las raíces, en la rizosfera y en la masa del suelo. La interacción puede inhibir o estimular, aunque estos hongos no pueden fijar biológicamente el nitrógeno atmosférico, incrementan la fijación de este compuesto porque interactúan positivamente con los fijadores de nitrógenos (Barea et al., 1992). Combinación de inoculación de hongos micorrízicos con microorganismos solubilizadores de fosfatos produce una mayor absorción de nitrógeno y fósforo e incrementa la producción de las plantas en suelos deficientes con nutrientes (Singh y Kapoor, 1999).

### **2.16 Factores que afectan la colonización de micorrizas en campo**

Entre los múltiples factores bióticos y abióticos que afectan la composición de las comunidades de HMA, la estructura de la comunidad de plantas es determinante debido a su preferencia por HMA (Kernaghan, 2005). La estructura y función de comunidades de micorrizas también puede variar con la edad de la planta, especialmente en especies perennes o semiperennes, y se ha encontrado, empleando métodos moleculares de evaluación, que los HMA dominantes en plántulas recién germinadas de especies forestales tropicales eran reemplazadas por otros tipos de HMA al realizar evaluaciones un año más

tarde, más aún, plantas de diferentes edades en un mismo sitio, presentaban diferentes comunidades de HMA asociadas a ellas (Husband et al., 2002).

En condiciones de campo, plantas micorrizadas sometidas a estrés hídrico muestran mejores respuestas a irrigación post estrés en producción y biomasa, que plantas no micorrizadas. Los mecanismos asociados al incremento en tolerancia al estrés hídrico de plantas micorrizadas están relacionados con el incremento en toma de agua por las hifas, alteración de niveles de hormonas que producen cambios en conductancia estomatal (Drüge y Schönbeck, 1992) Sánchez (1999), mejoramiento nutricional del hospedero (Johnson y Hummel, 1985) y mejoramiento de la recuperación de la planta después del estrés manteniendo un continuo raíz-suelo (Sweatt y Davies, 1984). Los efectos del exceso de agua de los suelos sobre HMA, no se han sido evaluados ampliamente, aunque se ha encontrado asociación micorrícica en plantas acuáticas y de zonas inundadas (Dhillion y Ampornpan, 1992) con excepción de aquellas pertenecientes a las familias Cyperaceae y Juncaceae. El efecto de la compactación del suelo se refleja en características del suelo como la estructura, porosidad, potencial hídrico, susceptibilidad a la erosión y crecimiento de la planta, especialmente del sistema radicular (Horn y Lebert, 1994) con cambios en longitud de raíz, peso seco, toma de Pi y capacidad de formación de micorriza con *Gigaspora margarita*, que se refleja en el crecimiento de *Cajanus cajan* (Yano et al., 1998). Otro factor físico que afecta el

funcionamiento de las micorrizas arbusculares, es la intensidad del pastoreo producidos por animales herbívoros.

El efecto de la compactación del suelo se refleja en características del suelo como la estructura, porosidad, potencial hídrico, susceptibilidad a la erosión y crecimiento de la planta, especialmente del sistema radicular (Horn y Lebert, 1994) con cambios en longitud de raíz, peso seco, toma de Pi y capacidad de formación de micorriza con *Gigaspora margarita*, que se refleja en el crecimiento de *Cajanus cajan* (Yano et al., 1998). Otro factor físico que afecta el funcionamiento de las micorrizas arbusculares, es la intensidad del pastoreo producidos por animales herbívoros.

Perez y Fuentes (2009), encontraron que en el proceso de modelación logística de la densidad poblacional de HMA en función de parámetros físico-químicos; los factores que mejor explican el fenómeno de la esporulación de hongos formadores de micorrizas asociados en rizósfera de pasto colosoana fueron el pH y el Potasio. Estudios realizados por Pérez y Peroza, (2010), para establecer relación entre el proceso de esporulación y colonización de HMA asociados al pasto angletón en función a factores físico-químico y de salinidad de los suelos de fincas ganaderas del municipio de Tolú-Colombia, determinaron varios modelos matemáticos para predecir dichos procesos. Los resultados obtenidos a través de modelos matemáticos construidos para densidad poblacional de esporas de HMA en función de parámetros físico-químicos, indican que la abundancia de esporas de HMA en los suelos está directamente relacionada a la concentración de los elementos intercambiables

de magnesio (Mg), sodio (Na) y de los valores de densidad aparente (Da) e inversamente relacionada a los valores de Cobre (Cu) y Manganeso (Mn). La colonización de HMA está directamente relacionada a los valores de los elementos intercambiables de potasio (K) y sodio (Na), de zinc (Zn) y del porcentaje de hidrogeno en los suelos e inversa a los valores de los elementos de Ca y Mg intercambiable.

Mientras que los modelos matemáticos construidos para densidad poblacional de esporas de HMA en función de salinidad, indican que la salinidad interfiere directamente con el número de espora de esporas de HMA en los suelos en presencia de parámetros como pH, SO<sub>4</sub>, magnesio (Mg), sodio (Na), porcentaje de sodio intercambiable (PSI) y el porcentaje de sodio en partes por mil (S/00) e inversamente relacionada a la conductividad eléctrica (CEE) y la colonización de estos HMA en raíces está directamente relacionada a los valores de los elementos intercambiables de potasio (K) y sodio (Na), de zinc (Zn) y del porcentaje de hidrogeno en los suelos e inversa a los valores de los elementos de Ca y Mg intercambiable (Pérez y Peroza, 2010).

### **2.17 Poblaciones de HMA en ecosistemas naturales**

Existe muy poca información de los HMA en ecosistemas naturales, sin embargo han surgido evidencias de que la diversidad es mayor que la que se ha inferido a partir de estudios morfológicos de esporas. Las poblaciones en diferentes ecosistemas, sobre la base de conteo de esporas, varían entre 5 y 25 especies diferentes. Este número depende de las especies hospederas involucradas. El numero de esporas no siempre esta bien correlacionado con el

grado de formación micorrizal (Brundrett, 1991) y su porcentaje de germinación varia en diferentes tiempos del año (Gemma et al., 1989).

La composición de una especie de HMA puede ser explicada como una respuesta a los cambios en la comunidad de plantas, ya que la naturaleza obligada de los simbioses de HMA une el crecimiento y la reproducción tanto de la planta hospedera como del hongo a las condiciones del suelo (Hendrix et al., 1995). En estudios de campo se ha mostrado que la secuencia de cosechas modifica la comunidad de HMA y la composición de especies. La predominancia de una sola especie de HMA para cada cosecha se desarrolla en secuencias continuas de maíz y soya (Johnson et al., 1991), favoreciendo las especies benéficas para la cosecha y reduciendo la población de especies de HMA menos benéficas (Johnson et al., 1992 a).

Cuando los ecosistemas son perturbados, por ejemplo por monocultivos o por utilización de pesticidas la dinámica de la comunidad es perturbada y se puede desarrollar un sesgo hacia pocos e incluso un hongo dominante (Johnson et al., 1992 a).

Aunque los estudios poblacionales de hongos micorrizales de MA están basados en caracteres morfológicos de los cuerpos fructificantes, esporas, micelios vegetativos o estructuras simbióticas, la aproximación es todavía limitada dado que los factores que influyen la esporulación de una especie individual son poco entendidos y no pueden ser extrapolados hasta la extensión de colonización vegetativa de diferentes especies de plantas. Las poblaciones de esporas proveen solo una indicación relativa de la abundancia y la

composición de especies de poblaciones fungales de MA sin embargo los estudios moleculares de la diversidad de los hongos (Van Tuinen et al., 1994) en ecosistemas naturales pueden ofrecer un mejor medio de identificación para información sobre poblaciones, especialmente cuando es difícil acumular un número suficiente de características morfológicas.

La ocurrencia de muchas especies de HMA en suelos o dentro de raíces sugiere, que la competencia interespecífica es posible. La variación en la producción de esporas entre endófitos coexistentes ha sido observada (Gemma et al., 1989) y una abundante producción de esporas por un HMA era usualmente correlacionada con niveles más bajos de producción de esporas por otros. Esto puede deberse al antagonismo entre las especies.

### **2.18 Métodos de estudio de diversidad de HMA**

Los métodos convencionales para estudiar las comunidades y poblaciones de naturales de HMA están basados en la identificación de esporas asexuales provenientes de suelo. La taxonomía de HMA está ampliamente basada en caracteres morfológicos de las esporas, con algunas excepciones (Öpik, 2004). Los estados de carácter morfológicos cambian el curso de desarrollo de las esporas lo que comúnmente complica la identificación de especímenes en campo. Más aún la presencia de esporas en el suelo no siempre coincide con la colonización fungal de raíces pero la morfología de las estructuras fungales intrarradiculares permite la identificación, en el mejor de los casos, hasta nivel de familia. Esta identificación tan primaria pone los límites en cuanto al estudio taxonómico de los HMA (Öpik, 2004).



Un factor importante que afecta los estudios de los hongos micorrícicos arbusculares incluyendo la taxonomía, es su naturaleza biotrofica obligada; hasta ahora no han sido cultivados en ausencia de un hospedero. Aunque hace falta el cultivo axénico, es posible que crezcan en un cultivo esteril con raíces de plantas o con los llamados pelos radiculares transformados con *agrobacterium rhizogenes* (Becard y Fortín, 1988).

### **III. MATERIALES Y METODOS**

El estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos en el Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Saltillo, Coahuila, México (25 ° 23 'de latitud norte y 101 ° 02' de longitud oeste).

#### **3.1 Muestreo de suelos y análisis fisicoquímico**

Dos muestreos de suelo y raíces se realizaron en una hectárea en cada uno de los campos tanto de TS y TC, en diciembre de 2012 en Arteaga, Coahuila, México (25° 20' 56.35" N, 100° 40' 45.84" O y 25° 23' 23,63" N, 100° 37' 33,97" O para TS y TC, respectivamente), utilizando el método de zig-zag. Un total de 20 muestras de 1 kg de cada campo fueron colectados a una profundidad de 0-30 cm (ICA, 1992), se mezclaron para formar una muestra compuesta para el análisis de suelo y caracterización de HMA. El análisis de suelo incluyó: determinación del contenido de materia orgánica utilizando el método Walkley and Black (Bornemisza, 1979), N por el método de Kjeldhal (Bremner, 1960), P (Olsen, 1954), K (espectrofotometría de absorción atómica), pH (relación suelo: agua, 2:4) y textura (Bouyoucos, 1936).

### **3.2 Extracción, conteo y morfología de las esporas de hongos micorrícicos arbusculares**

La extracción de esporas se realizó a partir de una muestra de suelo (100 g) utilizando el método de tamizado húmedo (tamices No. 50  $\mu\text{m}$ , 400  $\mu\text{m}$ , y 325  $\mu\text{m}$  y decantación (Gerderman y Nicolson, 1963), seguido por centrifugación en un gradiente de sacarosa 2 M a 3500 rpm durante 5 min. Las esporas sujetas a centrifugación fueron las retenidas por el tamiz de 325  $\mu\text{m}$ . Una vez que se recuperó la muestra de esporas limpias se contaron usando un microscopio estereoscópico y agrupado por su morfología (forma, color y tamaño). La forma de esporas y el color se determinó de acuerdo a la descripción proporcionada por INVAM (2014). El tamaño de las esporas se midió en un microscopio (Axio Scope A1, Carl Zeiss, Microscopy GmbH, Gottingen, Germany) con cámara integrada (AxioCam Icc 1) a 10 X en un portaobjetos con 100 esporas de rasgos comparables, añadiendo 3 gotas de solución Hoyer-yodo; los datos fueron procesados con el software Axion Visión Release 4.8.2.

### **3.3 Establecimiento del cultivo monosporico**

Los morfotipos anteriormente agrupados se propagaron durante 8 meses (dos ciclos de cultivo) en plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) mediante cultivos de una sola espora para su análisis preciso dado que generalmente las esporas obtenidas directamente del campo están dañadas y son difíciles de caracterizar con precisión (Guadarrama et al., 2014). En el cuarto mes, a las plantas se le cortó la base del tallo para inducir la producción de esporas

(Carreón Abud-et al 2013, Hernández-Cuevas y García-Sánchez, 2008), en el mismo tiempo se colocó una semilla de trigo por maceta con el fin de dar al HMA más tiempo para esporular. Para asegurarse de que sólo el morfotipo aislado fuera propagado, el suelo (arena) se esterilizó tres veces en un autoclave a 15 psi / 30 minutos previo al cultivo. El suelo estéril se colocó en macetas de 1L y los morfotipos se inocularon con 10 repeticiones (i. e. 10 cultivos monospóricos morfotipo-trigo). La inoculación se realizó colocando una espora en la raíz lateral de trigo con un microscopio estereoscópico y una micropipeta. Las macetas se cubrieron con bolsas de celofán transparente para evitar la contaminación y se colocaron en el invernadero con las más altas condiciones higiénicas. El cultivo monospórico se fertilizó con una solución nutritiva (Steiner, 1973) con el fósforo en 20% y el pH se mantuvo en 7-7,5. Después de seis meses, el riego se suspendió hasta el octavo mes y las plantas fueron cortadas desde la base del tallo como se mencionó anteriormente.

### **3.4 Caracterización morfológica de HMA que establecieron colonización con plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.)**

La extracción y el recuento de esporas, así como mediciones de diámetro ecuatorial y meridional y la determinación del color se llevaron a cabo como se indicó anteriormente; Además, se midió el espesor y número de capas de la pared de las esporas en portaobjetos con 100 esporas fraccionadas por morfotipo añadiendo 3 gotas de solución Hoyer – yodo.

La limpieza y teñido de las raíces se llevó a cabo de acuerdo con Walker

(2005), y la determinación de la colonización según McGonigle et al. (1990).

### **3.5 El análisis estadístico**

El diámetro ecuatorial, meridional, la colonización y el espesor de la pared de la espora se analizaron con ANOVA y comparación de medias de acuerdo con el procedimiento de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) utilizando SAS (Statistical Analysis System v. 9.00).

## IV. RESULTADOS

En el Cuadro 1 se muestran las propiedades fisicoquímicas del suelo sobre el que se desarrolló tomatillo silvestre (TS) y tomatillo cultivado (TC). Los sitios experimentales tuvieron un suelo alcalino y rico en materia orgánica; sin embargo, el suelo sobre el que se recogió TS, que se cultiva bajo condiciones edáficas naturales, mostró una menor concentración de nutrientes, en comparación con el suelo de TC.

**Cuadro 1.** Análisis físico-químico del suelo de los sitios experimentales en las que se desarrollaron (TS) y (TC).

	Materia Orgánica %	Nitrogeno %	Fosforo ppm	Potasio ppm	pH	Textura
TC	4.5	0.22	40.3	450	8.6	
Classificación	ER	MR	M	R	AF	Arcilla
TS	3.7	0.16	18.7	210	8.5	
Classificación	R	M	MP	MR	AF	Migajon Arcillo Arenoso

E.R =extremadamente rico, R= rico M.R= medianamente rico, M= mediano, M.P= medianamente pobre, A.F= alcalinidad fuerte, TC=tomatillo cultivado, TS= tomatillo silvestre.

### La diversidad morfológica de AMF

La diversidad morfológica de HMA recuperadas de muestras de suelo asociado con TC brindó nueve morfotipos (Cuadro 2), todos ellos con esporas de forma globosa-subglobosa y diferentes tonalidades de rojo; el diámetro

ecuatorial - meridional de las esporas variaron desde 110 hasta 201 micras y 116 a 190 micras, respectivamente. Los morfotipos D7 y D4 tuvieron el mayor diámetro, seguido por C5, C9 y C2. El diámetro más pequeño fue el de las esporas de D6. A pesar de que el análisis estadístico no indicó diferencias en el diámetro de esporas entre C7 y C4 y C5 entre, C9 y C2, existía una diferencia en el color de estas.

**Cuadro 2. La diversidad morfológica de los hongos micorrícicos asociadas al tomate de cáscara casero (*Physalis ixocarpa* cv. Rendidora).**

Morfotipos	Color	Forma	Díametro ecuatorial μm	Díametro meridional μm
C1	0-20-60-0	Globosa-Subglobosa	123cd	126ed
C2	0-50-60-0	Globosa-Subglobosa	146b	154cb
C3	0-50-60-0	Globosa-Subglobosa	140cb	144cd
C4	0-20-60-0	Globosa-Subglobosa	184a	188a
C5	0-20-60-0	Globosa-Subglobosa	158b	166b
C6	0-20-60-0	Globosal-Subglobosa	100e	117e
C7	0-50-60-0	Globosa-Subglobosa	202a	190a
C8	20-80-100-0	Globosa-Subglobosa	117ed	121e
C9	20-80-100-0	Globosa-Subglobosa	153b	151cb

C= cultivado 0-20-60-0= red- brown, 0-50-60-0=reddish-orange, 20-80-100-0= red- Brown (INVAM,2014), promedios con la misma letra indica diferencia no significativa (Tukey's 0.05).

**Diversidad morfológica de los hongos micorrícicos asociados al tomatillo silvestre (*Physalis ixocarpa*).**

El número total de esporas de hongos micorrícicos arbusculares asociados a las plantas de tomatillo silvestre en 100 g de suelo fue de 2034. En TS, resultaron 12 morfotipo (Cuadro 3) con esporas globosas- subglobosas y diferentes tonalidades de color de rojo y naranja; el diámetro ecuatorial-meridional de las esporas variaron desde 120 hasta 249 micras y 104 a 237 micras, respectivamente. El análisis estadístico arrojó diferencias en el diámetro entre morfotipos de esporas, además también se observaron diferencias en el color de las esporas como entre S1 y S4 por ejemplo (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Diversidad morfológica de hongos micorrícicos arbusculares asociados a tomatillo silvestre (TS).

Morfotipos	Color	Forma	Diámetro ecuatorial	Diametro meridional
S1	20-80-100-0	Globosa-Subglobosa	150f	149f
S2	0-10-90-5	Globosa-Subglobosa	123i	135g
S3	0-60-100-10	Globosa-Subglobosa	187b	164ed
S4	0-60-100-10	Globosa-Subglobosa	152f	174cb
S5	0-10-60-0	Globosa-Subglobosa	120i	118i
S6	0-10-90-5	Globosa-Subglobosa	164e	163e
S7	0-60-100-10	Globosa-Subglobosa	95j	104j
S8	20-80-100-0	Global-Subglobal	132h	127h
S9	0-50-60-0	Global-Subglobal	249a	238a
S10	0-20-60-0	Global-Subglobal	180c	176b
S11	0-60-100-10	Global-Subglobal	174d	169cd
S12	0-60-100-10	Global-Subglobal	139g	139g

20-80-100-0=red-brown, 0-10-90-5=orange, 0-60-100-10=orange brown, 0-10-60-0=pale orange-yellow, 0-50-60-0=reddish-orange, 0-20-60-0=red brown, promedios con la misma letra indica diferencia no significativa (Tukey's 0.05).

Morfotipos C7 y S 9 obtenida de plantaciones cultivadas y silvestres de tomatillo, respectivamente, exhibieron tamaño de las esporas comparable y color, que sugiere que puede ser, de hecho, el mismo morfotipo.

Caracterización de aislados de micorrizas que establecieron simbiosis en plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.)

Diez de los 12 y dos de los 9 morfotipos colectados en TS y TC, respectivamente, fueron capaces de establecer simbiosis con las plantas de trigo (Tabla 4) en cultivo en maceta.



**Cuadro 4.** Caracterización morfológica de aislados de HMA.

M	DE $\mu\text{m}$	DM $\mu\text{m}$	Forma	EPE $\mu\text{m}$	Color	NC	V/A	Colonización %
TS1	140bdc	136edc	Globosa- Subglobosa	9.2bc	0-60-100- 10	2	Yes	57.8a
TS2	123dc	129ed	Globosa- Subglobosa	10.7ba	0-60-100- 10	1	Yes	41.0bac
TS3	163ba	164bac	Globosa- Subglobosa	8.8bc	0-60-100- 10	1	Yes	33.9bc
TS4	150bac	196 <sup>a</sup>	Globosa- Subglobosa	12.6a	0-60-100- 10	1	Yes	32.7bc
TS5	123dc	131ed	Globosa- Subglobosa	10.8ba	0-10-60-0	1	Yes	34.5bc
TS6	167ba	170ba	Globosa- Subglobosa	9.4bac	0-10-90-5	1	Yes	41.5bac
TS7	108d	112e	Globosa- Subglobosa	7.0c	0-0-40-0	1	Yes	31.7bc
TS9	183a	172ba	Globosa- Subglobosa	9.5bac	0-50-60-0	1	Yes	46.0bac
TS10	170ba	173ba	Globosa- Subglobosa	12.8a	0-20-60-0	1	Yes	42.8bac
TS11	152bac	156bdc	Globosa- Subglobosa	9.4bac	0-10-90-5	1	Yes	27.16c
C2	145bdac	155bdc	Globosa- Subglobosa	8.0bc	0-50-60-0	1	Yes	47.2ba
C5	158bac	166bac	Globosa- Subglobosa	9.0bc	0-20-60-0	1	Yes	43.0bac

M= morfotipos, S1=silvestre uno, S2=silvestre dos, S3=silvestre tres, S4=silvestre cuatro, S5=silvestre cinco, S6=silvestre seis, S7=silvestre siete, S9=silvestre nueve, S10=silvestre diez, S11=silvestre once, C2=cultivado dos, C5=cultivado cinco, D.E= diámetro ecuatorial, D.M= diámetro meridional, EPE=espesor pared esporal, NC= número de capas, V= vesícula, A= arbusculo, 0-50-60-0=reddish-orange, 0-20-60-0=red-brown, 0-10-90-5=orange, 0-60-100-10=orange- Brown, 0-10-60-0=pale orange-yellow, 0-040-0=pale yellow (INVAM,2014), promedios con la misma letra indica diferencia no significativa (Tukey's 0.05).

De acuerdo con la caracterización morfológica de los HMA que establecieron simbiosis con las plantas de trigo, todos los morfotipos eran diferentes. Las esporas de S9 tuvieron el mayor diámetro ecuatorial mientras que S4 el mayor diámetro meridional, el color de esporas más frecuente era de color naranja-marrón (0-60-100-10), y la tasa de colonización más alto fue en

S1 mientras S11 el más bajo. Once de los 12 morfotipos exhibieron una capa de esporas excepto por S1 con dos capas y todos ellos presentaron vesículas, arbúsculo y forma globosa-subglobosa.

## **V. DISCUSIÓN**

En el presente estudio, hemos detectado que TS exhibió una mayor diversidad de HMA en comparación TC en la región del espectro muestral, esto probablemente debido a que la agricultura intensiva en el tomatillo cultivado puede crear condiciones ambientales adversas debido a los regímenes de labranza, riqueza mineral del suelo y la eliminación de la diversidad de plantas hospederas anuales, lo que lleva hacia una adaptabilidad inferior a competir por recursos limitados. En contraste, los HMA adaptados a los ecosistemas naturales y el suministro de nutrientes limitados, tienen una mayor capacidad para la colonización rápida. Esto significa una complementariedad funcional más baja de las comunidades de HMA en los sistemas agrícolas que en los ecosistemas naturales (Verbruggen y Toby Kiers, 2010). La mayor diversidad en HMA detectado en TS fue probablemente asociado con la fertilidad del suelo más bajo en el que se desarrolló presentando un menor contenido de materia orgánica, nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K). Las prácticas agrícolas tales como la eliminación de los bosques, el fuego, la fertilización y la labranza (Jansa et al., 2003) e indirectamente el microclima y la topografía afectan a la comunidad de plantas y por lo tanto las comunidades de HMA (Kernaghan, 2005).

Entre los factores abióticos, las condiciones del suelo han demostrado ejercer un control sobre las comunidades HMA (Johnson et al., 1992). Una fertilización alta N en suelos ricos en P disminuye la abundancia y diversidad de la comunidad de la AMF (Egerton-Warburton et al., 2007). Los modelos matemáticos desarrollados para la densidad de población de esporas de HMA en respuesta a la salinidad han demostrado que interfiere directamente con el número de esporas de HMA mientras que la colonización de la raíz está directamente relacionada con la concentración de K intercambiable del suelo y de sodio (Pérez y Peroza, 2010).

Nuestros resultados coinciden con estas declaraciones como el suelo sobre el que se desarrollo TS contenía una menor concentración K en comparación con el suelo sobre el que se cultivo TC, lo que pudo derivar en la detección de una mayor diversidad y abundancia de esporas de HMA. La materia orgánica del suelo y pH son parámetros que afectan a la composición de la flora de HMA; en Colombia por ejemplo, una mayor abundancia y diversidad de la HMA se asoció a suelos según su pH (Serralde y Ramírez, 2004).

En el presente estudio, hemos detectado que los morfotipos de HMA asociados con TS establecieron simbiosis más exitosamente en comparación con TC al ser expuestas en un suelo y un hospedero al que no está habituados; en este sentido, Kernaghan et al. (2005) indicaron que la comunidad vegetal es determinante debido a su preferencia por un determinado HMA. Otros autores indican que los compuestos que permiten el reconocimiento de la planta-hongo

y estimulan la germinación de esporas, el crecimiento y la ramificación de las hifas, incluyendo flavonoides (Vierheilig y Piché, 2002) y strigolactona (Akiyama et al., 2005), se extruyen por la raíz (Akiyama et al., 2005), que, en cierta medida, puede controlar la preferencia planta-hongo (Horan y Chilvers, 1990) y puede ser un factor clave en los morfotipos que fueron capaces de establecer una simbiosis con las plantas de trigo.

## **VI. CONCLUSIONES**

Las características físico- químicas del suelo donde se desarrolló tomatillo silvestre presenta mayor contenido de nutrientes que el suelo de tomatillo cultivado.

Se detectaron un total de 21 morfotipos de HMA en tomate de cáscara, sin embargo, se encontró un mayor número de morfotipos en el suelo asociado con el tipo de tomate de cáscara silvestre en comparación con el tipo cultivado. Los morfotipos aislados del suelo donde se desarrolló tomatillo silvestre mostraron una mayor capacidad para el establecimiento de nuevas simbiosis, incluso siendo transferidos a un hábitat diferente (en condiciones de cultivo en maceta, con trigo como hospedero).

## **VII. ARTÍCULO**

**Diversity and morphological characterization of native mycorrhizal fungi associated with husk tomato (*Physalis ixocarpa* Brot) in Arteaga, Coahuila, México.**

**Diversity and morphological characterization of native mycorrhizal fungi associated with husk tomato (*Physalis ixocarpa* Brot) in Arteaga, Coahuila, México.**

**Flor S. Hernández-Hernández<sup>1</sup>, Rosalinda Mendoza Villarreal<sup>2\*</sup>, Valentín Robledo-Torres<sup>2</sup>, Adrien Gallou<sup>3</sup>, Antonio Cárdenas-Flores<sup>4</sup>, Luis A. Valdez-Aguilar<sup>2</sup>**

**<sup>1</sup>Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.**

**<sup>2</sup>Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.**

**<sup>3</sup>Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, Tecomán, Colima, México.**

**<sup>4</sup>Departamento de Agroplásticos. Centro de Investigación de Química Aplicada,**

**Saltillo, Coahuila, México.**

**\*Corresponding author: [rosalinda.mendoza@uaaan.com](mailto:rosalinda.mendoza@uaaan.com)**

**Keywords:** color; diameter; morphotypes; spore; symbiosis; wheat.

**Abbreviations:** AMF\_ Arbuscular mycorrhizal fungi, ER\_ Extremely rich, DHT\_ domesticated tomato, D2\_ Morphotype two domesticated tomato, D5\_ Morphotype five domesticated tomato, M\_ Moderate, MP\_ Moderately poor, MR\_ Moderately rich, R\_ Rich, SA\_ Strongly alkaline, W1\_ Morphotype one wild tomato, W2\_ Morphotype two wild tomato, W3\_ Morphotype three wild tomato, W4\_ Morphotype four wild tomato, W5\_ Morphotype five wild tomato, W6\_ Morphotype six wild tomato, W7\_ Morphotype seven wild tomato, W9\_ Morphotype nine wild tomato, W10\_ Morphotype ten wild tomato, W11\_ Morphotype eleven wild tomato, WHT\_ Wild tomato.

### **Abstract**

To assess the diversity and to characterize morphologically the mycorrhizal fungi associated with wild and domesticated husk tomato plants cultivated in Arteaga, Coahuila, soil sampling was performed by the zigzag method at a depth of 30 cm; Spores were extracted and characterized considering their shape, color and size to establish a monosporic culture in wheat plants to ensure an accurate characterization; for this, diameter, shape, number of layers, color, thickness, percentage of colonization, presence and / or absence of vesicles and arbuscules were evaluated. According to the



classification of spores, 12 morphotypes from wild husk tomato and nine from the domesticated husk tomato were inoculated. Ten out of the 12 wild husk tomato morphotypes (W1, W2, W3, W4, W5, W6, W7, W9, W10 and W11) and two out of the nine domesticated husk tomato morphotypes (D2 and D5) established symbiosis in wheat plants. Morphotype W1 had the highest colonization (57.81%) followed by D2 (47.2%) and W9 (43.08%); the lowest colonization was observed in morphotype W11 (27.16%). The wild and domesticated morphotypes were similar in shape, presence of vesicle and arbuscle, whereas in all the morphotypes there was one spore layer, except for W1 that had two. Spore diameters ranged from 107 to 196  $\mu\text{m}$  and thickness from 7 to 12.8  $\mu\text{m}$ . Most frequent spore color was the orange brown (0-60-100-10). The soil in wild husk tomato contained more morphotypes and had a greater potential inoculum than the ones from the domesticated husk tomato.

### **Introduction**

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF): *Glomeromycota* (Schüßler *et al.*, 2001) form symbiotic associations with most of terrestrial plants in almost any ecosystem (Smith and Read, 2008). Mycorrhizal associations are of utmost importance as they provide the plants with mineral nutrients, improve the tolerance to biotic and abiotic stress, and

decrease plant competition due to the transference of carbon through the extraradical hyphae net (Simard and Durall, 2004). As symbiosis is a plant-fungi reciprocal process, it is essential to determine the role of the community of plants in the structure and diversity of the AMF community (Burrows and Pfleger, 2002). The compatibility of

plants with AMF depends on specific genetic and biochemical signals at all the stages of the symbiosis development that allow the recognition, colonization and nutrient exchange (Kogel, 2008). The AMF-plant symbiosis requires recognition and harmonization processes in space and time quite complex, leading to the establishing of the symbiosis (Harrison, 2005; Requena *et al.*, 2007). In México, most of the research about AMF associations has been performed in agricultural field and are focused to the response of plants to the symbiotic association, neglecting the origin and identity of the AMF as a part of the study (Varela and Trejo, 2001). The actual relationship, either strong (Hijri *et al.*, 2006) or weak (Carvalho *et al.*, 2003), between soil properties and the distribution of AMF species under field conditions is little known. Comparing AMF diversity among

disturbed and undisturbed sites seems to indicate that the diversity of AMF and with the number of mycorrhizal propagules diminish with increasing disturbance (Stahl *et al.*, 1988), hence some AMF species may be more susceptible to soil disturbance than others. Diversity of AMF has been related to plant diversity as stated by Anderson *et al.* (1984) but other authors have found no such relationship (Kurle and Pflieger, 1996). The use of molecular tools can reveal the high diversity of fungi that can form mycorrhizal associations, allowing the classification of such associations; however, some molecular data do not reveal all the information required, so that it is necessary to concurrently use the morphology of the fungi based in the study of structural traits (Beck *et al.*, 2007). The objective of the present study was to assess the diversity and to

characterize the morphology of native mycorrhizal fungi associated with wild husk tomato populations located in Arteaga, Coahuila, México, and to compare them with those associated with a domesticated husk tomato type.

## Results

### Physicochemical soil analysis

Physicochemical properties of the soil on which the wild (WHT) and domesticated (DHT) husk tomato types were cultivated are shown in Table 1. The experimental sites had an alkaline and rich in organic matter soil; however, the soil on which the WHT was collected, grown under natural edafic conditions, showed a lower concentration of nutrients, compared to the soil for the DHT.

### Morphological diversity of AMF

Morphological diversity of AMF associated with DHT resulted in nine morphotypes (Table 2), all of them with spores of global-sub global shape and different hues of red color; equatorial and meridional diameter of the spores ranged from 110 to 201  $\mu\text{m}$  and 116 to 190  $\mu\text{m}$ , respectively. Morphotypes D7 and D4 had the highest diameter, followed by D5, D9 and D2. The smallest diameter was for the spores of D6. Even though statistical analysis indicated no differences in spore diameter between D7 and D4 and among D5, D9 and D2, there existed a difference in the color of the spores (Table 2).

In WHT, morphological diversity resulted in 12 morphotypes (Table 3) with global-sub global spores and different hues of red and orange color; equatorial and meridional diameter of

the spores ranged from 120 to 249  $\mu\text{m}$  and 104 to 237  $\mu\text{m}$ , respectively. As for DHT, the statistical analysis indicated no differences in spore diameter between some morphotypes, as between W4 and W1 and between D2 and W5; similar to the DHT morphotypes, there existed a difference in the color of the spores (Table 3). Morphotypes D7 and W9 collected from domesticated and wild husk tomato plantations, respectively, exhibited comparable spore size and color, suggesting that they may be in fact the same morphotype.

Characterization of mycorrhizal isolates that set symbiosis with wheat plants  
Ten out of the 12 and two out of the 9 morphotypes collected in WHT and DHT, respectively, were able to establish symbiosis with wheat plants (Table 4). According to the

morphological characterization of the AMF that established symbiosis with wheat plants, all the morphotypes were different. Spores of W9 had the highest equatorial diameter whereas W4 the highest meridional diameter, the most frequent spore color was orange-brown (0-60-100-10), and the highest colonization rate was in W1 while W11 the lowest. Eleven out of the 12 morphotypes exhibited a spore layer except for W1 with two layers and all of them showed vesicles, arbuscle and global-subglobal form.

## **Discussion**

In the present study, we detected that WHT exhibited a higher AMF diversity than the DHT, probably because the intensive agriculture in the domesticated type may create unstable and unpredictable environmental conditions due to highly disturbing tillage regimes,

higher fluctuations in nutrient availability, and the elimination at large scale of annual host plants, leading towards a lower AMF adaptability to compete for limited resources. In contrast, the AMF adapted to natural ecosystems and limited nutrient supply, have a higher capacity for rapid colonization. This means a lower functional complementarity of AMF assemblages in agricultural systems than in natural ecosystems (Verbruggen and Toby Kiers, 2010).

The higher diversity in AMF detected in WHT was probably associated with the lower soil fertility on which it was grown as it presented a lower content of organic matter, nitrogen (N), phosphorus (P) and potassium (K). Agricultural practices such as forest removal, fire, fertilization and tillage (Jansa *et al.*, 2003) and indirectly the microclimate and topography affect the

community of plants and therefore the AMF communities (Kernaghan, 2005). Among the abiotic factors, soil conditions have shown to exert a control on AMF communities (Johnson *et al.*, 1992).

A high N fertilization in P-rich soils decreases the abundance and diversity of AMF community (Egerton-Warburton *et al.*, 2007). Mathematical models developed for population density of AMF spores in response to salinity have shown that it interferes directly with the number of AMF spores whereas root colonization is directly related with the concentration of soil exchangeable K and sodium (Pérez and Peroza, 2010). Our results are in agreement with these statements as the soil on which the WHT was grown contained a lower K concentration compared to the soil on

which the DHT was grown, resulting in a higher diversity and abundance of AMF spores.

Soil organic matter and pH are parameters that affect AMF composition; in Colombia, a higher abundance and diversity of AMF has been associated with acidic soils (Serralde and Ramírez, 2004).

In the present study, we detected that the morphotypes of AMF associated with WHT established a higher symbiosis compared with the DHT; (Kernaghan *et al.* 2005) indicated that the plant community is determinant due to its preference for a given AMF. Other authors indicate that the compounds that allow plant-fungus recognition and stimulate spore germination, growth and branching of hyphae, including flavonoids (Vierheilig and Piché, 2002) and strigolactona (Akiyama *et al.*,

2005), are extruded by the root (Akiyama *et al.*, 2005), which, at some extent, may control the preference plant-fungus (Horan and Chilvers, 1990) and may be a key factor in the morphotypes that were able to establish a symbiosis with wheat plants. Among abiotic factors, soil conditions have shown to play a role in the communities of AMF (Johnson *et al.*, 1992).

### **Materials and methods**

The study was conducted in the Laboratory of Tissue Culture in the Department of Horticultura at Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, in Saltillo, Coahuila, México (25° 23' N Latitude y 101° 02' west longitude).

Soil sampling and physicochemical analysis

Two soil and root samplings were performed in a 1 ha fields of each, the WHT and DHT, on December 2012 in Arteaga, Coahuila, México (25°20' 56.35" N latitude 100°40' 45.84" W longitude and 25°23' 23.63" N latitude 100°37' 33.97" West longitude for WHT and DHT, respectively) using the zig-zag method. A total of 20 1-kg soil samples from each field were drawn at 0-30 cm depth (ICA, 1992), and thoroughly mixed to form a composite sample for soil analysis and AMF characterization. Soil analysis included organic matter using the Walkley and Black method (Bornemisza, 1979), N with Kjeldhal's procedure (Bremner, 1960), P (Olsen, 1954), K (atomic absorption spectrometry), pH (soil:water 2:4) and texture (Bouyoucos, 1936).

Extraction, counting, and morphology of arbuscular mycorrhizal fungi spores

Spore extraction from a 100 g soil sample was conducted using the sieving and decanting method (Gerderman and Nicolson, 1963) followed by centrifugation in a 2 M sucrose gradient at 3500 rpm for 5 min. Once the clean spores sample was retrieved they were counted using a stereoscopic microscope and separated by their morphology (shape, color and size). Spore shape and color was determined according to the description provided by INVAM (2014). Spore size was measured in an optical microscope (Axio Scope A1, Carl Zeiss, Microscopy GmbH, Gottingen, Germany) with integrated camera (AxioCam Icc 1) at 10 X in a slide with 100 spores of comparable traits plus 3 drops of Hoyer-iodine solution added; data were processed with the software Axion Visión Release 4.8.2.

Establishment of monosporic cultura

The morphotypes previously grouped were propagated for 8 months (two growing cycles) on wheat plants (*Triticum aestivum* L.) as usually the spores obtained directly from the field are damaged and are difficult to be accurately characterized (Guadarrama *et al.*, 2014). In the fourth month, plants were cut at the base of the stem to induce spores production (Carreon-Abud *et al.* 2013, Hernandez-Cuevas and García-Sánchez, 2008) and one seed of wheat was placed per pot in order to give more time to the AMF to sporulate.

To make sure that only the spore of the morphotype isolated was being propagated, the soil was sterilized three times in an autoclave at 15 PSI / 30 minutes. Sterile soil was placed in styrofoam 1 L pots and the morphotypes were inoculated with 10 replications. Inoculation was performed by placing

one spore in the lateral root of wheat using a stereoscopic microscope and a micropipette. Pots were covered with transparent plastic sheet to prevent contamination and were placed in the greenhouse with highest aseptic conditions. The monosporic culture was fertilized with a nutrient solution (Steiner, 1973) with phosphorus at 20% and maintaining the pH at 7-7.5. After six months, watering was suspended until the eighth month and the plants were cut off from the stem base as mentioned above.

Morphological characterization of AMF morphotypes that established colonization with wheat plants

Spore extraction and counting, as well as equatorial and meridional diameter measurements, and color determination were conducted as indicated previously; in addition, the thickness and number of



layers of the spore wall were also measured in slides with 100 spores per morphotype fractionated by adding 3 drops of Hoyer – Iodine solution. Cleaning and dyeing of roots was conducted according to Walker (2005), and colonization arbuscule and vesicle presence according to McGonigle *et al.* (1990).

#### Statistical analysis

Equatorial and meridional diameter, colonization, and thickness of the spore wall were analyzed with ANOVA and mean comparison according to Tukey's procedure using SAS (Statistical Analysis System v. 9.00).

#### Conclusion

A total of 21 AMF morphotypes were detected in husk tomato, however, a higher number of morphotypes were found in the soil associated to the wild

husk tomato type compared to the domesticated type. The morphotypes isolated from the soil with the wild husk tomato exhibited a higher capacity for symbiosis establishment even if they were transferred to a different habitat. Morphotype W1 showed the highest colonization ability, therefore, it could be an isolate with potential agronomic application.

#### Acknowledgment

This project was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México.

#### References

Akiyama K, Matsuzaki KI, Hayashi H (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nat Resour J.*435:824–827

- Anderson R.C, A. E. Liberta and L.A Dickman (1984) Interaction of vascular plants and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi across a soil moisture- nutrient gradient. *Oecologia* (Berlin).64:111-117
- Beck A, Haug I, Oberwinkler F, Kottke I (2007) Structural characterization and molecular identification of arbuscular mycorrhiza morphotypes of *Alzatea verticillata* (Alzateaceae), a prominent tree in the tropical mountain rain forest of South Ecuador. *Mycorrhiza*.17:607-625
- Bouyoucos G.S (1936) Directions for making mechanical analysis of soil by hydrometer method. *Soil Sci*.4:225-228
- Bornemisza E (1979) Organic carbon determination by the Walkley-Black and dry combustion in surface soils and andept profiles from Costa Rica. *Soil Sci*.43:78-83
- Burrows, R.L, Pflieger FL (2002) Arbuscular mycorrhizal fungi respond to increasing plant diversity. *Can J Biochem Cell B*.80:120-130
- Bremner, J.M. (1960) Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method. *J.Agric. Sci*.55:11-33
- Carreón Abud-Y, Jerónimo Treviño-E, Beltrán-Nambo MA, Martínez-Trujillo M, Trejo Aguilar-D, Gavito ME (2013) Isolation and propagation of pure cultures of arbuscular mycorrhizal fungi from avocado orchards by the

- minirhizotron technique. *Revista Mexicana Micología*.37:29-39.  
In Spanish
- Carvalho L.M., Correia P.M., Ryel R.J. & Martins-Loução M.A (2003) Spatial variability of arbuscular mycorrhizal fungal spores in two natural plant communities. *Plant and Soil*.251:227-236
- Egerton-Warburton, L.M., Johnson, N.C., and Allen, E.B (2007) Mycorrhizal community dynamics following nitrogen fertilization: a cross-site test in five grasslands. *Ecol. Monogr*.77:527-544
- Gerderman, J; Nicholson, T (1963) Spores of mycorrhizal endogene species extracted from soil by wet sieving and decanting. *J. BMS*.46:235-244
- Guadarrama P, Castillo S, Ramos-Zapata JA, Hernández-Cuevas LV, Camargo-Ricalde SL. (2014) Arbuscular mycorrhizal fungal communities in changing environments: The effects of seasonality and anthropogenic disturbance in a seasonal dry forest. *Pedobiologia*.57:87-95
- Harrison, M.J. (2005) Signaling in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Annu Rev Microbiol*.59:19-42
- Hernández-Cuevas LV, García-Sánchez R (2008) Propagation by spores: the case of arbuscular mycorrhize In *Techniques for the study of the mycorrhizal associations and its implications in restoration: 29-42*. Edited by Álvarez-Sánchez J, Monroy-Ata A. Universidad Nacional

- Autónoma de México, México, DF. In Spanish
- Hijri I, Sykorova Z, Oehl F, Ineichen K, Mader P, Wiemken A, Redecker D (2006) Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Molecular Ecology*.15:2277–2289
- Horan, DP; Chilvers, GA (1990) Chemotropism the key to ectomycorrhizal formation. *New Phytol*.116:297-301
- ICA, Instituto Colombiano Agropecuario (1992) Fertilization de different crops. Fifth approximation. Manual of Technical Extension No. 25. Bogotá: ICA. In Spanish
- INVAM (International culture collection of VA mycorrhizal fungi). (In line). Viewed July 19, 2014. Available <http://invam.wvu.edu/the-fungi/species-descriptions>
- Johnson, N; Tilman, D.; Wedind D (1992) Plant and soil controls on mycorrhizal fungal communities. *Ecology*.73: 2034-2042
- Kernaghan G. (2005) Mycorrhizal diversity: Cause and effect *Pedobiologia*. 49: 511-520
- Kogel, K.H. (2008) Compatible Host–microbe Interactions: Mechanistic Studies Enabling Future Agronomical Solutions. *Plant Physiol*.165:1-8
- Kurle JE, Pflieger FL. (1996) Management influences on arbuscular mycorrhizal fungal species composition in a corn-soybean rotation. *A J*.88:155-161

- McGonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL, Swan JA (1990) A new method that gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*115:495–501
- Olsen, S. R., C. V. Cole, F. S. Watanabe and L. A. Dean (1954) Estimation of Available Phosphorus in Soils by Extraction with Sodium Bicarbonate. U. S. Department of Agriculture Circular No. 939.
- Banderis, A. D., D. H. Barter and K. Anderson. Agricultural and Advisor
- Peroza, C.V, Perez, C.A (2010) Effect of physical, chemical and salinity parameters on population density and arbuscular mycorrhize colonization and Angletón grass in Tolú Sucre, Colombia. *Rev. Colombiana Cienc. Anim.*2:312-324. In Spanish
- Requena N, Serrano E, Ocon A, Breuninger M (2007) Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry.*68:33-40
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C. (2001) A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research.*105:1413–1421
- Serralde O, A.M and M.M. Ramírez G (2004) Analysis of mycorrhizal populations in maize (*Zea mays*) cultivated in acid soils under varying agronomic treatments.

- Revista Corpoica.5:1-40. In Spanish
- Simard S, Durall D (2004) Mycorrhizal networks: a review of their extent, function and importance. *Can J Bot.*82:1140-65
- Smith S. E, Read D. R. (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd Edn. Amsterdam; New York; Boston: Academic Press
- Stahl P. D, Williams S. E. and Christensen M (1988) Efficacy of native vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after severe soil disturbance. *New Phytol.*110:347- 354
- Steiner, A.A. (1973) The selective capacity of tomato plants for ions in a nutrient solution. pp. 43-53. In: *Proceedings 3rd International Congress on Soils Culture*. Wageningen, The Netherlands
- Verbruggen, E,W.F.M. Röling, H.A. Gamper, G.A. Kowalchuk, H.A. Verhoef, and M.G.A. van der Heijden (2010) Positive effects of organic farming on below-ground mutualists: large- scale comparison of mycorrhizal fungal communities in agricultural soils. *New Phytol.*186:968-979
- Vierheilig H, Piché Y (2002) Signalling in arbuscular mycorrhiza: Facts and hypotheses, In: *Flavonoids in Cell Functions*, Eds. Buslig B, and Manthey J; Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York; p.23-39. ISBN 0-306-47254-6

Walker C (2005) A simple blue staining technique for arbuscular mycorrhizal and other root-inhabiting fungi. *Inoculum*.56:68-69

**Table 1.** Physicochemical soil analysis of the experimental sites on which the wild (WHT) and domesticated (DHT) husk tomato types were grown.

Type	Organic matter %	Nitrogen %	Phosphorus ppm	Potassium ppm	pH	Texture
DHT	4.5	0.22	40.3	450	8.6	
Classification	ER	MR	M	R	SA	Clay
WHT	3.7	0.16	18.7	210	8.5	
Classification	R	M	MP	MR	SA	Sandy Clay Loam

ER =extremely rich, R= rich, M.R= moderately rich, M= moderate, MP= moderately poor, SA= strongly alkaline.

**Table 2.** Morphological diversity of mycorrhizal fungi associated to the domesticated husk tomato (*Physalis ixocarpa* cv. Rendidora).

Morphotypes	Color	Spore shape	Equatorial diameter	Meridional diameter
			$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$
D1	0-20-60-0	Global-Subglobal	123cd	126ed
D2	0-50-60-0	Global-Subglobal	146b	154cb
D3	0-50-60-0	Global-Subglobal	140cb	144cd
D4	0-20-60-0	Global-Subglobal	184a	188a
D5	0-20-60-0	Global-Subglobal	158b	166b
D6	0-20-60-0	Global-Subglobal	100e	117e
D7	0-50-60-0	Global-Subglobal	202a	190a
D8	20-80-100-0	Global-Subglobal	117ed	121e
D9	20-80-100-0	Global-Subglobal	153b	151cb

0-20-60-0= red- brown, 0-50-60-0=reddish-orange, 20-80-100-0= red- brown, means followed by the same letter indicates non-significant difference (Tukey's 0.05).



**Table 3.** Morphological diversity of mycorrhizal fungi associated to the wild husk tomato (*Physalis ixocarpa*). The total number of spores of arbuscular mycorrhizal fungi associated to wild husk tomato plants in 100 g of soil was 2034.

Morphotypes	Color	Spore shape	Equatorial diameter µm	Meridional diameter µm
W1	20-80-100-0	Global-Subglobal	150f	149f
W2	0-10-90-5	Global-Subglobal	123i	135g
W3	0-60-100-10	Global-Subglobal	187b	164ed
W4	0-60-100-10	Global-Subglobal	152f	174cb
W5	0-10-60-0	Global-Subglobal	120i	118i
W6	0-10-90-5	Global-Subglobal	164e	163e
W7	0-60-100-10	Global-Subglobal	95j	104j
W8	20-80-100-0	Global-Subglobal	132h	127h
W9	0-50-60-0	Global-Subglobal	249a	238a
W10	0-20-60-0	Global-Subglobal	180c	176b
W11	0-60-100-10	Global-Subglobal	174d	169cd
W12	0-60-100-10	Global-Subglobal	139g	139g

20-80-100-0=red-brown, 0-10-90-5=orange, 0-60-100-10=orange brown, 0-10-60-0=pale orange-yellow, 0-50-60-0=reddish-orange, 0-20-60-0=red brown, means followed by the same letter indicates non-significant difference (Tukey's 0.05)

**Table 4.** Morphological characterization of arbuscular mycorrhizal fungi isolates.

Morphotypes	Equatorial diameter μm	Meridional diameter μm	Spore shape	Spore wall thickness μm	Color	Number of layers	Vesicles/Arbuscules	% Colonization
W1	140 <sup>bdc</sup>	136 <sup>edc</sup>	Global-Subglobal	9.2 <sup>bc</sup>	0-60-100-10	2	Yes	57.8 <sup>a</sup>
W2	123 <sup>dc</sup>	129 <sup>ed</sup>	Global-Subglobal	10.7 <sup>ba</sup>	0-60-100-10	1	Yes	41.0 <sup>bc</sup>
W3	163 <sup>ba</sup>	164 <sup>bac</sup>	Global-Subglobal	8.8 <sup>bc</sup>	0-60-100-10	1	Yes	33.9 <sup>bc</sup>
W4	150 <sup>bac</sup>	196 <sup>a</sup>	Global-Subglobal	12.6 <sup>a</sup>	0-60-100-10	1	Yes	32.7 <sup>bc</sup>
W5	123 <sup>dc</sup>	131 <sup>ed</sup>	Global-Subglobal	10.8 <sup>ba</sup>	0-10-60-0	1	Yes	34.5 <sup>bc</sup>
W6	167 <sup>ba</sup>	170 <sup>ba</sup>	Global-Subglobal	9.4 <sup>bac</sup>	0-10-90-5	1	Yes	41.5 <sup>bc</sup>
W7	108 <sup>d</sup>	112 <sup>e</sup>	Global-Subglobal	7.0 <sup>c</sup>	0-0-40-0	1	Yes	31.7 <sup>bc</sup>
W9	183 <sup>a</sup>	172 <sup>ba</sup>	Global-Subglobal	9.5 <sup>bac</sup>	0-50-60-0	1	Yes	46.0 <sup>bc</sup>
W10	170 <sup>ba</sup>	173 <sup>ba</sup>	Global-Subglobal	12.8 <sup>a</sup>	0-20-60-0	1	Yes	42.8 <sup>bc</sup>
W11	152 <sup>bac</sup>	156 <sup>bdc</sup>	Global-Subglobal	9.4 <sup>bac</sup>	0-10-90-5	1	Yes	27.1 <sup>6c</sup>
D2	145 <sup>bdac</sup>	155 <sup>bdc</sup>	Global-Subglobal	8.0 <sup>bc</sup>	0-50-60-0	1	Yes	47.2 <sup>ba</sup>
D5	158 <sup>bac</sup>	166 <sup>bac</sup>	Global-Subglobal	9.0 <sup>bc</sup>	0-20-60-0	1	Yes	43.0 <sup>bc</sup>

0-50-60-0=reddish-orange, 0-20-60-0=red-brown, 0-10-90-5=orange, 0-60-100-10=orange-Brown, 0-10-60-0=pale orange-yellow, 0-0-40-0=pale yellow, means followed by the same letter indicates non-significant difference (Tukey's 0.05).

## VIII. LITERATURA CITADA

Akiyama K, Matsuzaki KI, Hayashi H (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nat Resour J.*435:824–827

Akiyama, K. and Hayashi, H. (2006) Strigolactones: Chemical Signals for Fungal Symbionts and Parasitic Weeds in Plant Roots. *Annals of Botany*: doi: 10.093/aob/mcl063, available online at [www.aob.oxfordjournals.org](http://www.aob.oxfordjournals.org)

Allen, M.F. (1991) *The ecology of mycorrhizae*. Cambridge University Press. Cambridge, 184 pp

Anderson R.C, A. E. Liberta and L.A Dickman (1984) Interaction of vascular plants and vesicular- arbuscular mycorrhizal fungi across a soil moisture- nutrient gradient. *Oecologia (Berlin)*.64:111-117

Aono T, Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR, Harrison MJ, Saito M (2004) Expression of alkaline phosphatase genes in arbuscular mycorrhizas *New Phytol* 162: 525-534

Azcón-Aguilar C., Barea J. (1996) Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Scientia Horticulturae* 68:1-24.

- Bago B, Pfeffer P, Schachar- Hill Y (2001) Could the urea cycle be traslocating nitrogen in the arbuscular mycorrhizal simbiosis *New Phytol* 149: 4-8
- Bago B, Pfeffer PE, Zipfel W, Lammers P, Shachar- Hill Y (2002) Tracking metabolism and imaging transport in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 244: 189:197
- Bago, B; Azcon-Aguilar, C; Shachar-Hill; Pfefer, P.E. (2000) El micelio externo de la micorriza arbuscular como Puente simbiótico entre la raíz y su entono. En: *Ecología, Fisiología y Biotecnología de la micorriza arbuscular*. Eds. A. Alarcón y R. Ferrera-Cerrata. Mundi Prensa México, S.A. de C.V. 78-92
- Barea JM (2000) Rhizosphere and mycorrhiza of field crops. En: Toutant J, Balazs E, Galante E, Lynch J, Scherpers J, Wemer D, Werry P (eds) *Biol. Resource Management: Connecting Science and Policy* (OECD). INRA, Springer, Heidelberg-Alemania, pp 110-125
- Barea JM, Azcon R, Azcon-Aguilar C (1992) The use of  $^{15}\text{N}$  to assess the role of VA mycorrhiza on plant N nutrition and its applications to evaluate the role of mycorrhiza in restoring Mediterranean ecosystems. En: Read DJ, Lewia DH, Fitter AH, Alexander IJ (eds) *Mycorrhizas in ecosystems: Structure and function*. CAB International, Wallingford, UK, pp 190-197
- Becard G, Doner LW, Rolin DB, Douds DD, Pfeffer PE (1991) Identification and quantification of trehalose in vesicular- arbuscular mycorrhizal fungi in vivo  $^{13}\text{C}$  NMR and HPLC analyses. *New Phytol* 118: 547-552
- Becard G, Fortin JA (1988) Early events of vesicular- arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol* 108: 211-218

- Bécard, G. and Piché, Y. (1989) Fungal Growth Stimulation by CO<sub>2</sub> and Root Exudates in Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Appl Environ Microbiol* 55: 2320–2325
- Beck A, Haug I, Oberwinkler F, Kottke I (2007) Structural characterization and molecular identification of arbuscular mycorrhiza morphotypes of *Alzatea verticillata* (Alzateaceae), a prominent tree in the tropical mountain rain forest of South Ecuador. *Mycorrhiza*.17:607-625
- Bielecki RL (1973) Phosphates pools, phosphates transports and phosphates availability. *Annu Rev Plant Physiol* 24: 225-252
- Blee, K.A.; Anderson, A.J. (2000) Defense Responses in Plants to Arbuscular Mycorrhizal Fungi. In: Podila, G, K.; Douds, D., eds. *Current advances in mycorrhizae research*. Minnesota, USA: The Am. Phytopathol. Soc, 27–44
- Blilou, I.; Ocampo, J.; García-Garrido, J. (2000a) Induction of Catalase and Ascorbate Peroxidase Activities in Tobacco Roots Inoculated with Arbuscular Mycorrhizal *Glomus Mosseae*. *Mycol. Res.* 104: 722–725
- Blilou, I.; Ocampo, J.; García-Garrido, J. (2000b) Induction of Ltp (Lipid Transfer Protein) and Pal (Phenylalanine Ammonialyase) Gene Expression in Rice Roots Colonized by the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus Mosseae*. *J. Exp. Bot.* 51: 1969–1977
- Boby, V.; Balakrishna A.; Bagyaraj D. (2008) Interaction between *Glomus mosseae* and soil yeasts on growth and nutrition of cowpea. *Microbiological Research* 163: 693-700

- Bonanomi, A.; Oetiker, J.H.; Guggenheim, R.; Boller, T.; Wiemken, A.; Vögeli-Lange, R. (2001) Arbuscular Mycorrhizas in Minimycorrhizotrons: First Contact of *Medicago truncatula* Roots with *Glomus intraradices* Induces Chalcone Synthase. *New Phytologist* 150: 573–582
- Bonfante, P.; Genre, A.; Faccio, A.; Martini, I.; Schauser, L.; Stougaard, J.; Webb, J.; and Parniske, M. (2000) The *Lotus japonicus* LjSym4 Gene is Required for the Successful Symbiotic Infection of Root Epidermal Cells. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13: 1109–1120
- Boomsa, C.R. and T. Vyn. (2008) Maize drought tolerance: Potential improvements through arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Field Crop Research.* 108: 14-31
- Borie F, Rubio R, Morales A, Castillo C ( 2000) Relacion entre densidad de hifas de hongos micorizógenos arbusculares y produccion de glomalina con las características físicas y químicas de suelos bajo cero labranza. *Revista Chilena de Historia Natural* 73: 663-670
- Bornemisza E (1979) Organic carbon determination by the Walkley-Black and dry combustion in surface soils and andept profiles from Costa Rica. *Soil Sci.*43:78-83
- Bouyoucos G.S (1936) Directions for making mechanical analysis of soil by hydrometer method. *Soil Sci.*4:225-228
- Bremner, J.M. (1960) Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method. *J.Agric. Sci.*55:11-33
- Brrundrett, M.C. (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol.* 154:275-304

- Brundrett, M.C (1991) "Mycorrhizas in natural ecosystems", *Advances in Ecological Research*, vol. 21: 171-213
- Burrows, R.L, Pflieger FL (2002) Arbuscular mycorrhizal fungi respond to increasing plant diversity. *Can J Biochem Cell B*.80:120-130
- Carreón Abud-Y, Jerónimo Treviño-E, Beltrán-Nambo MA, Martínez-Trujillo M, Trejo Aguilar-D, Gavito ME (2013) Isolation and propagation of pure cultures of arbuscular mycorrhizal fungi from avocado orchards by the minirhizotron technique. *Revista Mexicana Micología*.37:29-39. In Spanish
- Carvalho L.M., Correia P.M., Ryel R.J. & Martins-Loução M.A (2003) Spatial variability of arbuscular mycorrhizal fungal spores in two natural plant communities. *Plant and Soil*.251:227-236
- Castillo, C.; Sotomayor, L.; Ortiz, C.; Leonelli, G.; Borie, F. and Rubio, R (2009) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on an ecological crop of chili peppers (*capsicum annum* L.). *Chilean Journal of Agricultural Research* 69 (1): 79-87
- Catoira, R.; Galera, C.; Billy, F.; Penmetsa, R.V.; Journet, E.; Maillet, F.; Rosenberg, C.; Cook, D.; Gough, C.; Denarie, J. (2000) Four Genes of *Medicago truncatula* Controlling Components of a Nod Factor Transduction Pathway. *Plant Cell*. 12:1647-65.
- Clark RB, Zeto SK (2000) mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *J Plants Nutr* 23: 867-902
- Cress WA, Throneberry GO, Lindsey DL (1979) Kinetics of Phosphorus absorption by mycorrhizal and non- mycorrhizal tomato roots. *Plant Phys*. 64: 484- 487

- Dhillon, S.S.; Ampornpan, L. (1992) The influence of inorganic nutrient fertilization on the growth, nutrient composition and vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization of pretransplant rice (*Oryza sativa* L) plants. *Biol. Fertil. Soils* 3:85-91
- Douds, D.D.; Galvez, L.; Bécard, G.; Kapulnik, Y. (1998) Regulation of Arbuscular Mycorrhizal Development by Plant Host and Fungus Species in Alfalfa. *New Phytologist*. 138: 27–35
- Drüge, U.; Schönbeck, F. (1992) Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on transpiration, photosynthesis and growth of flax-*Linum usitatissimum* L. In relation to cytokinin levels. *J. Plant Physiol.* 141:40-48
- Egerton-Warburton, L.M., Johnson, N.C., and Allen, E.B (2007) Mycorrhizal community dynamics following nitrogen fertilization: a cross-site test in five grasslands. *Ecol. Monogr.*77:527-544
- Escobar-Acevedo CJ, Zuluaga-Pelaez JJ, Colorado-Gasca G, Paez D. (1998) Micorriza Vesícula Arbúscular (MVA) Recurso microbiológico para desarrollar una agricultura sostenible
- Ezawa T, Cavagnaro TR, Smith SE, Smith FA, Ohtomo R (2004) Rapid accumulation of polyphosphate in extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus as revealed by histochemistry and a polyphosphate kinase / luciferase system. *New Phytol* 161: 387-392
- Fitter AH, Graves JD, Self GK, Brown TK, Bogie D, Taylor K (1998) Root production, turnover and respiration under two grassland types along an altitudinal gradient: influence of temperature and solar radiation. *Oecologia* 114: 20-30



- Feng, G., Zhang, F.S., LI, X. L., Tian,C.,Tang,C., RENGEL, Z. (2002) Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. *Mycorrhiza* 12,185–190
- Fitzsimons, M.S., Miller, R.M., Jastrow, J.D., (2008) Scale-dependent niche axes of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia* 158:117-127
- Franken, P.; Requena, N.; Bütehorn, B.; Krajinski, F.; Kuhn, G.; Laponin, L.; Mann, P.; Rhody, D.; Stommel, M. (2000) Molecular Analysis of the Arbuscular Mycorrhizas Symbiosis. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 45: 271–286.
- Garcia- garrido JM, Ocampo JA (2002) Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J Exp Bot*. 53: 1377-1386
- García-Garrido, J.M.; Tribak, M.; Rejón-Palomares, A.; Ocampo, J.A.; García-Romero, I. (2000) Hydrolitic Enzymes and Ability of Arbuscular Mycorrhizal Fungi to Colonize Roots. *J. of Experimental Botany*. 51: 1443–1448
- Gavito ME, Miller MH (1998) Early phosphorus nutrition, micorrhizae development, dry matter partitioning and yield of maize. *Plant and Soil* 199: 177-186
- Gemma, J., Carriero, T., and Koske, R. (1989) Seasonal dynamics of selected species of VA mycorrhizal fungi in a sand dune. *Micology research*, 92, 317-321
- Genre, A.; Chabaud, M.; Faccio, A.; Barker, D. and Bonfante, P. (2008) Prepenetration Apparatus Assembly Precedes and Predicts the Colonization Patterns of

Arbuscular Mycorrhizal Fungi within the Root Cortex of Both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *The Plant Cell*. 20:1407-1420

Genre, A.; Chabaud, M.; Timmers, T.; Bonfante, P. and Barker, D. (2005) Arbuscular Mycorrhizal Fungi Elicit a Novel Intracellular Apparatus in *M. truncatula* Root Epidermal Cells before Infection. *Plant Cell*. 17: 3489-3499

Gerderman, J; Nicholson, T (1963) Spores of mycorrhizal endogene species extracted from soil by wet sieving and decanting. *J. BMS*.46:235-244

Ginzberg, I.; David, R.; Shaul, O.; Elad, Y.; Wininger, S.; Ben-Dor, B.; Badani, H.; Fang, Y.; van Rhijn, P.; Li, Y.; Hirsch, A.; Kapulnik, Y. (1998) Glomus Intraradices Colonization Regulates Gene Expression in Tobacco Roots. *Symbiosis*. 25; 145 p

Goverde, M.; Van Der Heijden, M.A.; Wiemken, A.; Sanders, IR.; Erhardt A. (2000) Arbuscular mycorrhizal fungi influence life history traits of a lepidopteran herbivore. *Oecologia* 125:362-369

Govindarajulu, M., P. E. Pfeffer, H. Jin, J. Abubaker, D.D. Douds, J.W. Allen, H. Bücking, O.J. Lammers and Y. Shachar-Hill. (2005) Nitrogen transfer in the arbuscular Mycorrhizal symbiosis. *Nat*. 435: 819: 823

Guadarrama P, Castillo S, Ramos-Zapata JA, Hernández-Cuevas LV, Camargo-Ricalde SL. (2014) Arbuscular mycorrhizal fungal communities in changing environments: The effects of seasonality and anthropogenic disturbance in a seasonal dry forest. *Pedobiologia*.57:87-95

Guerrero, E.; Azcón, C. y Barea, J. (1996) Micorrizas: Recursos biológicos del suelo. Fondo FEN. Colombia, Bogotá. p. 130 – 132

Harrison M and Dixon R, (1994) Spation Patterns of Expression of Flavonoid/isoflavonoid Pathway Genes During Interactions Between Roots of *Medicago truncatula* and the Mycorrhizal Fungus *G.versiforme*. *Plant J.* 6: 9–20.

Harrison M, Dewbrw G, Liu J (2002) A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition og phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* 14: 2413- 2429

Harrison, M. (1999) Molecular and Cellular Aspects of the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:361–389

Harrison, M.J. (2005) Signaling in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Annu Rev Microbiol.*59:19-42

Hause, B.; Mrosk, C.; Isayenkov, S. and Dieter, S. (2007) Jasmonates in Arbuscular Mycorrhizal Interactions. *Phytochem.* 68: 101-110

Hawkins H-J, George E. (2001) Reduced <sup>15</sup> N-nitrogen transport through arbuscular mycorrhizal hyphae to *Triticum aestivum* L. supplied with ammonium vs. nitrate nutrition. *Ann Bot London.*87:303–311

Hawkins HJ, Johansen A, George E ( 2000) Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi.*Plant Soil* 226: 275-285

Hawkins H-J, Johansen A, George E. (2000) Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil*. 226:275–285

Hendrix, J., Guo, B., and An, Z. (1995) Divergence of mycorrhizal fungal communities in crop production systems. *Plant and Soil* 170, 131-140

Herbers, K.; Meuwly, P.; Frommer, W.B.; Metraux, J.P.; Sonnewald, U. (1996) Systemic Acquired Resistance Mediated by the Ectopic Expression of Invertase, Possible Hexose Sensing in the Secretory Pathway. *The Plant Cell*. 8: S.P.

Hernández-Cuevas LV, García-Sánchez R (2008) Propagation by spores: the case of arbuscular mycorrhize In *Techniques for the study of the mycorrhizal associations and its implications in restoration*: 29-42. Edited by Álvarez-Sánchez J, Monroy-Ata A. Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF. In Spanish

Hijri I, Sykorova Z, Oehl F, Ineichen K, Mader P, Wiemken A, Redecker D (2006) Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Molecular Ecology*.15:2277–2289

Ho I, Trappe JM (1973) Traslocation of  $^{14}\text{C}$  from *Festuca* plants to their endomycorrhizal fungi. *Nature* 244- 30-31

Horan, DP; Chilvers, GA (1990) Chemotropism the key to ectomycorrhizal formation. *New Phytol*.116:297-301

HORN, R.; LEBERT, M. (1994) Soil compactability and compressibility. In: Soon, S.D., Ouwerkerk, C.van. Eds., Soil Compaction in Crop Production. Elsevier Publishers, Amsterdam, The Netherlands, pp. 45-69

Husband R, Herre A, Turner SL, Gallery R, Young JPW (2002) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and patterns of host association over time and space in a tropical forest. *Mol Ecol* 11: 2669- 2678

ICA, Instituto Colombiano Agropecuario (1992) Fertilization de different crops. Fifth approximation. Manual of Technical Extension No. 25. Bogotá: ICA. In Spanish

INVAM (International culture collection of VA mycorrhizal fungi). (In line). Viewed July 19, 2014. Available <http://invam.wvu.edu/the-fungi/species-descriptions>

Jasper, D.A.; Robson, A.D.; Abbott, L.K. (1979) Phosphorus and the Formation of Vesicular-arbuscular Mycorrhizas. *Soil Biology and Biochemistry*. 11: 501–505

Jia Y, Gray VM, Straker CJ (2004) The influence of Rhizobium and arbuscular mycorrhizal fungi on nitrogen and phosphorus accumulation by *Vicia faba*. *Ann. Bot.* 94: 251-258

Johnson, C.R.; Hummel, RL. (1985) Influence of mycorrhizae and drought stress on growth of *Poncirus x Citrus* seedlings. *Hort. Sci.* 20:754-755

Johnson, N.C., Pflieger, F., Crookston, R., Simmons, S., and Copeland, P (1991) Vesicular- arbuscular mycorrhizas respond to com and soybean cropping history. *New Phytologist* 133, 103-111

- Johnson, N.C., Copeland, P., Crookston, R., and Pflieger, F ( 1992 a) Micorrhizae: Possible explanation for yield decline with continuous corn and soybean. *Agronomy Journal* 84, 387-390
- Johnson, N; Tilman, D.; Wedin D (1992) Plant and soil controls on mycorrhizal fungal communities. *Ecology*.73: 2034-2042
- Kabir Z, O'Halloran IP, Fyles JW, Hamel C (1997) Seasonal changes of arbuscular mycorrhizal fungi as affected by tillage practices and fertilization: Hyphal density and mycorrhizal root colonization. *Plant Soil* 192:285-293
- Kernaghan G. (2005) Mycorrhizal diversity: Cause and effect *Pedobiologia*. 49: 511-520
- Kistner, C.; Winzer, T.; Pitzschke, A.; Mulder, L.; Sato, S.; Kaneko, T.; Tabata, S.; Sandal, N.; Stougaard, J.; Webb, K.J. (2005) Seven Lotus japonicus Genes Required for Transcriptional Reprogramming of the Root During Fungal and Bacterial Symbiosis. *Plant Cell*. 17: 2217
- Kogel, K.H. (2008) Compatible Host–microbe Interactions: Mechanistic Studies Enabling Future Agronomical Solutions. *Plant Physiol*.165:1-8
- Kosuta, S.; Chabaud, M.; Loughon, G.; Gough, C.; Dénarié, J.; Barker, D. and Bécard, G. (2003) A Diffusible Factor from Arbuscular Mycorrhizal Fungi Induces Symbiosis-Specific MtENOD11 Expression in Roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol*, 131: 952-962

- Kurle JE, Pflieger FL. (1996) Management influences on arbuscular mycorrhizal fungal species composition in a corn-soybean rotation. *A J.*88:155-161
- Lambais, M.R.; Mehdy, M.C. (1998) Spatial Distribution of Chitinases and  $\beta$ -1,3-Glucanase Transcripts in Bean Arbuscular Mycorrhizal Roots Under Low and High Soil Phosphate Conditions. *New Phytologist.* 140: 33–42
- Lekberg, Y.L.V.A., Koide, R.T., Rohr, J.R., Aldrich-Wolfe, L.A.U.R., Morton, J.B., (2007) Role of niche restrictions and dispersal in the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Journal of Ecology* 95:95-105
- Linderman, R.G (1992) Vesicular Arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. P.p. 45-70. In bethlenfalvay G.J y Linderman R.G Eds. *Micorrhizae in sustainable Agriculture.* ASA Special Publication No. 54. Madison
- Lodge, DJ. (2000) Ecto- or arbuscular mycorrhizas - which are best? *New Phytol.* 146:353-354
- López-Pedrosa, A., M. González-Guerrero, A. Valderas, C. Azcón-Aguilar, and N. Ferrol. (2006) GintAMT1 encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*. *Fungal Genet. Biol.* 43:102-110.
- Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR, Harrison MJ (2001) A phosphate transporter gene from the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Mol Plant- Microbe Interact* 14: 1140- 1148

- Mathesius, U. (2009) Comparative Proteomic Studies of Root–microbe Interactions  
Ulrike J. Proteomics. 72: 353-366
- McGonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL, Swan JA (1990) A new method that gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 115:495–501
- Morton JB, Benny J (1990) Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glominae and Gigasporinae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with a reclassification of Glomaceae. *Mycotaxon* 37: 471- 491
- 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
- Mummey, D.L., Rillig, M.C., (2008) Spatial characterization of arbuscular mycorrhizal fungal molecular diversity at the submetre scale in a temperate grassland. *FEMS microbiology ecology* 64:260-270
- Oldroyd, G. and Downie, J.A. (2006) Nuclear Calcium Changes at the Core of Symbiosis Signaling. *Current Opinion in Plant Biology.* 9: 351–357
- Oldroyd, G. and Downie, J.A. (2006) Nuclear Calcium Changes at the Core of Symbiosis Signaling. *Current Opinion in Plant Biology.* 9: 351–357
- Oldroyd, G.; Harrison, M.; Paszkowski, U. (2009) Reprogramming Plant Cells for Endosymbiosis. *Science.* 324: 753-754



- Olsen, S. R., C. V. Cole, F. S. Watanabe and L. A. Dean (1954) Estimation of Available Phosphorus in Soils by Extraction with Sodium Bicarbonate. U. S. Department of Agriculture Circular No. 939. Banderis, A. D., D. H. Barter and K. Anderson. Agricultural and Advisor
- Olsson PA, Van Aarle IM, Allaway WG, Ashford AE, Rouhier H (2002) Phosphorus effects on metabolic processes in monoxenic arbuscular mycorrhiza cultures. *Plant Physiol* 130: 1162- 1171
- Öpik, M. (2004) Diversity of arbuscular micorrhizal fungi in the roots of perennial plants and their effect on plant performance. *Dissertiones Biologicae Universitatis Tartuensis*. Tartu. pp80
- Opik, M.A.A.R., Moora, M.A.R.I., Liira, J.A.A.N., Zobel, M.A.R.T., (2006) Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology* 94:778-790
- Paillacho Cedeño, Fabián Isacc. (2010) Evaluación de la efectividad de las micorrizas arbusculares nativas sobre el desarrollo y estado nutritivo del Palmito (*Bactris gasipaes* HBK) en etapa de vivero, en Santo Domingo de los Tsáchilas. Carrera de Ingeniería de Ciencias Agropecuarias. ESPEIASA II. Sede Santo Domingo.
- Parniske, M. (2000) Intracellular Accommodation of Microbes by Plants: A Common Developmental Program for Symbiosis and Disease? *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 320–328
- Parniske, M. (2004) Molecular Genetics of the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Curr Opinion Plant Biol.* 7: 414- 421

- Parniske, M. (2008) Arbuscular Mycorrhiza: the Mother of Plant Root Endosymbioses. *Nat Rev. Microbiol.* 6: 10 – 763
- Paszkowski, U. (2006) Mutualism and Parasitism: the Yin and Yang of Plant Symbioses. *Curr Opinion in Plant Biol.* 2006: 9: 364–37
- Perez, A.; Fuentes, J. (2009) Regresión logística en la evaluación de la esporulación de micorrizas en pasto *Bothriochloa pertusa* (L) A. Camus. *Rev. Colombiana Cienc. Anim* 1(1):1-18
- Peroza, C.V, Perez, C.A (2010) Effect of physical, chemical and salinity parameters on population density and arbuscular mycorrhize colonization and Angletón grass in Tolú Sucre, Colombia. *Rev. Colombiana Cienc. Anim.*2:312-324. In Spanish
- Pfeffer PE, Doudds DD, Bécard G, Shachar- hill Y ( 1999) Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol* 120: 587-598
- Pozo, M.J.; Dumas-Gaudot, E.; Azcón-Aguilar, C.; Barea, J.M. (1998). Chitosanase and Chitinase Activities in Tomato Roots During Interactions with Arbuscular Mycorrhizal Fungi or *Phytophthora parasitica*. *J. Exp Bot.* 49: 1729–1739
- Pozo, M.J.; Dumas-Gaudot, E.; Slezack, S.; Cordier, C.; Asselin, A.; Gianinazzi, S.; Gianinazzi-Pearson, V.; Azcón-Aguilar, C.; Barea, J.M. (1996) Detection of New Chitinase Isoforms in Arbuscular Mycorrhizal Tomato Roots: Possible Implications in Protection Against *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*. *Agronomie* 16: 689–697

- Rajan SK, Reddy Bjb, Bagyaraj, DJ. (2000) Screening of arbuscular mycorrhizal fungi for their symbiotic efficiency with *Tectona grandis*. *Forest. Ecol. Manage.* 126:91–95.
- Rasmussen N, Lloyd DC, Ratcliffe G, Hansen PE, Jakobsen I (2000)  $^{31}\text{P}$  NMR for the study of P metabolism and translocation in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 226: 245-253
- Read, D.J. 1991. Mycorrhizas in ecosystems. *Experienta* 47:376-391..Sieverding, E.1991.Vesicular Arbuscular Mycorrhiza in Tropical Agrosystem. Deutsche Gesellschaft für technische Zusammenarbeit (GTZ) GMBH, federal Republic of Germany. 371 p
- Reinhardt, D. (2007) Programming Good Relations-development of the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology.* 10: 98-105
- Requena N, Serrano E, Ocon A, Breuninger M (2007) Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry.*68:33-40
- Requena, N., Breuninger, M., Franken, P., Ocón, A. (2003) Symbiotic Status, Phosphate, and Sucrose Regulate the Expression of Two Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase Genes from the Mycorrhizal Fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiology*, 132: 1540-1549
- Requena, N.; Mann, P.; Hampp, R.; Franken, P. (2002) Early Developmentally Regulated Genes in the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus Mosseae*: Identification of GmGin1 a Novel Gene with Homology to the C-terminus of Metazoan Hedgehog Proteins. *Plant Soil* 244: 129–139

- Requena, N.; Serrano, E.; Oco'n, A.; Breuninger, M. (2007) Plant Signals and Fungal Perception During Arbuscular Mycorrhizae Establishment. *Phytochemistry*. 68: 33-40
- Rivillas O, C.A. (1995) The effects of arbuscular mycorrhizal fungi on two different coffee varieties from Colombia and their biochemical detection in roots. Kent, University of Kent. Research School of Biosciences. 88 p (Tesis: Magister Science)
- Sachar-Hill, Y.; Pfeffer, P. E.; Douds, D. D.; Osman, S. F.; Doner, L. W.; Ratcliffe, R. G. (1995) Partitioning of intermediary carbón metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizal leek. *Plant Physiology*. 108: 7–15
- Salzer, P.; Corbière, H.; Boller, T. (1999) Hydrogen Peroxide Accumulation in Medicago Truncatula Roots Colonized by the Arbuscular Mycorrhizaforming Fungus Glomus Mosseae. *Planta* 208: 319–325
- Salzer; P.; Boller, T. (2000) Elicitor Induced Reactions in Mycorrhizae and their Suppression. In: Podila, G.K.; Douds, D.D. eds. *Current Advances in Mycorrhizae Research*. APS Press, St. Paul, pp. 1-10
- Sánchez, P.A., Salinas, J.G. (1999) Low input technology for managing Oxisols and Ultisols in tropical America. *Advances in Agronomy*.34:279
- Santos, J.C., Finlay, R.D., Tehler, A., (2006) Molecular analysis of arbuscular mycorrhizal fungi colonising a semi-natural grassland along a fertilisation gradient. *New Phytologist* 172:159-168

Schenck, N.C. y Pérez, Y (1990) Manual for identification of VA Mycorrhizal Fungi, 3rd Edition, Synergistic Publications, Gainesville, USA.

Schüßler A, Schwarzott D, Walker C. (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*. 105:1413–1421

Schüßler and Walker (2010). Available In line [http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo/Schuessler&Walker2010\\_Glomeromycota.pdf](http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo/Schuessler&Walker2010_Glomeromycota.pdf)

Serralde O, A.M and M.M. Ramírez G (2004) Analysis of mycorrhizal populations in maize (*Zea mays*) cultivated in acid soils under varying agronomic treatments. *Revista Corpoica*. 5:1-40. In Spanish

Shaul, O.; David, R.; Sinvani, G.; Ginzberg, I.; Ganon, D.; Wininger, S.; Ben-Dor, B.; Badani, H.; Ovdad, N.; Kapulnik, Y. (2000) Plant Defense Responses During Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. In: Podila, G.K.; Douds, D.D. eds, *Current Advances in Mycorrhizae Research*. APS Press, St. Paul, MN, pp. 61-68

Shinshi, H.; Mohnen, D.; Meins, F. (1987) Regulation of a Plant Pathogenesis related Enzyme: Inhibition of Chitinase and Chitinase mRNA Accumulation in Cultured Tobacco Tissues by Auxin and Cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 84: 89–93

Sieverding, E. (1989) Aspectos de la taxonomía y la identificación de hongos formadores de endomicorrizas V.A. In; *Investigaciones sobre endomicorrizas en Colombia*. 2 ed. Palmira, CIAT. P 209-223

Simard S, Durall D (2004) Mycorrhizal networks: a review of their extent, function and importance. *Can J Bot.*82:1140-65

Singh S, Kapoor KK. (1999) Inoculation with phosphate solubilizing microorganisms and a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. *Biol.Fertil. Soils*; 28:139–44

Smith S. E, Read D. R. (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd Edn. Amsterdam; New York; Boston: Academic Press

Smith SE, Smith FA, Jakobsen I ( 2004) Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis: the contribution of the Mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytol.* 162: 511- 524

Smith, S.E., Read, D.J. (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London.

Smith. S.E., Jakobsen, I. (2000) Spatial differences in acquisition of soil phosphate between two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. *New Phytologist* 147:357-366

Somssich, I.; Hahlbrock, K. (1998) Pathogen Defense in Plants: a Paradigm of Biological Complexity. *Trends in Plant Sci.* 3: 86–90.

Stahl P. D, Williams S. E. and Christensen M (1988) Efficacy of native vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after severe soil disturbance. *New Phytol.*110:347-354

- Steiner, A.A. (1973) The selective capacity of tomato plants for ions in a nutrient solution. pp. 43-53. In: Proceedings 3rd International Congress on Soils Culture. Wageningen, The Netherlands
- Sweatt MR.; Davies, F.T. (1984) Mycorrhizae, water relations, growth, and nutrient uptake of geranium grown under moderately high phosphorus regimes. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 109: 210-213
- Van der Heijden MGA; JN Klironimos, M Ursic, P Moutoglis, R Streitwolf-Engle, R Boller, A Weimken y IR Sanders. (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72
- Van der Heijden, M.G.A., (2004) Arbuscular mycorrhizal fungi as support systems for seedling establishment in grassland. *Ecology Letters* 7:293-303
- Van tuinen, D., Dulieu, H., Zéze, A., and Gianinazzi- Pearson, V. (1994) Biodiversity and characterization of arbuscular mycorrhizal fungi at the molecular level. In "Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agricultura and natural ecosystems" (S. Gianinazzi and H. Shuep, eds.), pp. 13.23
- Varela F., L., D. Trejo, (2001) Los hongos micorrizógenos arbusculares como componentes de la biodiversidad del suelo en México. *Acta Zoológica Mexicana* 1:39-51
- Verbruggen, E.W.F.M. Röling, H.A. Gamper, G.A. Kowalchuk, H.A. Verhoef, and M.G.A. van der Heijden (2010) Positive effects of organic farming on below-ground mutualists: large- scale comparison of mycorrhizal fungal communities in agricultural soils. *New Phytol.* 186:968-979

- Vierheilig H, Piché Y (2002) Signalling in arbuscular mycorrhiza: Facts and hypotheses, In: Flavonoids in Cell Functions, Eds. Buslig B, and Manthey J; Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York; p.23-39. ISBN 0-306-47254-6
- Vierheilig, H.; Alt, M.; Mohr, U.; Boller, T.; Wiemken, A. (1994) Ethylene Biosynthesis and Activities of Chitinase and  $\beta$ -1,3-Glucanase in the Roots of Host and Non-host Plants of Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungi After Inoculation with *Glomus mosseae*. *J. of Plant Physiology*. 143: 337–343
- Walker C (2005) A simple blue staining technique for arbuscular mycorrhizal and other root-inhabiting fungi. *Inoculum*.56:68-69
- Wang, B. and Y.L. Qiu. (2006) Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*. 16:299-363
- Wolfe, B.E., Weishample, P.A., Klironomos, J.N., (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi and water table affect wetland plant community composition. *Journal of Ecology* 94:905-914
- Xiaohong; L.; Koide, R. (1994) The effects of mycorrhizal infection on components of plant growth and reproduction. *New Phytol*. 128:211-218.
- Yano, K.; Yamauchi, A.; Iijima M.; Kono, Y. (1998) Arbuscular mycorrhizal formation in undisturbed soil counteracts compacted soil stress for pigeon pea. *Appl. Soil. Ecol*. 10: 95-1022