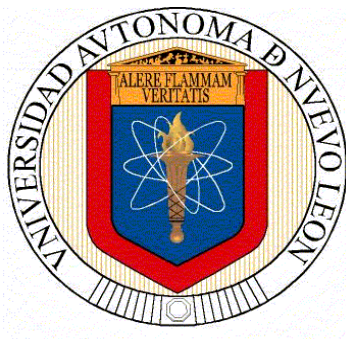


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**Análisis de metabolitos de tomate alterados en la ruta del ácido jasmónico
durante la simbiosis micorrízica con *Rhizophagus irregularis***

Presentada por:

NICOLE DABDOUB GONZÁLEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología**

Agosto 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANÁLISIS DE METABOLITOS DE TOMATE ALTERADOS EN LA RUTA DEL
ÁCIDO JASMÓNICO DURANTE LA SIMBIOSIS MICORRÍZICA CON
Rhizophagus irregularis

Por

NICOLE DABDOUB GONZÁLEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRA EN CIENCIA CON ORIENTACIÓN EN MICORBIOLOGÍA

Agosto, 2018

ANÁLISIS DE METABOLITOS DE TOMATE ALTERADOS
EN LA RUTA DEL ÁCIDO JASMÓNICO DURANTE
LA SIMBIOSIS MICORRÍZICA CON
Rizophagus irregularis

Comité de Tesis

Presidente: Dr. Hamlet Avilés Arnaut

Secretario: Dra. Susana de la Torre Zavala

Vocal 1: Dra. Aída Rodríguez García

Vocal 2: Dr. José María Viader Salvadó

Vocal 3: Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal

ANÁLISIS DE METABOLITOS DE TOMATE ALTERADOS
EN LA RUTA DEL ÁCIDO JASMÓNICO DURANTE
LA SIMBIOSIS MICORRÍZICA CON
Rizophagus irregularis

Dirección de Tesis

Director: Dr. Hamlet Avilés Arnaut

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer al Dr. Hamlet Avilés Arnaut, mi director de tesis, por su paciencia y gran apoyo a lo largo de estos dos años de cursar mi maestría, estando siempre a mi lado y apoyándome para superar todos los retos que aparecieron en el camino. Asimismo, quiero agradecerle a la Dra. Susana de la Torre Zavala quién fue para mí un pilar de apoyo moral y motivacional para la conclusión de este proyecto de tesis. Igualmente agradezco en su totalidad a mi comité de tesis por su ayuda a lo largo de esta etapa de mi vida, su ayuda en la terminación de esta tesis, así como sus consejos invaluable.

DEDICATORIAS

Este triunfo donde se cumple una meta más se la dedico a mi yo del futuro, espero este nuevo título te sea provechoso por el resto de tus días junto con la gran experiencia que te llevas.

Y a él, el hombre de la mesa de la esquina, quien me acompañó en todo momento en este camino, y ojalá lo haga por siempre.

ÍNDICE

Carátula

Introducción	1
Antecedentes	4
I. Beneficios de la simbiosis micorrízica arbuscular	4
II. Estudio de los efectos de la simbiosis mediante perfiles metabólicos ...	5
III. Las modificaciones metabólicas varían según el órgano vegetal.....	8
IV. Los efectos de la simbiosis son especia-específico	11
V. Los factores bióticos y abióticos en SMA y sus efectos metabólicos ...	14
VI. Hormonas vegetales que intervienen en la SMA	17
VII. Enfoque metabólico para el estudio de la SMA	24
Justificación	26
Hipótesis	27
Objetivos del trabajo	28
Material y Métodos	29
Resultados	34
Discusión	53
Conclusiones	70
Perspectivas	71
Bibliografía	72
Material Suplementario	93
Resumen Bibliográfico	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Registro de intensidad de micorrización (M%)	30
Figura 2: Registro de abundancia arbuscular (A%)	30
Figura 3: Medias de la Altura de la planta	34
Figura 4: Medias de la Longitud de raíz	35
Figura 5: Medias del Peso fresco	37
Figura 6: Medias de la Frecuencia de micorrización (F%)	38
Figura 7: Medias de la Intensidad de micorrización (M%)	39
Figura 8: Medias de la Abundancia arbuscular (A%)	40
Figura 9: Distribución de las intensidades de cada m/z	41
Figura 10: Análisis de componentes principales (PCA)	43
Figura 11: Círculo de correlaciones del PCA	44
Figura 12: Mapa calórico de los 15 m/z con mayor influencia sobre el PC1	45
Figura 13: Gráfico de correlaciones del PLS-DA entre m/z y el tratamiento	46
Figura 14: Gráfico de correlaciones del PLS-DA entre las observaciones y ejes t1-t2 ...	47
Figura 15: Gráfico de importancia de las variables sobre la proyección (PLS-DA)	48
Figura 16: Ruta biosintética de fenilpropanoides en <i>S. lycopersicum</i>	49
Figura 17: Ruta biosintética de flavonoides en <i>S. lycopersicum</i>	50
Figura 18: Ruta biosintética de carotenoides en <i>S. lycopersicum</i>	51
Figura 19: Ruta del metabolismo del carbono en <i>S. lycopersicum</i>	52

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
AJ	Ácido jasmónico
C	Carbono
CHI	Chalcona isomerasa
cv	Cultivar
ddi	Días después de inoculación
DXS	1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa
DXR	1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa
ET	Etileno
HMA	Hongo micorrízico arbuscular
IFR	Isoflavona reductasa
MA	Micorrizas arbusculares
MEP	Ruta de metileritritol-fosfato
PAL	Fenil-amonio liasa
PC	Componente principal
PCA	Análisis de componentes principales
Phe	Fenilalanina
PLS-DA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales
PDS	Fitoeno desaturasa
SL	Estrigolactonas
SMA	Simbiosis micorrízica arbuscular

Tyr

Tirosina

UV

Ultra Violeta

RESUMEN

En el siguiente proyecto se evaluó el impacto metabólico en raíces, así como los efectos en el crecimiento y nutrición, generados durante la simbiosis micorrízica entre *Rizophagus irregularis* y plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv Castelmart) alteradas en su contenido endógeno de ácido jasmónico (AJ) mediante análisis de espectrometría de masas y la realización de perfiles metabólicos. Se emplearon tres distintos fondos genéticos de tomate: silvestres (WT), transgénicas (PS) con sobreproducción de AJ y mutantes (*spr2*) con déficit en el contenido de dicha fitohormona. Respecto al desarrollo y rendimiento vegetal, en general, sea mayor o menor el contenido, las alteraciones en la concentración de AJ repercuten negativamente sobre diversos parámetros del crecimiento de la planta, incluyendo altura aérea, longitud de las raíces y peso fresco. Por otro lado, la acumulación de AJ en el tejido vegetal promueve el establecimiento de la simbiosis, como se observó en plantas PS un mayor grado de frecuencia e intensidad de micorrización y abundancia arbuscular, en contraste con mutantes *spr2*, cuales mostraron menor porcentaje en las tres mediciones. En cuanto al impacto metabólico, los espectros analizados revelaron una clara diferenciación entre plantas control y micorrizadas, donde la presencia del hongo reduce mayormente a metabolitos intermediarios de las rutas biosintéticas de fenilpropanoides, flavonoides y carotenoides; mientras que, en menor grado, aumentan los compuestos involucrados en el metabolismo del carbono. En general, se concluye que el establecimiento de la simbiosis “apaga” el metabolismo radicular en tomate, fomentando específicamente el metabolismo energético alcanzando niveles por encima de los observados en las plantas control, fenómeno probablemente vinculado a la transferencia de compuestos fotoasimilados hacia el hongo, el cual representa un sumidero de carbono. Asimismo, en este trabajo se descarta la participación del AJ sobre los efectos metabólicos en las raíces de *S. lycopersicum*, cuya influencia resultó no ser significativa.

ABSTRACT

In the following project the impact on metabolic fluxes in roots is assessed, as well as the growth and nutrition effects originated during the mycorrhizal symbiosis between *Rizophagus irregularis* and tomato plants (*Solanum lycopersicum* cv Castelmart) with altered jasmonic acid (JA) levels through mass spectrometry analysis and metabolic profiling. Three genetic backgrounds were used: wild-type (WT), transgenic line (PS) with overproduction of JA and mutants (*spr2*) with JA deficiency. Regarding plant development, the results show that any alteration on JA content, be it higher or lower, affect negatively several growth parameters, including aerial height, root length and fresh weight. On the other hand, higher levels of JA in the plants tissue promotes the establishment of the symbiosis, as observed in PS plants with higher rate of mycorrhizal frequency and intensity, as well as greater arbuscular abundance; in contrast, *spr2* mutants showed lower rates for those three measurements. With respect of the metabolic effects, the analyzed spectra revealed a clear difference between control and mycorrhizal roots, where the presence of the fungus mainly reduces metabolites involved in the biosynthetic routes of phenylpropanoids, flavonoids and carotenoids; while augmenting, on a lesser extent, the accumulation of compounds linked to carbon metabolism. In general, it seems that the establishment of the symbiosis “shuts down” the radicular metabolism, only promoting the energetic metabolism, likely due to the transfer of photoassimilates to the mycorrhizal fungus, which represents a carbon sink. Additionally, in this research, the participation of JA on the metabolic alterations of mycorrhizal tomato roots is dismissed, in which statistical differences proved not significant.

INTRODUCCIÓN

En ambientes naturales, las plantas se encuentran continuamente expuestas a condiciones ambientales adversas de origen tanto biótico como abiótico, como lo son patógenos, temperaturas extremas, desequilibrios de nutrientes, salinidad y sequías, los cuales representan un impacto negativo en la supervivencia, desarrollo y productividad de la planta (Ruiz et al. 2015). En respuesta a estas causas de estrés, las plantas han elaborado un conjunto de estrategias sofisticadas para protegerse contra dichos agentes, una de ellas siendo la habilidad de su sistema radicular de formar asociaciones micorrízicas (Song et al. 2015).

Estas asociaciones se establecen entre las raíces de las plantas y un grupo de hongos endosimbiontes pertenecientes al filo Glomeromycota. Dichos hongos conforman las micorrizas arbusculares (MA) y son capaces de establecer una interacción íntima con las raíces de la mayoría de las especies de plantas terrestres (Heckman et al. 2001). La simbiosis entre plantas y hongos micorrízicos arbusculares se caracteriza por el intercambio bidireccional de sustancias, donde compuestos fotoasimilados son transportados hacia el hongo y nutrientes minerales son aportados a la planta (Schweiger y Müller 2015). El principal macronutriente aportado por MA es el fósforo (Gerlach et al. 2015), asimismo la asimilación de nitrógeno es facilitada por MA bajo condiciones ambientales específicas (Fellbaum et al. 2012). La presencia de MA se caracteriza por la presencia una red de micelio extra radical en el suelo que permite a la planta adquirir tanto nutrientes como agua que su propio sistema radicular no podría obtener (Song et al. 2015).

Para el establecimiento y correcto funcionamiento de la simbiosis se requiere de un alto grado de coordinación entre ambas partes, implicando intercambio de señales que derivan en el reconocimiento mutuo (Bucher et al. 2014). El diálogo molecular durante el estado pre-simbiótico inicia con la exudación de estrigolactonas en la rizosfera por la planta huésped, moléculas cuales son detectadas por el hongo MA estimulando su desarrollo hifal y ramificación (Ruiz et al. 2015). De manera recíproca, el hongo MA produce señales difusibles, incluyendo lipoquitooligosacaridos (Myc-LCOs) y quitooligosacaridos (Myc-COs), que activan respuestas en las raíces del hospedero a nivel molecular, celular y de desarrollo (Laparra et al. 2014).

Posterior a la colonización de las raíces por MA, la interacción modifica el crecimiento y desarrollo de la planta ejerciendo múltiples efectos fisiológicos, en especial debido a la aportación de nutrientes minerales, el establecimiento de un sumidero o poza de carbono adicional y efectos en la resistencia de la planta contra estrés de origen biótico y abiótico (Smith et al. 2010); todos los resultados mencionados son reflejo de los perfiles de metabolitos (Fester et al. 2011). La respuesta sistémica de la planta ante la simbiosis altera la concentración y diversidad de carbohidratos, proteínas y aminoácidos en hojas (Schweiger y Müller 2015), igualmente modifica metabolitos secundarios como isoprenoides, compuestos fenólicos, ácido gálico y derivados de antraquinonas (Toussaint et al. 2007). En general, el fitometaboloma es un sistema altamente dinámico en su composición química, en el cual los hongos micorrízicos arbusculares ofrecen un sistema adecuado para la investigación de la especificidad de respuestas metabólicas (Schweiger et al. 2014), principalmente debido a su capacidad de modificar el metaboloma de la planta mediante la adsorción de nutrientes y agua (Parniske 2008).

Diversas fitohormonas, incluyendo ácido jasmónico, ácido salicílico, auxinas y giberelinas, están involucrada en la formación, regulación y funcionamiento de las MA (Gutjahr y Paszkowski 2009). De manera natural, el ácido jasmónico y salicílico desencadenan en la planta cascadas de señalización para la expresión de mecanismos de defensa ante un ataque (Kim et al. 2014). De manera similar, esta inducción de defensas ocurre indirectamente por los hongos MA posterior a su establecimiento en el sistema radicular (Schweiger y Müller 2015), confiriéndole al organismo vegetal una mayor eficiencia y rapidez en las respuestas celulares ante ataques por insectos herbívoros, patógenos o estrés abiótico.

En la agricultura, las micorrizas arbusculares son de suma importancia ya que mejoran los valores nutrimentales del producto y aumentan el rendimiento de los cultivos (Schweiger et al. 2014) siendo utilizadas principalmente como biofertilizantes. Adicionalmente, representan un ahorro económico al modular la resistencia la planta ante plagas y estrés abiótico, evitando asimismo el uso de plaguicidas químicos y contribuyendo en los ciclos globales del fósforo y el carbono (Parniske 2008), haciendo del cultivo una práctica sustentable. En esta industria destaca el tomate (*Solanum lycopersicum*), que es la segunda hortaliza de mayor importancia económica en el mundo

debido a su consumo humano y ocupa en México el primer lugar en volumen de exportaciones a nivel mundial (SAGARPA 2018). Por este motivo, además de sus características propias como periodos cortos de crecimiento, genoma secuenciado, colección de mutantes, rutas metabólicas conocidas y su facilidad de formar asociaciones micorrízicas arbusculares, hacen de este organismo un modelo biológico adecuado para su estudio.

ANTECEDENTES

I. Beneficios de la simbiosis micorrízica arbuscular

Las asociaciones mutualistas de micorrizas arbusculares (MA) formadas entre especies de hongos endosimbiontes del filo Glomeromycota y las raíces de la gran mayoría de las plantas terrestres se han estudiado ampliamente debido a sus atributos en la mejora nutricional de ambos organismos. La interacción de MA favorece el crecimiento y desarrollo de la planta involucrada debido a sus efectos fisiológicos, principalmente la aportación de nutrientes minerales por parte del hongo, así como la adición de una poza o sumidero de carbono anexo al sistema radicular vegetal y la resistencia contra factores tanto bióticos como abióticos (Smith et al. 2010).

La formación de micorrizas arbusculares representa para una gran ventaja la planta huésped en su fisionomía y desarrollo global. Esta interacción planta – hongo determina a primera mano la salud de la planta misma y la fertilidad del suelo, teniendo un impacto directo en el desarrollo de la comunidad vegetal, en los ciclos de los nutrientes, la disponibilidad de agua y la productividad sobre la superficie (Jeffries et al. 2003). El efecto más evidente de la simbiosis es referente al tamaño, altura y frondosidad de la planta. La inoculación con esporas de MA de la familia Glomeaceae resultan en un aumento de 104% en la biomasa de la planta huésped, 23% en el caso de Gigasporaceae y 22% con Acaulosporaceae; no obstante, la mayor contribución en la biomasa vegetal es concedida por la especie *Rizopagus irregularis*, concediendo un 419% de incremento en comparación con plantas control no inoculadas (Hart y Reader 2002). De manera consistente, la micorrización por *Funneliformis mosseae*, *Glomus claroideum* y *R. irregularis* en distintas plantas huésped provocan un efecto positivo en la producción de biomasa vegetal (Jansa et al. 2008), concretando que el suministro de nutrientes por parte del hongo es un factor fundamental para el incremento de materia orgánica vegetal. La absorción de fósforo muestra un patrón similar al del crecimiento, con niveles elevados en presencia del endosimbionte. Se ha registrado un aumento de hasta 17.2 ± 3.2 % en el contenido total de dicho nutriente (Hart y Reader 2002), aunque, en comparación con la biomasa, este efecto varía acorde a la especie micorrízica. Otro beneficio radica en el valor nutrimental de los frutos. Análisis químicos de nutrientes y metabolitos secundarios

en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) inoculados con MA revelan mayor concentración de minerales – en particular fósforo (P), nitrógeno (N) y cobre (Cu) –, así como antioxidantes, carotenoides y compuestos involucrados en su sabor, principalmente azúcares, ácidos y otros compuestos volátiles (Hart et al. 2014). Igualmente, en el mismo estudio demostraron un aumento del 34% en la producción de frutos en plantas micorrizadas. En cuanto a la salud vegetal, la simbiosis le otorga o mejora su resistencia ante amenazas bióticas y abióticas. Se ha registrado una reducción significativa en el proceso infectivo de enfermedades vinculadas a patógenos del suelo dado el establecimiento de la micorriza, incluyendo entre ellos *Phytophthora*, *Aphantomyces*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas syringae* (Jeffries et al. 2003). Asimismo, se ha observado una mayor tolerancia ante condiciones climáticas y ambientales adversas como sequías, salinidad, inundaciones, toxicidad por metales pesados, suelos deficientes e insolación, donde la micorriza ayuda a contrarrestar o mitigar el impacto negativo consecuente (Ruiz-Lozano et al. 2012; Bárzana et al. 2012; Augé et al. 2015). Estos numerosos beneficios mencionados y su diversidad de aplicaciones potenciales hacen de las micorrizas arbusculares un área de interés científico.

II. Estudio de los efectos de la simbiosis mediante perfiles metabólicos

Los efectos de la simbiosis MA pueden ser evaluados a través de perfiles de metabolitos polares y de tamaño pequeño (Pozo y Azcón 2007), en los cuales se identifican incrementos o disminuciones en la concentración de diversos compuestos a nivel sistémico. La composición elemental, también llamada ionoma, de una planta puede explicar hasta el 85% de variaciones en su crecimiento (Prinzenburg et al. 2010). Estudios metabólicos durante la simbiosis micorrízica revelan una clara alteración en los niveles de compuestos pertenecientes al metabolismo primario y secundario de la planta. Entre las categorías de moléculas reguladas, las principales afectadas son aquellas involucradas en las reacciones de fotosíntesis, en el metabolismo de carbohidratos, metabolismo de lípidos, glucólisis y en el metabolismo de aminoácidos, así como una amplia gama de metabolitos secundarios (Liu et al. 2007). Perfiles metabólicos realizado durante la asociación con *R. irregularis* muestran una regulación positiva de diversas rutas biosintéticas, destacando las rutas de síntesis de flavonoides, isoflavonoides, fenilpropanoides, clorofila y porfirinas (Aliferis et al. 2015). Este aumento de los

metabolismos primarios y secundarios también ha sido observada en *Medicago truncatula* en simbiosis con la misma especie de hongo, resaltando modificaciones en el metabolismo de aminoácidos, en específico del ácido glutámico, ácido aspártico y asparagina, así como ácidos grasos, principalmente ácido oleico y palmítico; asimismo metabolitos secundarios como ciclohexanona y derivados de micorradicina pertenecientes al metabolismo de los apocarotenoides, al igual que daidzeina, ononina y malonilnonina correspondientes a isoflavonoides (Fester et al. 2011). De manera similar, la inoculación combinada de *F. mosseae* y *R. irregularis* en cultivos de cebada afecta el contenido de carbohidratos y aminoácidos libres en toda la planta, identificando además una reducción en la concentración de sacarosa, almidón, glutamina, alanina, leucina y oxoglutarato (Kogel et al. 2009). Extractos de plantas de maíz en simbiosis con micorrizas arbusculares denotan una reducción general en el metabolismo de aminoácidos, mayormente en la concentración de prolina, aunque una significativa acumulación de azúcares solubles reducidos, proteínas solubles y ácidos orgánicos, así como de metabolitos inducidos por estrés (Sheng et al. 2011). Adicionalmente, tal efecto negativo en el contenido de ácidos orgánicos ha sido reportado en varias especies como *Lotus japonicus*, *Oryza sativa* y *S. lycopersicum* (Sánchez et al. 2008; Rivero et al. 2015). La disminución de ácidos orgánicos puede estar ligada a rutas del catabolismo central, como lo están el ácido málico, ácido cítrico y ácido succínico, al metabolismo de aminoácidos, incorporando al ácido glutámico, ácido aspártico, glicina, asparagina, ácido 4-amino-butanoico y ácido 2-metil-málico, al metabolismo de ácidos grasos, principalmente por el ácido octadecanoide, al metabolismo de carbohidratos o al metabolismo de ácido ascórbico (Fester et al. 2011).

En cuanto a la concentración sistémica de nutrientes minerales, también se observan fluctuaciones derivadas del establecimiento del hongo MA. Análisis de fringerprint metabólico mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) muestra un alza en los niveles de fósforo, sulfuro y zinc, mientras que el contenido de manganeso cobre y litio se reducen en *Zea mays* ante el establecimiento de la simbiosis (Gerlach et al. 2015). En el mismo estudio se demostró un incremento significativo en el contenido global de carbono en la planta, lo cual los autores vinculan con la redistribución de los pools metabólicos incluyendo carbohidratos y aminoácidos. De igual modo, Kogel

y colaboradores (2009) demostraron que existe un aumento en la concentración de diversos intermediarios fosforilados en plantas micorrizadas, indicando de forma indirecta el mejoramiento en la disponibilidad de fósforo concedida por el hongo. Dicha acumulación general de nutrientes sigue un patrón de distribución elemental que no varía entre plantas control y aquellas micorrizadas, señalando que la translocación de los elementos a los diferentes órganos y tejidos vegetales ocurre bajo el control de la planta huésped (Gerlach et al. 2015).

Por otro lado, múltiples investigaciones han identificado una clara acumulación de diversos compuestos de defensa durante la simbiosis. De entre los primeros estudios en el tema, análisis de inmublot y ensayos de actividad demostraron altos niveles en la expresión de proteína relacionadas con patogénesis (PRs) en plantas de tabaco, donde la presencia del endosimbionte provocaba la acumulación de las proteínas PR-1a, PR-3, PR-Q(prm1), PR-4 y PR-5 (Vierheilig et al. 1996). Análisis más recientes de transcriptómica y metabolómica en *Medicago truncatula* micorrizadas revelan que existe una inducción sistémica en la expresión de numerosos genes de defensa posterior al establecimiento del hongo, acompañado de una agregación de diversos metabolitos secundarios, incluyendo terpenoides y alfa- y beta-amirinas; estos resultados apoyan la respuesta vegetal micorriza-específica de priming (Leitner 2010). Resultados similares han sido publicados por Strack et al. (2003) y Gerlach et al. (2015), quienes describen el aumento generalizado en el espectro de terpenoides vegetales en distintas especies. Por otra parte, datos experimentales acerca del patrón de acumulación de ácido jasmónico (AJ) en plantas micorrizadas reportan una elevación en su concentración en algunos estudios (Hause et al. 2015; Meixner et al. 2005) y en otros casos no se observa una variación en comparación con su control (Riedel et al. 2008). Específicamente en tomate, se ha demostrado que la simbiosis MA genera un efecto positivo en la concentración de dos compuestos activos del grupo de las oxilipinas, el ácido 13-hidroperóxido linoléico y el ácido 12-oxophitodienoico, ambas moléculas siendo intermediarias en la biosíntesis de ácido jasmónico (León et al. 2012). Estos hallazgos concuerdan con los resultados previos en análisis por microarreglos de extractos de raíz de tomate micorrizado, indicando una fuerte regulación positiva en genes que codifican para las enzimas LOXA y AOS3, las cuales participan directamente en el metabolismo 9-LOX de oxilipinas (García-Garrido

et al. 2010; López-Ráez et al. 2010). Los jasmonatos pertenecen al grupo de metabolitos lipídicos de las oxilipinas, por lo tanto, su estudio contribuye a elucidar el comportamiento del AJ de manera indirecta.

III. Las modificaciones metabólicas varían según el órgano vegetal

A pesar de que la modificación en el fitometaboloma ocurre a nivel sistémico, algunos de los efectos en el metabolismo de la planta y sus reacciones fisiológicas ante micorrizas arbusculares varían acorde al órgano que se utiliza para su medición. Análisis cuantitativos y cualitativos de metabolitos mediante espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (GC-MS) de *Z. mays* revelaron un aumento significativo en la concentración de fósforo en plantas micorrizadas, específicamente en hojas completamente desarrolladas (Gerlach et al. 2015). El patrón de distribución de dicho nutriente suministrado por el hongo responde a una movilización de hojas en senescencia a aquellas con crecimiento activo; incluso, en la lámina foliar se ha reconocido un gradiente horizontal de fósforo con una concentración creciente de la punta a la base, es decir, del tejido joven al más maduro (Calderon-Vázquez et al. 2011). En hojas de *Salix purpurea* se ha observado un efecto directo de la micorrización en el metabolismo primario, con un alto incremento en gran diversidad de monosacáridos y reducción en la abundancia de alcoholes de azúcar (Aliferis et al. 2015). Por otro lado, el contenido de ácidos orgánicos tiende a descender en los tejidos foliares. Estudios de diversas especies, entre ellas *Plantago lanceolata*, *P. major*, *Veronica chamaedrys*, *M. truncatula* y *Poa annua*, en estado de simbiosis micorrízica revelaron una notable disminución en ácidos orgánicos en hojas, destacando el citrato, malato y fumarato, y con menor afectación el succinato e isocitrato (Schweiger et al. 2014). Mismos resultados han sido publicados por Fester et al. (2011), donde la concentración de ácidos orgánicos como ácido malónico, eritrónico, ascórbico, hexadecanoico, cítrico y málico se vio influenciada negativamente en hojas de *L. japonica* micorrizada. Asimismo, el mismo estudio reportó una disminución en aminoácidos, principalmente prolina, asparagina y triptófano. En el caso particular del tomate, la inoculación con MA conlleva una intensificación en las actividades de las enzimas β -1,3-glucanasa, quitinasa, fenilalanina amonio-liasa (PAL) y lipogenasa (LOX) en el tejido foliar, contribuyendo a la activación de defensas del denominado estado priming (Song et al. 2015). Por otro lado, se ha demostrado existe un

efecto de regulación negativa en el contenido de antocianinas en hojas debido a la asociación con hongos MA, identificando dos metabolitos correspondientes en su biosíntesis, quercetina e isohamnetina, con menores concentraciones que las plantas control (Gerlach et al. 2015). Dicho hallazgo resulta interesante, ya que la acumulación de antocianinas está relacionada con condiciones de deficiencia de fósforo (Devaiah et al. 2009), evento que es compensado por el flujo de nutrientes por parte de la micorriza. Asimismo, estudios de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR) de extractos foliares durante micorrización con *R. irregularis* revelaron un incremento en diversos metabolitos secundarios relacionados con respuestas de defensa (Aliferis et al. 2015). En esta investigación se identificaron tres rutas metabólicas potenciadas por la simbiosis: ruta biosintética de fenilpropanoide (participación en respuestas de defensa), ruta biosintética de α -linolato (relacionado con la producción de jasmonatos), y la ruta biosintética de flavonoides e isoflavonoides (involucrados en respuestas de estrés biótico y abiótico). De manera similar, en *S. lycopersicum* se ha registrado un alza en la concentración de proteínas relacionadas con patogénesis PR1, PR2 y PR3, así como una inducción en la expresión de genes de defensa LOX, AOC y PAL (Song et al. 2015).

Además de las hojas, otro órgano que muestra un comportamiento metabólico particular durante la simbiosis son los frutos. El establecimiento de *F. mosseae* en el sistema radicular de plantas de tomate deriva en un mayor rendimiento del cultivo, donde la producción de flores fue significativamente mayor que las plantas en condiciones control y hasta un 223% de aumento en el número de frutos cosechados (Salvioli et al. 2013). Estos investigadores realizaron asimismo un análisis transcriptómico resaltando los procesos metabólicos alterados por la simbiosis. Entre ellos, el más fuerte incremento correspondía al metabolismo del ácido carboxílico, en particular la reacción de catálisis para la síntesis de histamina; otro aumento se mostró en la enzima de acil-transferasa la cual cataliza los pasos finales de la producción de ésteres. Los procesos de fotorespiración y biosíntesis de azúcares UDP respondieron negativamente dada la simbiosis, vinculados con la ruta de fotorespiración y síntesis de la pared celular respectivamente. En el mismo orden de ideas, un análisis distinto de la composición metabólica de frutos de *S. lycopersicum* reportó un efecto intensificado de la simbiosis en los procesos de fotosíntesis, fotosíntesis luminosa, enlace proteína-cromóforo y procesos de oxido-

reducción, y, en menor manera, procesos de respuesta a estímulos bióticos, transporte transmembrana y metabolismo de carbohidratos (Zouari et al. 2014). Igualmente, en dicho estudio se evaluó la evolución del contenido de aminoácidos en la etapa de maduración del fruto, donde se observó un 68% de incremento en tomates micorrizados, en específico en los contenidos de asparagina, glutamina y glutamato. En suma con ello, análisis de regulación génica sobre los frutos de tomates revelan una intensificación del metabolismo con tendencia hacia los procesos de fotosíntesis y fotorespiración en presencia de MA (Fiorilli et al. 2009).

Respecto al impacto de la simbiosis micorrízica arbuscular (SMA) sobre el metabolismo en las raíces de la planta huésped, diversos estudios reflejan modificaciones específicas para este órgano. Un análisis dirigido para carbohidratos, aminoácidos, carboxilatos, intermediarios fosforilados, antioxidantes y otros metabolitos en cebada (*Hordeum vulgare*) varían en concentraciones conforme al origen del extracto entre raíces, extremo de las raíces, coleóptilo, hipocótilo y hojas (Kogel et al. 2010). En extractos metanólicos de raíces de *M. truncatula* procesados por GC-MS se observa una diferencia en abundancia hasta diez veces mayor de propionil- y butiril-carnitina en aquellas micorrizadas en comparación con las plantas control (Laparre et al. 2014). Un estudio extenso sobre el perfil metabólico en raíces de *S. lycopersicum* en asociación con *R. irregularis* y/o *F. mosseae* llevado a cabo por Rivero y colaboradores (2015), elucida múltiples modificaciones metabólicas en dicho tejido. Se identificaron un total de 1,876 compuestos en total, a partir de los cuales se identificaron aquellos con mayor influencia y su papel en la fisiología de la planta. El mayor impacto de la simbiosis fue sobre el metabolismo primario, principalmente en el metabolismo de aminoácidos y de azúcares, demostrado a través de las fluctuaciones de cuantiosos ácidos carboxílicos y tricarboxílicos. Fenilalanina, triptófano, tirosina, glutamato, aspartato y leucina/isoleucina se encontraron en menor cantidad en raíces micorrizadas; mientras que metabolitos derivados de cisteína, lisina, alanina, fenilalanina, tirosina y glutamina fueron acumulados. En concreto, el incremento de glutamato y aspartato ha sido ya reportado en raíces de *M. truncatula* y *O. sativa* (Govindarajulu et al. 2005; Pozo y Azcón 2007; Schliemann et al. 2007). Cabe destacar que la fenilalanina y tirosina son los aminoácidos que primordialmente generan ácidos fenólicos y sus derivados (Smith et al. 2010); no

obstante, compuestos intermediarios del metabolismo de fenoles, como ácido ferúlico, alcohol cumarílico y coniferílico, eran más abundantes en raíces micorrizadas, sugiriendo la estimulación de la reorganización de componentes de la pared celular dado el establecimiento del hongo. De manera similar, se ha demostrado que la inoculación en tomate con *Glomus versiforme* provoca un aumento del 20.8% en el contenido de fenoles simples y 17.8% de fenoles complejos (Zhu et al. 2004). Asimismo, en raíces simbiotes se identificaron altos niveles de 11 compuestos correspondientes a derivados del ácido α -linoléico, quienes participan en la sección de la ruta de oxilipinas que conduce la biosíntesis de ácido jasmónico (Rivero et al. 2015). Este resultado se opone a lo reportado por León et al. (2012), cuyo análisis de patrones de expresión génica en raíces de tomate inoculadas con *R. irregularis* reconoce tres genes relacionados con el metabolismo 9-LOX de oxilipinas, LOXA, AOS3 y LeDES, significativamente reducidos en su expresión durante la micorrización. Además de las moléculas mencionadas, se ha registrado que existe una evidente acumulación de lisofosfatidilcolina (LPC) en raíces de *S. lycopersicum*, compuesto que induce la expresión del gen LePT4 cual codifica para transportadores de fosfatos específicos de la simbiosis MA (Bucher et al. 2009). También se ha revelado que las micorrizas arbusculares alteran el metabolismo de lípidos en el tejido radicular. Dos compuestos de acil-carnitinas, propiamente el butiril-carnitina y propionil-carnitina, comúnmente asociados al metabolismo lipídico, suben en abundancia en raíces de *M. truncatula* en simbiosis con *R. irregularis* (Laparre et al. 2014), aunque en tomate poco ha sido elucidado en su referencia. Adicionalmente, un efecto en común en las raíces de distintas especies vegetales es la activación de la ruta de metileritriol-fosfato y biosíntesis de carotenoides, derivando en la formación de los apocarotenoides ciclohexanona y micorradicina, este último siendo el responsable de la coloración amarilla característica de raíces micorrizadas (Strack y Fester 2006). En resumen, la selección de porción vegetal a analizar debe hacerse bajo la consideración de que los metabolitos registrados revelarán una modificación metabólica que puede representar diferentes rutas metabólicas, y, por lo tanto, distinto papel en la fisiología de la planta.

IV. Los efectos de la simbiosis son especie-específico

Al igual que el órgano vegetal del cual se evalúa su perfil metabólico, otro factor que influye en las alteraciones metabólicas y su intensidad, procedentes de la simbiosis, es la

especie de hongo MA que coloniza a la planta, así como la especie de planta huésped. Por un lado, algunos científicos postulan que la ocurrencia y abundancia de especies vasculares en una comunidad en particular dependen de la presencia de una o varias especies de hongos MA (Allen et al. 1995; Van der Heijden et al. 2005), mientras que otros estudios difieren declarando a la especie vegetal como la responsable de la composición de la comunidad micorrízica arbuscular (Johnson et al. 2003). Schweiger et al. (2014) llevaron a cabo un estudio de la transición metabólica posterior a la inoculación con *R. irregularis* en hojas de cinco especies. Demostraron que el contenido total de fósforo no variaba significativamente entre las especies, mas la concentración de otros nutrientes, carbono y nitrógeno, era distinto en cada una, siendo mayor en *V. chamaedrys*. Asimismo, en su análisis no-dirigido uHPLC-ToF-MS de los extractos foliares reconocieron 850 señales comunes en todas las plantas, correspondientes a un “metaboloma núcleo”, representando los siguientes porcentajes de los metabolitos de cada especie: 23% para *P. lanceolata*, 29% *P. major*, 18% para *V. chamaedrys*, 39% para *M. truncatula* y 45% para *P. annua*. No obstante, otros compuestos fueron identificados especie-específico; por ejemplo, manitol fue únicamente detectado en *V. chamaedrys*, polioles cíclicos y ononitol se encontraron sólo en *M. truncatula* y sorbitol en ambas especies del género *Plantago*. También revelaron diferencias cuantitativas que responden a una clara separación entre la respuesta en dicotiledóneas y monocotiledóneas, donde las primeras mostraron una notable disminución de aminoácidos y ácidos orgánicos, mientras que en monocotiledóneas aumentó la concentración de ambas sustancias. A pesar de que este estudio provee evidencia de una clara variación acorde a la especie vegetal micorrizada, distintas investigaciones han elucidado modificaciones específicas según el hongo que coloniza. Un análisis de espectrometría de masas por ionización en electro-spray acoplado a cromatografía líquida (LC-ESI-MS) de raíces de tomate demostró una evidente segregación en los efectos metabólicos producidos por *R. irregularis* y *F. mosseae* (Rivero et al. 2015). Colectaron datos de 1876 señales, de las cuales 300 eran acumuladas diferencialmente en raíces micorrizadas, 85 únicamente aparecían ante la presencia de *F. mosseae* y 35 específicas para *R. irregularis*, sugiriendo un impacto metabólico más potente con la primera especie. Entre las señales identificadas, destacó la acumulación de glutamato y aspartato con ambos hongos, aunque *F. mosseae* modifica

con mayor intensidad el contenido de aminoácidos en la planta huésped, al igual que el metabolismo de azúcares y fenoles. Igualmente, de las señales en común se reconoció la acumulación de metabolitos involucrados en la ruta de oxilipinas, la cual deriva en la biosíntesis de ácido jasmónico y sus derivados (Wasternack y Hause 2013). Sin embargo, los niveles de las formas bioactivas de AJ, el metil-jasmonato (Me-JA) y jasmonil-isoleucina (JA-Ile) se elevaron de manera significativa solamente en raíces micorrizadas con *F. mosseae*. Por otro lado, Pozo y colaboradores (2002) compararon la capacidad de inducción local y sistémica en *S. lycopersicum* de respuestas de defensa entre las mismas especies fúngicas, demostrando que *R. irregularis* supera la producción de diversas enzimas hidrolíticas, y, por ende, mayor eficiencia en defensa que *F. mosseae*.

Las micorrizas arbusculares aparecen en los ecosistemas no de manera aislada, sino en comunidades que varían en su composición y diversidad (Bever et al. 2001), motivo por el cual diversos autores se han dedicado a realizar estudios comparativos de conjuntos de MA. Sharma et al. (2009), evaluaron la respuesta de *Curculigo orchinoides*, una planta de interés económico por sus propiedades anticancerígenas, ante distintas comunidades de MA. Probaron tres inóculos monoespecíficos (*Glomus geosporum*, *Glomus microcarpum* y *R. irregularis*) y cinco multi-especie con diferencias en composición y riqueza, incluyendo un total de 18 especies, y observaron un considerable aumento en los pigmentos fotosintéticos en las plantas con inóculo de mayor riqueza, hasta 3.07 veces mayor que en el resto de los tratamientos. Pese a ello, las valoraciones de concentración de nutrientes minerales como fósforo, magnesio y cobre no tuvieron una variación importante entre los consorcios de MA. En contraste, otro estudio analizó el contenido de P y N en las plantas de *Prunella spp* y *Brachypodium spp* micorrizadas por tres cepas del género *Glomus* (BEG19, BEG21 y Basle-Pi), señalando una disminución de 2.1 hasta 3.8 veces menor concentración de dichos nutrientes al utilizar las cepas simultáneamente en comparación con su efecto individual en ambas plantas (Van der Heijden et al. 2002). De igual modo, Jansa et al. (2007) estudiaron el impacto en el contenido de fósforo con el mismo diseño experimental: examinaron las especies *F. mosseae*, *G. claroideum* y *R. irregularis*, en inóculos individuales y en mezcla, en dos plantas, *M. truncatula* y *Allium porrum*. Observaron un evidente incremento en el fósforo total en ambas plantas micorrizadas únicamente por *F. mosseae* a las 4 semanas después de inoculación (sdi);

mismos niveles elevados de dicho nutriente fueron alcanzados por *R. irregularis* a 8 sdi. En su caso, ninguna de las combinaciones de MA sobrepasó la concentración adquirida por los inóculos individuales. Desde otra perspectiva, análisis transcriptómicos de *M. truncatula* en simbiosis con *R. irregularis* y/o *Gigaspora gigantea* y/o *G. versiforme* evidenciaron una separación de los tratamientos debido a sus distintas afectaciones metabólicas (Liu et al. 2007). Sus datos reportados indican 56 genes inducidos en común por *R. irregularis* y *G. gigantea*, de los cuales, 39 son igualmente compartidos con *G. versiforme*, representando los “genes núcleo” inducidos por la simbiosis. En cambio, respuestas transcripcionales referentes a procesos metabólicos de actividad hidrolítica, actividad enzimática y actividad molecular estructural difirieron dependiendo de la especie de hongo presente. De manera interesante, un gen que codifica para una proteína rica en cisteína mostró un alza en su inducción de 6,659 veces mayor en los tejidos asociados a *R. irregularis*, mientras que en los otros tratamientos y en plantas control no mostró expresión, revelando un efecto singular de este hongo. En definitiva, la variación en el fitometaboloma derivada de diferentes grupos de hongos MA comparte inicialmente un metabolismo núcleo (Brundett 2002), sin embargo, existe una alta especificidad en la modulación metabólica de tipo especie-específico (Schweiger et al. 2014).

V. Los factores bióticos y abióticos influyen en la SMA y sus efectos metabólicos

Además de los factores mencionados, otros elementos externos, de origen tanto abiótico como biótico, son capaces de alterar la reacción sistémica en el metabolismo de la planta. La condición ambiental que afecta más a la simbiosis es el contenido de nutrientes minerales en el suelo, principalmente el fósforo. En una investigación se valoraron los efectos metabólicos de plantas de maíz con y sin micorriza arbuscular sembrados en un sistema bi-compartimiento dividiendo la fuente de fosfatos (Pi) por una membrana hifal-permeable (Gerlach et al. 2009). Ante bajas concentraciones de Pi el contenido total de zinc y cobre aumentaron, mientras que los niveles de manganeso disminuyeron; de este último nutriente, el mismo efecto ha sido observado en *H. vulgare* ante la deficiencia de fósforo en el sustrato (Pedas et al. 2011). Asimismo, en extractos de las hojas de maíz micorrizadas con disponibilidad de Pi, se detectaron 13 metabolitos reducidos, relacionados con un incremento en carbohidratos, disminución en la concentración de aminoácidos totales y nitrato en tallo y raíz; lo que sugiere un efecto sistémico en la

relación P/N/C cuando los niveles de Pi en suelo son elevados. En cuanto a las consecuencias metabólicas de la simbiosis en fitohormonas, dichos investigadores revelaron un efecto inverso en patrón de expresión de genes, con una inducción de genes asociados a la síntesis de ácido salicílico (AS) y represión de aquellos vinculados con ácido jasmónico (AJ) y etileno (ET) en suelos fortificados con Pi, y lo opuesto con limitación de fósforo. De forma general, los patrones de expresión de genes del metabolismo central exhiben un incremento en condiciones con basto fósforo, en contraste con plantas en suelos con escasa disponibilidad de Pi (Schlüter et al. 2013). En contraparte, niveles elevados de fósforo en el suelo generan un impacto negativo sobre la SMA. Mack y Rodgers (2008) demostraron que la fertilización (proporción NPK de 15-16-17) de plantas *Schedonorus phoenix* micorrizadas aminoraba considerablemente la tasa de colonización. Bajo altas concentraciones de Pi, los exudados radiculares pierden su capacidad de estimular el desarrollo hifal y carecen de estrigolactonas (Balzergue et al. 2010), una hormona recientemente ubicada en su participación en el reconocimiento y establecimiento del hongo con función de señal pre-simbiótica (Gómez-Roldan et al. 2008). A pesar de estos resultados, el aumento en fósforo no alteró las tasas de germinación ni la formación de hifopodias. Mas adelante, en el mismo estudio evaluaron por LC-MS/MS extractos de los exudados, elucidando un claro efecto inhibitorio en la producción sistémica in planta de estrigolactonas dado el suministro elevado de Pi. Otro nutriente mineral que condiciona la interacción micorrízica es el nitrógeno. Plantas de trigo inoculadas con un conjunto poli-especie de MA y cultivadas en suelos deficientes en N muestra una reducción de hasta 16 veces de lisofosfatidilcolina en comparación con su respectivo control; igualmente se observó una menor abundancia de compuestos involucrados en el ciclo de la urea, en específico de la ornitina y putrescina, en cambio, los niveles del ácido gama-amino-butírico y de xilitol y sus derivados reducidos fueron ligeramente mayores en plantas micorrizadas (Saia et al. 2014). Similarmente, Thirkell et al. (2016) llevaron a cabo un experimento de compartimentalización de microcosmos con N15 con una proporción C:N de 7:1, demostrando que al permitir el acceso hifal a la fuente de N15 no sólo aumentaba la biomasa de tallo y raíz en un 62% y 73% respectivamente, sino que también incrementaba un 28% la concentración de Pi radicular en contraste con plantas micorrizadas sin acceso a la fuente rica en nitrógeno. En términos

generales, el enriquecimiento de los suelos con N provoca un alza en la producción de todas las estructuras intramatriciales del hongo (Wilson et al. 2009).

Por otro lado, diversos aspectos abióticos igualmente intervienen en el proceso simbiótico. Las comunidades de hongos MA son influenciadas por las propiedades del suelo que habitan, como pH, materia orgánica, humedad relativa, compactación, prácticas de labranza y las concentraciones de nutrientes (Egerton-Wharton y Allen 2000). En una investigación con gradientes de temperatura en el sustrato en un rango de 14 °C a 26°C realizado por Hawkes y colaboradores (2008) estudiaron sus efectos sobre una comunidad multi-especie de MA en *P. lanceolata*, descubriendo que la temperatura altera significativamente la estructura y locación de la red hifal, con una mayor producción de vesículas en suelos frescos y un desarrollo micelial potenciado en condiciones cálidas. El impacto fisiológico de la simbiosis también se encuentra sujeto a la exposición a radiación solar, cuya afectación a sido evaluada en *L. japonicus* en asociación con *F. mosseae*, donde la insolación reduce los efectos positivos de la simbiosis sobre la biomasa total, número de flores y valor nutrimental (Fester et al. 2011). Asimismo, en plantas de tomate sometidas a estrés por sequía, la presencia de micorrizas arbusculares promueve la acumulación de ácido abscísico (ABA) en un 58% durante sequías moderadas, y hasta un 200% en sequías severas, acompañado de un incremento de solanacol e isómeros de didehidro-orobancol (DDH), ambos compuestos de la familia de estrigolactonas (Ruiz-Lozano et al. 2015). Por lo común, existe una correlación directa en los cambios en abundancia relativa de las especies MA en una comunidad y las distintas estaciones del año, mostrando diferencias en su proceso de esporulación según la temporada y la especie (Lovelock et al. 2003). Por otra parte, la longitud del micelio fúngico es determinante para definir el grado de modificación del metaboloma vegetal. Entre más largo sea la red micelial, mayor será en beneficio nutrimental y fisiológico en la planta huésped; aunque existe una diferencia en extensión ligada a la especie o familia de micorriza, la variación intra-especie puede variar hasta 1,000% en su magnitud de respuesta del huésped, fenómeno explicado por la presencia de distintos ecotipos (Hart y Reader 2002). Así, se apoya la postura donde las condiciones abióticas contribuyen a los efectos micorrízicos y su alcance en el huésped.

Desde el punto de vista biótico, la presencia de otros organismos endófitos, el ataque por patógenos y la misma comunidad de rizobacterias en el suelo afectan las modificaciones metabólicas derivadas de la simbiosis. El acompañamiento de MA con otro hongo endófito en tejido aéreo reduce fuertemente la frecuencia de colonización en raíces, mostrando una correlación negativa entre la densidad hifal del endófito y el establecimiento de la micorriza arbuscular (Mack y Rodgers 2008). Los mecanismos que inducen dicho efecto negativo incluyen la inhibición de alcaloides vía endófito, alteración de los requerimientos nutrimentales por la planta, y la prioridad espacial en la interacción vegetal con múltiples simbiosis. En *S. lycopersicum* se han probado las fluctuaciones metabólicas ante el ataque por *Ralstonia solanacearum*, patógeno causante de la putridéz parda, en simbiosis con *G. versiforme*, donde se observó un 65.2% de aumento en el contenido total de fenoles ante el ataque bacteriano (Zhu y Yao 2004). Misma respuesta diferencial en el contenido de fenoles complejos y sencillos generada por la presencia de patógenos ha sido reportada en *M. truncatula* micorrizada por *R. irregularis*, junto el aumento en la expresión de proteínas de defensa (Salzer et al. 2000). En suma con lo mencionado, la comunidad de rizobacterias igualmente impacta la interrelación entre la planta y el hongo MA. Saia y colaboradores (2014), estudiaron el efecto en conjunto de un inóculo poli-especie de micorrizas y otro de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) incluyendo 15 especies de *Bacillus*. Demostraron que no existe un efecto sinérgico entre ambos inóculos en el incremento del porcentaje de biomasa. No obstante, el análisis de espectrometría de masas – tiempo de vuelo acoplado a cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC-Q-TOF-MS), reveló que el 94% de la variación entre tratamientos dependía del contenido de ácidos grasos insaturados, carbohidratos no descritos y aminoácidos. Concluyeron que el conjunto de simbiosis reduce el metabolismo de péptidos, en particular productos derivados de asparagina sintasa y glutamina-amonio liasa, así como una elevación en los niveles de D-arabitol, 2-oxoglutarato, piruvato y L-arabinosa, compuestos vinculados con el metabolismo de almidón y sacarosa.

VI. Hormonas vegetales que intervienen en la SMA

Diversas fitohormonas, incluyendo citoquininas, giberelinas, etileno, auxinas, ácido salicílico, ácido abscísico y ácido jasmónico, están involucradas en la formación,

regulación y funcionamiento de las MA (Hause et al. 2006; Gutjahr y Paszkowski 2009; Schweger y Müller 2015), e igualmente participan en las respuestas metabólicas durante la simbiosis. En etapas tardías del proceso de micorrización, las plantas en simbiosis con micorrizas arbusculares acumulan mayor cantidad de citoquininas (CK) tanto en tallo como hojas en comparación con su control (Van Rhijn et al. 1997). Se presume que el aumento en la concentración de CK funciona como señal para la síntesis de productos correspondientes a genes de nodulinas tempranas (ENOD), cuales, en conjunto, determinan la iniciación de primordios adicionales en raíces laterales de la planta micorrizada (Barker y Tagu, 2000). Permanece por esclarecer si los niveles alterados de CK son debidos al hongo o la planta huésped; una propuesta es que se debe al incremento en la nutrición de fósforo en la raíz, resultando en la acumulación de CK (Hause et al. 2006). Por otro lado, la concentración de giberelinas (GA) tiene un impacto sobre la frecuencia de micorrización y abundancia arbuscular en las raíces de tomate. Alteraciones en la ruta 13-hidroxilación de biosíntesis de GA muestran un efecto negativo en el desarrollo micorrízico ante el aumento de dicha fitohormona (Rodríguez et al. 2014). Se ha observado que una vez establecida la simbiosis, las modificaciones en los niveles de GA son órgano-específico, generando un aumento en su concentración en hojas, mientras en el tejido de raíz se muestra una tendencia de disminución en la actividad de GA (Allen et al. 1982; Barea y Azcón-Aguilar 1982). Al igual que las giberelinas, la presencia de etileno reduce la capacidad de colonización del hongo, e incluso puede llegar a inhibir por completo su establecimiento en la raíz (Hause et al. 2006). En consecuencia al ET en raíz, los apresorios fúngicos aparecen anormales, inflamados y altamente ramificados, afectando su eficiencia de penetración a las células vegetales (Geil et al. 2001), aunque el número de estructuras no difiere del control. Para especies del género *Solanum* se propone un mecanismo de represión de la biosíntesis de ET dado el aumento de compuestos fenólicos derivados de la simbiosis, permitiendo así el desarrollo del hongo (Barker y Tagu, 2000). El papel de las auxinas durante la infección por MA permanece controversial. Por un lado, se ha demostrado que la aplicación de ácido indole-3-acético (IAA) o del ácido tri-iodo-benzoico – un inhibidor del transporte de auxinas – provocan un aumento en las tasas de micorrización (Kaldorf y Müller, 2000). A pesar de ello, es posible que las auxinas faciliten la colonización, incrementando el número de raíces

laterales durante etapas tempranas de la simbiosis, estimulando así su colonización por MA (Fitze et al. 2005). En cuanto al ácido salicílico, su aplicación exógena en raíces reduce la tasa de colonización al inicio de la interacción simbiótica, aunque no afecta la formación de apresorios (Ludwig-Müller et al. 2002). Al respecto, se ha propuesto una correlación inversa entre los niveles de SA y el grado de colonización radicular (Medina et al. 2003). Opuesto a los efectos de las fitohormonas mencionada previamente, el ácido abscísico (ABA) juega un papel positivo en el establecimiento de micorrizas arbusculares en tomate. ABA contribuye al proceso de colonización aumentando la susceptibilidad de infección por parte del hongo MA en raíces de *S. lycopersicum* (Herrera et al. 2008).

Adicional a las distintas hormonas vegetales mencionadas, el ácido jasmónico (AJ) ha sido de particular interés por su latente participación en la simbiosis con micorrizas arbusculares. El AJ y sus derivados, los jasmonatos, son reguladores hormonales involucrados en respuesta ante estrés biótico y abiótico que desencadenan en la planta cascadas de señalización para la expresión de mecanismos de defensa ante un ataque o condiciones ambientales adversas (Hause et al. 2002; Kim et al. 2014). Como se mencionó anteriormente, existe controversia respecto a los patrones de acumulación de AJ en plantas micorrizadas en comparación con su control, donde ciertos estudios detectan un incremento de esta fitohormona y en otros casos permanece inalterada. Dado que los hongos micorrízicos arbusculares son organismos biótrofos obligados, comparten diversas propiedades en común con otros patógenos biótrofos (Paszkowski 2006). Por ende, el papel de las hormonas vegetales en la regulación de mecanismos de defensa contra hongos, tanto biótrofos como necrotróficos, resultan similares, en particular la acumulación de AJ acompañado de niveles reducidos de SA, actuando con roles inversos (Kazan y Manners 2009).

Inicialmente, el establecimiento de la asociación simbiótica conlleva la supresión de las respuestas de defensa vegetal ante el hongo MA (García-Garrido y Ocampo 2002); no obstante, durante las etapas tardías de la simbiosis los niveles de AJ endógeno se incrementan (Riedel et al. 2008; Foo et al. 2013). Durante el reconocimiento y las primeras horas después de inoculación con MA se ha identificado una inducción transitoria de las defensas vegetales, resultando en el alza de hormonas de defensa, principalmente de SA, respuesta que posteriormente es suprimida por el hongo

micorrízico en las etapas sucesivas (Cameron et al. 2013). Esta reducción de SA al inicio de la infección ha sido estudiada en raíces de tomate (Nair et al. 2014), demostrando una reducción del 50% en su concentración ante la asociación con *G. fasciculatum*. Si bien, en etapas tempranas de la colonización el hongo MA suprime las defensas dependientes de AS en la planta huésped para asegurar su establecimiento en las raíces (Pozo y Azcón-Aguilar 2007), simultáneamente, una vez formado los arbusculos, los niveles de AJ aumentan en células que contienen dichas estructuras (Hause et al. 2002; Meixner et al. 2005; López-Ráez et al. 2010). Por consiguiente, se ha propuesto que la simbiosis MA impone una supresión parcial de las respuestas dependientes de AS y promueve las respuestas reguladas por AJ (Gerlach et al. 2015).

La participación del AJ en el proceso inicial de colonización aún no resulta claro. Variedades mutantes o transgénicas de plantas de tomate defectuosas en la biosíntesis o ruta de señalización del AJ muestran una reducción en la tasa de colonización y en la formación de arbusculos (Nair et al. 2014). León y colaboradores (2012) evaluaron el rol del AJ durante la simbiosis empleando la línea mutante de tomate *sp2* deficiente en la ruta de síntesis de dicha hormona, la cual mostró una reducción en la intensidad de colonización y frecuencia arbuscular; asimismo, observaron que la expresión de los genes LOXA y AOS3 (los cuales codifican enzimas involucradas en el metabolismo 9-LOX y 13-LOX y en la biosíntesis de AJ) permanecía estable en mutantes, indicando bajos niveles de AJ, mientras que en plantas control se elevó en respuesta a la simbiosis. De manera similar, la supresión parcial de AOC1, otro gen involucrado en la producción endógena de AJ, en raíces de *M. truncatula* reveló que tanto la tasa de micorrización como la formación de arbusculos se ve negativamente afectada por la reducción en el contenido de AJ (Isayenkov et al. 2005). Empero, otras investigaciones con *S. lycopersicum* revelan una aceleración en la colonización en mutantes *jai-1* con bloqueo en la ruta de señalización de jasmonatos inducible por ataques (Herrera-Medina et al. 2008). En este caso, el déficit de AJ causa un fallo en la regulación del proceso, volviendo más susceptible a la raíz ante la infección fúngica, incrementando la abundancia arbuscular y la actividad de la fosfatasa alcalina fúngica, demostrando así que la señalización de AJ influye en la formación de las micorrizas arbusculares. Aunque, por otro lado, el silenciamiento del sistema LOX (parte del metabolismo vegetal que conduce a la síntesis de AJ endógeno) no afecta

significativamente la colonización en algunas plantas (Wasternack y Hause 2013), lo que sugiere que el AJ no se encuentra ligado al establecimiento del simbiote. Adicionalmente, un hallazgo que sustenta la supresión de defensas vegetales al comienzo de la simbiosis es la identificación de la proteína SP7 en *R. irregularis*. SP7 es secretada al iniciar el contacto entre las hifas fúngicas y el tejido radicular, posteriormente de transportada al núcleo de la planta donde inhibe el factor de transcripción ERF19, suprimiendo así las respuestas de defensa del huésped y promoviendo la infección (Kloppholz et al. 2011).

Con la finalidad de esclarecer el papel de esta hormona durante el establecimiento de la simbiosis, autores han analizado desde otro ángulo, estudiando los efectos en la simbiosis al aplicar jasmonatos de manera externa. Ante el suministro exógeno de metil-jasmonato (MeJA) en plantas de tomate micorrizadas, sus efectos muestran un comportamiento concentración-dependiente, donde valores menores de 5 μ M estimulan el desarrollo de la simbiosis, mientras que a concentraciones mayores reducen la frecuencia de colonización afectando principalmente el metabolismo de fosfato del hongo (Herrera-Medina et al. 2008). En consecuencia, se atribuye al equilibrio de homeostasis de AJ en el tejido vegetal el control sobre el establecimiento de la micorriza (Hause et al. 2007). Este vínculo concentración-dependiente entre el AJ y la formación de micorrizas arbusculares podría explicar los diversos resultados contradictorios en las diversas investigaciones.

Posterior al establecimiento del hongo, los reportes acerca del AJ son consistentes reportando un claro aumento en su concentración en el tejido vegetal. Este incremento ocurre de manera espacial y coordinada, específicamente en células corticales que contienen arbusculos, de lo cual se asume que el alza de AJ está ligado al desarrollo arbuscular (Hause et al. 2007; Herrera et al. 2007). Por ende, se considera que el rol de los jasmonatos se relaciona mayormente con la simbiosis ya establecida en su totalidad, más que con la interacción en la etapa de reconocimiento (Hause et al. 2002). El mecanismo mediante el cual se da dicha elevación en la biosíntesis de AJ es aún incierto; una propuesta al respecto es que se debe al estrés osmótico generado por la alta afluencia de carbono en células micorrizadas (Maucher et al. 2001), aunque es necesario mayor evidencia para comprender el proceso. Se ha descrito un incremento de AJ con distintas intensidades en pepino, cebada, *M. truncatula*, soya y tomate ante la simbiosis (Vierheilig

y Piche 2002; Hause et al. 2002; Meixner et al. 2005; Stumpe et al. 2005; León et al. 2012), así como la acumulación de OPDA, un precursor de AJ en tomate (López-Ráez et al. 2010). También en tomate, Nair y colaboradores (2014) observaron una elevación en los niveles de expresión de los genes OPR3 y COI1 involucrados en la biosíntesis y respuestas del AJ, al igual que en un gen codificador para prosistemina, un precursor del AJ, con niveles de 6, 42 y 23 veces mayor respectivamente. Datos experimentales similares se han reportado en *Z. mays* para genes involucrados en la biosíntesis de AJ y ET en etapas tardías de la simbiosis (Gerlach et al. 2015). De tales resultados, se especula domina una regulación dependiente de AJ de las respuestas de defensas durante la simbiosis, semejante a la resistencia sistémica inducida (RSI) por rizobacterias, proceso que es independiente de SA, pero requiere una respuesta íntegra de AJ y ET (Conrath et al. 2002). Por otra parte, los patrones de expresión de genes relacionados con el metabolismo LOX-9 en tomate, LOXA y AOS3, se ven disminuidos 50 días después de la inoculación con *R. irregularis* (León et al. 2012). Ambos genes son inducibles por AJ y la evolución en su expresión génica fue relativamente igual, lo que sugiere que la inducción de LOXA y AOS3 durante la micorrización depende de la activación de la ruta de AJ; sin embargo, su expresión no es indispensable para una colonización exitosa, dado que mutantes *jai-1* mostraron bajos niveles de transcritos de dichos genes y no impactó negativamente la formación de la MA. Asimismo, los investigadores evaluaron los genes LOXA y AOS3 junto con PIN II – un gen marcador típico en la ruta del AJ – en plantas de tomate mutantes *sp2*, en las cuales la expresión de los tres genes no tuvo una diferencia significativa con su control. De ello se infiere que el nivel basal de AJ en *sp2* es responsable de la baja tasa de micorrización, ya que la disminución del contenido de AJ reduce igualmente la presencia de señales vegetales sensibles a jasmonatos, compuestos que fomentan positivamente la infectividad fúngica (Gómez et al. 2009). Respecto a la rama 13-LOX de la ruta de oxilipinas, la cual deriva en la síntesis de AJ y sus derivados, se ha detectado una acumulación de sus compuestos intermediarios en *S. lycopersicum* colonizados por *R. irregularis* y *F. mosseae* (Rivero et al. 2015). De igual modo, en raíces micorrizadas de cebada se reconoció un aumento en la expresión de AOS, gen que participa en ruta 13-LOX, acompañado de altos niveles AJ y AJ-Ile hasta 5 y 2.5 veces mayor respectivamente (Hause et al. 2002). La inducción de la expresión de AOS ocurre

de manera restringida en células acarreadoras de arbusculos, apoyando la postura donde el ascenso de los niveles de AJ corresponde a etapas tardías de la simbiosis y no al proceso de reconocimiento. Finalmente, cabe destacar que tal acrecencia de dicha fitohormona varía ampliamente dependiendo de la especie vegetal; en el caso de *S. lycopersicum*, la mayoría de los genes que codifican enzimas relacionada con la biosíntesis de AJ son AJ-inducibles, generando un ciclo regulatorio positivo de alimentación directa y resultando en niveles de AJ más pronunciados (Isayenkov et al. 2005).

El propósito primordial de dicha agregación elevada de AJ en plantas micorrizadas está relacionado con su función de defensa originado por el estado priming y la resistencia inducida por micorrizas (RIM). Existe una acumulación explícita de jasmonatos durante la simbiosis micorrízica (Hause et al. 2007; López-Ráez et al. 2010), por lo tanto, es posible que tales compuestos actúen como señales complementarias de larga distancia del sistema RIM en respuesta a ataques de patógenos o herbívoros (Cameron et al. 2013). Cabe mencionar que las defensas priming dependientes de AJ durante la activación del RIM son parcialmente determinadas por rizobacterias efectoras de RSI presentes en la micorizósfera (Gallou et al. 2011). Song et al. (2015) emplearon plantas de tomate silvestres WT, mutantes *spr2* deficientes en la biosíntesis de AJ y líneas transgénicas 35S::PS que sobreexpresa prosistemina para elucidar que la ruta de señalización de AJ media las respuestas de defensa derivadas de los hongos MA. Analizaron la expresión de los genes LOX y PAL en los tres fondos genéticos durante la infección por *Alternaria solani*, observando un aumento en su actividad tanto en 35S::PS y WT, específicamente un incremento considerable en LOX en el caso de 35S::PS, mientras que en *spr2* no hubo inducción significativa en ninguno de los dos genes, siendo este genotipo el más susceptible a la infestación por el patógeno. Mismos resultados fueron reportados en tomates micorrizados inoculados con *Alterania alternata*, registrando una actividad 3 veces mayor para LOX y 1.8 para PAL, asimismo los niveles de MeJA aumentando hasta 4 veces en presencia del patógeno (Nair et al. 2014). En resumen, la función general de los jasmonatos en la simbiosis envuelve múltiples mecanismos, incluyendo inducción de biosíntesis de flavonoides, propiciar una mejor respuesta de defensas, reorganización del citoesqueleto de células infectadas, redistribución de nutrientes y suministro de carbono, así como una mejora global del fitness vegetal (Schaarschmidt et al. 2006).

VII. Enfoque metabolómico para el estudio de la SMA

La metabolómica es el estudio del metaboloma en su totalidad, es decir, todos los metabolitos que un organismo produce, en un momento determinado (Fiehn 2002). Tales estudios explican una respuesta o modificación del fenotipo a nivel metabólico en condiciones ambientales específicas y funcionan como una herramienta potente para el monitoreo de la variabilidad fenotípica de un genotipo en respuesta a cambios externos como sequías (Fumagalli et al. 2009), disponibilidad de nutrientes (Hirai et al. 2005), contaminantes (Jones et al. 2007), salinidad (Fumagalli et al. 2009), temperatura (Michaud y Delinger 2007) e interacciones bióticas (Choi et al. 2006), entre otros factores ecológicos. Los estudios metabolómicos son particularmente adecuados para plantas debido a que permiten el análisis simultáneo de compuestos derivados del metabolismo tanto primario como secundario (Sardans et al. 2011). Asimismo, esta rama de las ciencias “ómicas” concede un mejor análisis de las distintas capacidades de respuestas conferidas por la plasticidad fenotípica de cada especie, permitiendo determinar qué rutas metabólicas se encuentran involucradas en una respuesta en concreto. Anteriormente, diversos estudios se enfocaron en resolver los mecanismos moleculares de la simbiosis MA y su impacto en el fitness vegetal a través de patrones de expresión génica y perfiles proteómicos (Liu et al. 2007; Guether et al. 2009; López-Ráez et al. 2010). Su aplicación para elucidar los efectos sistémicos se limitaba al caso de interacciones rizobiales en un inicio (Barsch et al. 2006); en contraste, la simbiosis micorrízica se caracteriza por un grado considerablemente mayor de complejidad funcional y variabilidad, dados los múltiples posibles efectos mencionados previamente, así como la gran diversidad genética y funcional de los hongos (Fester et al. 2011). Hoy en día, los enfoques metabolómicos no-dirigidos facilitan la separación y detección de un amplio rango de metabolitos como aminoácidos, ácidos grasos, ácidos orgánicos, fosfatos de azúcar, nucleótidos y derivados de glucósidos, contribuyendo a la obtención de un fingerprint global de los cambios cuantitativos y cualitativos en el metabolismo del organismo de interés (De Vos et al. 2007). Así, la metabolómica representa una tecnología valiosa para la realización de perfiles metabólicos comprensivos de sistemas biológicos, cuya herramienta analítica más utilizada es la espectrometría de masas (Rivero et al. 2015).

Un planteamiento consistente de estudios “omicos” sobre la simbiosis MA ha sido la observación del impacto significativo que tiene la colonización micorrízica sobre la expresión génica y el perfil metabólico de la planta huésped (Salvioli y Bonfante, 2013). En la práctica, estudios combinan el enfoque metabolómico con los análisis de patrones de expresión para una determinación pronta de los genes involucrados en respuestas adaptativas; esta perspectiva combinada posee gran potencial para elucidar la función génica y establecer redes complejas de información fisiológica de un organismo (Fester et al. 2011).

El análisis metabolómico no-dirigido cuenta con numerosas ventajas. En comparación con otros métodos de análisis convencionales en ecología química, como fraccionamiento de extractos, purificación y bioensayos, el enfoque metabolómico permite medir todos los compuestos al mismo tiempo y en un solo paso, en vez de someterlo a varias etapas iterativas de purificación, y con mayor probabilidad de contabilizar igualmente compuestos inestables y/o volátiles (Sardans et al. 2011). Sin embargo, el análisis comprensivo del metaboloma en su totalidad no es posible realizarlo directamente debido a la inmensa diversidad de metabolitos primarios y secundarios de origen vegetal (Trethewey 2004). Por ende, la investigación del metaboloma requiere de la priorización de subconjuntos de metabolitos definidos por sus propiedades fisicoquímicas o su abundancia (Kogel et al. 2010). A pesar de que los enfoques de perfiles metabólicos se fundamentan en múltiples ensayos de metabolitos individuales dirigidos con alta precisión, el fingerprint metabólico tiene como finalidad obtener los patrones globales de todos los compuestos basado en la aplicación de EM o técnicas de RMN, permitiendo la recuperación subóptima de metabolitos individuales (Fiehn 2002). Al mismo tiempo se han dado rápidos avances en métodos analíticos y sistemas de software computacionales que, en conjunto con los análisis metabolómicos en laboratorio, han multiplicado las posibilidades de una identificación eficiente y cuantificación simultánea de un número cada día mayor de compuestos (Sardans et al. 2011), haciendo de esta técnica una alternativa útil y eficaz para el estudio de la simbiosis micorrízica.

JUSTIFICACIÓN

Hoy en día el tomate es una de las hortalizas de mayor importancia económica a nivel mundial. La asociación entre el hongo micorrízico arbuscular *Rhizophagus irregularis* y la planta de tomate (*Solanum lycopersicum*) aporta múltiples ventajas a la planta huésped como mayor velocidad de crecimiento, menor susceptibilidad a infecciones por fitopatógenos y aminoran el estrés causado por condiciones abióticas incluyendo heladas, sequías y alta salinidad. En concreto, en la industria agrícola aumentan el rendimiento y producción de los cultivos. Aunque existen diversos estudios respecto a la simbiosis con *R. irregularis* y el tomate, aún es necesario comprender los mecanismos metabólicos que potencian el establecimiento de la simbiosis micorrízica y su relación con las modificaciones de fitohormonas involucradas en la defensa, como lo es el ácido jasmónico. Este proyecto de investigación generará conocimiento nuevo respecto a la participación del ácido jasmónico en la interacción planta-hongo a través de un enfoque metabolómico, permitiendo en un futuro comprender su regulación y favorecer la simbiosis entre *R. irregularis* y plantas de tomate, y quizá en otros cultivos.

HIPÓTESIS

El ácido jasmónico altera la regulación de metabolitos dependientes de la colonización por hongos micorrízicos en las raíces de plantas de tomate, ejerciendo un efecto positivo sobre diversos aspectos de la fisiología vegetal como nutrición, desarrollo y rendimiento.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

Objetivo general:

Evaluar el efecto y participación del AJ en la colonización micorrízica de *Rhizophagus irregularis* en plantas de tomate alteradas en la ruta de señalización AJ/Sistemina mediante perfiles metabólicos.

Objetivos específicos:

- Analizar el desarrollo y la nutrición vegetal durante la colonización micorrízica.
- Determinar el efecto que tienen diferentes fondos genéticos de plantas de tomate en la colonización micorrízica.
- Identificar alteraciones en la abundancia de metabolitos marcadores en raíces durante la colonización micorrízica en plantas de tomate alteradas en la ruta del AJ/Sistemina.
- Identificar las rutas metabólicas a las que pertenecen los metabolitos marcadores previamente seleccionados y describir los efectos fisiológicos de la simbiosis derivados de sus modificaciones metabólicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelo experimental

Se realizó la evaluación de tres fondos genéticos de plantas de tomate: tipo silvestre (WT), 35S::Prosistemina (PS) y plantas mutantes *spr2*. De cada genotipo, se elaboraron tres repeticiones micorrizadas por *R. irregularis* y otras tres en suelos estériles correspondientes al control, con un total de 18 reproducciones. Cada reproducción constaba de una maceta con 4 plantas del mismo genotipo y tratamiento, con un total de 12 plantas para cada observación. De este modelo experimental se llevaron a cabo 2 repeticiones biológicas.

2. Crecimiento de las plantas e inoculación con *R. irregularis*.

Las semillas de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Castlemart) tipo silvestre (WT), 35S::Prosistemina (PS) y de las plantas mutantes *spr2*, se sembraron en un suelo basado en (1:1 arena-marga) y se inocularon con 3 g de *Rhizophagus irregularis* (Biofertilizante, INIFAP, México). Las plantas control se sembraron en la misma mezcla de suelo previamente esterilizado a 121 °C durante 15 min. Durante los primeros 21 días, las plantas germinadas se mantuvieron dentro de una cámara bioclimática (BioBase BJPX-A450) con condiciones controladas a 20 °C, humedad relativa del 50% y fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 de oscuridad. Todas las plantas se regaron con una solución Asthon con bajo contenido de fósforo (7 mM) con una frecuencia de 2 días a la semana hasta la cosecha de tejidos. A los 50 días posteriores a la inoculación (dpi), se tomaron muestras de raíz para evaluar su colonización micorrízica, el resto del tejido colectado se congeló y almacenó a -80 °C hasta el momento del análisis.

3. Estimación de la colonización de la raíz.

De cada genotipo, fragmentos de raíz tanto control como micorrizadas (120 por genotipo) se tiñeron con azul de tripano (Phillips and Hayman 1970) y se observaron con un microscopio óptico de luz blanca (Olympus BX53). Inicialmente, cada fragmento se clasificó acorde lo descrito por Trouvelot y colaboradores (1986) en cuanto a la intensidad de colonización (Fig. 1) y la abundancia arbuscular (Fig. 2). La información de las categorías asignada fue vaciada al software MYCOCALC

(www2.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocalc-prg/download.html) para la estimación de ambos parámetros. Adicionalmente, se contabilizó la frecuencia de colonización del sistema radicular promedio de cada genotipo y tratamiento.

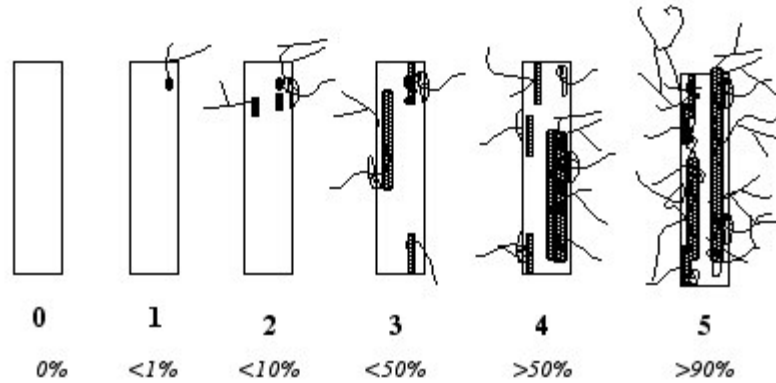


Figura 1. Registro de intensidad de colonización micorrízica (Trouwelot et al. 1986)

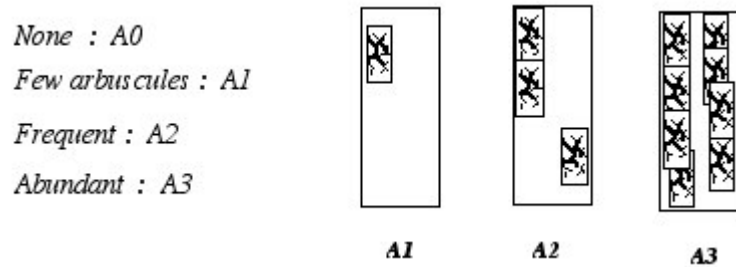


Figura 2. Registro de abundancia de arbuscúlos en raíz (Trouwelot et al. 1986)

4. Medición de los indicadores de crecimiento y efecto de la simbiosis.

4.1. Parámetros

Para determinar el efecto de la simbiosis sobre el crecimiento de las plantas de tomate se midió su altura total, el ancho del tallo, el número de hojas compuestas por planta, la longitud del pecíolo, el número, tamaño, peso y número de semillas de los frutos, así como el peso fresco y seco de las raíces y del tejido. Todas las determinaciones se realizaron a los 50 ddi, excepto el análisis de los frutos y semillas (80 ddi).

4.2. Análisis estadístico

Los datos se analizaron por ANOVA de una vía para determinar si las medias de cada parámetro de los distintos tratamientos probados son estadísticamente iguales. Un

procedimiento de comparación múltiple con la prueba de Tukey se realizó para encontrar diferencias significativas entre las medias. Ambos análisis se realizarán usando el software estadístico Minitab 15 (Minitab Inc., EE.UU.). Las diferencias en $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas.

5. Espectrometría de masas

5.1. Extracción de los metabolitos

Se tomaron 400 mg de muestra de raíz congelada de cada genotipo por cada tratamiento. El tejido radicular fue triturado en nitrógeno líquido y extraído dos veces en 400 μ l metanol acuoso al 80% durante 30 min. La mezcla fue centrifugada a 13,000 rpm a 4 °C durante 30 min. El sobrenadante fue filtrado a través de un tamaño de poro de 0.22 μ m Millex-GV (PVDF) mediante una jeringa con unidad de filtro (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). La solución filtrada se empleó directamente para el análisis de espectrometría de masas, previamente acidificada con ácido fórmico al 5% para fomentar la ionización de los compuestos.

5.2. Análisis por espectrometría de masas

Las medidas de espectrometría de masas se llevaron a cabo utilizando un instrumento de cuadrupolo Micromass ZQ 2000 (Waters, Milford, MA, USA) adjunto al software de control MassLynx 4.0. Los espectros se colectaron aplicando ionización por electrospray (ESI) en modo positivo. El voltaje capilar se ajustó a 3 kV, el voltaje de cono a 60 V y el voltaje de extracción 3 V. El lente de radio frecuencias (RF) se le asignó un valor igual a 0. Se empleó una temperatura de origen de 100 °C y una temperatura de desolvatación de 350 °C con un flujo gaseoso de 250 L/h y un flujo gaseoso de 20 L/h en el cono. En la sección de análisis, se determinó una resolución de 0.15 para masas bajas (LM) y masas altas (HM) con una energía de ion igual a 0.5. el multiplicador se ajustó a un valor de 650. Las muestras fueron inyectadas de forma directa con una tasa de flujo de 10 μ l/min. Se colectaron espectros continuos en un rango entre 15 – 2000 m/z con 1 min de tiempo de corrida, 10 s de tiempo de scan y 0.1 s de tiempo inter-scan.

5.3. Preprocesamiento de los espectros

Los espectros crudos se convirtieron de formato MassLynx a mzXML utilizando el software MassWolf 4.3.1. Los análisis posteriores de los espectros se realizaron empleando OpenMS/TOPP suite 1.7.0 (Kohlbacher et al. 2007, Sturm et al. 2008). Primeramente, se escribió un canal de operación para TOPPAS para la ejecución de las siguientes tareas a todos los espectros: conversión de archivo a mzML, filtro de ruido a través de Noise Filter sgolay (Savitzky y Golay, 1964) con un tamaño de marco de 21 y orden polinomial de 4, seguido de un análisis de selección de picos mediante PeakPicker con un radio de señal/ruido de 1 y amplitud de pico igual a 0.15. A continuación, los datos correspondientes a los picos fueron extraídos de forma manual de los espectros procesados.

5.4. Procesamiento de los datos

La matriz de datos obtenida del análisis de espectrometría contenía las intensidades de 673 m/z por cada una de las 18 observaciones (genotipo x tratamiento x repetición = 3 x 2 x 3). Dicha matriz fue sometida a 5 pruebas de normalización: Normalización a Línea Base, Normalización de Cyclic-Loess, Normalización por Cuantiles, Normalización por Cociente Probabilístico y Normalización por Interpolación Cúbica. Asimismo, por cada método de normalización se probaron dos tipos de transformación: Log10 y Log2. Los análisis se realizaron en el software R versión 2.14.0 (<http://www.rproject.org>) empleando los paquetes libres biocLite (“limma”), biocLite (“statmod”), biocLite (“affy”), library (norm), library (affy), library (limma), library (vsn) y libeary (NCStats) disponibles en <http://www.bioconductor.org/biocLite.R>. La valoración de los métodos de normalización y transformación más adecuado para el conjunto de datos se realizó acorde a lo descrito por Alamiríe y colaboradores (2013). Se consideró la varianza media y el coeficiente de variación medio de cada observación para la selección del método de normalización y transformación óptima para los datos. Para corroborar la optimización de distribución de los datos, se construyeron diagramas de caja de las intensidades de 6 m/z aleatorios con la finalidad de observar y contrastar la distribución de los datos antes y después de aplicar la normalización. Adicionalmente, se elaboró un diagrama de caja con las intensidades del total de m/z por cada observación.

5.5. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) empleando la matriz de intensidades con la finalidad de identificar los valores de m/z con mayor influencia sobre las observaciones y su correlación. El análisis se realizó utilizando el software R versión 2.14.0 con el paquete ‘stats’ versión 3.5.0 previamente instalado (<https://stat.ethz.ch/R-manual/R-devel/library/stats/html/00Index.html>). Se establecieron los parámetros de escalado en Pareto y centralización de los datos, adicional al procesamiento de normalización y transformación, previo al análisis multivariado. De los resultados, se identificaron y seleccionaron las 15 m/z con mayor valor de carga para su análisis subsecuente. A continuación, se ejecutó un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) con las intensidades correspondientes únicamente a las m/z anteriormente seleccionadas. El estudio se realizó con el software estadístico XLStat-BASE versión 2017.1 (<https://www.xlstat.com/es/>) bajo los parámetros de 0.0975 para el umbral de Qi2, número de componentes fijo igual a 2, variables centradas y reducidas, y validación cruzada por Jackknife (LOO).

6. Identificación putativa de los metabolitos y determinación de las rutas metabólicas alteradas

La asignación de los metabolitos putativamente correspondientes a las m/z seleccionadas se realizó mediante la consulta de diversas bases de datos metabolómicas específicas para compuestos registrados en *S. lycopersicum*. La búsqueda se llevó a cabo empleando el valor del radio masa-carga con un rango de tolerancia de ± 0.3 Da; a partir de los *hits* encontrados se recopilaban aquellos compuestos con menor variación respecto a la m/z experimental. Las bases de datos consultadas son Metabolome Tomato Database, <http://appliedbioinformatics.wur.nl/moto/> (Moco et al. 2006), Plant Metabolome Database, www.sastra.edu/scbt/pmdb (Udayakumar et al. 2010), METLIN Metabolite Database, <http://masspec.scripps.edu/> (Smith et al. 2005) y PubChem Substance Database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pcsubstance> (Bolton et al. 2008). Una vez identificados los compuestos, se procedió a identificar las rutas metabólicas en la que participan empleando la base de datos de rutas metabólicas para *S. lycopersicum* de KEGG Pathway (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

RESULTADOS

Indicadores de Crecimiento y Efecto de la Simbiosis

Para cada uno de los genotipos analizados, *Spr2*, WT y PS, se evaluaron los parámetros de altura total de la planta, longitud de la raíz y peso fresco como indicadores de crecimiento y efectos de la simbiosis, tanto en condiciones control y durante la micorrización por *R. irregularis*.

En cuanto a la altura de la planta, el análisis de ANOVA de dos factores (Tabla Sup.1) muestra una diferencia significativa debido al fondo genético ($p=0.037 < 0.05$), mas no así para el tipo de tratamiento aplicado ($p=0.344 > 0.05$) ni la interacción entre ambos factores ($p=0.802 > 0.05$). Esto refleja que la variable de la altura total de la planta varía de manera representativa únicamente acorde al genotipo de la planta de tomate. Se observó que el genotipo con mayor altura correspondía al WT, con un valor promedio de 16.70 cm, seguido de PS con 14.74 y *Spr2* con 13.77 (Tabla Sup. 2).

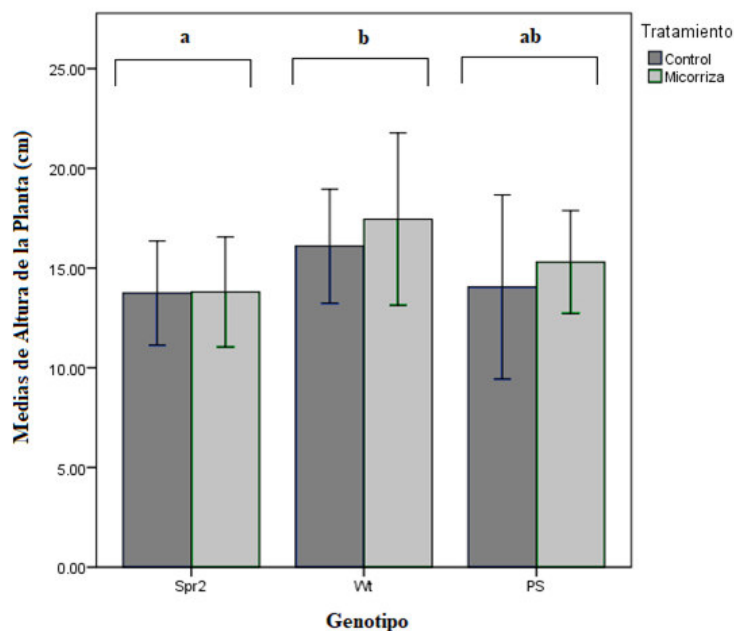


Figura 3. Medias de la altura de la planta (cm) de los tres fondos genéticos. El gráfico muestra las líneas del error estándar y las diferencias significativas indicadas por las letras a, b y ab. (Barras gris oscuro = Control; barras gris pálido = Micorrizadas).

Dada la diferencia estadística entre los genotipos, se procedió a realizar una comparación múltiple de medias (Tabla Sup. 3), corroborando la diversificación en la altura debido a

los fondos genéticos. El análisis de subconjuntos homogéneos reveló una separación entre *Spr2* y WT, mientras PS se muestra como conjunto intermediario, esta agrupación concuerda con las alturas promedio mencionadas previamente. En la Fig. 3 se observan las medias de altura para cada genotipo y correspondiente tratamiento, así como los subconjuntos identificados, destacando las plantas WT con la mayor altura promedio tanto en condiciones control y micorrizadas.

Adicionalmente, se llevó a cabo una prueba para muestras independientes pareadas para contrastar el efecto del tratamiento, control o micorriza, para cada uno de los fondos genéticos; en ninguno de ellos se encontró una diferencia significativa, indicando que la presencia del hongo *R. irregularis* no influye estadísticamente en la altura total (Tabla Sup. 4).

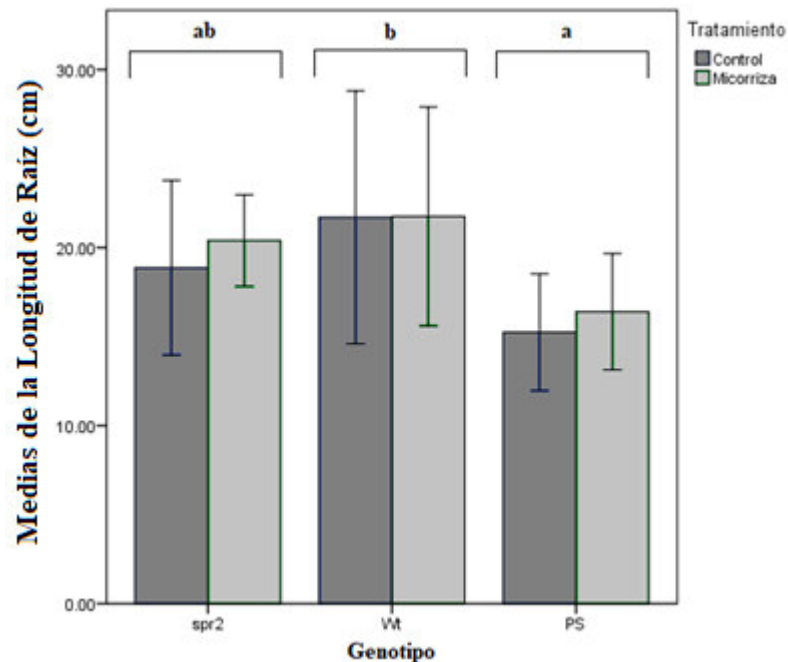


Figura 4. Medias de la longitud de raíz (cm) de los tres fondos genéticos. El gráfico muestra las líneas del error estándar y las diferencias significativas indicadas por las letras a, b y ab. (Barras gris oscuro = Control; barras gris pálido = Micorrizadas).

A continuación, se evaluó la longitud de la raíz para las muestras de cada genotipo y tratamiento. De manera similar a la altura de la planta, nuevamente se halló que solamente existe diferencia significativa en esta variable acorde al fondo genético estudiado ($p=0.012 < 0.05$); mientras que el tratamiento empleado y la interacción entre ambos factores no influyen de manera importante en la altura de la raíz ($p=0.535 > 0.05$).

y $p=0.910 > 0.05$, respectivamente) (Tabla Sup. 6). Visualmente se reconoció a las plantas de tipo silvestre, WT, con la mayor longitud de raíz con un promedio de 21.72 cm, seguido de *Spr2* con una media de 19.56 cm y de menor tamaño las plantas PS con 15.88 cm (Tabla Sup. 7).

La prueba post-hoc de los efectos del genotipo sobre la altura de la raíz demostró una diferencia significativa entre WT y PS, ubicando a *Spr2* como subconjunto intermedio entre ambos (Tabla Sup.8 y 9). Dichos resultados indican un mayor desarrollo radicular en las plantas de tomate silvestres, y aquellas mutantes deficientes en ácido jasmónico. Esto sugiere que la expresión constitutiva del precursor prosistemia en PS impacta de manera negativa el crecimiento de las raíces de tomate con y sin micorriza. El contraste entre las alturas medias de las raíces se aprecia en la Fig. 4, donde resulta evidente el menor desarrollo radicular en PS para ambos tratamientos.

En el mismo gráfico (Fig. 4) se observa un ligero aumento en la altura media radicular en presencia de *R. irregularis*, con excepción de las plantas WT. Para verificar su efecto sobre el tamaño de la raíz, se realizó la prueba correspondiente para comparar el crecimiento radicular bajo ambas condiciones; en ninguno de los genotipos se encontró una diferencia significativa en respuesta a la presencia/ausencia del hongo micorrízico (Tabla Sup. 10). Respecto al peso fresco, el análisis de ANOVA determina que la variación en el peso de las plantas no tiene variación significativa respecto a las condiciones o la interacción entre el tratamiento y el genotipo ($p=0.828 > 0.05$ y $p=0.516 > 0.05$, respectivamente); por otro lado, el factor del fondo genético aparece con una alta significancia ($p=0.001 < 0.05$), indicando su fuerte influencia sobre la variable de peso fresco de los ejemplares (Tabla Sup. 11). En promedio, PS destaca por tener el menor valor con 6.57 g, mientras que WT y *Spr2* obtuvieron un peso fresco medio de 11.93 g y 11.96 respectivamente (Tabla Sup. 12). Los resultados del análisis pueden apreciarse en la Fig. 5, donde claramente PS se muestra con un peso fresco promedio por debajo de los otros genotipos. Dicho resultado sugiere que la producción de biomasa en las plantas de tomate transgénicas es considerablemente menor que *Spr2* y WT; no obstante, esta variación es dependiente del fondo genético y no del tratamiento aplicado.

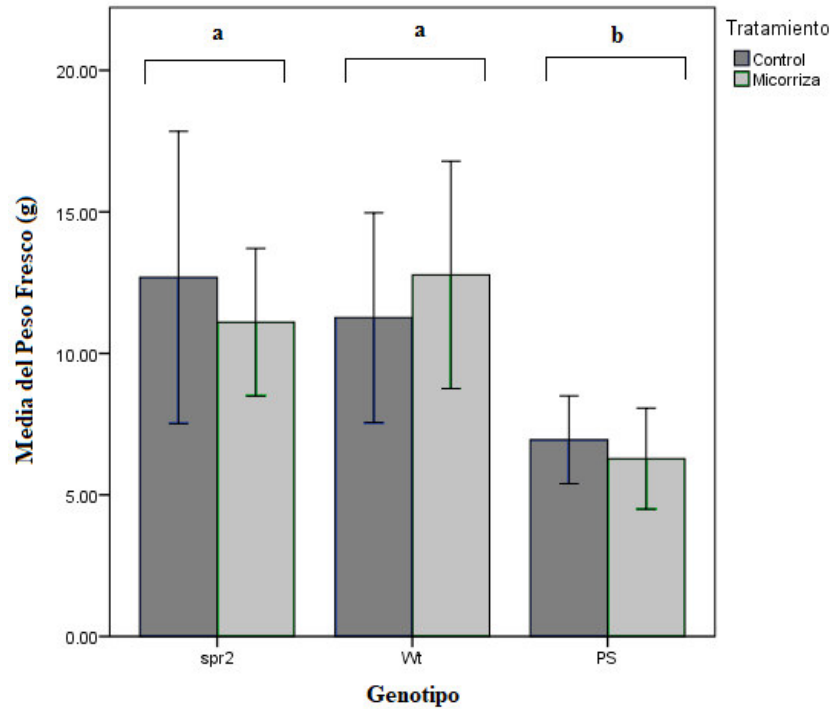


Figura 5. Medias del peso fresco (g) de los tres fondos genéticos. El gráfico muestra las líneas del error estándar y las diferencias significativas indicadas por las letras a y b. (Barras gris oscuro = Control; barras gris pálido = Micorrizadas).

Posteriormente, la prueba post-hoc de Scheffe revela una significativa separación del genotipo PS ($p=0.002 < 0.05$) del resto, agrupando en un mismo subconjunto a WT y *Spr2* cuales cuentan con pesos frescos medios muy similares (Tabla Sup.13 y 14).

El efecto del tratamiento aplicado no representa una diferencia significativa sobre peso fresco total de las plantas. Sin embargo, para los genotipos alterados en la ruta biosintética de ácido jasmónico, tanto *Spr2* como PS, se observa una ligera disminución en la producción de biomasa y peso total (Fig. 5); por el contrario, las plantas de tomate de tipos silvestre parecen favorecerse de la simbiosis micorrízica elevando su masa de tejido y aumentando su peso fresco.

Estimación de la Colonización Micorrízica de la Raíz

Con la finalidad de evaluar el proceso de micorrización por *R. irregularis* y la extensión de la colonización se analizaron los parámetros de frecuencia de micorrización (F%), intensidad de colonización (M%) y la abundancia arbuscular (A%).

En promedio, el genotipo *Spr2* contó con el menor porcentaje de frecuencia de micorrización ($F\%=45.01$), y las plantas PS con los niveles más altos ($F\%=80.19$) (Tabla Sup. 16). El análisis estadístico entre los grupos revela una alta diferencia significativa entre los genotipos en cuestión ($p=0.00 < 0.0$) (Tabla Sup. 15) (Fig. 6). El estudio subsecuente para la comparación múltiple de medias indica que las plantas *Spr2* difieren significativamente de aquellas WT y PS respecto a su frecuencia micorrízica (Tabla Sup. 17); donde los subconjuntos formados dividen las plantas de tomate mutantes de las de tipo silvestre y transgénicas (Tabla Sup. 18). Tales resultados sugieren que los bajos niveles de AJ repercuten negativamente el índice de frecuencia, y por tanto el número de fragmentos radiculares colonizados; mientras que valores altos de AJ sistémico parecen promover dicho proceso

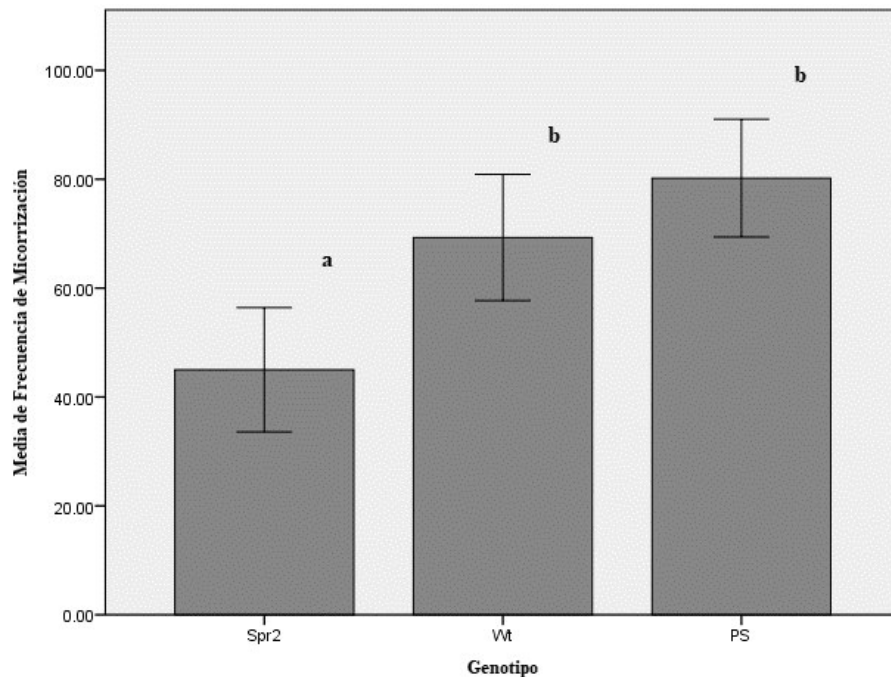


Figura 6. Medias de la frecuencia de micorrización ($F\%$) de los tres fondos genéticos. El gráfico muestra las líneas del error estándar y las diferencias significativas indicadas por las letras a y b.

Posteriormente, se evaluó la intensidad micorrízica y la abundancia arbuscular en base a la escala descrita por Trouvelot et al. (1986) en cada uno de los fondos genéticos (Ver apartado Material y Métodos).

Similar a los resultados de frecuencia, las plantas *Spr2* mostraron el menor valor medio de intensidad micorrízica ($M\%=5.30$), en cambio, WT y PS obtuvieron valores mayores

(%M=12.03 y %M=13.09, respectivamente) (Tabla Sup. 20). El análisis comparativo entre los genotipos determinó que no existe diferencia representativa ($p=0.053 > 0.05$) entre los porcentajes de intensidad de colonización por el hongo micorrízico (Tabla Sup. 19). A pesar de no ser estadísticamente significativa, el promedio de intensidad de colonización en las plantas mutantes, *Spr2*, fue visiblemente inferior en contraste con los otros genotipos (Fig. 7). Este resultado va acorde a lo observado en el valor de %F, donde *Spr2* muestra una frecuencia de micorrización reducida, y, por ende, la magnitud de colonización también se ve atenuada por los bajos niveles de AJ.

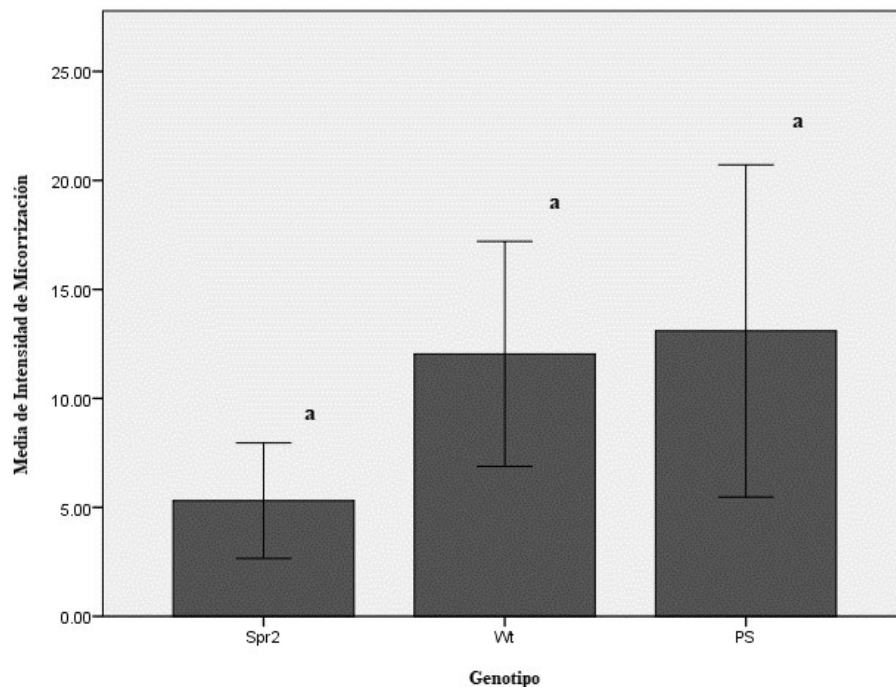


Figura 7. Medias de la intensidad de micorrización (M%) de los tres fondos genéticos. El gráfico muestra las líneas del error estándar y las diferencias significativas indicadas por las letras a y b.

Mismos resultados fueron hallados para la abundancia arbuscular, en los cuales, la diferencia entre los genotipos respecto a su contenido de arbusculos no fue significativa ($p=0.326 > 0.05$) (Tabla Sup. 21). Los valores medios más bajos corresponden, nuevamente, al genotipo *Spr2* (%A=2.43), mientras que WT y PS se observan con valores promedio mayores similares (A%=4.36 y %M=4.64, respectivamente) (Tabla Sup. 22). Aunque los valores de intensidad micorrízica son estadísticamente iguales, destaca el genotipo *Spr2* por contar con niveles más bajos que el resto, y una ligera acentuación en el caso de PS (Fig. 8).

En concreto, los tres parámetros estudiados parecen indicar que los niveles de AJ sistémico influyen directamente el proceso de infección por *R. irregularis* en el sistema radicular de las plantas de tomate. Los resultados en conjunto sugieren que niveles bajos de esta fitohormona afectan negativamente la colonización micorrízica en *S. lycopersicum*; por el contrario, concentraciones elevadas de AJ, como es el caso de PS cual cuenta con una expresión constitutiva de su precursor, parece favorecer el establecimiento y difusión del hongo a través de las raíces.

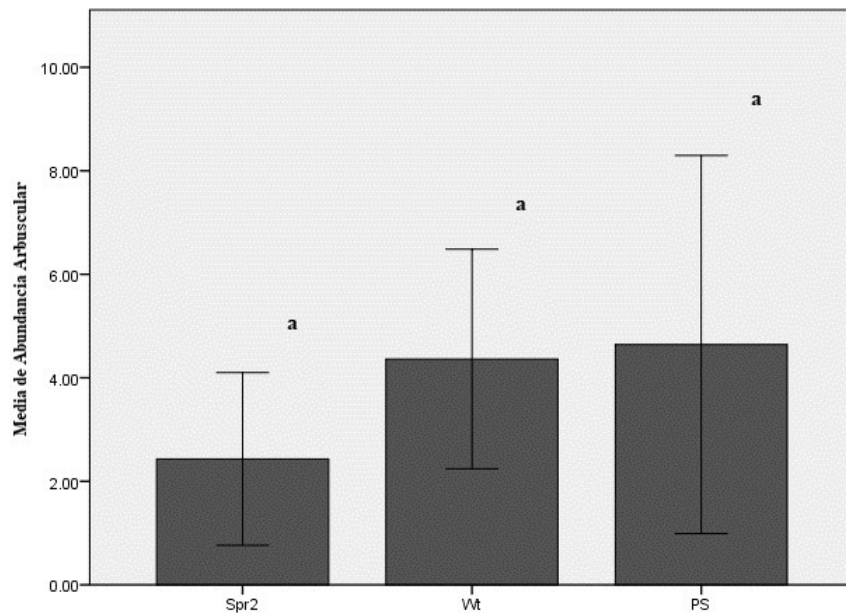


Figura 8. Medias de la abundancia arbuscular (A%) de los tres fondos genéticos. El gráfico muestra las líneas del error estándar y las diferencias significativas indicadas por las letras a y b.

Espectrometría de Masas

Un total de 18 muestras, correspondientes a los tres genotipos y con tres repeticiones por tratamiento, fueron sometidas a una extracción metanólica y analizadas por espectrometría de masas por inyección directa. Los espectros continuos se colectaron mediante ionización por electrospray (ESI) en modo positivo en un rango entre 15 a 2000 valor de radio masa-carga (m/z); éstos fueron alineados a la línea base, se realizó la filtración de ruido y se seleccionaron picos con un radio señal/ruido de 1 y amplitud igual a 0.15 (Ver apartado Material y Métodos). Se identificaron en total 673 m/z presentes en el conjunto de muestras (Tabla Sup. 23).

Previo al análisis estadístico de los resultados por espectrometría, se llevó a cabo la normalización y transformación de los datos. Se llevaron a cabo 5 pruebas distintas: Normalización a Línea Base, Normalización de Cyclic-Loess, Normalización por Cuantiles, Normalización por Cociente Probabilístico y Normalización por Interpolación Cúbica. Asimismo, por cada método de normalización se probaron dos tipos de transformación: Log10 y Log2. El método óptimo para el procesamiento de los datos resultó la Normalización de Cyclic-Loess transformados a Log10 al contar con la menor varianza y coeficiente de variación promedio (Tabla Sup. 24). El ajuste en la distribución de los datos puede observarse en la Fig. 9.

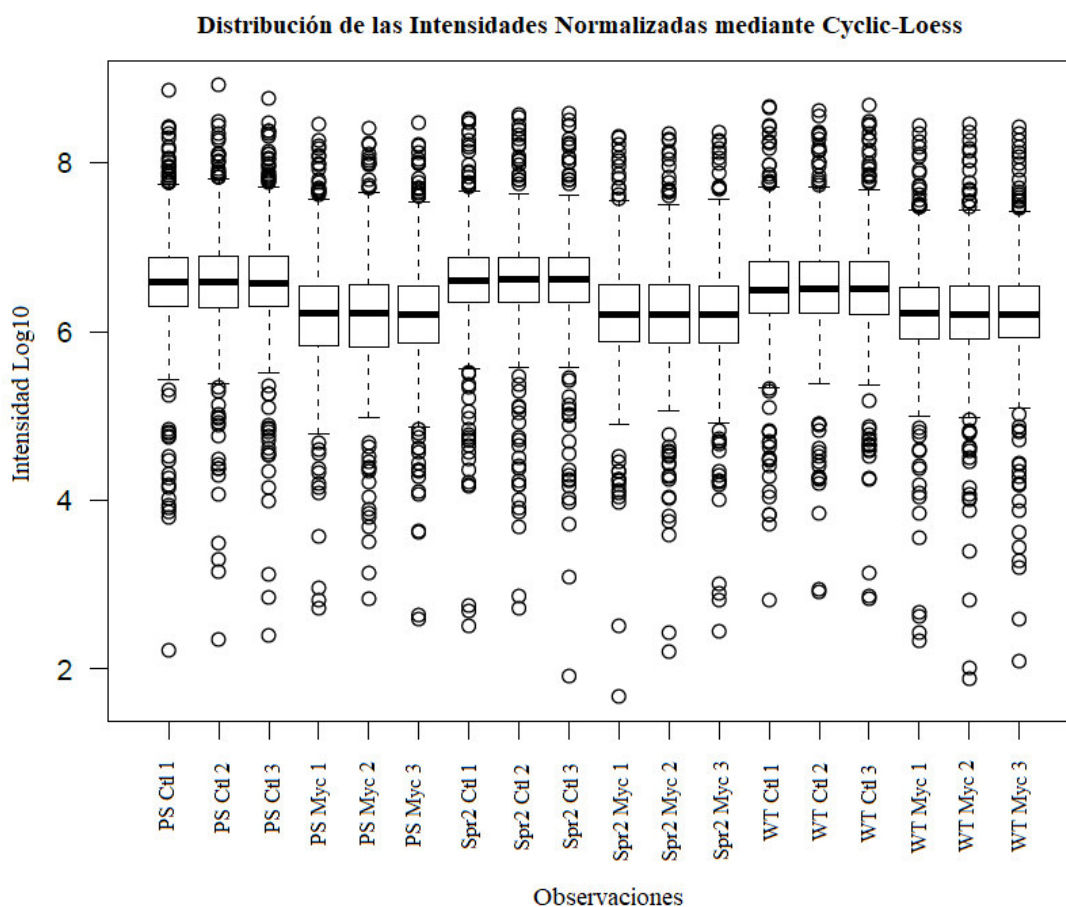


Figura 9. Gráfico de caja que ilustra la distribución de los datos de intensidades transformadas a Log10 obtenidas por espectrometría de masas de cada una de las observaciones posterior a su normalización mediante Cyclic-Loess.

A continuación, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para describir las variables reduciendo la dimensionalidad del conjunto de datos. En la Fig. 10 se puede observar que el componente 1 explica en mayor magnitud la varianza entre las m/z (PC1= 77.1%). En este eje se puede apreciar una clara separación de las observaciones acorde al tratamiento empleado, ubicando en el extremo izquierdo los genotipos control y en derecho los micorrizados. En la misma imagen se valoran los siguientes dos componentes con mayor influencia en eje vertical, se puede observar una ligera disgregación en las observaciones en cuanto a su fondo genético; sin embargo, no aparenta existir una separación evidente entre los mismos y su influencia sobre la varianza explicada no es significativa (PC2= 5.4% y PC3=3.7%).

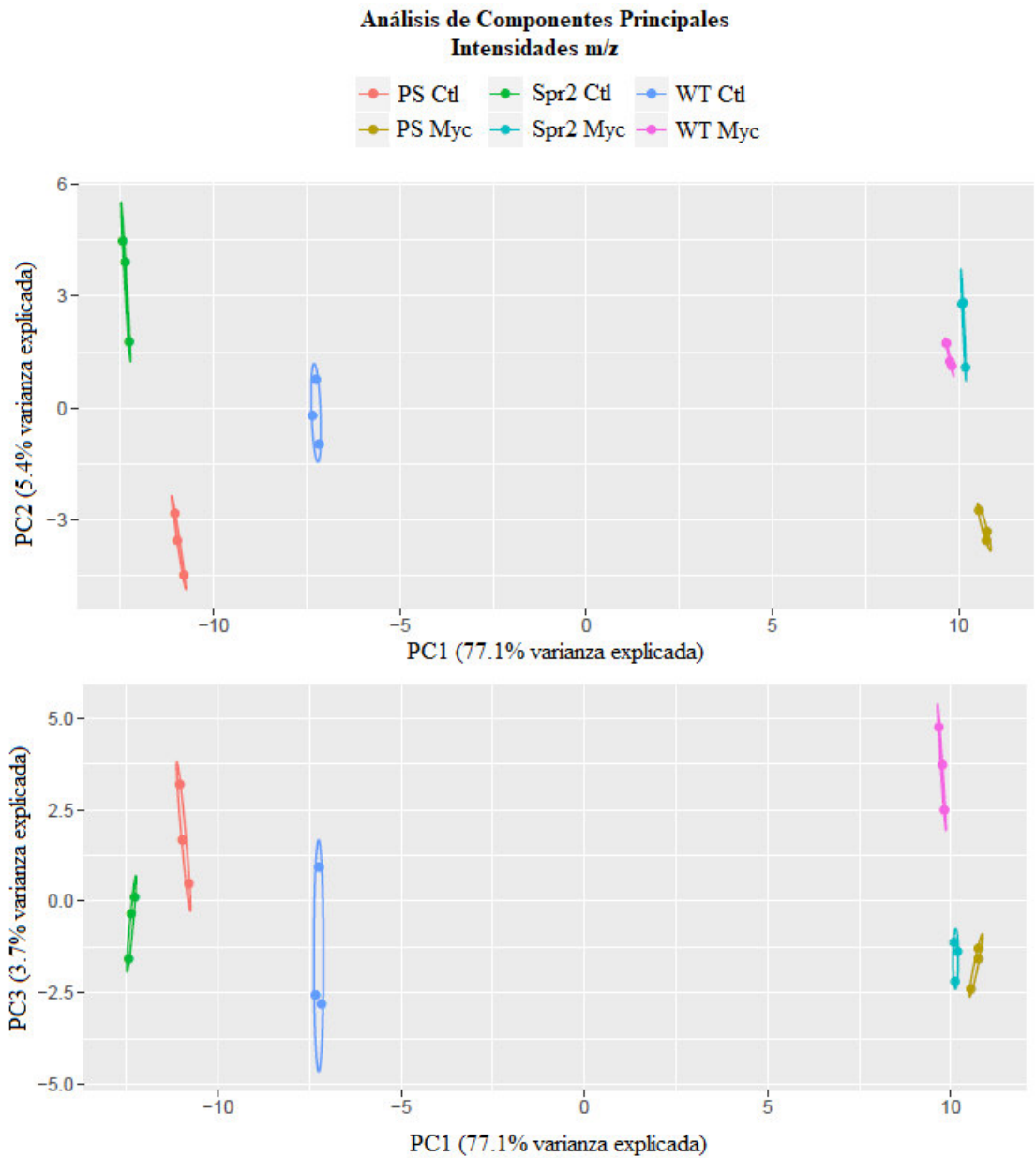


Figura 10. Análisis de componentes principales (PCA) de los 673 m/z y las observaciones de cada fondo genético y su respectivo tratamiento. Se incluyen los primeros tres componentes que contienen la mayor cantidad de varianza explicada (PC1=77.1%; PC2=5.4%; PC3=3)

Estos resultados indican que existe un efecto importante de la presencia del hongo *R. irregularis* sobre la concentración de diversos metabolitos detectados. No obstante, la falta de segregación de los genotipos en base a las intensidades de m/z propone que el AJ no influye significativamente sobre los efectos metabólicos durante la simbiosis micorrízica.

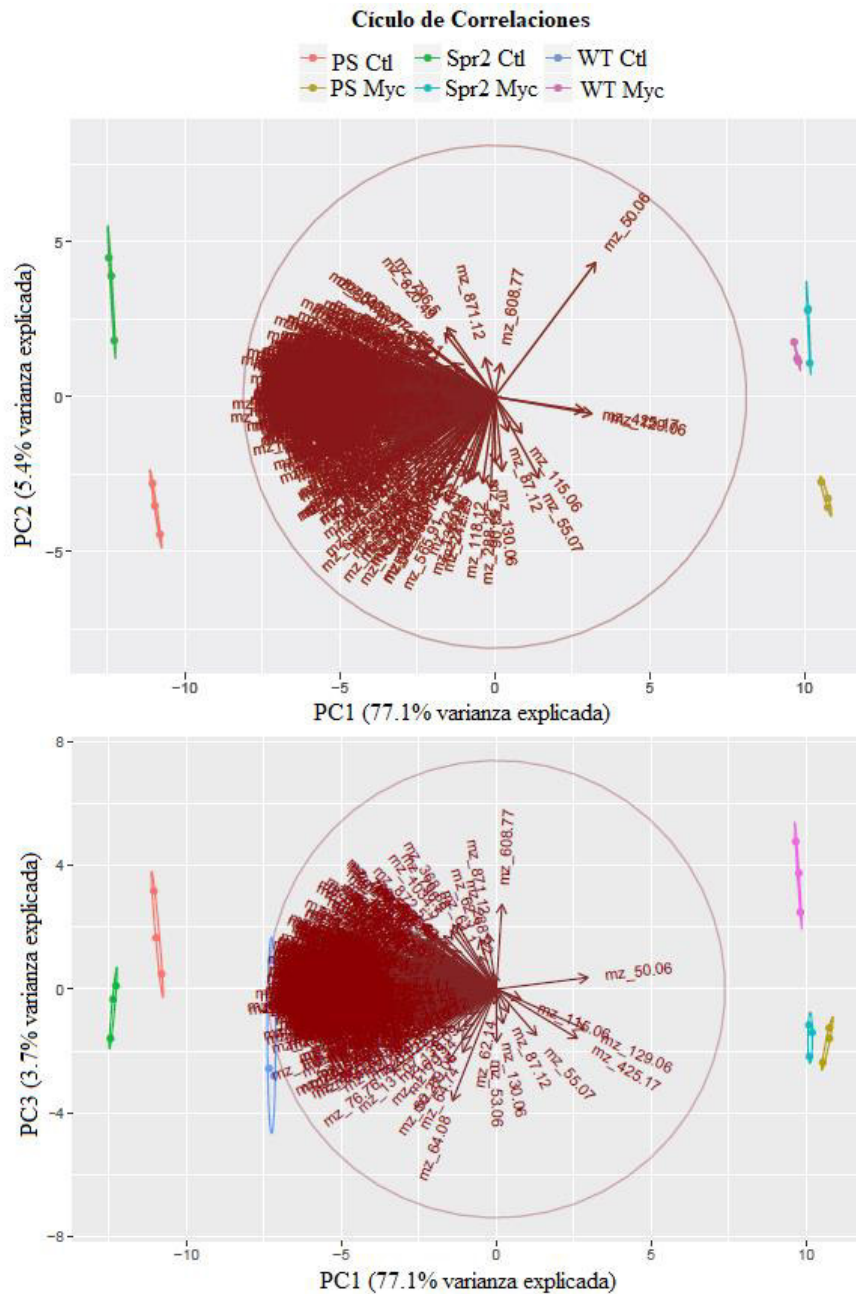


Figura 11. Círculo de correlaciones del PCA indicando la relación entre las variables (m/z) y las observaciones (genotipo/tratamiento).

Los gráficos de círculo de correlación de variables (m/z) con las observaciones (Fig. 11) es posible reconocer una evidente tendencia de las distintas m/z en dirección al hemisferio negativo de plano, que corresponde a la locación de las observaciones bajo tratamiento control. Esto indica que la mayor parte de los metabolitos detectados se encuentran

acumulados en las plantas control, y, por lo tanto, disminuidos bajo las condiciones de simbiosis con *R. irregularis*.

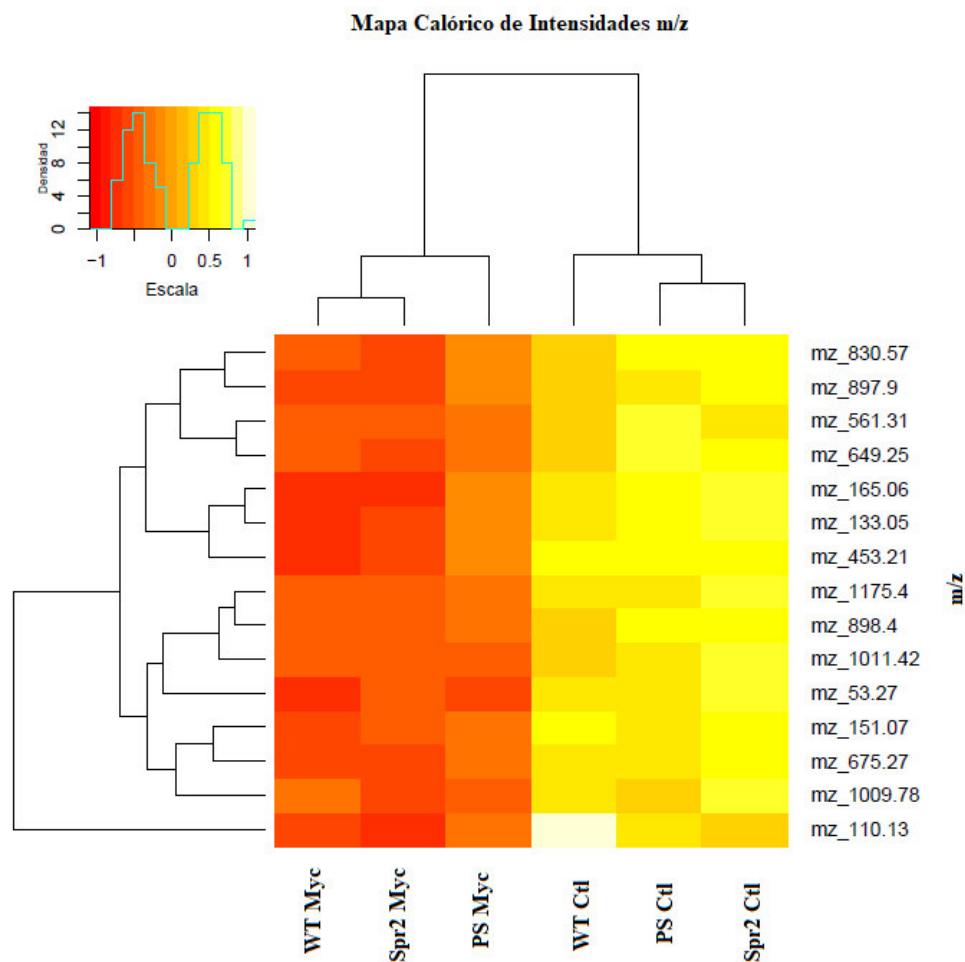


Figura 12. Mapa calórico de los 15 m/z con mayor influencia sobre el PC1 y análisis por conglomerados que indica la relación entre las variables y entre las observaciones.

Con el objetivo de comprender el origen de la variación el PC1, se identificaron y seleccionaron las 15 variables de m/z con mayor valor de carga (*loadings*), que representan las variables con mayor influencia sobre la variación del componente 1. De esta selección se elaboró un mapa calórico para elucidar las tendencias de intensidad (Fig. 12), donde es posible apreciar un claro aumento en la concentración de dichos m/z en condiciones control, mientras que bajo la presencia del hongo MA, sus intensidades son

claramente menores. Adicionalmente, en la misma figura se incluyó un análisis de conglomerados con la finalidad de reconocer similitudes en la variación entre los genotipos. De este, se observa una correlación entre PS y *Spr2* en ausencia de *R. irregularis*, mientras que, durante la simbiosis, WT y *Spr2* cuentan con una variación similar de dichos m/z. En suma, los resultados sugieren que el establecimiento de la micorriza reduce el contenido de numerosos compuestos en el tejido radicular, aparentemente ralentizando el metabolismo de biosíntesis de diversos metabolitos.

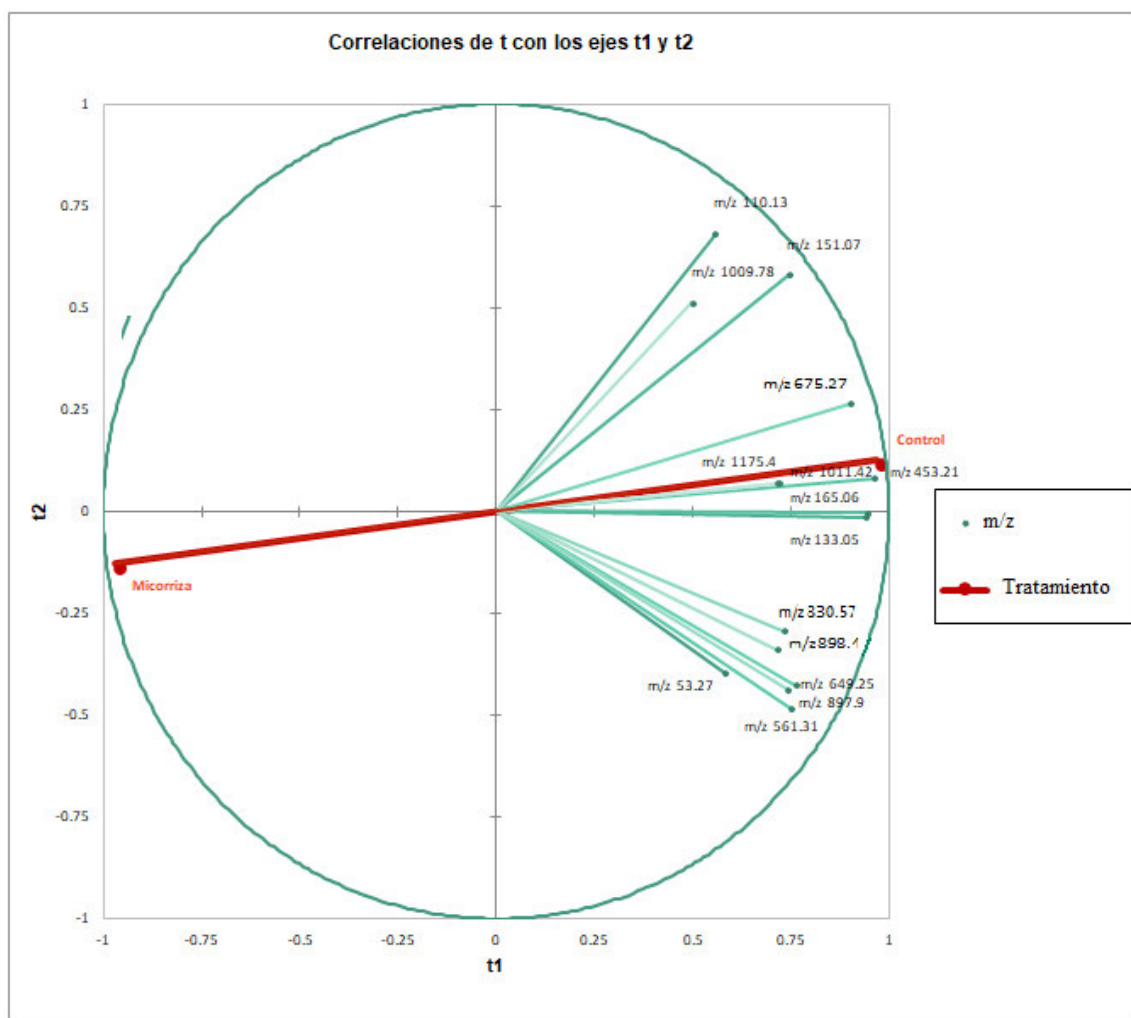


Figura 13. Gráfico de correlaciones del análisis PLS-DA entre los 15 m/z de mayor influencia sobre el PCI y el tratamiento aplicado (Control/Micorriza).

Para un análisis más profundo de los 15 m/z previamente seleccionados, se realizó una prueba discriminante por regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) con la finalidad de identificar con mayor precisión las variables (m/z) que mejor discriminan

entre los grupos de tratamientos. El modelo producido muestra un muy buen ajuste (Q^2 acum. =0.929) y resume de manera satisfactoria la correlación entre las variables (R^2Y acum. =0.955 y R^2X acum. =0.724) (Figura Sup. 1). En el gráfico de correlaciones generado (Fig. 13) se muestran nuevamente la clara tendencia acumulativa de los 15 valores de m/z en las plantas control en los nuevos componentes formados (t1 y t2), donde el tratamiento responde principalmente al componente t1, mostrándose como una línea casi horizontal. Asimismo, en el gráfico de correlación con las observaciones (Fig. 14) se posicionan los genotipos en conjuntos según al tratamiento aplicado, reconociendo las muestras micorrizadas en el hemisferio negativo de plano y aquellas control del lado positivo. De manera similar como en el PCA, el fondo genético no aparenta ninguna asociación en los nuevos componentes formados.

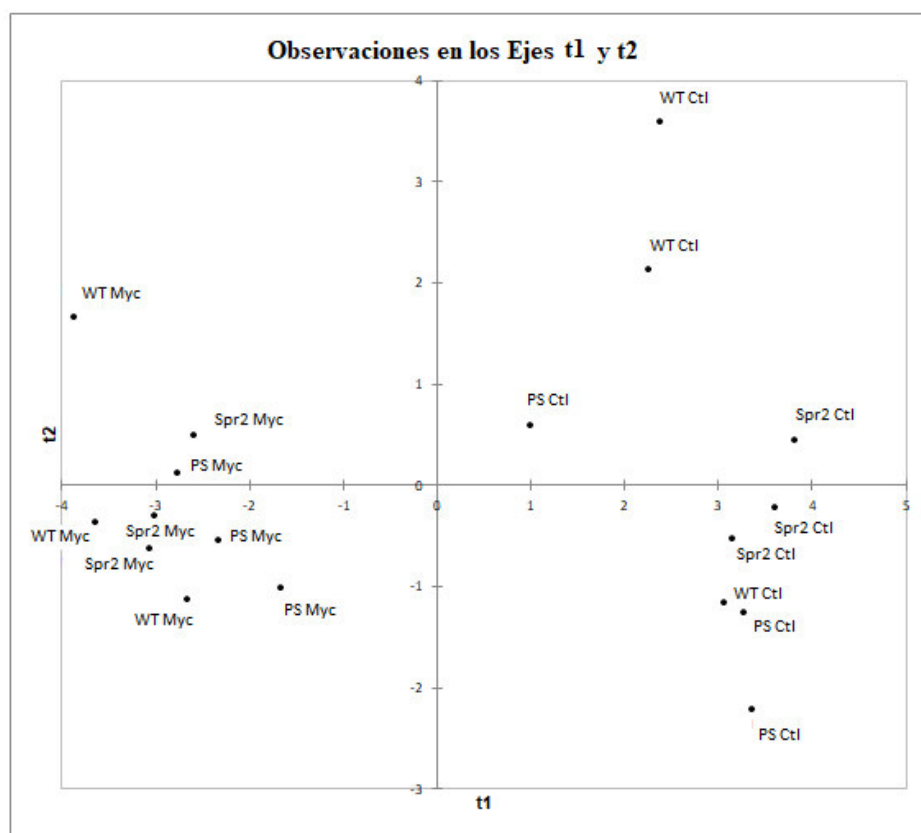


Figura 14. Gráfico de correlaciones del PLS-DA de las observaciones (genotipo/tratamiento) y los nuevos ejes (t1 y t2) producidos del análisis.

La importancia de las variables de m/z sobre la proyección se resumen en la Fig. 15. Se destacan los valores de m/z 165.06, 133.05 y 453.21 representando los tres metabolitos

de mayor influencia sobre la variación entre tratamientos correspondiente al eje t1. En suma con estas m/z, los radios 675.27 y 151.07 igualmente representan las variables óptimas para explicar la varianza entre las plantas micorrizadas y control al contar con valores por encima de 1. Asimismo, el resto de las variables con valores debajo de 1 se consideran variables satisfactorias para explicar la agrupación producida, con excepción de m/z 1009.78 y 53.27 cuales no sobrepasan el umbral de 0.8. Esta importancia sobre la proyección fue considerada para proceder a la identificación putativa de los diferentes metabolitos que se muestra a continuación.

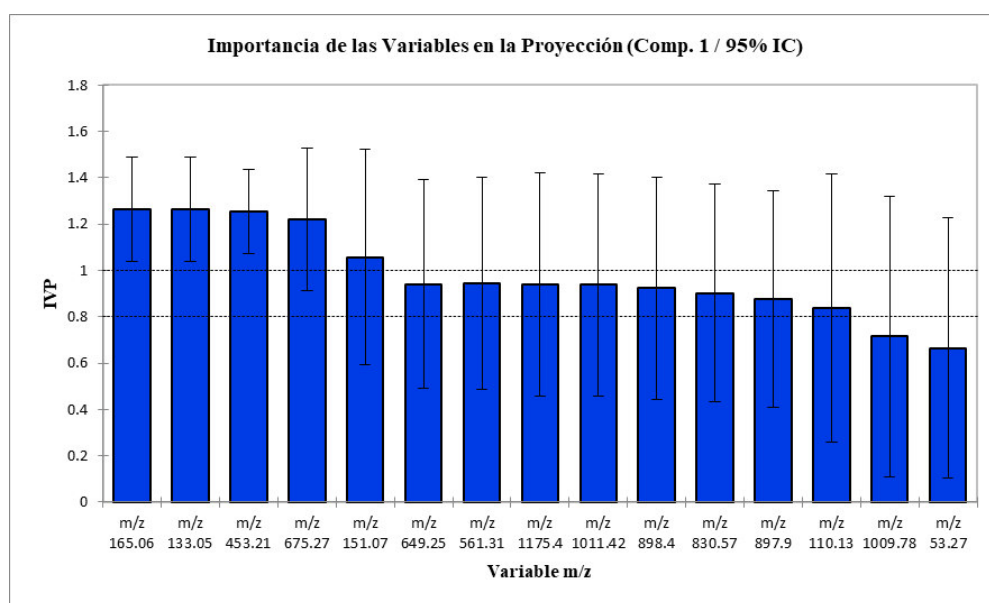


Figura 15. Gráfico de importancia de la variable sobre la proyección (IVP) del análisis PLS-DA mostrando el grado de influencia de los 15 m/z previamente seleccionados.

Identificación putativa de los metabolitos (m/z) y determinación de las rutas metabólicas alteradas

De los 15 valores m/z de mayor influencia sobre el PC1 y que mejor explican la separación entre las observaciones acorde a su tratamiento, se identificó la presencia de compuestos intermediarios correspondientes a las rutas biosintéticas de fenilpropanoides (Fig. 16), flavonoides (Fig. 17) y carotenoides (Fig. 18). Dichas rutas presentan menor concentración de moléculas intermediarias en plantas micorrizadas, mientras que en control se encuentran acumulados.

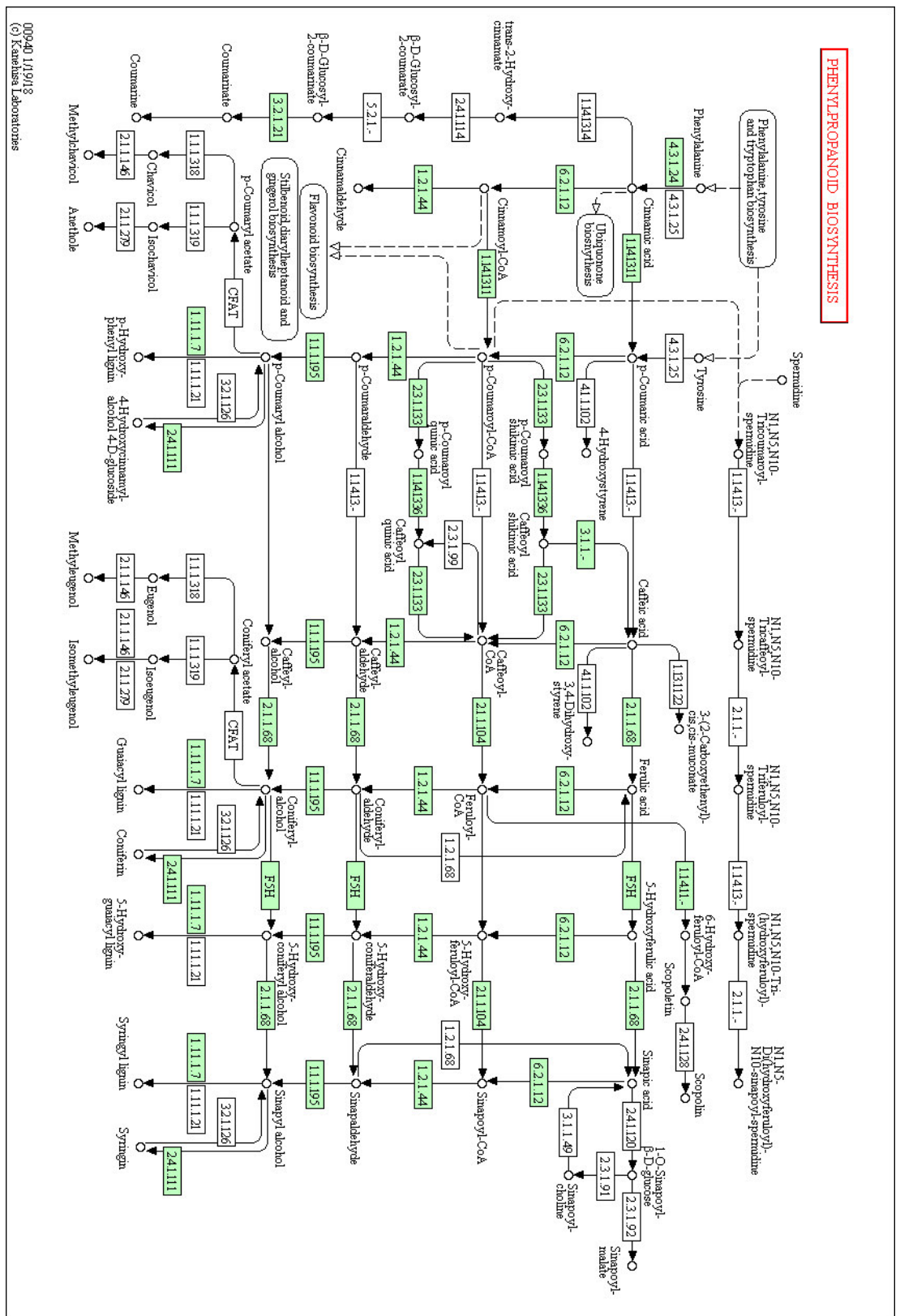


Figura 16. Ruta metabólica de la biosíntesis de fenilpropanoides en *S. lycopersicum*. (KEGG ID: sly00940)

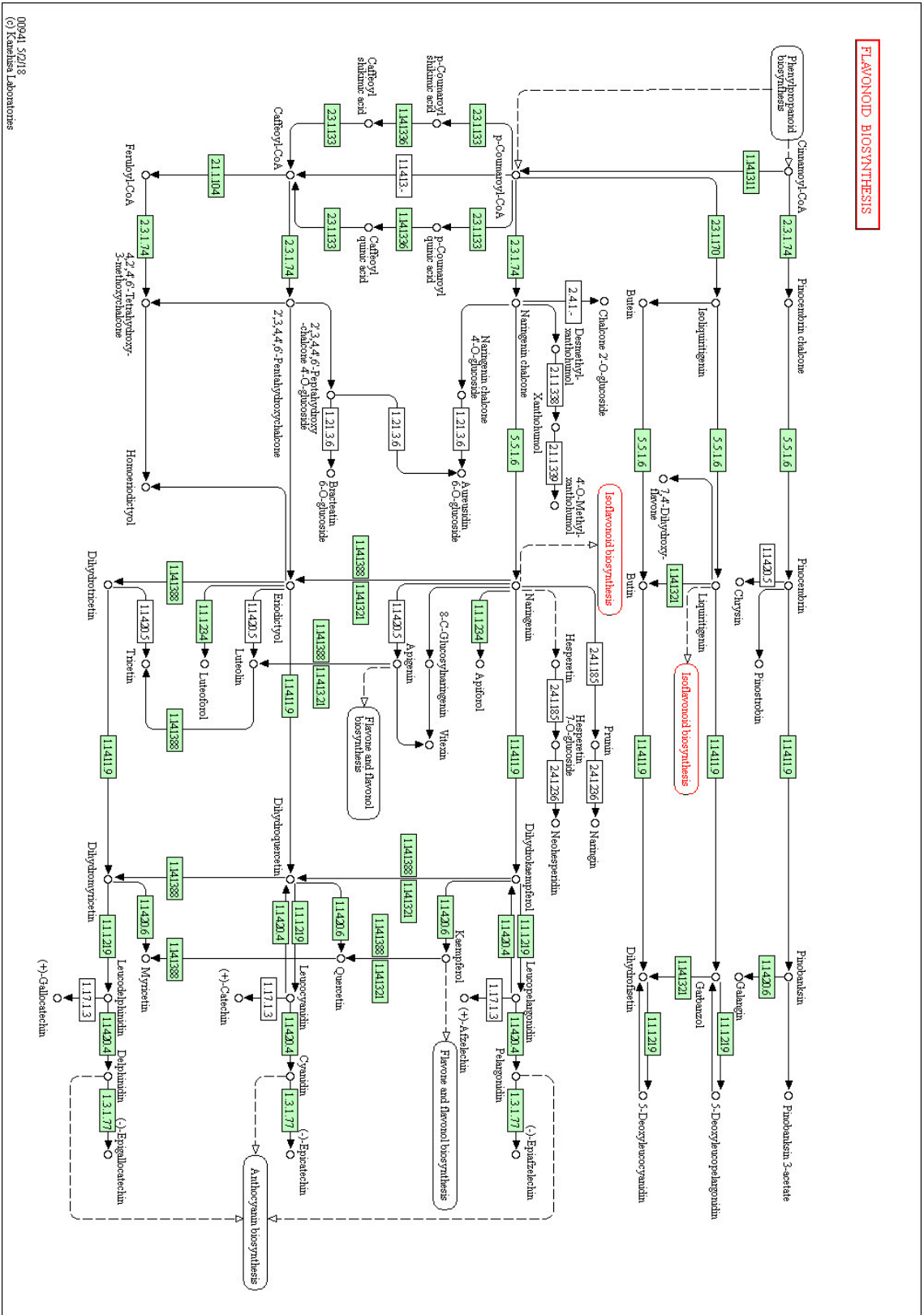


Figura 17. Ruta de biosíntesis de flavonoides en *S. lycopersicum*. (KEGG ID:sly 00941)

Asimismo, a pesar de que ningún m/z se acumulaba de manera significativa en plantas micorrizadas, se analizaron los 9 m/z presentes con mayor concentración en raíces micorrizadas para estudiar qué efectos metabólicos ocurrían durante la simbiosis. Se detectó que los compuestos acumulados en plantas colonizadas por *R. irregularis* corresponden a intermediarios del metabolismo del carbono (Fig. 19).

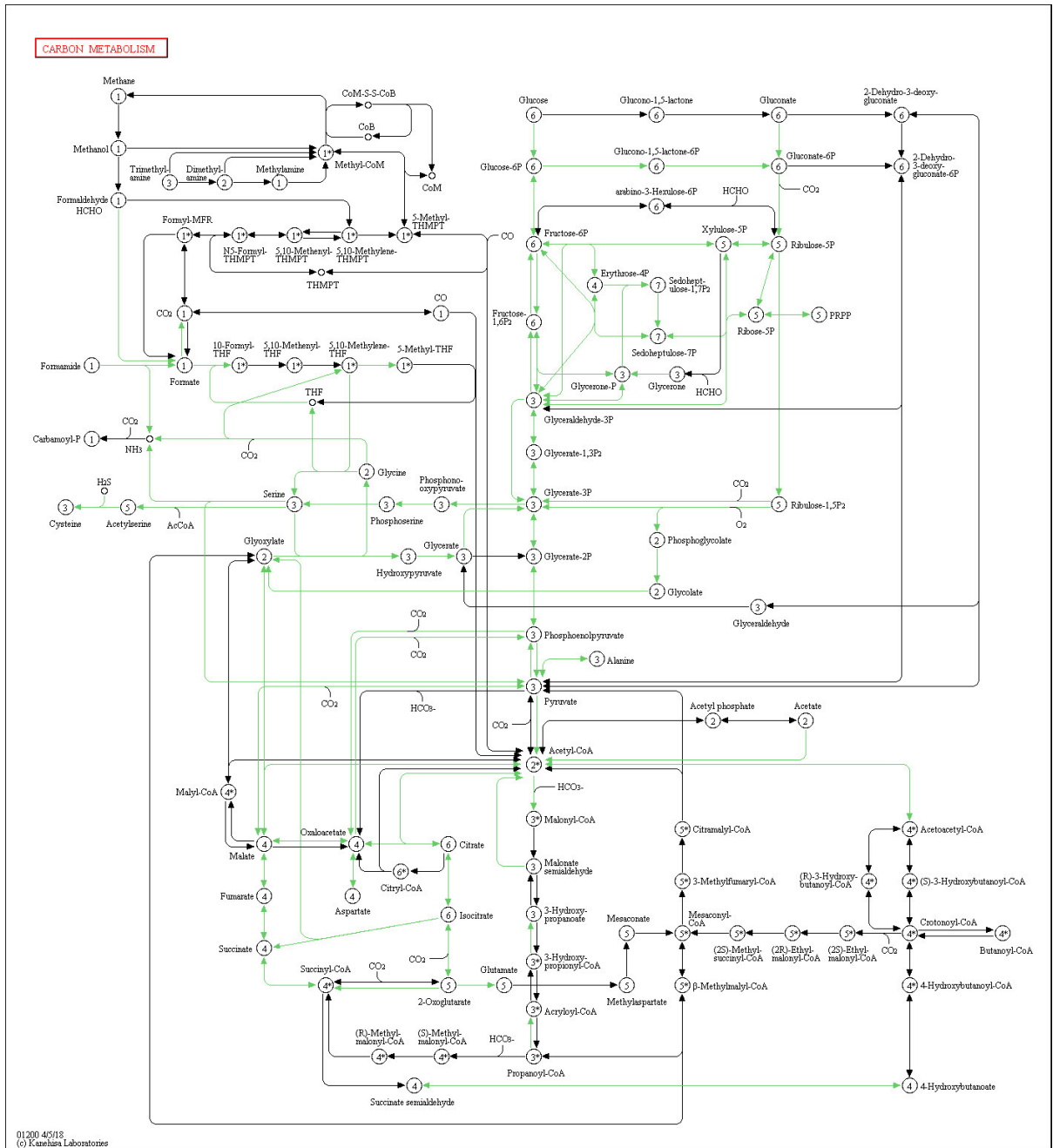


Figura 19. Metabolismo del carbono en *S. lycopersicum* (KEGG IG: sly01200)

DISCUSIÓN

De manera general, los resultados indican una evidente diferencia entre los distintos perfiles de AJ en cada uno de los genotipos y bajo la simbiosis micorrízica con *R. irregularis* en los aspectos de crecimiento y efectos del simbionte, establecimiento y desarrollo del hongo micorrízico y en el contenido global de metabolitos secundarios.

El ácido jasmónico y el resto de los jasmonatos pertenecen a la familia de derivados de ácidos grasos oxigenados, llamados en conjunto oxilipinas, los cuales se sintetizan vía el metabolismo oxidativo de ácidos grasos poliinsaturados bajo la ruta 13-LOX (Howe 2009). Las plantas transgénicas 35S::PS expresan de manera constitutiva prosisteminina, molécula precursora de la sisteminina, la cual, en condiciones silvestres, se produce en los sitios de heridas por herbívoros. La función de la sisteminina es la amplificación de la biosíntesis de AJ a niveles necesarios para una respuesta sistémica ante un ataque (Vanholme et al. 2007), ocurriendo una inducción de manera cíclica donde la expresión de prosisteminina es inducible por AJ (Wasternack 2015). En el caso de las mutantes *Spr2*, estas carecen de la enzima desaturasa en el cloroplasto, la cual cataliza la primera reacción de la vía 13-LOX, lo que deriva en una reducción considerable en el pool de ácidos grasos 18:3, moléculas que fungen como punto de partida en la síntesis de AJ (Tejada-Sartorius et al. 2008). En consecuencia, la concentración de dicha fitohormona se ve significativamente reducida en este genotipo. Bajo esta premisa, las diferentes líneas genéticas con alteraciones en su contenido de AJ endógeno permiten analizar la participación de la fitohormona en el proceso y desenvolvimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular, detectando una clara influencia del AJ en el desarrollo vegetal y en la colonización fúngica, mas no así para el contenido de metabolitos secundarios, lo que se discutirá a continuación.

Crecimiento y Efecto de la Simbiosis Micorrízica

Los indicadores evaluados de altura total de la planta, altura de la raíz y peso fresco, en general, se ven favorecidos en plantas WT y reducidos en la línea transgénica PS, con la excepción de la altura de la porción aérea, cual es menor en *Spr2*. El AJ se encuentra relacionado con múltiples procesos de desarrollo y crecimiento vegetal, incluyendo modulación de genes fotosintéticos, partición de carbono, desarrollo floral y tuberización

(León 2013). En base a ello, el resultado esperado respecto a la altura total corresponde a un fenotipo de menor tamaño para las plantas PS que sobreexpresan prosistemina y contienen altos niveles de AJ, ya que un efecto fisiológico de esta fitohormona es la inhibición del crecimiento inducido por daños al tejido (Zhang y Turner 2008). Debido a que los tomates transgénicos PS sintetizan de manera constitutiva AJ, su crecimiento se ve inhibido por el arresto del ciclo mitótico en la fase G1 y la regulación negativa de factores determinantes para la replicación del ADN (Noir et al. 2013), resultando en una expansión, tamaño y número de células reducidos, y, por ende, menor longitud de tallo y tamaño de hoja. Degenhardt y colaboradores (2010) observaron una diferencia similar en la altura, donde tomates transgénicos PS mostraron un crecimiento atrofiado en comparación con las plantas silvestres. A pesar de esto, la menor altura promedio corresponde a las plantas *Spr2* (Fig. 3). Esto es posible se deba a que *Spr2* destaca por poseer un mayor número de ramificaciones laterales secundarias (Torres-Vera 2017), dirigiendo así el enfoque a un crecimiento horizontal en vez de vertical. Se ha demostrado que las plantas *Spr2* contienen mayores concentraciones de ácido-3-indolacético (IAA), una clase de auxina (Torres-Vera 2017), hormonas que poseen un papel clave en el control de ramificaciones aéreas (Domgalska y Leyser 2011), hecho que concuerda con el fenotipo altamente ramificado de dicho fondo genético. Esto explica asimismo el mayor valor de peso fresco en *Spr2* en comparación a PS (Fig. 5), aunque éste último contara con una altura más elevada.

Por otra parte, una de las primeras funciones atribuidas al AJ es la inhibición del crecimiento radicular (Ueda y Kato 1980). En este sentido, plantas mutantes o transgénicas sobreproductoras de dicha fitohormona, como el caso de la línea PS, presentan un crecimiento radicular inferior al de sus variedades silvestres (Fig. 4). Mismo fenotipo se ha observado en plantas mutantes *cevl* de *A. thaliana*, cuales contienen niveles elevados de AJ y OPDA constitutivamente, derivando en una atrofia en el desarrollo de las raíces (Ellis et al. 2002). La inhibición del crecimiento del sistema radicular ante la acumulación de AJ se debe a los efectos que alteran la división celular, el tráfico de membrana, la distensión y síntesis de la pared celular, así como alteraciones en la turgencia y tasas de crecimiento (Wasternack 2013). Si bien la acumulación de AJ en raíces de plantas de tomate PS se ha vinculado con una reducción en su longitud, diversos

autores determinan que dicho fenotipo es un efecto indirecto del AJ y su interacción con otras hormonas vegetales. Las auxinas, hormonas que juegan un papel clave en el crecimiento de las raíces, se encuentran influenciadas por AJ/AJ-Ile, las cuales inducen la expresión del gen ASA1, necesario para su biosíntesis (Sun et al. 2009); de igual modo, el AJ induce la redistribución de PIN-FORMED2, un transportador de auxinas (Sun et al. 2011). De tal modo, es posible que el alto contenido de AJ en las plantas PS sea motivo de perturbación de esta interacción con las auxinas y el correcto desarrollo radicular; aunque ante niveles basales de AJ, como lo que ocurre en *Spr2*, parece no alterar de manera significativa el proceso de comunicación cruzada entre ambas moléculas, observándose un desarrollo radicular similar a las plantas WT (Fig. 4).

Para los tres indicadores del crecimiento y efecto de la simbiosis evaluados se muestra una diferencia en los resultados según el fondo genético, mas no así para la diferenciación entre plantas micorrizadas o en ausencia del hongo (Fig. 3, 4 y 5). No obstante, en todos los indicadores suele aparecer un ligero incremento en la versión micorrizada de cada genotipo, aunque no de manera significativa, sugiriendo que el establecimiento de la simbiosis efectivamente mejora el rendimiento del cultivo en cierto grado. Rivero y colaboradores (2015) estudiaron plantas de tomate micorrizadas por *R. irregularis* y *F. mosseae*, reportando resultados similares, donde la simbiosis no tuvo un efecto significativo en la biomasa total de raíz ni de la porción aérea de la planta. A pesar de que la percepción general de las micorrizas arbusculares conllevan un impacto positivo sobre la especie vegetal hospedera, en la práctica, sus efectos más relevantes y visibles son aquellos dirigidos a contrarrestar el daño causado por diversas fuentes de estrés como salinidad, sequías, metales pesados, bajo contenido de fósforo, plagas y patógenos (Arafat y He 2011). Sin embargo, ya que las medidas fueron obtenidas 50 dpi, existe la posibilidad que el tiempo de muestreo haya sido insuficiente para poder observar propiamente los efectos de la simbiosis, no alcanzando así a valorar el beneficio aportado por el hongo micorrízico arbuscular.

Estimación de la Colonización Micorrízica de la Raíz

Desde un ángulo global, tanto la frecuencia de micorrización (F%), intensidad de colonización (M%) y la abundancia arbuscular (A%) se vieron incrementados en

condiciones con altos niveles endógenos de AJ, siendo los tres parámetros con mayor nivel para el genotipo PS, aunque únicamente de manera significativa en respecto a *Spr2* en cuestión de frecuencia (Fig. 6). Los primeros estudios acerca de la participación del AJ y sus derivados, los jasmonatos, durante el proceso de micorrización arbuscular están basados en la aplicación exógena de dicha hormona (Regvar et al. 1996; Ludwig-Müller et al. 2002; Tejada-Sartorius et al. 2008; León 2013). Los resultados obtenidos hasta la fecha son contradictorios, revelando efectos tanto negativos como positivos en el proceso de colonización, los cuales muestran un comportamiento dosis-dependiente, donde bajas concentraciones promueven el establecimiento del simbionte y dosis elevadas inhiben su desarrollo (Torres-Vera 2017). En este estudio, los resultados obtenidos parecen indicar que el alto contenido de AJ favorece el desarrollo y expansión del hongo MA en la raíz de las plantas de tomate, así como la formación de arbusculos (Fig. 6, 7 y 8). Tejada-Sartorius y colaboradores (2008) reportaron los mismos resultados para los tres parámetros de colonización, donde *Spr2* mostró una disminución significativa en contraste con plantas WT y PS, siendo este último el genotipo con mayor porcentaje de todos. Interessantemente, estos autores probaron los efectos de la aplicación externa de metil-jasmonato sobre plantas *Spr2*, observando un aumento en dichos parámetros, lo que apoya la postura del efecto positivo del AJ sobre la colonización micorrízica arbuscular.

La alta tasa de colonización en términos de frecuencia e intensidad ha sido previamente reportada en plantas transgénicas sobreproductoras de prosistemina vinculado a sus niveles elevados de AJ. Una investigación comparó el grado de colonización por *R. irregularis* en plantas de tomate PS en contraste con la línea PS-, la cual posee una modificación en el gen codificante de sistemina y en consecuencia bajo contenido de AJ, observando en este último una intensidad de colonización prácticamente despreciable ($M\%=3\%$), mientras que las plantas que sobreexpresan prosistemina obtuvieron niveles de colonización superiores a la variedad silvestre (Fernández et al. 2013). Una posible explicación del papel del AJ sobre la regulación de la micorrización es mediante la inducción de metabolitos secundarios. Como es sabido, el ácido jasmónico induce la producción de flavonoides y terpenos en respuesta a los ataques por herbívoros (Strack et al. 2003), en consecuencia, los altos niveles de esta fitohormona en plantas PS pueden producir un incremento en la actividad enzimática fenilalanina amino liasa (PAL), así

como transcritos asociados a ella (Thoma et al. 2003). La enzima PAL está involucrada en la biosíntesis de flavonoides, compuestos que poseen la capacidad de estimular el desarrollo fúngico en el tejido radicular (Vera-Tejeda 2017), favoreciendo así la colonización de MA mediante la actividad indirecta del AJ. Por otra parte, en el caso particular de plantas transgénicas PS, su mayor capacidad de micorrización ha sido ligada directamente a su alta concentración de sistemina y la interacción de esta molécula con estrigolactonas (SL). Se ha demostrado que los exudados de hormonas SL participan en la simbiosis micorrízica arbuscular en el diálogo molecular que inicia en la rizosfera previo al contacto entre el hongo y las raíces, durante la etapa denominada pre-simbiótica (Requena et al. 2007). El nivel endógeno de SL se encuentra correlacionado con el contenido de sistemina, donde plantas PS- presentan niveles inferiores en comparación con aquellas PS (López-Ráez et al. 2008), sugiriendo una posible participación propiamente de la sistemina en la regulación de la simbiosis mediante el control de los niveles de SL.

En cuanto a *Spr2*, el análisis de niveles reducidos en la frecuencia e intensidad de micorrización han sido previamente reportados por múltiples estudios (Li et al 2002; Isayenkov et al. 2005; Tejada-Sartorius et al. 2007, 2008; León 2013; Torres-Vera 2017). Fernández y colaboradores (2013) propusieron el papel regulatorio del AJ al estudiar distintos genotipos de tomate alterados en la biosíntesis/señalización de esta fitohormona, encontrando que mutantes deficientes en la acumulación de AJ, *Spr1*, *Spr2* y *def1*, así como la mutante insensible *jai1*, mostraron cambios sutiles o no consistentes en su grado de colonización respecto a sus variedades silvestres; mientras que las modificaciones más dramáticas pertenecieron a las plantas PS con un aumento considerable en tal parámetro. Asimismo, Mohanta y Bae (2015) reportaron los mismos resultados que en este estudio, señalando una clara supresión en el establecimiento del hongo MA en tomates mutantes *Spr2*, de la mano de una baja infectividad y frecuencia de micorrización. Un factor que pudiese influir en la baja tasa de micorrización en este genotipo es que carece de palmitvacenico y otros ácidos oleicos en sus raíces (Schaarschmidt et al. 2007a), ya que la acumulación de estos ácidos grasos se considera un marcador de la colonización fúngica en raíz y suplemento de carbono para el hongo (Stumpe et al. 2005). No obstante, el mecanismo más estudiado mediante el cual *Spr2* disminuye su grado de colonización

corresponde a la interacción entre AJ y carbohidratos. Se ha señalado que la supresión de la vía de síntesis de esta fitohormona puede producir perturbaciones en la expresión y actividades de genes y enzimas implicadas en la hidrólisis de sacarosa y el transporte de azúcares, derivando en una afectación de la colonización y/o de la formación de arbusculos (Wright et al. 1998; Schaarschmidt et al. 2006, 2007b; García-Garrido et al. 2010). Ensayos bioquímicos y moleculares sugieren que la ausencia de AJ interrumpe la expresión y altera los patrones de actividad de un grupo de genes y enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos en la raíz (Li et al. 2002). Tejeda-Sartorius et al. (2008) investigaron los patrones de expresión de genes involucrados en el metabolismo y transporte de azúcares en plantas *Spr2* colonizadas por *Glomus fasciculatum*. Sus resultados revelan una evidente supresión de los genes *Lin6* y *Sus3*, codificantes para una invertasa de pared celular y una sintasa de sacarosa respectivamente, acompañado de un fenotipo con una tasa de micorrización severamente disminuida; sin embargo, la aplicación exógena de Me-JA elevó los niveles de expresión de dichos genes, simultáneamente mejorando el porcentaje de colonización. Esto indica que efectivamente existe una estrecha relación entre la concentración de la fitohormona de AJ y el metabolismo de carbohidratos, aparentemente con una influencia positiva sobre el proceso de colonización MA. Adicionalmente, *Spr2* manifiesta una perturbación en la partición de carbono, detectando niveles significativamente mayores de glucosa y radio fructosa/sacarosa en sus raíces, indicando un transporte de sacarosa inadecuado (Tejeda-Sartorius et al. 2008), corroborando de tal modo la influencia del AJ sobre el metabolismo y locación de azúcares, y por ende, del proceso micorrízico. Por otro lado, el gen *LHA1*, reconocido por favorecer la micorrización mediante la reducción de los niveles de ATP en células colonizadas (lo que conlleva el aumento en el tamaño del plasmodesmo y el importe de sacarosa (Blee y Anderson 1998)), se observa con una expresión totalmente suprimida en raíces de *Spr2* (Tejeda-Sartorius et al. 2007), representando otra posible causa del efecto negativo sobre el establecimiento de la simbiosis en este genotipo. Por lo tanto y en concordancia con lo anteriormente mencionado, es posible que el AJ esté relacionado con la distribución de nutrientes en la planta, lo que permita una mayor disponibilidad de carbohidratos para el hongo, aumentando así la capacidad de colonización del hospedero.

En otro orden de ideas, los resultados de baja tasa de colonización en *Spr2* podrían parecer contradictorios con lo reportado para plantas de tomate transgénicos insensibles al AJ *jai1*. Las plantas *jai1* son deficientes en la señalización de AJ, siendo incapaces de inducir la expresión de genes relacionados con la defensa vegetal inducidos por AJ (Li et al. 2004); a diferencia de *Spr2*, la cual posee una deficiencia en la biosíntesis de tal fitohormona contando con niveles basales de la misma (Zhang y Turner 2008). Herrera-Medina y colaboradores (2008) observaron una mayor susceptibilidad a la colonización, especialmente en la frecuencia e intensidad de micorrización, en plantas *jai1* respecto a la variedad WT. En base a ello, el resultado esperado sería que la capacidad de micorrización en mutantes *Spr2* se viera aumentada como en *jai1*, aunque tal no ha sido el caso en este y otros estudios. De acuerdo con esto, resulta plausible que el nivel basal de AJ sea el responsable de la reducción en la formación de las micorrizas arbusculares (León 2013), dado que los bajos niveles de AJ deben causar, a su vez, una reducción de algún compuesto dependiente de la señal mediada por AJ necesario para una mayor infectividad del hongo MA.

En cuanto al porcentaje de abundancia arbuscular, se aprecia el mismo patrón que en los otros parámetros, donde los niveles mayores se observan en plantas PS y WT, principalmente en las plantas transgénicas, y reducido en las mutantes *Spr2*, aunque no significativamente (Fig. 8). Diversos investigadores han descrito el posible papel del AJ sobre la regulación en la formación y mantenimientos de los arbusculos, aunque su papel concreto aún no está claro (Pozo et al. 2015). Inicialmente, Hause y colaboradores (2007) observaron modificaciones en la expresión de genes marcadores para AJ en células con arbusculos en contraste con aquellas no colonizadas, en consecuencia, los autores sugieren que esta fitohormona afecta el desarrollo arbuscular. Los resultados del presente estudio indican que altos niveles de AJ endógeno favorecen el desarrollo de las estructuras arbusculares. Esta alta tasa de abundancia arbuscular en plantas de tomate PS ha sido reportada anteriormente en diversas investigaciones (Isayenkov et al. 2005; Herrera-Medina et al. 2008; Fernández et al. 2013; Torres-Vera 2017). Se ha descrito que dicha elevación en el número de arbusculos en este genotipo puede deberse a los mayores niveles de AJ endógeno desde etapas tempranas de la colonización, y/o debido a una potenciación en la habilidad de síntesis de AJ en plantas maduras en respuesta a un

estímulo relacionado con la simbiosis (Stenzel et al. 2003). Otros posibles mecanismos mediante los cuales los altos niveles de AJ influyen en el proceso de colonización son los cambios en la actividad proteolítica (Takeda et al. 2007), así como la alteración de la susceptibilidad de la raíz a la infección micorrízica causado por la modificación en las respuestas de defensa dependientes de SA derivadas de la interacción JA-SA (Tejada-Sartorius et al. 2008). Por otro lado, se ha propuesto que el AJ interviene en la expansión de la pared celular del hospedero (Gutjahr y Paszkowski 2013), representando así otro posible aspecto positivo aportado por dicha fitohormona en el desarrollo arbuscular. Además de la correlación directa del AJ con la formación de arbusculos, es posible que exista otro mecanismo indirecto que favorezca tal proceso en plantas PS debido a su alto contenido de sistemina y su interacción con estrigolactonas. Como se mencionó previamente, la sobreexpresión de sistemina conlleva un aumento en la producción de SL (Torres-Vera 2017); dado que dichas hormonas se han vinculado con el proceso de inducción de ramificación de las hifas fúngicas, es plausible participen asimismo en el desarrollo arbuscular, estructuras caracterizadas por su alta ramificación hifal.

En contraparte, la concentración basal de AJ en *Spr2* parece tener un impacto negativo en la abundancia de arbusculos, siendo el genotipo con menor porcentaje. Tales resultados concuerdan con lo hallado por Isayenkov y colaboradores (2005), quienes demostraron que la supresión de un gen relacionado con la biosíntesis de JA en *M. truncatula* resulta en niveles bajos de AJ y un menor número de arbusculos en comparación con plantas silvestres.

Igualmente, Tejada-Sartorius et al. (2008) reportaron que plantas deficientes en AJ *Spr2* muestran una micorrización reducida y un menor total de arbusculos, así como una menor expresión de diversos genes involucrados en el metabolismo y transporte de carbohidratos. La supresión de dichos genes puede estar ligado directamente al desarrollo arbuscular, ya que las células vegetales con arbusculos actúan como sumideros de carbohidratos, puesto que la planta cede parte de los mismo al hongo simbionte a cambio de nutrientes minerales (León 2013). En consecuencia, dicha alteración en el metabolismo de azúcares en *Spr2* representa una posible explicación a su bajo contenido arbuscular. No obstante, estudios acerca de la colonización micorrízica realizados con el genotipo PS-, cuyo contenido de AJ es prácticamente indetectable, se observa, además de un número considerablemente

menor, arbúsculos con malformaciones, con desarrollo incompleto o incluso muertos (Torres-Vera 2017). Esto sugiere que, a pesar de que la baja concentración de AJ en *Spr2* tiene un efecto negativo en el desarrollo arbuscular en términos de abundancia, niveles basales de AJ son necesarios para la correcta formación y funcionamiento de dichas estructuras.

Espectrometría de Masas e Identificación de Rutas Alteradas

El estudio de los extractos de raíz por espectrometría de masas reveló un total de 673 señales (Tabla Sup. 23). Una vez procesados los espectros y los datos de intensidades correspondientes a cada valor de m/z (Ver apartado de Metodología) se llevó a cabo un análisis de componente principales (PCA) para elucidar el comportamiento de las observaciones según su perfil metabólico. El gráfico del PCA (Fig. 10) muestra una clara separación de las observaciones acorde a su tratamiento con o sin micorriza en el eje horizontal del componente principal 1 (PC1), el cual contiene el mayor porcentaje de la varianza explicada con 77.1%. En dicha imagen se observan los tres genotipos en condiciones control en el hemisferio izquierdo del plano, mientras que en la presencia del hongo MA, se posicionan en el extremo derecho. Los siguientes dos componentes, PC2 y PC3, representan la variación acorde al genotipo en el eje vertical; sin embargo, en esta orientación no se aprecia una agrupación clara entre los distintos fondos genéticos, además de contar con una varianza explicada considerablemente menor (PC2=5.4% y PC3=3.7%). De estos resultados, puede decirse que las alteraciones en el contenido de AJ endógeno no afectan significativamente los efectos metabólicos generados por la simbiosis con el hongo.

En el círculo de correlaciones generado por el PCA (Fig. 11), es posible apreciar la correlación de las distintas variables (m/z) y cada una de las observaciones, donde existe una fuerte tendencia de acumulación de la amplia gama de m/z detectados en plantas control. Del total de 673 m/z identificadas, únicamente se reconocieron 9 acumuladas en mayor proporción en plantas micorrizadas, indicando que la asociación con *R. irregularis* disminuye severamente diversos procesos metabólicos en las raíces de plantas de tomate, independiente del genotipo analizado. En la Fig. 12, se muestra el mapa calórico generado a partir de los 15 m/z de mayor influencia sobre el PC1, el cual refleja la variación según

el tratamiento aplicado, observando una clara reducción en las intensidades de dichos metabolitos en plantas micorrizadas. Asimismo, el análisis discriminante por regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) ejecutado con las m/z previamente seleccionadas, revela ciertamente una acumulación en tomates control en contraste con aquellos con simbionte (Fig. 13); mientras que nuevamente no existe una diferenciación clara ni significativa entre plantas WT, PS o *Spr2* (Fig. 14). En concreto, tal patrón de disminución en la concentración de distintos metabolitos ante la simbiosis micorrízica sugiere un cierto “apagón” metabólico en las raíces de la planta huésped, lo cual, en consecuencia, permite o facilita el establecimiento del hongo y desarrollo de la simbiosis.

Ya que se detectaron las m/z con mayor influencia sobre la varianza entre los tratamientos (Fig. 15), se realizó la identificación putativa de los metabolitos y se ubicaron en qué rutas metabólicas intervienen; adicionalmente, aunque no representan una varianza significativa, se identificaron los 9 m/z acumulados específicamente en plantas micorrizadas. Los metabolitos cuya concentración se ve reducida en tomates micorrizados corresponden a intermediarios de las rutas de biosíntesis de fenilpropanoides (Fig. 16), biosíntesis de flavonoides (Fig. 17) y biosíntesis de carotenoides (Fig. 18). Mientras que los metabolitos aumentados durante la simbiosis pertenecen a compuestos que participan en el metabolismo del carbono (Fig. 19). A continuación, se discutirán los resultados para cada una de las rutas metabólicas identificadas.

Biosíntesis de Fenilpropanoides

Los fenilpropanoides son una familia diversa de compuestos orgánicos sintetizados por las plantas a partir de los aminoácidos fenilalanina (Phe) y tirosina (Tyr) (Barros et al. 2016). Su nombre deriva del grupo aromático fenol de 6 carbonos y la cola de propeno que los componen, donde el principal intermediario en su biosíntesis es el ácido cumárico (Fig. 16). Los productos de esta ruta incluyen lignoles, flavonoides, isoflavonoides, coumarinas y estilbenos, con una amplia gama de funciones como componentes esenciales de polímeros estructurales, protección contra luz UV, así como defensa contra herbívoros y patógenos (Vogt 2010).

La reducción en la actividad de esta ruta ante la presencia de hongos MA ya ha sido reportada por Espinosa y colaboradores (2014), quienes observaron una disminución en

el contenido de glicósidos de fenilpropanoides, así como compuestos fenólicos y flavonoides en raíces de olivo inoculadas con *R. irregularis*. Dicho fenómeno puede atribuirse al papel de los compuestos fenólicos sobre la rigidez de la pared celular vegetal, donde modifican sus propiedades limitando la degradación de polisacáridos por enzimas exógenas (Gayoso et al. 2010). Dado que para el correcto establecimiento de la simbiosis se requiere la distensión de la pared celular de las células corticales de raíz para permitir la penetración hifal y formación de arbusculos, resulta plausible la producción de tales compuestos vía la ruta biosintética de fenilpropanoides se vea aminorada durante la simbiosis. De manera similar, en *S. lycopersicum* se ha reportado una menor concentración de los intermediarios de esta ruta incluyendo ácido ferúlico, alcohol cumarílico y alcohol coniferílico, en paralelo con una disminución en la abundancia de Phe y Tyr (Rivero et al. 2015). Interesantemente, en el mismo estudio evaluaron el contenido de derivados fenólicos, en concreto de ligninas y lignanos, revelando su acumulación en raíces micorrizadas. Tales compuestos poseen la función de lignificación de la pared celular, y se han vinculado con la simbiosis MA como un mecanismo de defensa mediante el cual el hongo micorrízico restringe o limita la penetración por otros hongos patógenos (Ziedan et al. 2011). Pese a que el incremento en el contenido de ligninas y lignanos en respuesta a la colonización MA, de la mano con la menor concentración de intermediarios de la ruta de fenilpropanoides, puede aparentar un impacto negativo en el desarrollo de la simbiosis, la acumulación de estos compuestos ocurre de manera localizada en células radiculares circundantes y no colonizadas (Espinosa et al. 2014). Por lo tanto, estos resultados sugieren, y en concordancia con la reducción de los sustratos Phe y Tyr, que la reducción de los compuestos intermediarios de la ruta de fenilpropanoides sea consecuencia del flujo metabólico a lo largo de la ruta y sus reacciones subsecuentes, reduciendo así los sustratos y acumulando los productos derivados.

No obstante, otros estudios han reportado resultados contradictorios indicando un aumento en la biosíntesis de fenilpropanoides en raíces micorrizadas (Pozo et al. 2002; Dumas-Gadout et al. 2000), existe evidencia de acumulación de compuestos de defensa vegetales relacionados con la micorrización, incluyendo la activación del metabolismo de fenilpropanoides, aumento de especies reactivas de oxígeno y de isoformas específicas de

enzimas hidrolíticas (Pozo et al. 2007). Dichas activaciones de respuestas de defensa ocurren generalmente de manera localizada, sugiriendo un papel en el establecimiento y/o control de la simbiosis (García-Garrido y Ocampo 2002). Sin embargo, Hause y Fester (2005) demostraron que la acumulación de compuestos correspondientes a la biosíntesis de fenilpropanoides, en la mayoría de las especies vegetales, se dan de manera débil, transitoria, no coordinada y estrictamente localizados. Asimismo, Espinosa et al. (2014) reportaron que en raíces de tomate la acumulación de metabolitos de la ruta en cuestión ocurre únicamente en las primeras 24 horas, posteriormente los niveles tienden a disminuir hasta alcanzar valores por debajo de las plantas control después de la primera semana de inoculación con hongos MA. Por consiguiente, la discrepancia entre estas investigaciones y los resultados obtenidos en este estudio, donde se observa una reducción de fenilpropanoides, podría explicarse por el tiempo de análisis, ya que las muestras fueron procesadas 50 ddi y los reportes previos determinan una activación de dicho metabolismo en las primeras horas del establecimiento del hongo, probablemente como respuesta de defensa ante el organismo exógeno, siendo posteriormente reprimidas para permitir la asociación mutualista.

Biosíntesis de Flavonoides

Al igual que la ruta de fenilpropanoides, el metabolismo biosintético de flavonoides se vio con menor contenido de intermediarios en raíces micorrizadas de tomate. Los flavonoides son metabolitos secundarios sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y tres moléculas de malonil-CoA, cuyos productos incorporan numerosas modificaciones y adiciones de grupos funcionales diversificando esta familia en flavononas, flavonoles, chalconas, antocianinas y taninos (Fig. 17) (Galeotti et al. 2008). Las fluctuaciones en la concentración de estos compuestos durante la simbiosis micorrízica varían según el tipo de cultivar analizado, la especie de hongo MA que colonice y de la etapa de la simbiosis en que se evalúe. Carlsen et al. (2008) evaluaron el contenido de flavonoides en dos cultivares trébol blanco, cv. Milo y cv. Sonja, durante la asociación con *G. mosseae* y *G. claroiderum*, donde observaron diferencias significativas en la concentración de dichos compuestos, tanto dependiente del cultivar empleado como de la especie de hongo simbionte. En específico, detectaron menor contenido de daidzeina, coumesterol y kaempferol para todos los tratamientos, aunque en diferente

medida, simultáneamente con un incremento únicamente de medicarpina. Tal reducción de flavonoides, al igual que lo reportado en este proyecto, se puede vincular a un posible mecanismo del hongo MA con la finalidad de evitar supresión de la colonización por parte de la planta hospedera, dado que esta familia química posee propiedades antifúngicas con influencias alelopáticas en microorganismos y otras plantas (Guenoune et al. 2001). Por otro lado, otras investigaciones que analizaron la abundancia de flavonoides de manera periódica en distintas etapas de la simbiosis revelan que existe una activación en la biosíntesis de flavonoides estrictamente en los primeros 14 -18 días de la simbiosis, posteriormente los niveles tienden a disminuir paulatinamente. *Medicago sativa* inoculada con *R. irregularis* y *G. rosea*, muestra un alto contenido de formononetina, kaempferol y ononina en etapas tempranas, mientras que sus niveles se reducen por debajo de las plantas control después de dos semanas (Larose et al. 2002); en contraste, la concentración de coumasterol y medicarpina se incrementó con el paso del tiempo. Si bien existe un aumento de flavonoides solamente en las primeras fases de la simbiosis, esto se atribuye a la presencia de estos compuestos en los exudados radiculares que estimulan el proceso micorrización induciendo la germinación de las esporas fúngicas y afectando positivamente el crecimiento hifal (Gianinazzi-Pearson et al. 2008). Sin embargo, estudios previos indican la elevación en el contenido en particular de medicarpina y coumasterol, esto se debe a lo que se ha descrito como el mecanismo de autorregulación de la simbiosis por parte del hospedero (Guenoune et al. 2001), ya que ambas moléculas flavonoides representan fitoalexinas con actividad antifúngica e impactan negativamente el desarrollo del hongo. Por ende, es posible que la presencia de la micorriza induzca inicialmente la producción de flavonoides como respuesta de defensa contra el organismo exógeno, aunque en etapas avanzadas, el hongo simbionte inhiba la producción de tales compuestos de defensa para favorecer su desarrollo. No obstante, debido al gasto energético que representa la simbiosis para el hospedero, eventualmente provoque la acumulación particular de medicarpina y coumasterol como mecanismo de regulación.

Estudios transcriptómicos también concuerdan con lo mencionado respecto a que las alteraciones en la abundancia de flavonoides ocurren de una forma tiempo-dependiente. Volpin y colaboradores (1995) analizaron los niveles de mRNA de las enzimas fenil-

amonio liasa (PAL), chalcona isomerasa (CHI) y isoflavona reductasa (IFR) en raíces de alfafa en la presencia de *R. irregularis*. Observaron que los transcritos de PAL y CHI, enzimas clave en la biosíntesis de flavonoides, se duplicaban en los primeros 15 días y de ahí en adelante sus niveles se redujeron drásticamente. De manera opuesta, IFR, enzima que cataliza la penúltima reacción de biosíntesis de medicarpina, sufrió un incremento hasta 17 veces mayor a partir del día 18. Nuevamente, a través de la actividad enzimática, se corrobora que la acumulación de gran diversidad de flavonoides se lleva a cabo en los inicios de la simbiosis, mientras que en etapas tardías su producción se ve suprimida, a excepción de la medicarpina, la cual juega un papel en la autorregulación de la simbiosis y el control del desarrollo del hongo. El mecanismo de supresión de la respuesta de defensa de fitoalexinas mediante la reducción en la biosíntesis de flavonoides por parte del hongo MA, es una estrategia común que ocurre igualmente en microorganismos no patógenos que colonizan especies vegetales (Jacobeck et al. 1993). En conjunto, estas evidencias apoyan lo observado en las raíces de tomate, ya que su perfil metabólico fue realizado en fases tardías, los resultados esperados concuerdan con los obtenidos, revelando una reducción en el contenido de flavonoides.

Biosíntesis de Carotenoides

La tercera ruta que se vio afectada negativamente durante la asociación micorrízica es la biosíntesis de carotenoides. Los carotenoides son pigmentos orgánicos del grupo de los terpenos y poseen distintas funciones como componente estructural del complejo proteico de clorofila, protección de los centros de reacción contra la autooxidación, pigmentos alternativos para la captación de luz solar y fungen como sustrato para la síntesis de las fitohormonas ABA y SL (Nisar et al. 2015). La disminución de carotenoides observada en este estudio ya ha sido reportada en raíces micorrizadas de *Z. mays*, *Nicotiana tabacum* y *M. truncatula* (Fester et al. 2002; Maier et al. 2000), destacando particularmente la baja cantidad de β -caroteno presente en los tejidos radiculares. Pese a ello, prevalece cierta contradicción en los resultados de diversos autores respecto al efecto de la simbiosis micorrízica sobre dicha familia de moléculas. En múltiples plantas, se han detectado aumentos en los transcritos de las enzimas 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS) y 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXR), ambas involucradas en la ruta de metileritritol fosfato (MEP) (Strack y Fester 2006), lo cual se ha vinculado a la producción

de carotenoides ya que los productos finales de esta ruta, el isopentenil difosfato (IPP) y el dimetilalil difosfato (DMAPP), actúan como sustrato inicial en la biosíntesis de carotenoides (Walter et al. 2000). Es importante destacar que esta alta tasa de actividad en la ruta MEP y acumulación de los sustratos derivados de la misma se lleva a cabo estrictamente en células corticales que contienen arbusculos. De manera similar, Walter y colaboradores (2002) demostraron en *S. lycopersicum* que la expresión de DXS1 y DXS2, los cuales codifican para enzimas homólogas de DXS y DXR, se ve reducida en la mayoría de los tejidos vegetales con excepción de las células portadoras de arbusculos. Asimismo, precisamente en células con estructuras arbusculares se ha detectado un incremento en los niveles de fitoeno desaturasa (PDS), enzima que cataliza la segunda reacción en la biosíntesis de carotenoides, mientras que en el resto de tejido circundante los niveles de PDS eran indetectables, proponiendo así la activación de dicha ruta durante la simbiosis únicamente en presencia de arbusculos (Fester et al. 2002). La inducción de las rutas MEP y de carotenoides se fundamenta también por el cambio morfológico en los plástidos, dado que ambas reacciones ocurren en estas estructuras, únicamente en células con arbusculos se muestran en mayor número y con formas inusuales elongadas e interconectados entre sí creando una especie de red alrededor de la estructura fúngica (Köhler et al. 1997; Fester et al. 2001). Ya que el incremento de carotenoides se ve limitado a células arbusculares, una posible causa del menor contenido observado en este análisis sea debido al bajo porcentaje de abundancia arbuscular en los tres fondos genéticos (Fig. 8; Tabla Sup. 22). Por otro lado, IPP y DMAPP también son moléculas precursoras para la biosíntesis de alcaloides como vía alternativa a la ruta de mevalonato (Dubey et al. 2003), y, por lo tanto, es posible estos compuestos sean dirigidos a la producción de alcaloides y terpenoides en vez de carotenoides, para lo cual existe mayor evidencia de su acumulación en raíces micorrizadas (Zhi-lin et al. 2007; Keenan et al. 2008; Rasmussen et al. 2009; Andrade et al. 2012).

Otra posible explicación del bajo contenido de intermediarios de la ruta de carotenoides es debido al alto flujo en esta ruta, el cual no se ve reflejado en las cantidades de moléculas pertenecientes a la misma, sino a la acumulación de sus respectivos productos, los apocarotenoides (Fester et al. 2002). Estos compuestos derivan de la escisión oxidativa de sus precursores carotenoides y se detectaron recientemente en cantidades traza en

raíces micorrizadas (Schliemann et al. 2006). La inducción en la síntesis de apocarotenoides durante la simbiosis MA ha sido demostrada en dicotiledóneas que naturalmente cuentan con niveles indetectables de estos compuestos, pero ante la asociación con el hongo micorrízico aumentan (Fester et al. 2005), en particular la producción de blumenina y micorradicina, compuestos vinculados con la inhibición del desarrollo hifal y con la típica coloración amarilla en las raíces micorrizadas, respectivamente (Strack y Fester 2006; Schliemann et al. 2007). Asimismo, se ha reconocido un incremento en la concentración de moléculas apocarotenoideas de cadenas C₁₃ y C₁₄ en células vegetales que albergan arbusculos (Walter et al. 2010). Ambos compuestos carotenoides juegan un papel benéfico en el desarrollo de la simbiosis, donde en mutantes carentes de dichos compuestos se observa una supresión en la expresión de genes marcadores de la simbiosis, incluyendo el gen MtPT4 que codifica para el transportador de fosfatos específico de la asociación micorrízica, así como alteraciones en el desarrollo y degradación de arbusculos (Park et al. 2004). Cabe mencionar que, dada la naturaleza altamente lipofílica de los apocarotenoides (López-Ráez et al. 2011), en este estudio no es posible identificarlos ya que la extracción metanólica realizada únicamente incorpora compuestos polares (Ver Metodología). De tal modo que, un posible efecto del establecimiento del hongo MA sea potenciar la producción de esta familia de compuestos que, en general, favorecen su crecimiento, por ende, la ruta de carotenoides que precede la biosíntesis de apocarotenoides se vea disminuida por el flujo metabólico.

Metabolismo del Carbono

Mientras que el metabolismo de fenilpropanoides, flavonoides y carotenoides se vio aminorado en las raíces de tomate micorrizadas, el metabolismo del carbono se muestra con una mayor actividad que en plantas control, aunque no significativamente. Los procesos metabólicos relacionados con el carbono (C) incluyen la asimilación de C fotosintético, el metabolismo de sacarosa y almidón, y el transporte y utilización de carbohidratos (Coruzzi y Bush 2001). Las señales identificadas con mayor intensidad en tomates micorrizados corresponden a compuestos involucrados en el metabolismo de azúcares y ácido carboxílico, lo que sugiere una activación del metabolismo primario como efecto de la simbiosis, como ha sido reportado por múltiples estudios (Bago et al. 2000; Zouari et al. 2014; Rivero et al. 2015), probablemente relacionado con el simultáneo

incremento en las tasas de fotosíntesis de la planta hospedera (Kaschuk et al. 2009). Esta activación del metabolismo del carbono se fundamenta en la evidencia de una clara inducción de diversos genes relacionados con esta ruta. Se ha observado una mayor expresión del gen transportador de azúcares, *Mtst1*, en tejido radicular circundante a las hifas (Harrison 1996), al igual que otros genes codificantes para el transporte de carbohidratos, como TC77798 y AW584546, cuales se ven inducidos durante la simbiosis (Hohnjec et al. 2005). Para suministrar hexosas al hongo MA, el C fijado a través de la fotosíntesis debe ser translocado a las raíces en forma de sacarosa, donde debe adherirse mediante una sacarosa sintasa o invertasa citosólica (Roitsch y González 2004). Se ha reportado una expresión elevada del gen de la enzima sacarosa sintasa en raíces de *Z. mays*, la cual incluso se ha relacionado como factor determinante de la potencia del sumidero de C (Ravnskov et al. 2003). En el caso de *S. lycopersicum*, se ha demostrado una inducción hasta 6 veces mayor de la invertasa apoplástica LIN6 de manera localizada en células con arbusculos y en tejido de raíz colonizado por *R. irregularis* (Schaarschmidt et al. 2006). No obstante, el pico de expresión de LIN6 se observó en la semana 11, motivo que pudiese explicar la acumulación no significativa analizada en este proyecto, donde las muestras corresponden a 7 semanas de la colonización micorrízica y probablemente aún no alcanzaban su máxima activación metabólica. Misma estimulación en la producción de enzimas participantes en el transporte y anclaje de azúcares se han apreciado en raíces de *Phaseolus vulgaris*, *M. truncatula*, *Glycine max* y *Trifolium repens* (Blee y Anderson 2002; Hohnjec et al. 2003; Schubert et al. 2003; Wright et al. 1998). La síntesis de sacarosa sintasas e invertasas resulta indispensable para el correcto establecimiento del hongo simbiote debido a que este carece de las enzimas necesarias para utilizar la sacarosa del hospedero como fuente de C (Solaiman y Satio 1997), al igual que la estimulación positiva del metabolismo y transporte de carbohidratos para sustentar el sumidero de C que representa la simbiosis para la planta. Por consiguiente, la alta expresión de genes transportadores de azúcares, así como la inducción de enzimas sintasas e invertasas, suponen una activación del metabolismo del carbono en raíces micorrizadas como lo observado en este estudio.

CONCLUSIONES

- Las alteraciones en los niveles fisiológicos de ácido jasmónico repercuten negativamente el crecimiento y desarrollo vegetal, mostrando tanto en plantas mutantes (*spr2*) y transgénicas (PS) menores valores de altura de la planta, longitud de raíz y peso fresco.
- El ácido jasmónico influye positivamente el establecimiento de la simbiosis micorrízica en raíces de plantas de tomate y *R. irregularis*, reconociendo un mayor grado de colonización (F% y M%) así como número de arbusculos (A%) en plantas PS con expresión constitutiva de la fitohormona en cuestión.
- En general, la presencia del hongo micorrízico arbuscular “apaga” o ralentiza el metabolismo radicular en *S. lycopersicum*, detectándose una menor concentración de una gran diversidad de metabolitos en raíces colonizadas por el simbionte, en particular reduciendo la actividad en las rutas de biosíntesis de fenilpropanoides, flavonoides y carotenoides.
- La asociación micorrízica entre *R. irregularis* y plantas de tomate aumenta el contenido de metabolitos involucrados con el metabolismo del carbono en las raíces del hospedero, probablemente relacionado con la presencia del sumidero de carbono y el suministro de carbohidratos al hongo MA.

PERSPECTIVAS

En este estudio se demostró que las fluctuaciones en el nivel de AJ endógeno (distintos a los de las plantas silvestres) impacta negativamente sobre el crecimiento y desarrollo de la planta de tomate; mientras que el alto contenido de dicha fitohormona favorece el proceso de colonización, aumentando los porcentajes de frecuencia e intensidad de colonización, así como la abundancia arbuscular. Tal resultado marca la pauta para una posible utilización del AJ como potenciador de la simbiosis micorrízica arbuscular, tanto en condiciones de laboratorio, como su posible uso en cultivos en campo abierto. Simultáneamente, las ventajas de la aplicación exógena de dicha fitohormona podrían permitir superar las limitaciones que representa la formación de la simbiosis en condiciones naturales.

Por otro lado, la detección de las rutas metabólicas cuya actividad se ve reprimida en presencia del hongo micorrízico, podría servir como punto de partida para el estudio de mecanismos alternativos y sintéticos para habilitar el desarrollo de la simbiosis MA en familias vegetales consideradas actualmente no-micorrizables, entre las cuales destacan algunas con alto valor económico como Amaranthaceae, Brassicaceae, Crassulaceae y Fabaceae.

BIBLIOGRAFÍA

Alamirie B, Valkenborg, D, Baggerman G, Vanaerschot M, Witter E, Dujardin JD, Burzykowsky T, Berg M. (2013). Evaluation of Normalization Methods to Pave the Way towards Large-Scale LC-MS-Based Metabolomics Profiling Experiments. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*. 17 (9): 95-102.

Aliferis KA, Chamoun R, Jubaji S. 2015. Metabolic response of willow (*Salix purpurea* L.) leaves to mycorrhization as revealed by mass spectrometry and HNMR spectroscopy metabolite profiling. *Frontiers in Plant Science*. 6: 344.

Allen MF, Moore TS, Chirstensen M. 1982. Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. II. Altered levels of gibberellin-like substances and abscisic acid in the host plant. *Canadian Journal of Botany*. 60(4): 468-471.

Allen EB, Allen MF, Helm DJ, Trappe JM, Molina R, Rincon E. 1995. Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. *Plant Soil*. 140: 47-62.

Andrade SAL, Malik S, Sawaya ACHF, Bottcher A, Mazzafera P- 2012. Association with arbuscular mycorrhizal fungi influences alkaloid synthesis and accumulation in *Catharanthus roseus* and *Nicotiana tabacum* plants. *Acta Physiologiae Plantarum*. 35(3): 867-880.

Arafat AHA, He C. 2011. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. *Scientia Horticulturae*. 127(3): 228-233.

Augé RM, Toler HD, Sacton AM. 2015. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. *Mycorrhiza*. 25: 13-24.

Bago B, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. 2000. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology*. 124:949-958.

Balzergue C, Puech V, Bécard G, Rochange SF. 2010. The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signaling events. *Journal of Experimental Botany*. 62 (3): 1049-1060.

Barea JM, Azcón-Aguilar C. 1982. Production of plant growth regulating substances by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Appl Environ Microbiol*. 73: 810-813.

Barker SJ, Tagu D. 2000. The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. *J Plant Growth Regul*. 19: 144-154.

Barrat DH, Derbyshire P, Findlay K, Pike M, Wellner N, Lunn J, Smith AM. 2009. Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106: 13124-13129.

Barros J, Serrani JC, Chen F, Baxter D, Venables BJ, Dixon RA. 2016. Role of bifunctional ammonia-lyase in Grass cell Wall biosynthesis. *Nat. Plants*. 2(1): 16050.

Barsch A, Tellström V, Patschkowski T, Küster H, Niehaus K. 2006. Metabolite profiles of nodulated Alfalfa plants indicate that distinct stages of nodule organogenesis are accompanied by global physiological adaptations. *Mol Plant Microbe Interactions*. 19: 998-1013.

Bárzana G, Aroca R, Paz JA, Chaumont F, Martínez MC, Carvajal M. 2012. Arbuscular mycorrhizal symbiosis increases relative apoplastic water flow in roots of host plant under both well-watered and drought stress conditions. *Annals of Botany*. 109: 1009-1017.

Bever JD, Schultz PA, Pringle A, Morton JB. 2001. Arbuscular mycorrhizal fungi: more diverse than meets the eye, and the ecological tale of why. *Bioscience*. 51: 923-931.

Blee KA, Anderson AJ (1998) Regulation of arbuscule formation by carbon in the plant. *Plant J* 16: 523–530.

Blee KA, Anderson AJ. 2002. Transcripts for genes encoding soluble acid invertase and sucrose accumulate in root tip and cortical cells containing mycorrhizal arbuscules. *Plant Molecular Biology*. 50: 197-211

- Bolton EE, Wang Y, Thiessen PA, Bryant SH. (2008). Chapter 12 – PubChem: Integrated platform of small molecules and biological activities. Annual reports in Computational Chemistry. 4: 217-241.
- Brundett MC. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol.* 154:275-304.
- Bucher M, Hause B, Krajinski F, Küster H. 2014. Through the doors of perception to function in arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytol.* 10:1111/nph.12862
- Calderón-Vázquez C, Sawers RJ, Herrero-Estrella L. 2011. Phosphate deprivation in maize: genetics and genomics. *Plant Physiology.* 156: 1067-1077.
- Cameron DD, Neal AL, VanWees SCM, Ton J. 2013. Mycorrhiza-induced resistance: more than a sum of its parts? *Trends in Plant Science.* 18(10): 539-545.
- Carlsen SCK, Understrup A, Fomsgaard IS, Mortensen AG, Ravnskov S. 2008. Flavonoids in roots of white clover: interaction of arbuscular mycorrhizal fungi and pathogenic fungus. *Plant Soil* 302: 33-43.
- Choi YH, Kim HK, Linthorst JM, Hollander JG, Lefeber AWM, Erkelens C, Nuzillard JM, Verpoorte R. 2006. NMR metabolomics to revisit the Tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana tabacum* leaves. *J. Nat. Prod.* 69(5): 742-748.
- Conrath U, Pieterse CM, Mauch-Mani B. 2002. Priming in plant pathogen interactions. *Trends in Plant Science.* 7: 210-216.
- Coruzzi G, Bush DR. 2001. Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. *Plant Physiology.* 125: 61-64.
- De Vos RC, Moco S, Lommen A, Keurentjes JJ, Bino RJ, Hall RD. 2007. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature Protocols.* 2: 778-791.
- Degenhardt D, Refi A, Stratmann JW, Lincoln DE. 2010. Systemin and jasmonic acid regulate constitutive and herbivore-induced systemic volatile emissions in tomato, *Solanum lycopersicum*. *Phytochemistry.* 71: 2021-2037.

Devaiah BD, Madhuvanthi R, Karthikeyan AS, Raghothama KG. 2009. Phosphate starvation responses and gibberellic acid biosynthesis are regulated by the MYB62 transcriptional factor in Arabidopsis. *Molecular Plant*. 2: 73-58.

Domgalska MA, Leyser O. 2011. Signal interaction in the control of shoot branching. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 12: 211-221.

Dubey VS, Bhalla R, Luthra R. 2003. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biosciences*. 28: 637-645.

Dumas-Gadout E, Golloette A, Cordier C, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V. 2000. Modulation of host defence systems in arbuscular mycorrhizas: physiology and function. Kluwer Academic Publishers. 12: 173-200.

Egerton-Wharton LM, Alen EB. 2000. Shifts in arbuscular mycorrhizal communities along anthropogenic nitrogen deposition gradient. *Ecol Appl*. 10: 484-496.

Ellis C, Karafyllidis I, Wasternack C, Turner JG. 2002. The Arabidopsis mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell* 14:1557–1566.

Espinosa F, Garrido I, Ortega A, Casimiro I, Álvarez C. 2014. Redox activities and ROSA, NO and Phenylpropanoids production by axenically cultured intact olive seedling roots after interaction with mycorrhizal or a pathogenic fungus. *PLoS ONE*. 9(6): e100132.

Fellbaum CR, Gachomo EW, Beesetty Y, Choudhari S, Strahan S, Bucking H. 2012. Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:2666-2671.

Fernández I. 2013. Papel de los jasmonatos y prosistemina en el establecimiento y funcionamiento de la simbiosis micorrízica arbuscular. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Fester T, Fetzer I, Buchert S, Lucas R, Riling MC, Härtig C. 2011. Towards a systemic metabolomic signature of the arbuscular mycorrhizal interaction. *Physiological Ecology*. 167:913-924.

- Fester T, Schmidt D, Lohse S, Walter MH, Giuliano G, Bramley PM, Fraser PD, Hause B, Strack D. 2002. stimulation of carotenoid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots. *Planta*. 216: 148-154.
- Fester T, Strack D, Hause B. 2001. Reorganization of tobacco root plastids during arbuscule development. *Planta*. 213: 864-868.
- Fester T, Schmidt D, Lohse S, Walter MH, Giuliano G, Bramley PM, Fraser PD, Hause B, Strack D. 2002. Stimulation of carotenoid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots. *Planta*. 216(1): 148-154.
- Fester T, Wray V, Nimtz M, Strack D. 2005. Is stimulation of carotenoid biosynthesis in arbuscular mycorrhizal roots a general phenomenon? *Phytochemistry*. 66(15): 1781-1786.
- Fiehn O. 2002. metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*. 48: 155-171.
- Fiorilli V, Catoni M, Miozzi L, Novero M, Acotto GP, Lanfranco L. 2009. Global and cell-type gene expression profiles in tomato plants colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol*. 184: 975-987.
- Fitze D, Wiepning A, Kaldorf M, Ludwig-Müller J. 2005. Auxins development of an arbuscular mycorrhizal symbiosis in maize. *Journal of Plant Physiology*. 162(11): 1210-1219.
- Foo E, Ross JJ, Jones WT, Reid JB. 2013. Plant hormone in arbuscular mycorrhizal symbioses: an emerging role for gibberellins. *Annals of Botany*. 111(5): 769-779.
- Fumagalli E, Baldoni E, Abbruscato P, Piffanelli P, Genga A, Lamanna R, Consonni R. 2009. NMR techniques coupled with multivariate statistical analysis: tools to analyze *Oryza sativa* metabolic content under stress conditions. *J Agron Crop Sci*. 195: 77-88.
- Galeotti F, Barile E, Curir P, Dolci M, Lanzotti V. 2008. Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity. *Phytochemistry Letters*. 1: 44-48.

- Gallou A, Mosquera HPL, Cranenbrouck S, Suárez JP, Declerck S. 2011. Mycorrhiza induced resistance in potato plantlets challenged by *Phytophthora infestans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 76(1): 20-26.
- García-Garrido JM, Morcillo L, Martín-Rodríguez JA, Ocampo JA. 2010. Variations in the mycorrhization characteristics in roots of wild-type and ABA-deficient tomato are accompanied by specific transcriptomic alterations. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 23: 651-664.
- García-Garrido JM, Ocampo JA. 2002. Regulation of the plant defense response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*. 53: 525-534.
- Gayoso C, Pomar F, Novo E, Merino F, Martínez O. 2010. The *Ve*-mediated resistance response in tomato to *Verticillium dahlia* involves H₂O₂ peroxidase and lignins and drives PAL gene expression. *BMC Plant Biol*. 10: 232.
- Geil RD, Peterson LR, Guinel FC. 2001. Morphological alterations for pea (*Pisum sativum* cv. Sparkle) arbuscular mycorrhizas as a result of exogenous ethylene treatment. *Mycorrhiza*. 11(3): 137-143.
- Gerlach N, Schmitz J, Polatajko A, Schlüyer U, Fahnenstich H, Witt S, Fernie A, Uroic K, Scholz U, Bucher M. 2015. An integrated functional approach to dissect systemic responses in maize to arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant, Cell and Environment*. 38: 1591-1612.
- Gianinazzi-Pearson V, Séjalon-Delmas N, Genre A, Jeandroz S, Bonfane P. 2008. Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: cues and communication in the early steps of symbiotic interactions. *Adv Bot*. 46: 181-219.
- Govindarajulu M, Pfeffer PE, Jin H, Abubaker J, Douds DD, Allen JW. 2005. Nitrogen transfer in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*. 435: 819-823.
- Gómez SK, Javot H, Deewatthanawong P, Torres I, Tang Y, Blancaflor EB, Udvardi MK, Harrison MJ. 2009. *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC Plant Biology*. 9: 10.

Gómez-Roldán V, Fermas S, Brewer PB. 2008. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*. 455: 189-194.

Guenone D, Galili S, Phillips DA, Volpin H, Chet I, Okon Y, Kapulnik Y. 2001. The defense response elicited by the pathogen *Rhizoctonia solania* is suppressed by colonization of AM-fungus *Glomus intraradices*. *Plant Science*. 160: 925-932.

Guether M, Balestrini R, Hannah M, He J, Udvardi MK, Bonfante P. 2009. Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. *New Phytology*. 182: 200-212.

Gutjahr C, Parniske M. 2013. Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 29: 593-617.

Gutjahr C, Paszkowski E. 2009. Weights in the balance: jasmonic acid and salicylic acid signaling root-biotroph interactions. *Mol. Plant Microbe Interact*. 22: 26-34.

Gutjahr C y Paszkowski U. 2013. Multiple control levels of root systems remodeling in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Frontiers in Plant Science*. 4: 204.

Gutjahr C, Siegler H, Iino M, Paszkowski. 2015. Full establishment of arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice occurs independently of enzymatic jasmonate biosynthesis. *PLoS ONE*. 10(4): e0123422.

Harrison MJ. 1996. A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal association. *Plant J*. 9: 491-503.

Hart M, Ehret DL, Krumbein A, Leung C, Murch S, Turi C, Franken P. 2014. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi improves the nutritional value of tomato. *Mycorrhiza*. 25 (5):359-376.

Hart MM, Reader RJ. 2002. Host plant benefit from association with arbuscular mycorrhizal fungi: variation due to differences in size of mycelium. *Biol Fert Soils*. 36: 357-366.

Hause B, Maier W, Miersch O, Kramell R, Strack D. 2002. Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiology*. 130: 1212-1217.

Hause B, Fester T. 2005. Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Planta*. 221(2): 184-196.

Hause B, Mrosk C, Isayenkov S, Strack D. 2007. Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry*. 68(1): 101-110.

Hause B, Maire W, Mierscher O, Kramell R, Strack D. 2015. Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiol*. 130: 1213-1220.

Hawkes CV, Hartley IP, Ineson P, Fitter AH. 2008. Soil temperature affects carbon allocation within arbuscular mycorrhizal networks and carbon transport from plant to fungus. *Global Change Biology*. 14(5): 1535.

Heckman DS, Geiser DM, Eidell BR, Stauffer RL, Kardos NL, Hedges SB. 2001. Molecular evidence of the early colonization of land by fungi and plants. *Science*. 293:1129-1133.

Herrera-Medina MJ, Gagnon H, Piché Y, Ocampo JA, García JM, Vierheilig H. 2003. Root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi is affected by the salicylic acid content of the plant. *Plant Science*. 164(6): 993-998.

Herrera-Medina MJ, Steinkellner S, Vierheilig H, Ocampo JA, García-Garrido JM. 2007. Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist*. 175(3): 2107.

Herrera-Medina MJ, Tamayo MI, Vierheilig H, Ocampo JA, García-Garrido JM. 2008. The jasmonic acid signaling pathway restricts the development of the arbuscular mycorrhizal association in tomato. *Journal of Plant Growth and Regulation*. 27: 221-230.

Hirai MY, Klein M, Fujikawa Y, Yano M, Goodenowe DB, Yamazaki Y, Kanaya S, Nakamura Y, Kitayama M, Suzuki H, Sakurai N, Shibata D, Tokuhisa J, Reichelt M, Gershenzon J, Papenbrock J, Saito K. 2005. Elucidation of gene-to-gene and metabolite-to-gene networks in Arabidopsis by integration of metabolomics and transcriptomics. *J Biol Chem*. 280: 25590-25595.

Hohnjec N, Perlick AM, Pühler A, Küster H. 2003. The *Medicago truncatula* sucrose synthase gene MtSucS1 is activated both in the infected region of root nodules and in the cortex of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 16: 903-915.

Hohnjec N, Vieweg MF, Pühler A, Becker A, Küster H. 2005. Overlaps in the transcriptional profiles of *Medicago truncatula* roots inoculated with two different *Glomus* fungi provide insights into the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol* 137: 1283–1301

Howe A. G. 2009. The Role of Hormones in Defense Against Insect and Disease. Jasmonates. MSU-DOW Plant Research Laboratory. Pp. 646-682.

Isayenkov S, Mrosk C, Stenzel I, Strack D, Hause B. 2005. Suppression of allene oxide cyclase in hairy roots of *Medicago truncatula* reduces jasmonate levels and the degree of mycorrhization with *Glomus intraradices*. *Plant Physiol*. 139:1401–1410.

Jacobek JL, Smith JA, Lindgren PB. 1993. Suppression of bean responses by *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell*. 5: 57-63.

Jansa J, Smith FA, Smith SE. 2008. Are the benefits of simultaneous roots colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? *New Phytologist*. 177: 779-789.

Jeffries P, Gianinazzi S, Perotto S, Turnau K, Barea JM. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol Fertil Soils*. 37: 1-16.

Johnson D, Vandenkoornhuyse PJ, Leake JR, Gilbert L, Booth RE, Grim JP, Young JPW, Read DJ. 2003. Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. *New Phytologist*. 161: 503-515.

Jones OAH, Walker LA, Nicholson JK, Shore RF, Griffin JL. 2007. Cellular acidosis in rodents exposed to cadmium is caused by adaptation of the tissue rather than an early effect of toxicity. *Comp Biochem Phys*. 2: 316–321.

Kaldorf M, Müller J. 2000. AM fungi might affect the root morphology of maize by increasing indole-3-butyric acid biosynthesis. *Physiol Plant*. 109: 58-67.

- Kaschuk G, Kuyper TW, Leffelaar PA, Hungri M, Griller KE. 2009. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? *soil Biol Biochem.* 41: 1233-1244.
- Kazan K, Manners JM. 2009. Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science.* 14: 13
- Keenan M, Mack L, Rudgers JA. 2008. Balancing multiple mutualists: asymmetric interactions among plants, arbuscular mycorrhizal fungi and fungal endophytes. *OIKOS.* 117: 310-320.
- Kim YC, Gao C, Zheng Y, Yang W, Chen L, Xe XH, Wan SQ. 2014. Different responses of arbuscular mycorrhizal fungal community to day-time and night-time warming in a semiarid steppe. *Schin. Sci. Bull.* 59: 5080-5089.
- Kloppholz S, Kuhn H, Requena N. 2011. A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Current Biology* 21(16):1204-1209.
- Kogel KH, Voll LM, Schäfer P, Jansen C, Wu Y, Langen G, Imani J, Hoffman J, Schmiedl A, Sonnewald S, Wettstein DV, Cook RJ, Sonnewald U. 2010. Transcriptome and metabolome profiling of field-grown transgenic barley lack induced differences but show cultivar-specific variances. *PNAS.* 107:6198-6203.
- Kohlbacker O, Reinert K, Gropl C, Lange E, Pfeifer N, Schulz-Trieglaff O, Sturm M. (2007). TOPP—the OpenMS proteomics pipeline. *Bioinformatics.* 15;23(2): e191-7.
- Köhler RH, Cao J, Zipfel WR, Webb WWW, Hanson MR. 1997. Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids. *Science.* 276: 2039-2042.
- Laparre J, Malbreil M, Letisse F, Prtais JC, Rouc C, Bécard G, Puech V. 2014. Combining metabolomics and gene expression analysis reveals that propionyl- and butyryl- carnitines are involved in late stages of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Molecular Plant.* 7:3:554-556.
- Larose G, Chenevert R, Moutoglis P, Gagné S, Piché Y, Vierheilig H. 2002. *Jour of Plant Physiol.* 159(12): 1329-1339.

Leitner M. 2010. Does mycorrhization influence herbivore-induced volatile emission in *Medicago truncatula*? *Mycorrhiza*. 20: 89-101.

León RJ, Ángel J, Rodríguez M, Vierheilig H, Ocampo JA, García-Garrido JM. 2012. Late activation of the 9-oxylin pathway during arbuscular mycorrhiza formation in tomato and its regulation by jasmonate signaling. *Jour Exp Bot*. 63 (10): 3545-3558.

León RJ. 2013. Estudio del papel del ácido jasmónico como señal reguladora del proceso de micorrización arbuscular en Solanáceas. Universidad de Granada. Tesis Doctorales. ISBN: 978-84-9083-353-7.

Li L, Li C, Lee GI, Howe GA. 2002. Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:6416–6421.

Li L, Zhao Y, McCaig BC, Wingerd BA, Wang J, Whalon ME, Pichersky E, Howe GA. 2004. The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed natural control of seed maturation, jasmonate signaled defense responses, and glandular trichome development. *The Plan Cell*. 16: 126-143.

Liu J, Mendoza I, López M, Cheung F, Town CD, Harrison MJ. 2007. Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *The Plant Journal*. 50: 529-544.

López-Ráez J, Charnikhova T, Fernández I, Bouwmeester H, Pozo MJ. 2011. Arbuscular mycorrhizal symbiosis decreases strigolactone production in tomato. *Journal of Plant Physiology*. 168: 294-297.

López-Ráez JA, Verhage A, Fernández I, García JM, Azcón-Aguilar C, Flors V, PozoMJ. 2010. Hormonal and transcriptional profiles highlight common and differential host responses to arbuscular mycorrhizal fungi and the regulation of the oxylin pathway. *J Exper Bot*. 61: 2589-2601.

López-Ráez Ja,m charnikhova T, Gómez V, Matusova R, Kohlen W, De Vos R, Verstappen F, Puech-Pages V, Bécard G, Mulard P. 2008. Tomato strigolactones are

derived from the carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytologist*. 175: 863-874.

Lovelock CE, Andersen K, Morton JB. 2003. Arbuscular mycorrhizal communities in tropical forests are affected by host tree species and environment. *Ecosystems Ecology*. 135: 268-279.

Ludwig-Müller J, Bennett R, Garcí-Garrido JM, Piché Y, Vierheilig H. 2002. Reduced arbuscular mycorrhizal root colonization in *Tropaeloum majus* and *Carica papata* after jasmonic acid application cannot be attributed to increased glucosinolate. *Journal Plant Physiology*. 159: 517-523.

Mack KML y Rodgers JA. 2008. Balancing multiple mutualists: asymmetric interactions among plants, arbuscular mycorrhizal fungi and fungal endophytes. *Oikos*. 117(2): 417-425.

Maier W, Schmidt J, Nimtz M, Wray V, Strack D. 2000. Secondary products in mycorrhizal roots of tobacco and tomato. *Phytochemistry*. 54: 473-479.

Maucher H, Hause B, Feussner I, Ziegler J, Wasternack C. 2001. Allene oxidase synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv Salome): tissue specific regulation in seedling development. *The Plant Journal*. 21(2): 135-1374.

Meixner C, Ludwig-Müller J, Miersch O, Gresshoff PM, Staehelin C, Vierheilig H. 2005. Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supermodulation soybean mutant nts1007. *Planta*. 222: 709-715.

Michaud MR, Denlinger DL (2007) Shifts in the carbohydrate, polyol, and amino acid pools during rapid cold-hardening and diapause-associated cold-hardening in flesh flies (*Sarcophaga crassipalpis*): a metabolomic comparison. *J Comp Physol*. 177: 753–763.

Moco S, Bino JR, Vorst O, Verhoeven HA, de Groot V, Van Beek TA, Vervoort J, de Vos R. (2006). A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. *Breakthrough Technologies*. 10 (11): 78-86.

Mohanta TK, Bae H. 2015. Functional genomics and signaling events in mycorrhizal symbiosis. *Journal of Plant Interactions*. 10(1): 21-40.

- Nair, A, Kolet, SP, Thulasiram HV, Bhargava S. 2014. Systemic jasmonic acid modulation in mycorrhizal tomato plants and its role in induced resistance against *Alternaria alternate*. *Plant Biol.* ISSN 1435-8603.
- Nisar N, Li L, Shan L, Na K, Pogson C, Barry J. 2015. Carotenoid metabolism in plants. *Molecular Plant. Plant Metabolism and Synthetic Biology.* 8(1): 68-82.
- Noir S, Bömer M, Takahashi N, Ishida T, Tsui T-L, Balbi V, Shanahan H, Sugimoto K, Devoto A. 2013. Jasmonate controls leaf growth by repressing cell proliferation and the onset of endoreduplication while maintaining a potential stand-by mode. *Plant Physiology.* 161:1930–1951.
- Park S, Takano Y, Matsuura H, Yoshihara T. 2004. Antifungal compounds from the root and root exudate of *Zea mays*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry.* 68: 1366-1368.
- Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbiosis. *Nat. Rev. Microbio.* 6: 763-775.
- Paszkowski U. 2006. Mutualism and parasitism: the yin yang of plant symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology.* 9: 364-370.
- Pedas P, Husted S, Skytte K, Schjoerring JK. 2011. Elevated phosphorous impedes manganese acquisition by barley plants. *Frontiers in Plant Science.* 2: 1-12.
- Phillips JM, Hayman DS. (1970). Improved procedures for cleaning roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Elsevier.* 55 (1): 158-161.
- Pozo MJ, Azcón C. 2007. Unraveling mycorrhiza induced resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 393-398.
- Pozo MJ, Cordier C, Dumas-Gadout E, Gianinazzi S, Barea JM, Azcón-Aguilar C. 2002. Localized vs systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *Jornal of Experimental Botany.* 53: 525-534.

- Pozo MJ, López-Ráez JA, Azcón-Aguilar C, García-Garrido JM. 2015. Phytohormones as integrator of environmental signals in the regulation of mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*. 205: 1431-1436.
- Prinzenburg AE, Barbier H, Salt, DE, Stich B, Reymond M. 2010. Relationships between growth, growth response to nutrient supply, and ion concentration content using a recombinant inbred line population in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 154: 1361-1371.
- Rasmussen S, Parson AJ, Newman JA. 2009. Metabolomics analysis of the *Lolium perenne*-*Neotyphodium lolii* symbiosis: more than just alkaloids? *Phytochemistry Reviews*. 8(3): 535-550.
- Ravnskov S, Wu Y, Graham JH. 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect expression of genes coding for sucrose synthases in maize roots. *New Phytol*. 157: 539–545
- Regvar M, Gogala N, Zalar P. 1996. Effects of jasmonic acid on mycorrhizal *Allium sativum*. *New Phytologist*. 134: 703-707.
- Requena N, Serrano E, Ocón A, Breuninger M. 2007. plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry*. 68(1): 33-40.
- Riedel T, Groten K, Baldwin I. 2008. Symbiosis between *Nicotiana attenuata* and *Glomus intraradices*: ethylene plays a role, jasmonic acid does not. *Plant, Cell and Environment*. 31: 1203-1213.
- Rivero J, Gamir J, Aroca R, Pozo MJ, Flores V. 2015. Metabolic transition in tomato roots. *Frontiers in Microbiology*. 6: 598-605.
- Rodríguez JAM, Ocampo JA, Molinero-Rosas N, Tarkowská D, Ruíz-Rivero O, García-Garrido JM. 2014. Role of gibberellins during arbuscular mycorrhizal formation in tomato: new insight revealed by endogenous quantification and genetic analysis of their metabolism in mycorrhizal roots. *Physiologia Plantarum*. 154(1): 66-81.
- Roitsch T, González MC. 2004. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science*. 9: 606-613.

Ruiz JM, Arcoa R, Zamarreño AM, Molina S, Andrero B, Porcel R, García, JM, Ruyter C, López JA. 2015. Arbuscular mycorrhizal symbiosis induces strigolactone biosynthesis under drought and improves drought tolerance in lettuce and tomato. Un-published version. 10.1111/pce. 12631.

Ruiz-Lozano JM, Aroca R. 2012. Regulation by arbuscular mycorrhizae of the integrated physiological response to salinity in plants: new challenges in physiological and molecular studies. *Journal of Exploratory Botany*. 63: 4033-4044.

SAGARPA 2018. México se consolida como proveedor de jitomate a nivel mundial. Artículo disponible en <https://www.gob.mx/sagarpa%7Cchiapas/articulos/mexico-se-consolida-como-proveedor-de-jitomate-a-nivel-mundial-166924>

Saia S, Ruisis P, Fileccia V, DiMiceli G, Amato G, Martinelli F- 2014. Metabolomics suggests that soil inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi decreases free amino acid content in roots of Durum Wheat grown under N-limited, P-rich field conditions. *PLoS ONE*. 10(6): e0129591.

Salvioli A, Bonfante P. 2013. Systems biology and “omics” tools: a cooperation for the next-generation mycorrhizal studies. *Plant Sci*. 203-204: 107-114.

Salzer P, Bonanomi A, Beyer K. 2000. Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation and pathogen infection. *Mol Plant Microbe Inter*. 13: 763-777.

Sanchez DH, Lippold D, Redestig H, Hannah MA, Erban A, Krämer U, Kopka J. 2008. Integrative functional genomics of salt acclimatization in the model legume *Lotus japonicus*. *Plant J*. 53:973-987.

Sardans J, Peñuelas J, Rivas A. 2011. Ecological metabolomics: overview of current developments and future challenges. *Chemoecology*. 21: 191-225.

Savitzky A, Golay JE. (1964). Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Square Procedures. *Anal of Chemistry*. 36 (8): 1627-1639.

Schaarschmidt S, González M-C, Roitsch T, Strack D, Sonnewald U, Hause H. 2007a. Regulation of arbuscular mycorrhization by carbon. The symbiotic interaction cannot be

improved by increased carbon availability accomplished by root-specifically enhanced invertase activity. *Plant Physiology*. 143: 1827–1840

Schaarschmidt S, Kopka J, Ludwig-Müller J, Hause B. 2007b. Regulation of arbuscular mycorrhiza by apoplastic invertases. Increased invertase activity the leaf apoplast effects the symbiotic interaction. *Plant Journal*. 51: 390-405.

Schaarschmidt S, Roitsch T, Hause B. 2006. Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Journal of Experimental Botany*. 57(15): 4015-4023.

Schliemann W, Ammer C, Strack D. 2007. Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry*. 69: 112-146.

Schliemann W, Schmidt J, Nimtz M, Wray V, Feste T, Strack D. 2006. Apocarotenoids from mycorrhizal roots of *Ornithogalum umbellatum*. *Phytochemistry*. 67: 119-1205.

Schlüter U, Colmsee C, Scholz U, Bräutigam A, Weber AP, Zellerhoff N, Sonnewald U. 2013. Adaptation of maize source leaf metabolism to stress related disturbances in carbon, nitrogen and phosphorous balance. *BMC Genomic*. 14: 442-451.

Schubert A, Allara P, Morte A. 2003. Cleavage of sucrose in roots of soybean (*Glycine max*) colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 161, 495–501.

Schweiger R, Baier MC, Persicke M, Müller C. 2014. High specificity in plant leaf metabolic responses to arbuscular mycorrhiza. *Nature Communications*. Doi: 10.1038/ncomms4886.

Schweiger R, Müller C. 2015. Leaf metabolome in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*. 26:120-126.

Sharma D, Kapoor R, Bhatnagae AK. 2009. Differential growth response of *Curculigo orchioides* to native arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities varying in number and fungal components. *European Journal of Soil Biology*. 45(4): 328-333.

- Sheng M, Tang M, Zhang F, Huang Y. 2011. Influence of arbuscular mycorrhiza on organic solutes in maize leaves under salt stress. *Mycorrhiza*. 21: 423-430.
- Smith CA, Maille GO, Want EJ, Chuan Q, Trauger SA, Brandone TR, Custodio DE, Ruben A, Siuzdak G. (2005). METLIN: A metabolite mass spectral database. *Therapeutic Drug Monitoring*. 24 (6): 747-751.
- Smith SE, Facelli E, Pope S, Smith FA. 2010. Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant Soil*. 326:3-20.
- Solaimain MD, Satio M. 1997. Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry. *New phytol*. 136: 533-538.
- Song Y, Chen D, Lu K, Sun Z, Zeng R. 2015. Enhances tomato disease resistance primed by arbuscular mycorrhizal fungus. *Frontiers in Plant Science*. 6:786.
- Stenzel I, Hause B, Maucher H, Pitzschke A, Miersch O, Ziegler J, Ryan CA, Wasternack C. 2003. Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato-amplification in wound signaling. *Plant Journal*. 33: 577–589.
- Strack D, Fester T, Hause B, Schliemann W, Walter MH. 2003. Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical, and molecular aspects. *Journal of Chemical Ecology*. 29: 1955-1979.
- Strack D, Fester T. 2006. Isoprenoid metabolism and plastid reorganization in arbuscular mycorrhizal roots. *Tansley review*. *New Phytologist*. 172: 22-34.
- Stumpe M, Carsjens JG, Stenzel I, Gobel C, Lang I, Pawlowski K, Hause B, Feussner I. 2005. Lipid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry*. 66: 781-791.
- Sturm M, Bertsch A, Gropl C, Hildebrandt A, Hussong R, Lange E, Pfeifer N, Schulz-Trieglaff O, Zerck A, Reinert K, Kohlbacher O. (2008). OpenMS – An open-source software framework for mass spectrometry. *BMC Bioinformatics*. 9: 163.

Sun J, Chen Q, Qi L, Jiang H, Li S, Xu Y, Liu F, Zhou W, Pan J, Li X, Palme K, Li C (2011) Jasmonates modulates endocytosis and plasma membrane accumulation of the Arabidopsis PIN2 protein. *New Phytol* 191:360–375.

Sun J, Xu Y, Ye S, Jiang H, Chen Q, Liu F, Zhou W, Chen R, Li X, Tietz O, Wu X, Cohen JD, Palme K, Li C (2009) Arabidopsis ASA1 is important for jasmonate-mediate regulation of auxin biosynthesis and transport during lateral root formation. *Plant Cell* 21:1495–1511.

Takeda N, Kistner C, Kosuta S, Winzer T, Pitzschke A, Groth M, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Parinske M. 2007. Protease in plant root symbiosis. *Phytochemistry*. 68(1): 111-121.

Tejeda-Sartorius M, Martínez O, Délano-Fier JP. 2008. Jasmonic acid influences mycorrhizal colonization in tomato plants by modifying the expression of genes involved in carbohydrate partitioning. *Physiologia Plantarum*. 133: 339-353.

Tejeda-Sartorius M, Martínez-Gallardo NA, Olalde-Portugal V, Délano-frier JP. 2007. Jasmonic acid accelerates the expression of a pathogen-specific lipoxygenase (POTLX-3) and delays foliar late blight development in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Rev Mex Fitopatol*. 25:18–25.

Thirkell TJ, Cameron DD, Hodge A. 2016. Resolving the ‘nitrogen paradox’ of arbuscular mycorrhizas: fertilization with organic matter brings considerable benefits for plant nutrition and growth. *Plant, Cell and Environment*. 39(8): 126-131.

Thoma L, Loeffler C, Sinha AK, Gupta M, Krischke M, Steffan B. et al. 2003. Cyclopentanone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense genes and phytoalexin accumulation in plants. *Plant Journal*. 34: 363-375.

Torres-Vera R. 2017. Role of strigolactones in plant defense: hormonal cross-talk and implication in arbuscular mycorrhizal symbiosis. Universidad de Granada. Tesis Doctorales. ISBN: 978-84-9163-460-7.

Toussaint JP, Smith FA, Smith SE. 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi can induce the production of phytochemicals in sweet basil irrespective of phosphorous nutrition. *Mycorrhiza*. 17:291-297.

Trethewey RN. 2004. Metabolite profiling as an aid to metabolic engineering in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 7: 196-201.

Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V. 1986. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In : *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*, V. Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi (eds.). INRA Press, Paris, pp. 217-221.

Udayakumar M, Chandar DP, Arun N, Mathangi J, Hemavathi K, Seeivasagam R. (2012). PMDB: Plant metabolome database – A metabolomic approach. *Medicinal Chemistry Research*. 21 (1): 47-52.

Ueda J, Kato J. 1980. Isolation and identification of a senescence promoting substance from wormwood (*artemisa absinthium* L.). *Plant Physiology*. 66: 246-249.

Van der Heijden MDA, Boller T, Wiemken A, Sanders IR. 2005. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology*. 79: 2082-2091.

Van Rhijn P, Fang Y, Galili S, Shaul O, Atzmon N, Wininger S, Eshed Y, Lum M, Li Y, To V, Fujishige N, Hirsch AM. 1997. Expression of early nodulin genes in alfalfa mycorrhizae indicates that signal transduction pathways used in forming arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium*-induced nodules may be conserved. *Proc Natl Acad Sci*. 94: 5467-5472.

Vanholme B, Grunewald W, Bateman A, Kohchi T, Gheysen G. 2007. The tify family previously known as ZIM. *Trend in Plant Science*. 12: 239-244.

Vierheilig H, Lange J, Alt M, Rella M, Wiemken A, Boller T. 1996. Colonization of transgenic tobacco constitutively expressing pathogenesis related proteins by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Appl Environ Microbiol*. 61 (8): 3031-3034.

Vierheilig H, Piché Y. 2002. Signaling in arbuscular mycorrhiza: facts and hypotheses. Capítulo publicado en: Buslig BS, Manthey JA, Flavonoids in Cell Function. Advances in experimental medicine and biology. Vol 505. Springer, Boston, MA, USA.

Vogt T. 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*. 2(11): 2-20.

Volpin H, Phillips DA, Okon Y, Kapulnik Y. 1995. Suppression of an isoflavonoid phytoalexin defense response in mycorrhizal Alfalfa roots. *Plants Physiology*. 108: 1449-1454.

Walter MH, Fester T, Strack D. 2000. Arbuscular mycorrhizal fungi induce the non-mevalonate methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis correlated with the accumulation of the yellow pigment and other apocarotenoids. *Plant J*. 21: 571-578.

Walter MH, Floss DS, Strack D. 2010. Apocarotenoids: hormones, mycorrhizal metabolites and aroma volatiles. *Planta*. 232: 1-17.

Walter MH, Joachim H, Strack D. 2002. Two distant related genes encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. *The Plant Journal*. 31(3): 243-254.

Wasternack C, Hause B. 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*. 111: 1021-1058.

Wasternack C. 2013. Action of jasmonates in plant stress responses and development – applied aspects. *Biotechnology Adv*. 32(1): 31-39.

Wasternack, C. 2015. How jasmonates earned their laurels: past and present. *Journal of Plant Growth Regulation*. 34(4): 1-34.

Wilson GWT, Rice CW, Rillig MC, Springer A, Hartnett DC. 2009. Soil aggregation and carbon sequestration are tightly correlated with the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi: results from long-term field experiments. *Ecology Letters*. 12: 452-461.

Wright DP, Read DJ, Scholes JD. 1998. Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment* 21, 881–891.

Zhang Y, Turner JG. 2008. Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis. *PLoS ONE*. 3: e3699.

Zhi-lin Y, Chuan D, Lian C. 2007. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. *African Journal of Biotechnology*. 6(11): 1266-1271.

Zhu HH y Yao Q. 2004. Localized and systemic increase of phenols in tomato roots induced by *Glomus versiforme* inhibits *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Phytopathology*. 152(10): 111-114

Ziedan E, Elewa I, Mostafa M, Sahab A. 2011. Application of mycorrhizae for controlling root disease in sesame. *J. Plant Prot. Res.* 51: 355-361.

Zouari I, Salviolli A, Chialva M, Novero M, Miozzi L, Tenore GC, Bagnaresi P, Bonfante P. 2014. From root to fruit: RNA-Seq analysis shows that arbuscular mycorrhizal symbiosis may affect tomato fruit metabolism. *BMC Genomics*. 15: 221.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

ANOVA de 2 Factores Prueba de los Efectos Inter-Sujetos

Variable Dependiente: Altura de la Planta (cm)

Fuente	Suma de Cuadrados Tipo III	gl	Media Cuadrática	F	Sig.
Modelo Corregido	50.686 ^a	5	10.137	1.708	.173
Intersección	6458.844	1	6458.844	1088.024	.000
Genotipo	45.307	2	22.654	3.816	.037
Tratamiento	5.544	1	5.544	.934	.344
Genotipo*Tratamiento	2.652	2	1.326	.223	.802
Error	136.535	23	5.936		
Total	6697.230	29			
Total Corregido	187.221	28			

a. R cuadrado = .271 (R cuadrado corregida = .112)

Tabla Suplementaria 1. Análisis de ANOVA de 2 factores de la Altura de la Planta (cm) de los tres fondos genéticos.

Análisis Descriptivo

Variable Dependiente: m Altura de la Planta (cm)

Genotipo	Tratamiento	Media	Error Tipico	N
Spr2	Control	13.7500	2.48495	6
	Micorriza	13.8000	2.22486	5
	Total	13.7727	2.25126	11
Wt	Control	16.1000	2.30217	5
	Micorriza	17.4500	2.71600	4
	Total	16.7000	2.43362	9
PS	Control	14.0500	2.90000	4
	Micorriza	15.3000	2.07966	5
	Total	14.7444	2.39797	9
Total	Control	14.6133	2.59254	15
	Micorriza	15.3786	2.61480	14
	Total	14.9828	2.58582	29

Tabla Suplementaria 2. análisis descriptivo de la variable Altura de la Planta (cm) para los tres fondos genéticos.

Comparación Múltiple de Medias

Variable Dependiente: Altura de la Planta (cm)

Scheffe

(I) Genotipo	(J) Genotipo	Diferencia de las Medias (I-J)	Error Típico	Sig.	Intervalo de Confianza al 95%	
					Lim. Inf.	Lim. Sup.
Spr2	Wt	-2.9273 [*]	1.09510	.045	-5.7922	-.0623
	PS	-.9717	1.09510	.679	-3.8367	1.8932
Wt	Spr2	2.9273 [*]	1.09510	.045	.0623	5.7922
	PS	1.9556	1.14856	.255	-1.0492	4.9604
PS	Spr2	.9717	1.09510	.679	-1.8932	3.8367
	Wt	-1.9556	1.14856	.255	-4.9604	1.0492

*. La diferencia entre medias es significativa al nivel 0.05.

Tabla Suplementaria 3. comparación múltiple de medias de la variable Altura de la Planta (cm) para los tres genotipos.

Subconjuntos Homogéneos

Altura de la Planta (cm)

Scheffe^{a,b,c}

Genotipo	N	Subconjunto	
		1	2
Spr2	11	13.7727	
PS	9	14.7444	14.7444
Wt	9		16.7000
Sig.		.687	.235

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

a. Utilica media armónica del tamaño de muestra = 9.581

b. Los tamaños entre los grupos no son iguales. Se emplea la media armónica entre los tamaños de grupos. Los niveles del Error Tipo I no se garantizan.

c. Alfa = 0.05

Tabla Suplementaria 4. Subconjuntos homogéneos de la prueba de Scheffé para la variable Altura de la Planta (cm) de los tres genotipos.

Prueba de T-Student para Muestras Independientes

		Prueba de Levene para Igualdad de Varianzas		Prueba t para Igualdad de Medias			Intervalo de Confianza de la Diferencia al 95%			
		F	Sig.	t	gl	Sig. (2-colas)	Diferencia de las Medias	Error Típico	Inf.	Sup.
Altura de la planta Spr2 Ctl/Myc	Se han asumido varianzas iguales	.065	.804	.496	10	.630	.84286	1.69864	-2.94196	4.62767
	No se han asumido varianzas iguales			.531	9.998	.607	.84286	1.58818	-2.69594	4.38165
Altura de la Planta Wt Ctl/Myc	Se han asumido varianzas iguales	.540	.486	-.809	7	.445	-1.35000	1.66898	-5.29651	2.59651
	No se han asumido varianzas iguales			-.792	5.962	.459	-1.35000	1.70416	-5.52631	2.82631
Altura de la Planta PS Ctl/Myc	Se han asumido varianzas iguales	.540	.486	-.809	7	.445	-1.35000	1.66898	-5.29651	2.59651
	No se han asumido varianzas iguales			-.792	5.962	.459	-1.35000	1.70416	-5.52631	2.82631

Tabla Suplementaria 5. prueba de t-student para muestras independientes para la variable Altura de la Planta (cm) para los tres fondos genéticos.

**ANOVA de 2 Factores
Prueba de los Efectos Inter-Sujetos**

Variable Dependiente: Altura de la Raíz (cm)

Fuente	Suma de Cuadrados Tipo III	gl	Media Cuadrática	F	Sig.
Modelo Corregido	166.405 ^a	5	33.281	2.235	.085
Intersección	10326.106	1	10326.106	693.567	.000
Genotipo	159.692	2	79.846	5.363	.012
Tratamiento	5.898	1	5.898	.396	.535
Genotipo*Tratamiento	2.817	2	1.408	.095	.910
Error	342.433	23	14.888		
Total	11080.690	29			
Total Corregido	508.839	28			

a. R cuadrado = .327 (R cuadrado corregida = .181)

Tabla Suplementaria 6. análisis de ANOVA de dos factores de la variable Longitud de la Raíz (cm) para los tres fondos genéticos.

Análisis Descriptivo

Variable Dependiente: Altura de la Raíz (cm)

Genotipo	Tratamiento	Media	Error Tipico	N
Spr2	Control	18.8667	4.67404	6
	Micorriza	20.4000	2.07364	5
	Total	19.5636	3.64480	11
Wt	Control	21.7000	5.71839	5
	Micorriza	21.7500	3.86221	4
	Total	21.7222	4.68449	9
PS	Control	15.2500	2.06155	4
	Micorriza	16.4000	2.63154	5
	Total	15.8889	2.32886	9
Total	Control	18.8467	4.96586	15
	Micorriza	19.3571	3.52698	14
	Total	19.0931	4.26296	29

Tabla Suplementaria 7. Análisis descriptivo de la variable Longitud de Raíz (cm) para los tres fondos genéticos.

Comparación Múltiple de Medias

Variable Dependiente: Altura de la Raíz (cm)

Scheffe

(I) Genotipo	(J) Genotipo	Diferencia de Medias (I-J)	Error Tipico	Sig.	Intervalo de Confianza al 95%	
					Lim. Inf.	Lim. Sup.
Spr2	Wt	-2.1586	1.73429	.473	-6.6958	2.3786
	PS	3.6747	1.73429	.129	-.8624	8.2119
Wt	Spr2	2.1586	1.73429	.473	-2.3786	6.6958
	PS	5.8333*	1.81894	.014	1.0747	10.5920
PS	Spr2	-3.6747	1.73429	.129	-8.2119	.8624
	Wt	-5.8333*	1.81894	.014	-10.5920	-1.0747

*. La diferencia entre medias es significativa al nivel 0.05.

Tabla Suplementaria 8. comparación múltiple de medias de la variable Longitud de Raíz (cm) para los tres fondos genéticos.

Subconjuntos Homogéneos

Altura de la Raíz (cm)

Scheffe^{a,b,c}

Genotipo	N	Subconjunto	
		1	2
PS	9	15.8889	
Spr2	11	19.5636	19.5636
Wt	9		21.7222
Sig.		.137	.484

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza la media armónica del tamaño de muestra = 9.581

b. Los tamaños entre los grupos no son iguales.

Se emplea la media armónica entre los tamaños de los grupos. Los niveles del Error Tipo I no se garantizan.

c. Alfa = 0.05.

Tabla Suplementaria 9. subconjuntos homogéneos de la Prueba de Scheffé para la variable Longitud de Raíz (cm) para los tres fondos genéticos.

Prueba de T-Student para Muestras Independientes

Prueba de Levene para Igualdad de Varianzas

		F	Sig.	t	gl	Sig. (2-colas)	Diferencia de las Medias	Error Tipico	Intervalo de Confianza de la Diferencia al 95%	
									Inf.	Sup.
Altura de la Raíz Spr2 Ctl/Myc	Se han asumido varianzas iguales	1.948	.196	-.676	9	.516	-1.53333	2.26958	-6.66748	3.60081
	No se han asumido varianzas iguales			-.723	7,143	.493	-1.53333	2.12158	-6.52982	3.46316
Altura de la Raíz Wt Ctl/Myc	Se han asumido varianzas iguales	.092	.770	-.015	7	.989	-.05000	3.35937	-7.99364	7.89364
	No se han asumido varianzas iguales			-.016	6.880	.988	-.05000	3.20455	-7.65450	7.55450
Altura de la Raíz PS Ctl/Myc	Se han asumido varianzas iguales	.320	.589	-.713	7	.499	-1.15000	1.61256	-4.96310	2.66310
	No se han asumido varianzas iguales			-.735	6.999	.486	-1.15000	1.56445	-4.84943	2.54943

Tabla Suplementaria 10. prueba de t-student para muestras independientes de la variable Longitud de Raíz (cm) para los tres fondos genéticos.

ANOVA de 2 Factores
Prueba de los Efectos Inter-Sujetos

Variable Dependiente: Peso Fresco (g)

Fuente	Suma de Cuadrados Tipo III	gl	Media Cuadrática	F	Sig.
Modelo Corregido	192.076 ^a	5	38.415	4.319	.006
Intercepto	2942.289	1	2942.289	330.779	.000
Genotipo	174.561	2	87.281	9.812	.001
Tratamiento	.430	1	.430	.048	.828
Genotipo*Tratamiento	12.105	2	6.052	.680	.516
Error	204.586	23	8.895		
Total	3462.980	29			
Total Corregido	396.661	28			

a. R cuadrado = .484 (R cuadrado corregida = .372)

Tabla Suplementaria 11. análisis de ANOVA de dos factores de la variable Peso Fresco (g) de los tres fondos genéticos.

Análisis Descriptivo

Variable Dependiente: Peso Fresco (g)

Genotipo	Tratamiento	Media	Error Típico	N
Spr2	Control	12.6833	4.92033	6
	Micorriza	11.1000	2.10119	5
	Total	11.9636	3.81504	11
Wt	Control	11.2600	2.98379	5
	Micorriza	12.7750	2.52504	4
	Total	11.9333	2.73496	9
PS	Control	6.9500	.97468	4
	Micorriza	6.2800	1.43944	5
	Total	6.5778	1.23164	9
Total	Control	10.6800	4.14836	15
	Micorriza	9.8571	3.40626	14
	Total	10.2828	3.76384	29

Tabla Suplementaria 12. Análisis descriptivo de la variable Peso Fresco (g) para los tres fondos genéticos.

Comparación Múltiple de Medias

Variable Dependiente: Peso Fresco (g)
Scheffe

(I) Genotipo	(J) Genotipo	Diferencia de Medias (I-J)	Error Típico	Sig.	Intervalo de Confianza al 95%	
					Lim. Inf.	Lim. Sup.
Spr2	Wt	.0303	1.34051	1.000	-3.4767	3.5373
	PS	5.3859*	1.34051	.002	1.8789	8.8928
Wt	Spr2	-.0303	1.34051	1.000	-3.5373	3.4767
	PS	5.3556*	1.40594	.004	1.6774	9.0337
PS	Spr2	-5.3859*	1.34051	.002	-8.8928	-1.8789
	Wt	-5.3556*	1.40594	.004	-9.0337	-1.6774

*. La diferencia de las medias es significativa al nivel 0.05.

Tabla Suplementaria 13. Comparación múltiple de medias de la variable Peso Fresco (g) para los tres fondos genéticos.

Subconjuntos Homogéneos

Peso Fresco (g)

Scheffe^{a,b,c}

Genotipo	N	Subconjunto	
		1	2
PS	9	6.5778	
Wt	9		11.9333
Spr2	11		11.9636
Sig.		1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza la media armónica del tamaño de muestra = 9.581

b. Los tamaños entre los grupos no son iguales. Se emplea la media armónica entre los tamaños de los grupos. Los niveles del Error Tipo I no se garantizan.

c. Alfa = 0.05.

Tabla Suplementaria 14. Subconjuntos homogéneos de la Prueba de Scheffé para la variable Peso de Fresco (g) para los tres fondos genéticos.

ANOVA de 1 Factor

Frecuencia de Micorización

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	8972.623	2	4486.312	11.453	.000
Intra-grupos	15276.358	39	391.701		
Total	24248.981	41			

Tabla Suplementaria 15. Análisis de ANOVA de un factor para la variable Frecuencia de micorización (F%).

Análisis Descriptivo

Frecuencia de Micorización

	N	Media	Desviación Típica	Error Típico	Intervalo de Confianza para la Media al 95%			
					Lim. Inf.	Lim. Sup.	Mín.	Máx.
Spr2	15	45.0140	20.60819	5.32101	33.6016	56.4264	12.00	88.00
Wt	15	69.2947	20.94514	5.40801	57.6956	80.8937	37.50	100.00
PS	12	80.1967	17.02622	4.91505	69.3787	91.0146	56.00	100.00
Total	42	63.7379	24.31951	3.75258	56.1594	71.3163	12.00	100.00

Tabla Suplementaria 16. Análisis descriptivo de la variable Frecuencia de micorización (F%) para los tres fondos genéticos.

Comparación Múltiple de Medias

Variable dependiente: Frecuencia de Micorización
HDS de Tukey

(I) Genotipo	(J) Genotipo	Diferencia de Medias (I-J)	Error Típico	Sig.	Intervalo de Confianza al 95%	
					Lim Inf.	Lim Sup.
Spr2	Wt	-24.28067 [*]	7.22682	.005	-41.8874	-6.6739
	PS	-35.18267 [*]	7.66520	.000	-53.8574	-16.5079
Wt	Spr2	24.28067 [*]	7.22682	.005	6.6739	41.8874
	PS	-10.90200	7.66520	.340	-29.5768	7.7728
PS	Spr2	35.18267 [*]	7.66520	.000	16.5079	53.8574
	Wt	10.90200	7.66520	.340	-7.7728	29.5768

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Tabla Suplementaria 17. Comparación múltiple de medias de la variable Frecuencia de micorización (F%) para los tres fondos genéticos.

Subconjuntos Homogéneos

Frecuencia de Micorización

HDS de Tukey^{a,b}

Genotipo	N	Subconjuntos para alfa = 0.05	
		1	2
Spr2	15	45.0140	
Wt	15		69.2947
PS	12		80.1967
Sig.		1.000	.326

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Tabla Suplementaria 18. Subconjuntos homogéneos de la Prueba de Tukey para la variable Frecuencia de micorización (F%) para los tres fondos genéticos.

ANOVA de 1 Factor

Intensidad de Micorización

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	507.366	2	253.683	3.173	.053
Intra-grupos	3118.531	39	79.962		
Total	3625.897	41			

Tabla Suplementaria 19. Análisis de ANOVA de un factor de la variable Intensidad de micorización (M%).

Análisis Descriptivo

Intensidad de Micorización

	N	Media	Desviación Típica	Error Típico	Intervalo de Confianza para la Media al 95%		Mín.	Máx.
					Lim Inf.	Lim Sup.		
Spr2	15	5.3080	4.78660	1.23589	2.6573	7.9587	.12	12.88
Wt	15	12.0380	9.31951	2.40629	6.8770	17.1990	1.16	27.72
PS	12	13.0958	11.99175	3.46172	5.4766	20.7150	2.72	40.10
Total	42	9.9367	9.40407	1.45108	7.0062	12.8672	.12	40.10

Tabla Suplementaria 20. Análisis descriptivo de la variable Intensidad de micorización (M%) para los tres fondos genéticos.

ANOVA de 1 Factor

Abundancia Arbuscular

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	41.216	2	20.608	1.154	.326
Intra-grupos	696.611	39	17.862		
Total	737.826	41			

Tabla Suplementaria 21. análisis de ANOVA de un factor de la variable Abundancia arbuscular (A%).

Análisis Descriptivo

Abundancia Arbuscular

	N	Media	Desviación Típica	Error Típico	Intervalo de Confianza para la Media al 95%		Mín.	Máx.
					Lim. Inf.	Lim Sup.		
Spr2	15	2.4320	3.01462	.77837	.7626	4.1014	.03	8.38
Wt	15	4.3620	3.83042	.98901	2.2408	6.4832	.28	11.10
PS	12	4.6417	5.75223	1.66053	.9869	8.2965	.36	20.10
Total	42	3.7526	4.24214	.65458	2.4307	5.0746	.03	20.10

Tabla Suplementaria 22. Análisis descriptivo de la variable Abundancia arbuscular (A%) para los tres fondos genéticos.

Total de m/z identificados por Espectrometría de Masas											
ID	m/z	ID	m/z	ID	m/z	ID	m/z	ID	m/z	ID	m/z
1	mz_50.06	10	mz_195.0	20	mz_365.1	30	mz_578.4	40	mz_768.4	50	mz_1032.4
		1	9	1	6	1	3	1	2	1	mz_911.48
2	mz_50.21	10	mz_197.1	20	mz_367.2	30	mz_580.8	40	mz_769.3	50	mz_1034.5
		2	5	2	2	2	2	2	3	2	mz_912.59
3	mz_53.06	10	mz_198.2	20	mz_368.8	30	mz_583.3	40	mz_771.0	50	mz_1039.8
		3	mz_198.2	3	8	3	mz_583.3	3	1	3	mz_913.29
4	mz_53.27	10	mz_199.1	20	mz_371.2	30	mz_585.2	40	mz_772.9	50	mz_1041.2
		4	3	4	1	4	2	4	2	4	mz_914.05
5	mz_55.07	10	mz_200.1	20	mz_372.8	30	mz_587.1	40	mz_775.0	50	mz_1042.1
		5	mz_200.1	5	5	5	8	5	1	5	mz_914.59
6	mz_55.23	10	mz_201.1	20	mz_375.1	30	mz_589.2	40	mz_776.2	50	mz_1042.7
		6	mz_201.1	6	7	6	4	6	7	6	mz_915.68
7	mz_57.08	10	mz_203.0	20	mz_376.7	30	mz_591.2	40	mz_777.4	50	mz_1043.4
		7	7	7	3	7	4	7	2	7	mz_916.56
8	mz_59.1	10	mz_207.1	20	mz_381.1	30	mz_595.9	40	mz_778.5	50	mz_1044.6
		8	4	8	2	8	mz_595.9	8	1	8	mz_916.8
9	mz_60.12	10	mz_209.1	20	mz_383.1	30	mz_597.2	40	mz_780.5	50	mz_1046.5
		9	7	9	3	9	mz_597.2	9	1	9	mz_917.7
10	mz_61.1	11	mz_211.1	21	mz_385.2	31	mz_599.2	41	mz_782.5	51	mz_1048.4
		0	1	0	1	0	9	0	2	0	mz_919.36

11	mz_62.14	11	mz_213.1	21	mz_387.1	31	mz_601.2	41	mz_785.3	51		61	mz_1050.4
		1	3	1	6	1	4	1	4	1	mz_921.32	1	8
		11	mz_215.0	21	mz_389.1	31		41	mz_786.9	51		61	mz_1054.2
12	mz_62.3	2	7	2	7	2	mz_603.2	2	5	2	mz_923.29	2	7
		11	mz_217.0	21	mz_391.1	31	mz_605.3	41	mz_789.2	51		61	mz_1056.4
13	mz_63.92	3	9	3	3	3	4	3	3	3	mz_925.21	3	7
		11	mz_219.0	21	mz_393.1	31		41	mz_791.2	51		61	mz_1057.4
14	mz_64.08	4	7	4	7	4	mz_607.3	4	7	4	mz_926.63	4	7
		11	mz_221.0	21	mz_395.1	31	mz_608.7	41	mz_793.5	51		61	mz_1059.5
15	mz_64.22	5	8	5	2	5	7	5	1	5	mz_927.53	5	4
		11	mz_223.1	21	mz_397.2	31	mz_611.1	41	mz_794.4	51		61	
16	mz_64.74	6	2	6	8	6	5	6	8	6	mz_928.4	6	mz_1061.5
		11	mz_225.2	21	mz_399.1	31	mz_613.3	41		51		61	mz_1063.1
17	mz_65.23	7	1	7	9	7	6	7	mz_796.5	7	mz_929.5	7	4
		11	mz_227.1	21	mz_401.1	31	mz_615.2	41	mz_799.4	51		61	
18	mz_66.13	8	4	8	6	8	5	8	2	8	mz_930.97	8	mz_1063.8
		11	mz_229.1	21	mz_403.1	31	mz_617.2	41	mz_801.4	51		61	mz_1064.5
19	mz_67.11	9	8	9	1	9	7	9	7	9	mz_931.8	9	8
		12	mz_231.0	22	mz_405.1	32	mz_619.1	42	mz_802.5	52		62	mz_1065.8
20	mz_69.02	0	4	0	4	0	9	0	5	0	mz_932.2	0	3
		12	mz_233.0	22	mz_407.1	32	mz_621.1	42	mz_804.5	52		62	mz_1066.4
21	mz_69.17	1	9	1	8	1	9	1	7	1	mz_933.26	1	7
		12	mz_235.1	22		32	mz_623.1	42	mz_806.3	52		62	mz_1068.4
22	mz_70.11	2	5	2	mz_409.2	2	4	2	1	2	mz_934.91	2	8
		12	mz_236.2	22	mz_411.1	32	mz_625.0	42	mz_807.2	52		62	mz_1070.4
23	mz_70.26	3	1	3	4	3	7	3	9	3	mz_935.98	3	3
		12	mz_237.1	22	mz_413.1	32	mz_627.2	42	mz_808.6	52		62	mz_1072.4
24	mz_72.11	4	2	4	6	4	2	4	9	4	mz_936.29	4	5
		12	mz_239.1	22	mz_414.2	32	mz_629.2	42	mz_810.6	52		62	
25	mz_72.26	5	2	5	8	5	8	5	6	5	mz_937.39	5	mz_1076.3
		12		22		32	mz_631.1	42	mz_813.2	52		62	mz_1078.8
26	mz_73.08	6	mz_241.1	6	mz_416.4	6	5	6	8	6	mz_939.46	6	9
		12	mz_242.2	22	mz_419.1	32	mz_633.1	42	mz_815.4	52		62	mz_1080.9
27	mz_73.25	7	9	7	2	7	1	7	4	7	mz_940.55	7	3
		12	mz_243.1	22	mz_421.1	32	mz_636.3	42	mz_818.0	52		62	mz_1082.9
28	mz_76.76	8	1	8	5	8	7	8	7	8	mz_941.37	8	9
		12	mz_244.1	22	mz_423.1	32	mz_639.2	42	mz_820.4	52		62	mz_1087.4
29	mz_79.14	9	9	9	8	9	1	9	9	9	mz_942.14	9	6
		13	mz_245.1	23	mz_425.1	33	mz_640.1	43	mz_822.4	53		63	mz_1088.4
30	mz_80.21	0	3	0	7	0	8	0	3	0	mz_943.33	0	6
		13	mz_247.0	23	mz_427.1	33	mz_641.2	43		53		63	mz_1089.4
31	mz_80.98	1	7	1	9	1	3	1	mz_824.8	1	mz_944.42	1	2
		13	mz_249.0	23	mz_429.1	33	mz_643.2	43		53		63	
32	mz_81.15	2	7	2	8	2	9	2	mz_827	2	mz_945.59	2	mz_1090.5
		13	mz_251.1	23	mz_431.1	33	mz_645.3	43	mz_828.3	53		63	
33	mz_82.05	3	4	3	2	3	1	3	9	3	mz_946.36	3	mz_1092.5
		13	mz_253.0	23	mz_432.9	33	mz_647.2	43	mz_829.3	53		63	mz_1095.7
34	mz_84.15	4	3	4	8	4	6	4	7	4	mz_947.29	4	3
		13	mz_255.1	23	mz_435.1	33	mz_649.2	43	mz_830.2	53		63	mz_1098.9
35	mz_84.94	5	1	5	7	5	5	5	3	5	mz_949.16	5	4
		13	mz_256.0	23		33	mz_651.2	43	mz_830.5	53		63	mz_1101.1
36	mz_85.15	6	7	6	mz_437.2	6	4	6	7	6	mz_950.02	6	5
		13	mz_257.1	23	mz_439.1	33	mz_652.2	43	mz_831.4	53		63	mz_1103.7
37	mz_86.15	7	4	7	7	7	1	7	5	7	mz_950.57	7	9
		13	mz_259.1	23	mz_441.1	33	mz_653.4	43	mz_833.3	53		63	mz_1105.9
38	mz_87.12	8	1	8	8	8	5	8	8	8	mz_951.44	8	6
		13	mz_261.0	23	mz_443.1	33	mz_655.1	43	mz_834.6	53		63	mz_1108.7
39	mz_89.08	9	5	9	5	9	5	9	8	9	mz_953.43	9	7
		14	mz_263.0	24	mz_445.1	34	mz_657.1	44	mz_836.6	54		64	mz_1110.4
40	mz_90.21	0	7	0	4	0	9	0	3	0	mz_955.51	0	1
		14	mz_265.0	24	mz_447.1	34		44	mz_838.3	54		64	mz_1112.5
41	mz_90.97	1	8	1	5	1	mz_659.2	1	4	1	mz_957.66	1	3
		14	mz_266.1	24	mz_449.1	34	mz_661.2	44	mz_839.2	54		64	mz_1114.9
42	mz_91.16	2	7	2	3	2	5	2	7	2	mz_958.33	2	4
		14	mz_267.2	24	mz_451.1	34	mz_663.2	44	mz_841.1	54		64	mz_1116.3
43	mz_93.14	3	9	3	4	3	2	3	5	3	mz_958.78	3	2
		14	mz_269.0	24	mz_453.2	34		44	mz_843.1	54		64	mz_1117.4
44	mz_95.11	4	1	4	1	4	mz_665.2	4	9	4	mz_959.63	4	9
		14	mz_270.1	24	mz_455.1	34	mz_667.1	44	mz_844.2	54		64	mz_1118.9
45	mz_97.13	5	8	5	7	5	7	5	9	5	mz_961.37	5	5

46	mz_101.1	14	mz_271.0	24	mz_457.1	34	mz_669.1	44	mz_845.2	54		64	mz_1121.0
	2	6	4	6	7	6	9	6	9	6	mz_962.35	6	1
	mz_104.2	14	mz_273.1	24	mz_459.1	34	mz_671.1	44		54		64	mz_1123.2
47	1	7	1	7	6	7	9	7	mz_847.2	7	mz_963.44	7	3
	mz_109.1	14	mz_274.6	24	mz_461.1	34	mz_673.2	44	mz_849.2	54		64	mz_1125.8
48	6	8	2	8	8	8	3	8	5	8	mz_964.49	8	1
	mz_110.1	14		24	mz_463.1	34	mz_675.2	44	mz_851.0	54		64	mz_1128.9
49	3	9	mz_277.1	9	5	9	7	9	9	9	mz_965.28	9	2
	mz_113.1	15	mz_279.1	25	mz_465.1	35	mz_677.2	45	mz_852.8	55		65	mz_1130.4
50	3	0	3	0	9	0	4	0	1	0	mz_966.24	0	3
	mz_115.0	15	mz_281.1	25	mz_467.1	35		45		55		65	mz_1131.4
51	6	1	4	1	7	1	mz_679.2	1	mz_855.2	1	mz_966.85	1	7
	mz_116.1	15	mz_282.2	25	mz_469.1	35	mz_681.2	45	mz_857.2	55		65	mz_1132.5
52	5	2	1	2	9	2	4	2	5	2	mz_967.63	2	2
	mz_118.1	15	mz_283.0	25	mz_471.1	35	mz_683.3	45	mz_858.4	55		65	mz_1134.4
53	2	3	8	3	3	3	4	3	5	3	mz_969.54	3	6
	mz_119.1	15	mz_284.2	25	mz_472.9	35	mz_685.1	45	mz_859.4	55		65	
54	3	4	5	4	5	4	9	4	9	4	mz_971.46	4	mz_1139.5
	mz_121.1	15	mz_286.1	25	mz_474.6	35	mz_687.2	45	mz_861.3	55		65	mz_1144.9
55	2	5	3	5	9	5	5	5	4	5	mz_973.14	5	2
	mz_123.0	15	mz_287.0	25		35	mz_689.2	45	mz_863.1	55		65	mz_1147.1
56	5	6	7	6	mz_477.2	6	2	6	6	6	mz_974.53	6	6
	mz_125.0	15	mz_288.2	25	mz_479.1	35	mz_691.1	45	mz_865.1	55		65	
57	6	7	2	7	6	7	8	7	6	7	mz_975.45	7	mz_1151.4
	mz_127.0	15	mz_289.0	25		35	mz_693.2	45		55		65	mz_1157.7
58	6	8	9	8	mz_481.2	8	9	8	mz_865.9	8	mz_977.49	8	8
	mz_129.0	15	mz_291.0	25	mz_483.1	35	mz_695.3	45	mz_866.3	55		65	mz_1160.0
59	6	9	7	9	8	9	2	9	7	9	mz_979.5	9	5
	mz_130.0	16	mz_293.1	26	mz_485.1	36	mz_697.3	46	mz_866.8	56		66	mz_1161.6
60	6	0	3	0	7	0	6	0	7	0	mz_980.61	0	6
	mz_131.0	16	mz_295.1	26	mz_487.1	36	mz_699.2	46		56		66	mz_1166.6
61	7	1	4	1	9	1	7	1	mz_867.2	1	mz_981.49	1	2
	mz_133.0	16	mz_299.0	26	mz_489.2	36	mz_701.2	46	mz_867.5	56		66	mz_1168.6
62	5	2	8	2	1	2	8	2	1	2	mz_982.36	2	3
		16	mz_301.1	26	mz_490.2	36	mz_703.1	46	mz_868.5	56		66	mz_1171.7
63	mz_136.1	3	8	3	7	3	3	3	9	3	mz_983.46	3	5
	mz_138.0	16	mz_303.2	26	mz_491.2	36	mz_705.2	46	mz_869.5	56		66	
64	9	4	4	4	4	4	5	4	7	4	mz_984.39	4	mz_1175.4
	mz_140.0	16	mz_305.1	26		36	mz_707.1	46	mz_871.1	56		66	mz_1179.1
65	9	5	6	5	mz_493.2	5	6	5	2	5	mz_985.3	5	3
	mz_142.1	16	mz_307.1	26		36	mz_709.2	46	mz_872.5	56		66	mz_1182.6
66	3	6	9	6	mz_495.2	6	5	6	7	6	mz_986.29	6	5
	mz_145.0	16	mz_309.1	26	mz_497.2	36	mz_711.2	46	mz_873.3	56		66	mz_1187.8
67	6	7	6	7	3	7	6	7	3	7	mz_987.4	7	2
	mz_147.0	16	mz_311.1	26	mz_499.1	36	mz_713.2	46	mz_873.7	56		66	mz_1194.0
68	9	8	9	8	5	8	2	8	5	8	mz_988.49	8	2
		16	mz_312.7	26	mz_501.1	36	mz_714.9	46	mz_874.2	56		66	mz_1201.6
69	mz_150.1	9	1	9	8	9	5	9	1	9	mz_989.53	9	8
	mz_151.0	17		27	mz_503.1	37		47		57		67	mz_1207.0
70	7	0	mz_314.2	0	7	0	mz_717.2	0	mz_875.3	0	mz_991.27	0	2
	mz_152.0	17	mz_315.1	27		37	mz_718.9	47	mz_876.2	57		67	mz_1244.2
71	9	1	2	1	mz_505.2	1	9	1	2	1	mz_993.18	1	7
	mz_153.0	17	mz_316.3	27	mz_507.2	37	mz_721.2	47	mz_877.2	57		67	
72	3	2	6	2	1	2	1	2	5	2	mz_994.06	2	mz_1249.6
	mz_154.1	17	mz_317.1	27	mz_509.1	37	mz_723.1	47	mz_879.0	57		67	mz_1277.4
73	1	3	9	3	6	3	7	3	8	3	mz_995.31	3	8
	mz_155.0	17	mz_319.2	27	mz_511.2	37	mz_725.1	47		57			
74	6	4	3	4	1	4	9	4	mz_880.1	4	mz_996.56	4	
	mz_156.1	17	mz_320.2	27	mz_513.2	37	mz_727.1	47		57			
75	2	5	6	5	2	5	2	5	mz_881.3	5	mz_997.48	5	
	mz_157.0	17	mz_321.2	27		37	mz_729.3	47	mz_882.2	57			
76	5	6	1	6	mz_515.2	6	4	6	3	6	mz_998.35	6	
	mz_159.0	17	mz_322.1	27	mz_517.1	37	mz_731.2	47	mz_883.3	57			
77	7	7	2	7	9	7	9	7	9	7	mz_999.33	7	
	mz_160.1	17	mz_323.1	27	mz_518.8	37	mz_733.2	47	mz_885.3	57	mz_1001.3	5	
78	2	8	6	8	2	8	3	8	2	8		5	
	mz_161.0	17	mz_325.1	27	mz_520.3	37	mz_734.8	47	mz_886.2	57	mz_1003.1	4	
79	9	9	6	9	5	9	5	9	1	9		4	
		18	mz_327.1	28	mz_521.2	38	mz_737.1	48	mz_887.1	58	mz_1004.3	9	
80	mz_163.1	0	7	0	6	0	2	0	9	0		9	

81	mz_165.0	18	mz_329.1	28	mz_523.2	38	mz_737.7	48	mz_888.4	58	mz_1005.4
	6	1	6	1	4	1	5	1	4	1	7
	mz_166.1	18	mz_330.2	28	mz_525.0	38	mz_739.3	48	mz_888.7	58	mz_1007.1
82	2	2	4	2	9	2	5	2	4	2	4
	mz_169.0	18	mz_331.1	28	mz_528.8	38	mz_740.3	48	mz_889.6	58	mz_1008.5
83	8	3	7	3	9	3	8	3	3	3	3
	mz_170.0	18	mz_333.2	28	mz_533.2	38	mz_741.3	48	mz_891.0	58	mz_1009.7
84	3	4	1	4	2	4	8	4	6	4	8
	mz_171.1	18	mz_335.2	28		38	mz_743.1	48	mz_891.9	58	mz_1011.4
85	3	5	1	5	mz_536.9	5	9	5	5	5	2
	mz_173.1	18	mz_337.1	28	mz_541.2	38	mz_745.1	48	mz_892.3	58	mz_1012.5
86	2	6	3	6	5	6	8	6	3	6	8
	mz_174.1	18	mz_339.1	28	mz_544.9	38	mz_747.2	48	mz_893.4	58	mz_1013.4
87	5	7	6	7	3	7	3	7	5	7	3
	mz_175.1	18	mz_341.1	28	mz_549.0	38	mz_748.4	48	mz_894.8	58	mz_1014.1
88	3	8	9	8	8	8	5	8	3	8	7
	mz_176.1	18	mz_343.2	28	mz_552.0	38	mz_749.2	48	mz_896.0	58	mz_1015.2
89	2	9	1	9	9	9	1	9	6	9	1
	mz_177.1	19	mz_345.1	29	mz_555.2	39	mz_750.9	49		59	mz_1017.1
90	0	8	0	7	0	1	0	mz_897.1	0	0	3
	mz_177.9	19	mz_347.1	29	mz_557.9	39		49	59	mz_1018.3	
91	3	1	7	1	9	1	mz_752.5	1	mz_897.9	1	5
	mz_179.1	19	mz_349.1	29	mz_560.0	39	mz_754.9	49	59	mz_1019.2	
92	2	7	2	2	2	7	2	mz_898.4	2	7	7
	mz_180.1	19	mz_351.2	29	mz_561.3	39	mz_756.5	49	mz_899.2	59	mz_1020.4
93	3	3	3	3	1	3	1	3	5	3	2
	mz_183.1	19	mz_353.1	29	mz_563.1	39	mz_758.5	49	mz_901.1	59	mz_1021.2
94	2	4	2	4	5	4	7	4	8	4	9
	mz_184.9	19	mz_354.1	29	mz_565.9	39	mz_761.2	49	mz_902.7	59	mz_1023.4
95	2	5	5	5	1	5	6	5	1	5	3
	mz_187.1	19	mz_358.3	29	mz_569.2	39	mz_763.2	49	mz_905.2	59	
96	5	6	7	6	7	6	4	6	5	6	mz_1025.2
	mz_189.1	19	mz_360.3	29		39	mz_764.2	49	mz_906.4	59	mz_1027.1
97	7	3	7	mz_571.2	7	4	7	4	7	2	
	mz_191.1	19	mz_361.1	29	mz_573.3	39	mz_765.1	49	mz_907.4	59	mz_1028.6
98	8	5	8	6	8	9	8	5	8	3	
	mz_192.1	19	mz_362.1	29	mz_575.1	39	mz_766.2	49	mz_909.2	59	mz_1029.3
99	8	9	3	9	8	9	5	9	7	9	8
10	20	30	mz_576.3	40	mz_767.2	50	60	mz_1030.5			
0	mz_192.9	0	mz_363.2	0	7	0	5	0	mz_910.5	0	1

Tabla Suplementaria 23. Listado de m/z detectados por espectrometría de masas.

	Varianza media	Desv. Est. de la Varianza	Coefficiente de Variación medio	Desv. Est. del Coeficiente de Variación
Datos Originales	0.0138	0.0840	0.0033	0.0242
Normalización por Línea Base	0.0132	0.0842	0.0030	0.0240
Normalización por Interpolación Cúbica	0.0147	0.1102	0.0038	0.0355
Normalización por Cociente Probabilístico	0.0133	0.0843	0.0033	0.0242
Normalización de Cyclic-Loess	0.0117	0.0693	0.0025	0.0190
Normalización por Cuantiles	0.0119	0.0675	0.0025	0.0197

Tabla Suplementaria 234. Evaluación de los distintos métodos de normalización implementados para los datos de intensidad del conjunto de m/z.

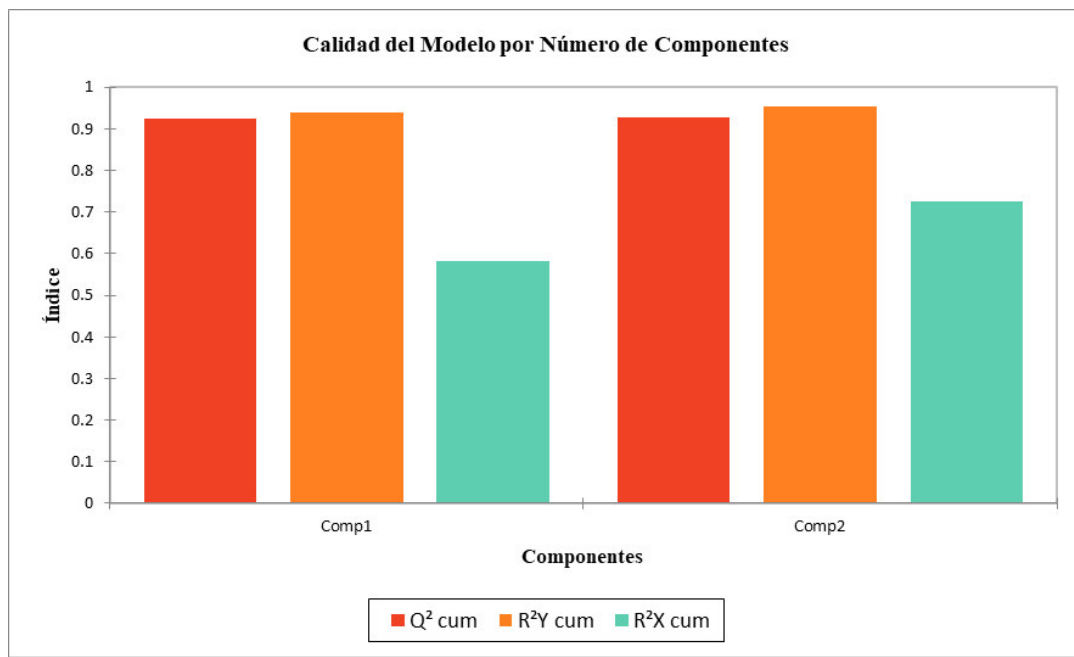


Figura Suplementaria 1. Gráfico de calidad del modelo de PLS-DA para los 15 valores de m/z con mayor influencia sobre el PC1.

RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Nicole Dabdoub González

Candidata para el Grado de

Maestra en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: ANÁLISIS DE METABOLITOS EN PLANTAS DE TOMATE ALTERADOS EN LA RUTA DEL ÁCIDO JASMÓNICO DURANTE LA SIMBIOSIS MICORRÍZICA CON *Rhizophagus irregularis*

Campo de Estudio: Biotecnología material, biomateriales y bioprocesos.

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León, México, el día 08 de Abril de 1992, hija de Juan Dabdoub Giacoman y María de los Ángeles González Garza.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Biólogo en 2016, segundo lugar de la generación.

Experiencia Profesional: Prácticas profesionales en Griffith Laboratories ® durante el periodo primavera-verano del 2015. Tutor de matemáticas y cálculo diferencial en la Facultad de Ciencias Biológicas durante el periodo de estudio de la carrera. Asistente del Laboratorio de Biología Molecular y Ecología de la Facultad de Ciencias Biológicas durante el 2015-2016.