

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



IDENTIFICACION DE HONGOS MICORRÍDICOS ARBUSCULARES NATIVOS Y
SU EFECTO EN ESPECIES HORTICOLAS BAJO INVERNADERO

Tesis

Que presenta FLOR SILVESTRE HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ
como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN AGRICULTURA PROTEGIDA

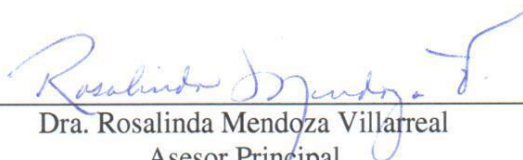
Saltillo, Coahuila

Junio 2019

IDENTIFICACION DE HONGOS MICORRÍMICOS ARBUSCULARES NATIVOS Y
SU EFECTO EN ESPECIES HORTICOLAS BAJO INVERNADERO

Tesis

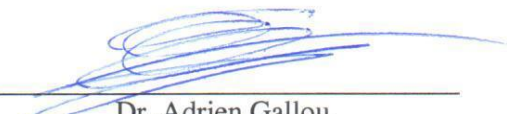
Elaborada por FLOR SILVESTRE HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ como requisito
parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Agricultura Protegida con la
supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Asesor Principal


Dr. Valentín Robledo Torres
Asesor


Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Asesor


Dr. Antonio Cárdenas Flores
Asesor


Dr. Adrien Gallou
Asesor


Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente
Subdirector de Postgrado
UAAAN

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

Al Dr. **Miguel Ángel Pérez Rodríguez** por sus consejos y asesoría durante la realización del proyecto.

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

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

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

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

DEDICATORIA

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

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

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

A mi hijo **Ángel Damián Hernández Hernández** que ha pesar de su corta edad me ha dado lecciones de fortaleza y valentía, siendo él, mi principal fortaleza para seguir adelante en la vida y a nivel profesional.

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

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA	iv
CARTA DE ACEPTACIÓN DE ARTÍCULOS.....	vi
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Micorrizas	3
Estructuras de las micorrizas arbusculares.....	4
Etapas en el establecimiento de las micorrizas	6
Taxonomía HMA.....	7
Clasificación taxonómica de los HMA (Morton & Redecker, 2001)	8
Ecofisiología de los hongos MA.....	11
Distribución espacial de los hongos formadores de micorrizas arbusculares	11
Relación HFMA – hospedero	12
Señales de reconocimiento en la fase asimbiótica	13
Señales de reconocimiento en la Fase Simbiótica	15
Respuestas de la planta (Respuestas de defensa)	17
Atenuación de los mecanismos de defensa	18
Ventajas de las micorrizas en los agroecosistemas	20
Factores que afectan la colonización de micorrizas en campo	22
Poblaciones de HMA en ecosistemas naturales	23
Métodos de estudio de diversidad de HMA.....	25
Article 1	27
Artículo 2.....	41
CONCLUSIONES	63
REFERENCIAS.....	64

CARTA DE ACEPTACIÓN DE ARTÍCULOS

[Agronomy] Manuscript ID: agronomy-452497 - Article Processing Charge Confirmation

Received: 8 February 2019

E-mails: florsilvestre1988@hotmail.com, rosalindamendoza@hotmail.com,
robledo3031@gmail.com, gallou.adrien@hotmail.fr

Submitted to section: Soil and Plant Nutrition,

[http://www.mdpi.com/journal/agronomy/sections/Soil Plant Nutrition](http://www.mdpi.com/journal/agronomy/sections/Soil_Plant_Nutrition)

Symbiotic Associations of Plants with Beneficial Microbes: Perspectives and
Challenges for Agronomical Applications

http://www.mdpi.com/journal/agronomy/special_issues/symbiotic_microbes_agronomical

We confirm that, if accepted for publication, the following Article
Processing Charges (APC) will apply to your article:

Journal APC: 1000 CHF

Total APC: 1000 CHF

Please note that you may be entitled to a discount if you have previously
received a discount code or if your institute is participating in the MDPI
Institutional Open Access Program (IOAP), for more information see
<http://www.mdpi.com/about/ioap>.

Please note that reviewer vouchers must be applied before acceptance for
publication. Vouchers can no longer be applied once an APC invoice has been
issued. If you have been granted any discounts that are not displayed here,
please contact the Agronomy editorial office as soon as possible.

Please confirm that you support open access publishing, which allows
unlimited access to your published paper and that you will pay the Article
Processing Charge if your manuscript is accepted.

We would be grateful if you could reply to us as soon as possible.

Kind regards,

Shelly Sun

Assistant editor

E-mail: shelly.sun@mdpi.com

De: Dr. Efraín de la Cruz Lázaro <editorera1@ujat.mx>
Enviado: jueves, 6 de junio de 2019 11:22 a. m.
Para: rosalindamendoza@hotmail.com
Asunto: [ERA] Submission Acknowledgement

Dra. Rosalinda Mendoza-Villarreal:

Thank you for submitting the manuscript, "AISLAMIENTO E INOCULACIÓN DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NATIVOS EN CUCURBITACEAE Y SOLANACEAE EN INVERNADERO" to Ecosistemas y Recursos Agropecuarios. With the online journal management system that we are using, you will be able to track its progress through the editorial process by logging in to the journal web site:

Manuscript URL: <http://148.236.18.64/index.php/rera/author/submission/2326>
Username: rmendoza

If you have any questions, please contact me. Thank you for considering this journal as a venue for your work.

Dr. Efraín de la Cruz Lázaro
Ecosistemas y Recursos Agropecuarios

Ecosistemas y Recursos Agropecuarios
<http://era.ujat.mx>

Email secured by Check Point

INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) son bioestimulantes naturales que en asociación simbiótica ayudan a mejorar la eficiencia nutricional, tolerancia a estrés tanto biótico como abiótico, mejorando así la calidad de las plantas (Lucini et al., 2019). Múltiples investigaciones reportan que los HMA son altamente eficientes en el crecimiento de las plantas, sin embargo, esto puede variar ampliamente provocando en algunos eventos depresiones de crecimiento micorrícico por las cuales las plantas acumulan menos biomasa que una planta control no micorrizada (Watts et al., 2019). Por lo tanto, es necesario tener conocimiento del funcionamiento de los HMA así como la interacción planta-hongo para comprender los factores que influyen en su respuesta, por ejemplo, maíz (*Zea mays*), el puerro (*Allium porrum*) y Medicago (*Medicago truncatula*) muestran respuestas de crecimiento positiva cuando establecen simbiosis con HMA, particularmente en condiciones deficientes de nutrientes del suelo (Plenchette et al., 1983). Sin embargo, existen reportes que especies de trigo (*Triticum aestivum*) y cebada (*Hordeum vulgare*) no responden o incluso hay respuesta negativa a la inoculación de HMA (Zhu et al., 2003, Watts et al., 2019).

En México, la mayor parte de la investigación acerca de las asociaciones de HMA se ha realizado en el campo agrícola y están enfocados a la respuesta de las plantas a la asociación simbiótica, dejando de lado el origen y la identidad como parte del estudio (Varela y Trejo, 2001). El uso de herramientas moleculares revela la alta diversidad de hongos que forman micorrizas, lo que ha permitido una clasificación de estas asociaciones (Beck et al., 2007) mismo que permite conocer el verdadero efecto que ejerza cada especie micorrícica.

La respuesta de la interacción hongo- planta es impresionantemente variable entre genotipos de la misma especie de planta y entre especies o aislados de HMA (Watts et al., 2019). Existen reportes que un alto porcentaje de hortalizas establecen simbiosis (Baum et al., 2015), sin embargo, la mayoría de los estudios realizados están enfocados a la respuesta en campo abierto (Ávila et al., 2015) pero hacen falta estudios bajo condiciones de invernadero y sustrato (Nelson y Nelson, 2015; Oseni et al., 2010; Carpio et al., 2005). Cultivos vegetales como Amaryllidaceae (Cebolla, puerro), Apiaceae

(Zanahoria), Asteraceae (Lechuga), Cucurbitaceae (pepino), Fabaceae (Frijol y guisante) y Solanaceae (tomate y pimiento) se han reportado con alta dependencia micorrícica (Baum et al., 2015), por lo tanto, la inoculación de hortalizas con HMA puede ser rentable y existen productos de inoculación comercial disponible, no obstante, el efecto que ejerza bajo condiciones de invernadero se verán influenciadas por la cepa de HMA, la especie de la planta, así como las condiciones de crecimiento (Corkidiet al., 2004) y es importante señalar que los HMA de origen comercial pueden estar en desventaja por la competitividad con los microorganismos del suelo, por lo que se recomienda utilizar cepas nativas (Caldera et al., 2013).

De acuerdo con lo citado anteriormente nos indica la necesidad de identificar y desarrollar bioinoculantes de HMA nativos en base a las necesidades del hongo como de la planta, por lo tanto, la presente investigación tiene como objetivo identificar a nivel molecular un aislado de origen nativo e inocularlo en plantas de pepino, melón y tomate bajo condiciones de invernadero y estudiar el efecto que ejercen a nivel agronómico.

REVISIÓN DE LITERATURA

Micorrizas

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

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

La mayoría de los cultivos hortícolas tienen la capacidad de establecer simbiosis con HMA, aumentando la productividad mediante la promoción de crecimiento, mejora la absorción y traslocación de nutrientes minerales, reducen estrés biótico y abiótico, mejora el suelo y son efectivos para tolerar sequía, estrés salino y sobre todo aumentar la calidad química de los vegetales (Santander et al., 2019 y Haghighi et al., 2016).

Se ha reportado que plantas de la familia Amaryllidaceae (cebolla y puerro), Apiaceae (zanahoria), Asteraceae (lechuga), Cucurbitaceae (pepino), Fabaceae (frijol) y Solanaceae (tomate y pimiento) presentan alta dependencia de la colonización micorrícica (Martínez et al., 2009). Inoculaciones realizadas en cebolla de 1 a 7 especies de HMA en varias combinaciones bajo invernadero en suelo deficiente en fósforo demostraron un aumento en el peso seco del brote, pero reducción en la concentración de potasio y azufre; las especies de Glomeraceae tuvieron mayor impacto en el crecimiento y absorción de nutrientes mientras que Acaulospora y Racocetra no tuvieron un impacto significativo, mencionan que los resultados pueden variar de acuerdo a las condiciones experimentales (Vani et al., 2018). En pepino se ha estudiado el efecto de la densidad de inóculo de micorrizas, aplicando M1 (planta sin micorriza), M2 y M3 (inoculaciones con 1000 y 2000 esporas) y agua salina (control, 50, 75 y 100 mM de NaCl); los resultados mostraron que con la inoculación de micorrizas con 2000 esporas incrementa el peso de frutas frescas

y secas, y el volumen de la raíz con la inoculación de 2000 esporas en condiciones sin estrés. Los pesos frescos y secos aumentaron con la inoculación de 1000 esporas en todos los niveles de agua salina (Koyama et al.,2017). Así mismo en plantas de melón se evaluaron 4 interacciones de HMA (*Glomus intraradices*, *Glomus mosseae*, *Glomus claroideum* y *Glomus constrictum*) más *Trichoderma harzianum* para observar sus efectos sobre el crecimiento de las plantas y el control biológico del marchitamiento por *Fusarium* en vivero y los resultados arrojaron que la colonización de HMA disminuyó el peso fresco de la planta en comparación de *T. harzianum*. La inoculación doble disminuyó el peso fresco en comparación con las plantas inoculadas con HMA, a excepción de *G. intraradices*. El nivel de colonización de HMA varió y se incrementó con *T. harzianum*, excepto en las plantas inoculadas con *G. mosseae*. Se encontraron efectos negativos del HMA en las unidades formadoras de colonias de *T. harzianum*, excepto con *G. intraradices*. El HMA solo fue menos efectiva que *T. harzianum* para suprimir el desarrollo de la enfermedad. La inoculación combinada dio como resultado un efecto sinérgico general sobre el control de la enfermedad (Rúa et al., 2016). De igual forma, plantas de tomate de la variedad PKM-1, Gaurav y Monarca se inocularon con *Glomus fasciculatum* para evaluar la simbiosis sobre la colonización de la raíz y el crecimiento de la planta. Los tres cultivares de tomate mostraron una respuesta positiva a la inoculación, el porcentaje de colonización varió de 26.4 a 36.0% en 30 días y de 40.2 a 47.0% en plantas de 60 días. El mayor porcentaje de colonización se presentó en PKM-1 (47.0%) y mínimo 40.2% en el cultivar Monarca. La simbiosis provocó un aumento significativo en la altura de la planta, el brote y las raíces frescas y sus pesos secos. El contenido de N, P y K de la planta aumentó significativamente (Lumini et al., 2010).

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

Estructuras de las micorrizas arbusculares

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

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

Arbúsculos: los HMA al ponerse en contacto con la raíz forman una estructura sobre las células epidérmicas vegetales conocida como “apresorio” y a partir de este cuerpo se producen las hifas que son filamentos tubulares, que penetran la epidermis radicular hasta llegar a la endodermis sin atravesarla, allí comienza su ramificación para formar los arbúsculos, que tienen un tamaño comparable al de las mitocondrias y su vida aproximada es de 1 a 3 semanas, después de lo cual se colapsa y parte de él se reabsorbe hacia el citoplasma hifal y el resto de componentes permanecen en la célula hospedera, rodeados por el plasmalema (Escobar, 1998).

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

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

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

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

Micelio externo o extramático: componente importante en la simbiosis, formado por las hifas principales, gruesos y ramificados dicotómicamente, así como por hifas también ramificadas, siendo las encargadas de la absorción del fósforo y otros nutrientes de lugares donde las raíces no pueden acceder por sí mismas. Pero cuando el sustrato se agota el citoplasma de las hifas finas se retrae hacia la hifa principal donde se forman septos. Este fenómeno puede ser un indicador de deficiente aireación y/o agotamiento de nutrientes del suelo, entre otros (Escobar, 1998).

Esporas: se forman sobre el micelio extramático y son órganos de conservación sexual o asexual de las MVA. Formadas en el extremo o no de una hifa, con características propias que constituyen la única estructura externa que puede permitir el reconocimiento morfológico de las especies de las Micorrizas Vesícula Arbúscular. Las esporas se dividen en dos grupos: las Clamidosporas que son células especializadas formadas de manera asexual y que agrupa a los géneros *Glomus* y *Sclerocystis*. Y las azigosporas que son esporas formadas sexualmente y que agrupa a los tres géneros: *Gigaspora Acaulospora* y *Entrophospora* (Escobar, 1998).

Etapas en el establecimiento de las micorrizas

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

En el proceso de la formación de la simbiosis se pueden distinguir diferentes fases: precolonización, penetración inicial del hongo, colonización extraradical y desarrollo del micelio externo y de las estructuras reproductivas. Aparentemente los modelos de penetración y colonización del hongo son independientes no solo del hospedero si no también del tejido a colonizar (Sánchez, 1999).

Primera etapa o de precolonización

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

Segunda etapa o de colonización y distribución

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

Tercera etapa o de estabilización o efectividad

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

Cuarta etapa o de reproducción

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

Taxonomía HMA

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

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

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

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

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

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

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

Fisiología de la simbiosis

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

(Sachar – Hill et al. 1995), con menor capacidad osmótica, y también a lípidos de reserva (triacilglicéridos) (Bécard et al.1991).

No obstante, lo anterior, se ha puesto de manifiesto la existencia de una dualidad fisiológica entre las hifas interna (intrarradicales) y externas del hongo MA, presentando las primeras una significativa capacidad de metabolizar glucosa (y un poco menos fructosa) e incapaces de utilizar otros compuestos carbonados. Por su parte, las hifas del micelio externo son incapaces de metabolizar glucosa y fructosa, pero por gluconeogénesis son capaces de metabolizar compuestos lipídicos, formados en el micelio intrarradical, y desde allí transportados al micelio extrarradical (Bago et al. 2002).

La importancia de las micorrizas en la nutrición mineral de las plantas es, sin duda, uno de los aspectos mas estudiados de la simbiosis por su repercusión en el desarrollo vegetal. La mejora nutricional que ocasiona a la planta el establecimiento de la simbiosis se podría deber a varias causas, como son: i) el aumento del volumen de suelo explorado, al actuar las hifas del hongo como un sistema radical complementario altamente efectivo; esto se verifica sobre todo en nutrientes que difunden con dificultad en la solución del suelo (Barea 2000); ii) una mayor competitividad de las hifas del hongo con respecto a otros microorganismos del suelo que la presentada por las propias raíces (Linderman 1992); iii) una mayor especificidad de los transportadores del hongo respecto de los de la planta (Cress et al. 1979); iv) la posibilidad de absorber fuentes de nutrientes minerales o disponibles a la propia planta (Clark y Zeto 2000).

Entre los nutrientes cuya absorción favorece la formación de micorrizas, el P es uno de los mas importantes, por tratarse de una macronutriente, y ademas por que entre un 95 y un 99 % del fosforo presente en el suelo se encuentra de forma no disponible para la planta (Bieleski, 1973). En general, la micorriza permite una mayor absorción de P por las plantas (Jia et al., 2004), llegando en algunas especies hacer responsables del 100% de la absorción de P (Smith et al. 2004).

Respecto a los mecanismos implicados en la absorción, transporte y transferencia de P por las hifas del hongo en la planta, se puede señalar que la absorción de P como ión ortofosfato es un proceso rápido y eficiente. Esto debido a la existencia de transportadores de $H_2PO_4^-$ de alta afinidad en las hifas del hongo (Maldonado- Mendoza et al., 2001), aunque operan asociados a un simporte de H^+ creado por distintas H^+ - ATPasas (Requena

et al., 2003). El H_2PO_4^- absorbido es rápidamente transformado en polifosfato en el micelio extrarradical (Ezawa et al., 2004). Los polifosfatos se acumulan fundamentalmente a nivel de las vacuolas (Rasmussen et al, 2000), y en ellas son transportados hasta el micelio intrarradical mediante corrientes citoplasmáticas (Olsson et al., 2002). Ya en el micelio intrarradical, el polifosfato es hidrolizado por diversas fosfatasas alcalinas (Aono et al., 2004). El paso del H_2PO_4^- liberado hacia la matriz interfacial todavía no se ha descrito, aunque probablemente ocurre de forma pasiva, a favor de un gradiente de concentración. Si se ha descrito la existencia de varios transportadores de H_2PO_4^- , que se expresan específicamente en células colonizadas por arbusculos (Harrison et al., 2002), y que son responsables de la entrada de P en la célula hospedera.

Las hifas de los MA presentan además la capacidad de absorber tanto NO_3^- como NH_4^+ del suelo (Hawkins y George 2001), y se ha estudiado la posibilidad de que pueden también absorber cantidades importantes de N orgánico (Hawkins et al., 2000). Recientemente se ha descrito la existencia de un transportador de alta afinidad por NH_4^+ expresado en las hifas extrarradicales de *Glomus intrarradices* (López- Pedroza et al, 2006). Es probable que exista un sistema GS/GOGAT para la asimilación de N inorgánico por parte de hifas de micorrizas arbusculares además de una actividad Nitrato Reductasa (Bago et al, 2001).

Por otra parte, plantas micorrizadas en sistemas bicompartimentados, suplementadas con ^{15}N - Gly como única fuente de N en el compartimiento de desarrollo exclusivo de hifas extrarradicales del hongo MA, alcanzaron hasta los 150 nmol de ^{15}N por gramo de raíz, lo que demostraría la capacidad del micelio extrarradical de hongos MA de transportar el N como aminoácidos (Hawkins y George, 2000). Existen además evidencias de que el ciclo de la urea estaría implicado en la formación de arginina en las hifas extrarradicales, la cual asociada a polifosfatos en las vacuolas sería el medio de transporte de N desde la zona extrarradical hacia las hifas intrarradicales, habiéndose encontrado altas concentraciones de arginina especialmente en el sistema vacuolar (Govindarajulu et al., 2005). Se debe considerar separadamente las partes sintética (en el micelio extrarradical) y degradativa liberándose la arginina junto con los iones fosfato por hidrólisis de los polifosfatos en el micelio intrarradical, siendo poco probable la salida desde las hifas del

hongo a la matriz interfacial, ya que con ello representaría una importante pérdida de C para el hongo, se ha demostrado la ausencia de un flujo carbonado desde el hongo a la planta (Fitter et al., 1998). La probable vía de degradación de la arginina sería a la ornitina, urea y, finalmente a NH_4^+ , hipótesis que esta reforzada por el hecho de que se ha encontrado ornitina en cantidades importantes en las estructuras del hongo y actividad ureasa en las hifas (Bago et al., 2001).

Ecofisiología de los hongos MA

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

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

Distribución espacial de los hongos formadores de micorrizas arbusculares

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

Opik y colaboradores (2006) observaron que las comunidades de HMA difieren entre ecosistemas y que la diversidad de taxones disminuye del bosque tropical al pastizal, al

bosque templado y a los ecosistemas degradados. Estos datos a gran escala sirven para conocer su distribución a nivel global; sin embargo, si el objetivo es estudiar como afecta la distribución a las interacciones entre las comunidades de HMA y plantas es necesario reducir la escala de estudio.

En los últimos años han aumentado las investigaciones que buscan definir los factores abióticos y bióticos que condicionan la estructura espacial de las comunidades de HMA. Se ha demostrado que factores abióticos como la humedad (Wolfe et al., 2006), la estructura (Lekberg et al., 2007) y composición química del suelo (Fitzsimons et al., 2008) se correlacionan con la distribución espacial de las comunidades de HMA. Sorprendentemente, los últimos estudios parecen indicar que es el nivel de N y no el de P el que más influye en la distribución de las HMA (Fitzsimons et al., 2008), mientras que cabría pensar que al ser el P la principal contribución a la planta por parte de las micorrizas, fuese este el que más afectase. Se ha demostrado que existe una correlación negativa entre el N en el suelo y la presencia de HMA (Santos et al., 2006), mientras que existe una falta de respuesta de las HMA a la disponibilidad de P (Fitzsimons et al., 2008). Por otro lado, Mummey y Rillig (2008) detectaron diferencias significativas en la diversidad y abundancia de HMA entre parches de suelo situados a distancias menores de 1 metro. Estas diferencias pueden condicionar la estructura de la vegetación ya que los HMA facilitan el establecimiento y supervivencia de las plántulas (Van der Heijden, 2004).

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

Relación HFMA – hospedero

Las plantas presentan respuestas de defensa frente a la posible invasión de microorganismos que impiden o dificultan la entrada de éstos en sus células; sin embargo, aunque en la asociación con HFMA, las plantas generan respuestas de defensa, éstas son débiles, localizadas en células específicas y no impiden la colonización del hongo (García-

Garrido y Ocampo, 2002). Lo anterior puede estar asociado a mecanismos de regulación de las respuestas de las plantas o debido a la baja capacidad del hongo de inducir respuestas de la planta (García- Garrido y Ocampo, 2002). Con el reconocimiento del hongo formador de micorriza arbuscular (HFMA) se activa el sistema de defensa de la planta mediante señales específicas, elicitores, que pueden ser producidos por el microorganismo (exógenos) o por la planta (endógenos). Una vez percibido el elicitor ocurre una serie de cambios bioquímicos que permiten una rápida respuesta de la célula del hospedero y llevan a la activación de genes relacionados con la respuesta de defensa de la planta (Somssich and Hahlbrock, 1998).

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

Señales de reconocimiento en la fase asimbiótica

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

En la fase asimbiótica se presentan señales bioquímicas relacionadas con compuestos volátiles que forman parte de los exudados de las raíces. Uno de ellos es el CO₂, que es fundamental para la germinación de esporas y el crecimiento de la hifa germinativa (Bécard y Piché, 1989). Estudios fisiológicos han mostrado que, aunque la espora tiene capacidad de almacenar carbohidratos en forma de lípidos y azúcares, el CO₂ es una de las fuentes de carbono necesario para el crecimiento de la hifa (Bago et al., 2000). Sin embargo, éste no es el único compuesto involucrado en esta fase. Los exudados de las raíces contienen diferentes tipos de compuestos y hormonas que favorecen la germinación de esporas, el crecimiento y ramificación de la hifa germinativa y la localización de las raíces del hospedero (Requena et al., 2007). Antes de que la hifa agote sus reservas debe ser capaz de localizar las raíces e iniciar la formación del apresorio (Bécard y Piché, 1989), ya que aunque los exudados de las raíces estimulan el crecimiento de hifas, no pueden

mantener en forma indefinida su crecimiento, ni inducen la formación del apresorio. Por lo anterior se plantea la existencia de señales tigmotróficas o metabolitos secundarios producidos por la planta, requeridos para el establecimiento de la simbiosis (Requena et al., 2007).

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

Otros compuestos de los exudados de las raíces, los flavonoides, favorecen ramificación de hifas (Vierheilig y Piché, 2002); sin embargo, raíces de maíz deficientes en producción de flavonoides, son colonizadas por HFMA, mostrando que los flavonoides no son esenciales para este proceso (Siqueira et al., 1991). Uno de los compuestos de los exudados de las raíces, denominado “factor de ramificación”, que induce una amplia ramificación de hifas, fue identificado en *Lotus japonicus* como una strigolactona, la cual ha demostrado ser una señal de fundamental importancia en el desarrollo de la simbiosis (Akiyama et al., 2005).

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

strigolactona en el hongo es necesario para que el hongo produzca los factores Myc y active la expresión de genes *ENDO11* (Akiyama y Hayashi, 2006).

Hause y colaboradores (2007) presentan un resumen acerca del efecto de las hormonas en la micorrización de raíces, encontrándose que citoquininas y auxinas tienen un efecto positivo en el crecimiento del hongo, las giberelinas presentan respuestas tanto positivas como negativas en el hongo formador de MA, el ácido jasmónico muestra respuestas positivas cuando se encuentra en bajas concentraciones y negativas cuando las concentraciones son altas, el etileno presenta respuestas negativas y el ácido salicílico (AS) no afecta la micorrización.

Señales de reconocimiento en la Fase Simbiótica

La activación de expresión de genes *Endo* en el hospedero, producida por HFMA, permite a la planta localizar las células en las cuales las hifas del hongo hacen contacto para la formación del apresorio (Kosuta et al., 2003). Esta señal, acompañada de factores Myc, activa una serie de cambios celulares que llevan a formar un aparato de prepenetración (APP), especie de canal por donde la hifa fúngica posteriormente va a ingresar a la célula (Genre et al., 2005). El proceso inicia con la localización del núcleo inmediatamente debajo del apresorio y su posterior movimiento a través de la célula, señalando la zona en la cual se debe formar el APP dentro de una columna de citoplasma, acompañada de un manojo de microtúbulos y microfilamentos que se localizan paralelos a la columna y asociado con una región densa de cisterna del retículo endoplasmático. Una vez penetra en la célula, la hifa sigue el camino definido por el citoesqueleto y las estructuras del retículo endoplasmático al interior de la columna. Paralelamente, se produce la expresión de genes *Endo* en las células epidermales (Genre et al., 2005). Esta señal es repetida en las células de la epidermis marcando el camino de colonización de las hifas. Una vez que el hongo alcanza las células corticales se producen señales específicas para la formación del arbusculo. En este punto la reorganización celular es más drástica para permitir la ramificación de la hifa que genera el arbusculo y para la formación de la membrana periarbuscular, lugar de intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo. Se observa fragmentación de la vacuola, migración del núcleo, reorganización del citoesqueleto, modificación de plastidios y activación de genes relacionados con el transporte de Pi (Reinhardt, 2007). Una vez que el arbusculo finaliza su ciclo, la célula recupera su

estructura original (Genre *et al.*, 2005). Los cambios morfológicos están acompañados de cambios bioquímicos, expresión de genes que permiten la reorganización celular, la formación de membranas, el intercambio de nutrientes (Breuninger and Requena, 2004) y la producción de proteínas (Mathesius, 2009).

Para que los cambios a nivel de célula ocurran se requiere de la activación de genes mediante una cascada de señales; este proceso es similar al que ocurre en la simbiosis leguminosas-rizobio, por lo que se le ha llamado vía común Sym (Catoira *et al.*, 2000). Esta similitud se observa a nivel molecular, citológico y genético (Parniske, 2000). Se ha encontrado que los factores Nod requeridos en la simbiosis leguminosa-rizobios también son requeridos en la asociación planta-HFMA (Oldroyd and Downie, 2006). En *Medicago trunculata* se han encontrado tres (3) genes (Catoira *et al.*, 2000) y en *L. japonicum*, siete (7) genes, involucrados en esta vía Sym y presentes en las dos simbiosis (Kistner *et al.*, 2005). Oldroyd y Downie (2006), con base en la revisión de este proceso, proponen un modelo para la vía de señalización Sym, con la participación de receptores de quinasas específicos para rizobios (NFR1 y NFR5) asociados a la percepción de los factores Nod (en HFMA deben existir receptores similares para factores Myc, pero aún no se han identificado) y receptores DMI2/SYMRK que participan en las dos simbiosis. Una vez que se produce el reconocimiento de factores Nod (y posiblemente Myc) se genera una cascada de fosforilación en la membrana plasmática, posiblemente ligada a los cambios que sufre el calcio a nivel nuclear, con la participación de segundos mensajeros (productos de fosfolipasas C y D – PLC y PLD), los cuales, además de regular la fosforilación, activan los canales de cationes DMI1/Pollux y Castor.

Para la percepción de los factores Nod en la membrana plasmática se requiere la inducción de oscilaciones de Ca en el núcleo y la participación de un nucleoporin (NUP133) que permite la entrada del segundo mensajero al núcleo, para activar los canales de Ca en el interior y en el exterior de la membrana nuclear. Las bombas de Ca requieren ATP para su movilización en contra del gradiente de concentración y para mantener un nivel adecuado del elemento almacenado. Lo anterior genera la activación de proteína quinasa, dependiente de Ca y calmodulin (CCaMK), localizada en el núcleo, para regular la nodulación por medio de la activación de la expresión de genes nodulin. Genes de simbiosis temprana DMI3, codifican para la CCaMK, importante en la simbiosis, ya que

regula la morfogénesis del nódulo y es requerida para la simbiosis con HFMA, posiblemente para activar la respuesta de la planta (Oldroyd and Downie, 2006). En la asociación con HFMA se activan genes que permiten la reorganización de las células del hospedero para la formación del APP y metabolismo (Reinhardt, 2007).

Respuestas de la planta (Respuestas de defensa)

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

La respuesta más fuerte se presenta en las etapas posteriores, la cual está localizada en las células que contienen arbusculos, posiblemente como un mecanismo de control de la dispersión de hifas y formación de arbusculos (García-Garrido and Ocampo 2002). Se encuentra una acumulación de mRNA de genes asociados con respuestas de defensa, dentro de los cuales es importante resaltar: las enzimas relacionadas con metabolismo de fenilpropanoides (flavonoides e isoflavonoides) (Harrison and Dixon, 1994); especies

reactivas al oxígeno (ROS) (Blee and Anderson, 2000) e hidrolasas de plantas (Salzer et al., 2000). Los incrementos en flavonoides e isoflavonoides dependen de los genotipos de los simbiontes (Harrison and Dixon, 1994), y en la asociación con rizobios estimulan la simbiosis, por lo que se considera que con HFMA puede ocurrir un proceso similar (Harrison, 1999).

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

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

Atenuación de los mecanismos de defensa

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

Degradación de las moléculas elicitoras. Algunas hidrolasas se expresan durante la simbiosis y pueden actuar rompiendo las moléculas de los elicitores del HFMA, (Salzer et al., 2000). Estas hidrolasas deben ser producidas por la planta y estar reguladas por los niveles de Pi, ya que la primera señal de reconocimiento hongo-planta se produce en condiciones de deficiencia de Pi (Akiyama et al., 2005). Este factor no ha

sido identificado y por tanto la participación de quitinasas en la degradación del elicitor es objeto de controversia (Salzer and Boller, 2000). La prevención de la formación de elicitores endógenos no parece ser el mecanismo de atenuación, debido a que los HFMA producen cantidades muy bajas de enzimas capaces de degradar la pared celular del hospedero, las cuales son utilizadas para la penetración de la hifa (García-Garrido et al., 2000).

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

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

positiva de los incrementos en flujos de sucrosa, glucosa y fructosa con aumentos en la activación de genes de defensa (Blee and Anderson, 2000) y con resistencia sistémica (Herbers et al., 1996).

Los niveles de hormonas varían diferencialmente en la simbiosis, observándose reducción en los niveles de etileno (Vierheilig et al., 1994) e incremento en los de citoquininas (Ginzberg et al., 1998). Las citoquininas actúan como factores que suprimen la actividad quitinasa (Shinshi et al., 1987) y los niveles elevados de citoquininas en raíces micorrizadas pueden suprimir la inducción de algunos genes que codifican proteínas PR, específicamente de quitinasa y glucanasa. Sin embargo, el papel de las hormonas en la regulación de las respuestas de defensa, en simbiosis, no es muy claro (Shaul et al., 2000). La respuesta de la planta se refleja en el tipo de colonización de las células de la corteza radical, encontrándose dos tipos de estructuras: hifas tipo “Paris” e hifas tipo “Arum” (Genre et al., 2008). Por su parte, los HFMA también presentan diferentes patrones de crecimiento intraradical, encontrándose que *Glomus* coloniza abundantemente las raíces y ubica su micelio extraradical muy cerca de la raíz, mientras que *Gigaspora o Scutelospora* presentan pequeños parches de colonización en las raíces y su micelio extraradical se expande ampliamente en la rizósfera (Parniske, 2004, 2008).

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

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

Ventajas de las micorrizas en los agroecosistemas

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

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

La fisiología de la planta micorrizada cambia completamente cuando se asocia al hongo. Mediante el micelio externo, el contacto entre las raíces y el medio se incrementa considerablemente. La inoculación con hongos formadores de micorrizas es conocida por incrementar el crecimiento de muchas especies de plantas. Es atribuido un incremento en la toma de nutrientes, especialmente los de difusión limitada tales como: P, Zn, Cu, etc.; producción de sustancias promotoras de crecimientos, tolerancia a estrés hídricos; salinidad, estrés por trasplante; resistencia a plantas por fitopatógenos e interacción sinérgica con otros microorganismos benéficos del suelo (Boby, *et al.*; 2008). Las plantas micorrizadas crecen mejor que las no micorrizadas en suelos infértiles, por producir un incremento en la nutrición mineral a través de las hifas, quienes ayudan a explorar un mayor volumen de suelo que los pelos radiculares de las mismas plantas (Rajan *et al.*, 2000). El incremento en la nutrición mineral aumenta los contenidos de clorofilas y como consecuencia una alta tasa fotosintética (Feng *et al.*, 2002). Los HMA interactúan con una amplia diversidad de microorganismos del suelo en las raíces, en la rizosfera y en la masa del suelo. La interacción puede inhibir o estimular, aunque estos hongos no pueden fijar biológicamente el nitrógeno atmosférico, incrementan la fijación de este compuesto porque interactúan positivamente con los fijadores de nitrógenos (Barea *et al.*, 1992). Combinación de inoculación de hongos micorrízicos con microorganismos solubilizadores de fosfatos produce una mayor absorción de nitrógeno y fosforo e

incrementa la producción de las plantas en suelos deficientes con nutrientes (Singh y Kapoor, 1999).

Factores que afectan la colonización de micorrizas en campo

Entre los múltiples factores bióticos y abióticos que afectan la composición de las comunidades de HMA, la estructura de la comunidad de plantas es determinante debido a su preferencia por HMA (Kernaghan, 2005). La estructura y función de comunidades de micorrizas también puede variar con la edad de la planta, especialmente en especies perennes o semiperennes, y se ha encontrado, empleando métodos moleculares de evaluación, que los HMA dominantes en plántulas recién germinadas de especies forestales tropicales eran reemplazadas por otros tipos de HMA al realizar evaluaciones un año más tarde, más aún, plantas de diferentes edades en un mismo sitio, presentaban diferentes comunidades de HMA asociadas a ellas (Husband et al., 2002).

En condiciones de campo, plantas micorrizadas sometidas a estrés hídrico muestran mejores respuestas a irrigación post estrés en producción y biomasa, que plantas no micorrizadas. Los mecanismos asociados al incremento en tolerancia al estrés hídrico de plantas micorrizadas están relacionados con el incremento en toma de agua por las hifas, alteración de niveles de hormonas que producen cambios en conductancia estomatal (Drüge y Schönbeck, 1992) Sánchez (1999), mejoramiento nutricional del hospedero (Johnson y Hummel, 1985) y mejoramiento de la recuperación de la planta después del estrés manteniendo un continuo raíz-suelo (Sweatt y Davies, 1984). Los efectos del exceso de agua de los suelos sobre HMA, no se han sido evaluados ampliamente, aunque se ha encontrado asociación micorrícica en plantas acuáticas y de zonas inundadas (Dhillion y Ampornpan, 1992) con excepción de aquellas pertenecientes a las familias Cyperaceae y Juncaceae.

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

Pérez y Fuentes (2009), encontraron que en el proceso de modelación logística de la densidad poblacional de HMA en función de parámetros físicos-químicos; los factores que mejor explican el fenómeno de la esporulación de hongos formadores de micorrizas asociados en rizósfera de pasto colosoana fueron el pH y el Potasio. Estudios realizados por Pérez y Peroza, (2010), para establecer relación entre el proceso de esporulación y colonización de HMA asociados al pasto angletón en función a factores físico-químico y de salinidad de los suelos de fincas ganaderas del municipio de Tolú-Colombia, determinaron varios modelos matemáticos para predecir dichos procesos. Los resultados obtenidos a través de modelos matemáticos construidos para densidad poblacional de esporas de HMA en función de parámetros físicos-químicos, indican que la abundancia de esporas de HMA en los suelos está directamente relacionada a la concentración de los elementos intercambiables de magnesio (Mg), sodio (Na) y de los valores de densidad aparente (Da) e inversamente relacionada a los valores de Cobre (Cu) y Manganeso (Mn). La colonización de HMA está directamente relacionada a los valores de los elementos intercambiables de potasio (K) y sodio (Na), de zinc (Zn) y del porcentaje de hidrogeno en los suelos e inversa a los valores de los elementos de Ca y Mg intercambiable.

Mientras que los modelos matemáticos construidos para densidad poblacional de esporas de HMA en función de salinidad, indican que la salinidad interfiere directamente con el número de espora de esporas de HMA en los suelos en presencia de parámetros como pH, SO₄, magnesio (Mg), sodio (Na), porcentaje de sodio intercambiable (PSI) y el porcentaje de sodio en partes por mil (S/00) e inversamente relacionada a la conductividad eléctrica (CEE) y la colonización de estos HMA en raíces está directamente relacionada a los valores de los elementos intercambiables de potasio (K) y sodio (Na), de zinc (Zn) y del porcentaje de hidrogeno en los suelos e inversa a los valores de los elementos de Ca y Mg intercambiable (Pérez y Peroza, 2010).

Poblaciones de HMA en ecosistemas naturales

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

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

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

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

Aunque los estudios poblacionales de hongos micorrizales de MA están basados en caracteres morfológicos de los cuerpos fructificantes, esporas, micelios vegetativos o estructuras simbióticas, la aproximación es todavía limitada dado que los factores que influyen la esporulación de una especie individual son poco entendidos y no pueden ser extrapolados hasta la extensión de colonización vegetativa de diferentes especies de plantas. Las poblaciones de esporas proveen solo una indicación relativa de la abundancia y la composición de especies de poblaciones fungales de MA sin embargo los estudios moleculares de la diversidad de los hongos (Van Tuinen et al., 1994) en ecosistemas naturales pueden ofrecer un mejor medio de identificación para información sobre poblaciones, especialmente cuando es difícil acumular un número suficiente de características morfológicas.

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

Métodos de estudio de diversidad de HMA

Los métodos convencionales para estudiar las comunidades y poblaciones de naturales de HMA están basados en la identificación de esporas asexuales provenientes de suelo. La taxonomía de HMA esta ampliamente basada en caracteres morfológicos de las esporas, con algunas excepciones (Öpik, 2004).

Los estados de carácter morfológicos cambian el curso de desarrollo de las esporas lo que comúnmente complica la identificación de especímenes en campo. Más aún la presencia de esporas en el suelo no siempre coincide con la colonización fungal de raíces pero la morfología de las estructuras fungales intrarradiculares permite la identificación, en el mejor de los casos, hasta nivel de familia. Esta identificación tan primaria pone los límites en cuanto al estudio taxonómico de los HMA (Öpik, 2004).


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

PRIMER ARTÍCULO

MONOSPORIC INOCULATION OF ECONOMICALLY IMPORTANT
HORTICULTURAL SPECIES WITH NATIVE ENDOMYCORRHIZAE UNDER
GREENHOUSE CONDITIONS

Article 1

Monosporic Inoculation of Economically Important Horticultural Species with Native Endomycorrhizae under Greenhouse Conditions

Flor S. Hernandez ¹, Rosalinda M. Villarreal ^{2,*} , Valentin R. Torres ² and Adrien Gallou ³

¹ PhD student in protected agriculture, Department of Horticulture, Antonio Narro Agrarian Autonomous University, Calzada Antonio Narro 1923, Saltillo 25315, Coahuila, Mexico; florsilvestre1988@hotmail.com

² Department of Horticulture, Antonio Narro Agrarian Autonomous University, Calzada Antonio Narro 1923, Saltillo 25315, Coahuila, Mexico; robledo3031@gmail.com

³ National Centre for Biological Control Reference (CNRCB), Molecular Biology laboratory, Km 1.5 carretera Tecomán 28110, Colima, Mexico; gallou.adrien@hotmail.fr

* Correspondence: rosalingdamendoza@hotmail.com; Tel.: +52-844-806-7114



Received: 8 February 2019; Accepted: 7 March 2019; Published: 12 March 2019

Abstract: Research into the symbiotic relationship between plants and arbuscular mycorrhizal fungi

(AMF) is key for sustainable agricultural intensification. The objective of the present study is to evaluate native AMF at the monosporic level in greenhouse-grown, economically important crops. Agricultural soil samples from three locations (Saltillo, Zaragoza, and Parras) were obtained by combining portions resulting from a zigzag sampling pattern. From these samples, 15 morphotypes were extracted according to a modified Gerdemann's technique and monosporically inoculated on melon, cucumber, tomato, and onion, 30 days after their sowing. Under a completely random experimental design, 16 treatments with three repetitions were defined. Plant height, root length, stem diameter, total fresh weight, fresh root weight, dry root weight, bulb weight, fresh leaf weight, total dry weight, flower number, leaf number, fruit number, spore number, and percentage of colonization were all evaluated. The results were subjected to the analysis of variance (ANOVA) and the Tukey comparison test ($p \leq 0.05$), which showed that the monosporic inoculation favors significantly the AMF and the host, while the T6 (Saltillo spore + Steiner modified with 20% of the normal phosphorus concentration) showed a greater response uniformity on onion and melon,

which indicates its great potential as an inoculum.

Keywords: endomycorrhizas; onion; tomato; melon; cucumber

1. Introduction

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) form mutualistic symbioses with 85% of terrestrial plants [1–3]. The AMF obtains sources of photosynthetic carbon from the host, which favors the absorption of nitrogen and phosphorus [4], increases productivity, promotes growth, reduces abiotic and biotic stresses, improves the soil quality for drought tolerance and saline stress, and above all, increases the chemical quality of horticulturally cultivated vegetables [5,6].

Plants from the Amaryllidaceae (onion and leek), Apiaceae (carrot), Asteraceae (lettuce), Cucurbitaceae (cucumber), Fabaceae (bean), and Solanaceae (tomato and bell pepper) families possess a high dependence on mycorrhizal colonization [5]. Inoculations of greenhouse onion plants grown in phosphorus deficient soil with 1–7 species of AMF in various combinations demonstrated increases in dry shoot weight, but a reduction in the concentrations of potassium and sulfur; *Glomeraceae* species had a greater impact on growth and nutrient absorption while *Acaulospora* and *Racocetra* spp. did not have a significant impact [4]. The effects of mycorrhiza inoculation density (no inoculum,

Agronomy **2019**, *9*, 130; doi:10.3390/agronomy9030130

www.mdpi.com/journal/agronomy

1000 spore, and 2000 spore inocula) on cucumber plants subjected to saline stress (control, 50, 75, and 100 mM NaCl) has been studied. Inoculation with 2000 spores resulted in increases in dry and fresh fruit weight and root volume, in the absence of salt stress. In cucumber, dry and fresh weights increased with the inoculation of 1000 spores at all levels of salt stress [7]. Similarly, the interactions between four AMF (*Glomus intraradices*, *Glomus mosseae*, *Glomus claroideum*, and *Glomus constrictum*) and *Trichoderma harzianum* were evaluated in melon plants. The AMF reduced fresh plant weight compared to *T. harzianum*, while dual inoculation resulted in a decrease of fresh weight compared to AMF-inoculated plants, except for *G. intraradices* [8]. PKM-1, Gaurav, and Monarch tomato cultivars inoculated with *Glomus fasciculatum* were assessed. Root colonization of the AMF varied between 26.4% to 36.0% in 30-day-old plants and 40.2% to 47.0% in 60-day-old plants. Significant increases in plant height, and both shoot and root fresh and dry weights, as well as plant N, P, and K content were recorded [9].

The actual effects of commercial inoculations are not always positive [10,11], because the conventional agricultural systems coupled with the irrational use of pesticides reduces the positive effect of AMF [12,13]. Few studies objectively adjust their inoculum to the environment in order to avoid failure of the inoculation process. The objective of the present study is to evaluate the response to monosporic inoculation of native endomycorrhizae in melon, cucumber, onion, and tomato plants subjected to low doses of phosphorus fertilization under greenhouse conditions.

2. Materials and Methods

The experiment took place throughout 2015 and 2016 in a medium technology greenhouse belonging to the Antonio Narro Autonomous Agrarian University, located in Saltillo, Coahuila, Mexico (23° 37" N, 100° 38" W, at an altitude of 1581 m.a.s.l.).

2.1. Sampling and Soil Analysis

Agricultural soils abandoned for 10 years in Parras, Saltillo, and Zaragoza, Coahuila, inhabited only by wild sunflowers of the family *Asteraceae*, were sampled in June 2015. Using a zigzag method, four 1-kg samples per point, with four points per location, were taken at a depth of 0–30 cm. Texture was determined by the Bouyoucus method [14], pH by a potentiometric technique (1:2), phosphorus by Olsen's technique [15], organic material (OM) by Walkey and Black's method [16], and electrical conductivity (EC) by electrometric methods (1:2).

2.2. AMF Spore Extraction by Modified Gerdemann's Method

Twenty soil samples were analyzed (five from Saltillo, seven from Zaragoza, and eight from Parras). The 200 g, unsifted soil samples were deposited in a container with 5 L of tap water, mixing until the lumps were gone, and leaving to stand for 2 h to separate the soil from the water. The soil was

washed three times by pouring the contents through 40, 60, 200, 325, and 400 μm sieves. Subsequently, the residue from each sieve was collected in 50-mL Falcon tubes by rinsing the sieve with 20 mL of distilled water from a wash bottle. Each tube had 25 mL of 1.8 M sucrose solution added and the tubes were centrifuged at 3700 rpm for 4 min. The supernatant was poured through a 400- μm sieve and the residue washed until the sucrose was eliminated. The rinsed residue was deposited in 6-cm diameter, glass Petri dishes and visualized under a stereoscopic microscope (Olympus SZ51, Olympus America Inc, Center Valley, PA, USA).

2.3. Morphological Grouping and Washing of Spores

Using a stereoscopic microscope (Olympus SZ51), spores were grouped according to color, shape, size, and number of layers, according to the International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) [17]. The morphotypes were washed with 1 mL of 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) solution by inverting for 1 min before passing to an Eppendorf tube containing 1 mL of distilled water. Each sample was washed four times. The spores were stored at 4 °C for 3 days.

2.4. Plant Material Sowing and Inoculation

Peat moss for germination and sandy loam soil were sterilized for 30 min at 15 (lb in⁻²) of pressure, three times. Red onion, cucumber var. Centauro, melon var. Magno F1, and tomato var. Híb MX7047 (Syngenta, Guanajuato, Mexico) seeds were germinated in 200-cell, Styrofoam trays and kept in the germination chamber for 15 days. The seedlings were moved to the greenhouse for transplanting into black, 3-L nursery pots filled with sandy loam soil that had been irrigated to capacity the day before. Inoculation was performed 30 days after sowing (d.a.s) by placing a single spore on the lateral root of each plant.

2.5. Crop Management

The plants were fertilized by drip irrigation with a Steiner solution modified to contain only 20% of the normal phosphorus concentration. Each pot received 900 mL of nutrient solution daily, divided amongst three irrigations (8:00 AM, 2:00 PM, and 8:00 PM). The average pH was 7.8 with an EC of 2.8 ds/m. The average temperature and relative humidity at 8 AM was 16.5 °C and 77%; at 2 PM, 36.3 °C and 30%; and at 8 PM, 20.2 °C and 56%. Pruning was performed, as well as

chemical control of white fly and potato psyllid with imidacloprid. Powdery mildew and early blight were controlled with chlorothalonil and copper hydroxide.

At 66 days after transplant (d.a.t.), plant height (PH) and root length (RL) of each plant was measured with a tape measure, and stem diameter (SD) with digital Vernier calipers. Total fresh weight (TFW), root fresh weight (RFW), and leaf fresh weight (LFW) were measured with an analytical balance (Mettler AJ100 and Ohaus EP114C). Flower number (FLN), leaf number (LN), and fruit number (FRN) were also counted. The cucumber, melon, and tomato were in flowering, but the onion was in the vegetative phase start of bulb formation.

2.6. Determination of Root Colonization Percentage and Spore Number

The roots of the triple-repetition 16 treatments and the controls were washed under running water and then cut into 1-cm-long fragments, as per the root staining technique [18]. The root fragments were vertically aligned on slides (three slides per plant with 100 observations) with a drop of acidified glycerol added. The slides were observed under an Olympus CX21 Olympus America Inc, Center Valley, PA, USA. compound microscope. The percentage of colonization was estimated according to the McGonigle method [19]. The spores in 100 g of soil per pot and per crop were counted

with an Olympus SZ51 stereoscopic microscope according to a modified Gerdemann's technique [20].

2.7. Statistical Analysis

The experiment consisted of 16 treatments with three repetitions: 15 treatments with 1 AMF spore from each location plus fertilization with Steiner solution containing 20% of the normal P concentration, and a control (no AMF) with the same fertilization scheme. The experimental design was completely random for each species studied. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's comparison of means test ($p \leq 0.05$) was performed with the Statistical Analysis Systems (SAS) software suite (2013).

3. Results

3.1. Soil Analysis

Table 1 presents the physicochemical characteristics of the studied soil. The pH of soil from Parras is moderately alkaline and alkaline in Zaragoza and Saltillo. Parras soil has high electrical conductivity (EC). Saltillo soil has low OM content, while Zaragoza soil has high OM, and Parras soil has moderately high OM. Zaragoza and Saltillo soil have moderately low total phosphorus (P), while Parras soil has medium levels of P.

Table 1. Analysis of soil from three locations in Coahuila.

Location	Texture	pH	EC (ds/m)	OM (%)	P (ppm)
Parras	Loamy	7.89	3.04	2.79	18.4
Zaragoza	Loamy	8.07	0.93	3.40	9.83
Saltillo	Sandy Loam	8.11	1.55	0.73	9.92

3.2. Spore Morphology

Table 2 shows that of the three locations studied, 15 treatments were obtained whose spores present a globose to sub-globose shape and a spore coat made up of one to three layers, with a wall thickness of 5.3–19.9 μm . Seven colors were identified, mostly the 0-10-60-0 orange–brown defined by the INVAM [17]. The spore equatorial diameter (ED) ranges from 93.1 to 217.8 μm and the meridian diameter (MD) from 96.5 to 208.05 μm . The number of strata (NS) varies from 1 to 3 and the thickness of the spore wall (TSW) from 3.09 to 13.90 μm .

Table 2. Characteristics of native AMF associated with wild sunflower from Coahuila, 2015.

Treatments	Color (INVAM 2015)	ED (μm)	MD (μm)	NS	TSW (μm)	
1 Saltillo	0-10-60-0	Yellow–Brown	162.64	167.24	3	5.30
2 Saltillo	0-10-60-0	Yellow–Brown	143.10	146.55	3	11.38
3 Saltillo	0-10-40-0	Orange	125.86	129.89	2	6.92
4 Saltillo	0-10-40-0	Orange	149.43	142.53	3	8.75
5 Saltillo	0-10-60-0	Yellow–Brown	93.10	96.55	3	7.67
6 Saltillo	20-80-80-0	Orange–Brown	177.01	177.59	3	12.08
7 Zaragoza	20-80-80-0	Orange–Brown	133.33	135.06	3	13.84
8 Zaragoza	0-10-60-0	Yellow–Brown	110.92	122.41	1	3.09
9 Zaragoza	0-5-20-0	Cream with a pale pink tint	111.50	137.36	3	10.04
10 Zaragoza	0-10-40-0	Orange	132.76	137.36	2	12.08
11 Zaragoza	20-80-80-0	Orange–Brown	217.82	208.05	2	12.92
12 Parras	0-5-40-0	Hyaline/white	108.62	109.77	3	6.90
13 Parras	0-10-60-0	Yellow–Brown	125.86	137.93	2	13.90
14 Parras	0-20-80-0	Salmon	177.01	182.76	2	7.30
15 Parras	0-10-60-0	Yellow–Brown	106.34	111.56	3	8.12

3.3. Number of AMF Spores

Table 3 illustrates the capacity of the 15 inoculated treatments to produce spores under conditions totally different to their natural habitat. The T1 Saltillo ($p \leq 0.05$) in tomato presented the highest significant density of spores. The T5 Saltillo in onion, T9 Zaragoza in cucumber, T11 Zaragoza in melon, and T1 Saltillo in tomato also presented significant densities of spores. The letter in the table is the result of the Tukey comparison test.

Table 3. Average density of spores (Tukey's $p \leq 0.05$) in four horticultural species.

Treatment	Onion	Cucumber	Melon	Tomato
C	0.00 f	0.00 h	0.00 g	0.00 f
1 Saltillo	18.00 bdec	9.66 g	10.66 ef	30.33 a
2 Saltillo	17.00 bdec	14.66 fbecd	10.33 ef	25.33 bdac
3 Saltillo	14.66 de	18.00 ba	8.00 f	23.66 dec
4 Saltillo	15.33 bdec	14.33 fbecd	13.66 edc	23.66 dec
5 Saltillo	27.00 a	11.66 fge	14.33 bdc	18.33 e
6 Saltillo	13.33 e	14.33 fbecd	15.33 bac	26.33 bdac
7 Zaragoza	21.66 bac	15.66 becd	8.00 f	29.00 bac
8 Zaragoza	21.66 bac	13.33 fged	11.00 edf	26.33 bdac
9 Zaragoza	19.00 bdec	21.66a	15.00 bac	24.66 bdc
10 Zaragoza	21.00 bdac	16.33 bcd	15.66 bac	26.66 bdac
11 Zaragoza	17.33 bdec	17.33 bc	18.00 a	23.00 de
12 Parras	18.00 bdec	11.00 fg	17.33 ba	26.33 bdac
13 Parras	22.00 ba	13.00 fged	14.33 bdc	29.33 ba
14 Parras	17.33 bdec	12.66 fged	16.33 bac	27.00 bdac
15 Parras	15.00 dec	11.66 fge	14.66 bac	27.00 bdac
P	***	***	***	***
% C. V	12.93	10.21	9.49	7.54

C = control; *** = $p \leq 0.001$ ANVA; C. V = coefficient of variation.

3.4. Mycorrhizal Colonization

Table 4 demonstrates that the 15 monosporically-inoculated treatments did have the capacity to develop symbioses, even with low phosphorus fertilization. According to the statistical analyses, the T6 Saltillo established the greatest percentage of colonization in all four host species, though colonization in melon and cucumber was the highest among them.

Table 4. Average mycorrhizal colonization (Tukey, $p \leq 0.05$) in four horticultural species.

Treatment	Onion	Cucumber	Melon	Tomato
C	0.00 f	0.00g	0.00 g	0.00 g
1 Saltillo	14.00 ed	28.57 dfce	54.77 ba	28.00 edf
2 Saltillo	22.33 bdc	30.82 dce	53.07 bc	32.00 ebdfc
3 Saltillo	22.33 bdc	54.38 ba	52.66 bc	37.33 bac
4 Saltillo	24.33 bac	47.61 b	48.29 bc	24.00 f
5 Saltillo	22.00 bedc	35.50 c	38.69 fe	33.00 ebdac
6 Saltillo	33.00 a	58.36 a	60.33 a	41.00 a
7 Zaragoza	24.00 bc	32.89dc	52.70 bc	24.00 f
8 Zaragoza	13.33 e	34.67 c	32.10 f	38.33 bac
9 Zaragoza	21.00 bedc	22.73 fe	41.08 de	30.00 edfc
10 Zaragoza	25.66 bac	22.11 f	47.26 dc	36.00 bdac
11 Zaragoza	17.33 edc	36.37 c	51.33 bc	33.33 ebdac
12 Parras	18.66 bedc	24.58 fe	48.86 dc	34.00 bdac
13 Parras	26.66 ba	30.17 dfce	51.57 bc	25.33 ef
14 Parras	18.33 bedc	25.11 dfe	33.84 f	39.00 ba

15 Parras	18.66 bedc	29.37 dfce	47.76 dc	33.33 ebdac
p	***	***	***	***
% C.V	14.34	8.43	4.98	9.24

C = control; *** = $p \leq 0.001$ ANOVA; C.V = coefficient of variation.

The greatest difference in colonization percentages in onion was of 20% between the T6 Saltillo and T8 Zaragoza. In cucumber, the greatest difference was 36.25% between T6 Saltillo and T10 Zaragoza. In melon, it was 28.33% between the T6 Saltillo and T8 Zaragoza; while in tomato, the greatest difference was 17% between the T6 Saltillo and both the T4 Saltillo and T7 Zaragoza. The letter in the table is the result of the Tukey comparison test.

3.5. Agronomic Characteristics of Cucumber

Table 5 shows the results of Tukey's comparison test for the evaluated plant parameters in cucumber. A 23.67% increase in PH can be seen in T1 Saltillo over the control. T5 Saltillo had a 30.85% increase in SD, a 85.81% increase in TFW, and a 282.55% increase in RFW. T9 Zaragoza had an 23.21% increase in leaf number (LN) and a TDW increase of 286.89%. The FLN in T6 Saltillo increased 12.81% and RL in T13 Parras increased 5.4 times. The latter response is of great economic and environmental importance as it implies better absorption and utilization of nutrients and water as well as better plant anchoring. The letter in the table is the result of the Tukey comparison test.

Table 5. Average effects (Tukey, $p \leq 0.05$) of AMF on the agronomic parameters of greenhouse-grown cucumber.

T	PH (cm)	SD (mm)	LN	FLN	TFW (g)	TDW (g)	RFW (g)	RDW (g)	RL (cm)
C	103.50 bcde	7.26 e	28.0 abcde	18.50 ab	150.04 fg	42.34 b	43.00 gef	23.98 ab	13.66 g
1 Saltillo	128.00 a	8.833 abc	31.0 abc	15.0 bcd	199.81 cdef	58.77 b	44.00 gef	27.96 a	28.00 def
2 Saltillo	111.50 ab	9.23 ab	30.50 abcd	15.00 bcd	268.2 bcde	64.12 b	63.33 b	27.80 a	24.33 efg
3 Saltillo	81.00 fg	7.40 e	26.00 cde	10.66 efg	178.81 def	34.17 b	59.00 cb	24.32 ab	31.75 d
4 Saltillo	87.50 def	8.10 cde	28.0 abcde	11.66 defg	198.69 cdef	57.22 b	57.00 cbd	29.29 a	40.66 c
5 Saltillo	108.0 bc	9.50 a	27.33 bcde	17.50 abc	278.79 a	70.40 b	121.50 a	28.35 a	15.75 fg
6 Saltillo	105.5 bcd	8.35 abcd	30.0 abcd	20.87 a	258.10 ab	54.13 b	46.50 gefd	26.05 a	29.50 cde
7 Zaragoza	92.50 cdef	7.40 e	27.50 bcde	13.50 def	182.26 def	55.70 b	56.50 cbd	16.27 c	20.00 defg
8 Zaragoza	77.33 fg	8.26 bcde	31.0 abc	9.33 g	158.12 efg	60.47 b	60.50 b	26.84 a	23.00 defg
9 Zaragoza	102.50 bcde	8.65 abcd	34.50 a	9.50 g	243.72 abc	121.47 a	47.50 cefd	25.41 a	47.50 b
10 Zaragoza	66.66 g	7.55 de	24.0 de	13.66 cdef	175.19 defg	41.72 b	48.00 cefd	25.82 a	18.00 efg
11 Zaragoza	110.5 abc	7.60 de	33.50 ab	20.00 a	231.51 abcd	52.13 b	38.00 gf	24.72 ab	23.00 defg
12 Parras	93.66 bcdef	8.0 cde	27.0 bcde	10.0 fg	198.34 cdef	49.50 b	63.50 b	25.67 a	17.50 efg
13 Parras	106.0 bcd	8.20 bcde	29.33 abcd	11.66 defg	172.32 efg	59.05 b	51.66 cebd	17.27 bc	74.33 a
14 Parras	85.50 feg	7.76 cde	25.50 cde	14.00 cde	120.33 g	37.13 b	34.50 g	24.59 ab	13.75 g
15 Parras	76.33 fg	8.15 bcde	21.500 e	11.50 defg	151.92 efg	34.78 b	39.66 gef	24.86 ab	16.83 fg
p	***	***	***	***	***	***	***	***	***
CV	6.46	4.65	7.64	9.14	9.72	29.90	7.36	10.083	13.60

C = control; *** = $p \leq 0.001$ ANOVA; C.V = coefficient of variation.

3.6. Agronomic Characteristics of Melon

The results of monosporic inoculation of melon with native AMF are summarized in Table 6. At 66 d.a.t., inoculation with a single spore results in significant differences in all the evaluated agronomic parameters. Of the 15 treatments, excelling T6 of Saltillo with six out of nine evaluated parameters: PH (101.6%), LN (80.6%), FLN (180.6%), TFW (157.61%), RFW (155%), and RL (164.86%), The T11 and T13 Parras resulted in an increase of biomass production statistically

the same as T6 over the control. Those AMF are potentially significant candidates for melon seedling inoculation under greenhouse conditions.

Table 6. Average effects (Tukey, $p \leq 0.05$) of AMF on the agronomic parameters of greenhouse-grown melon. The letter in the table is the result of the Tukey comparison test.

T	PH (cm)	LN	FLN	FRN	TFW (g)	TDW (g)	RFW (g)	RDW (g)	RL (cm)
C	83.33 g	10.33 c	7.00 ef	0.33 ab	70.00 f	22.34 h	18.50 f	8.73 e	11.33 f
1 Saltillo	153.00 ab	12.00 bc	13.00 b	0.00 b	147.50 b	78.46 ab	21.50 ef	9.30 e	24.80 bc
2 Saltillo	116.33 defg	12.00 bc	13.00 b	1.00 ab	105.50 cde	42.95 bef	44.33 ab	19.97 ab	13.50 def
3 Saltillo	118.66 bcdef	11.66 bc	8.66 cdef	0.66 ab	116.00 cd	39.72 defg	24.00 def	10.99 de	16.50 def
4 Saltillo	142.00 abcde	13.66 b	9.33 cdef	0.33 ab	107.50 cde	64.75 bc	32.66 cd	15.13 bcd	14.66 def
5 Saltillo	124.66 bcdef	11.33 bc	14.00 b	1.00 ab	121.00 bcd	50.63 cd	29.33 cde	12.97 de	12.05 ef
6 Saltillo	168.00 a	18.66 a	19.66 a	2.00 a	180.33 a	79.23 ab	49.00 a	18.64 bc	34.45 a
7 Zaragoza	100.00 fg	12.33 bc	11.50 bcd	1.33 ab	122.00 bcd	48.67 de	37.50 bc	13.66 cde	19.83 cd
8 Zaragoza	133.00 bcdef	12.66 bc	6.50 f	0.66 ab	130.00 bc	35.28 efgh	30.00 cde	12.66 de	15.25 def
9 Zaragoza	151.00 abc	12.66 bc	7.50 ef	0.00 b	146.50 b	67.53 b	24.50 def	12.21 de	24.33 bc
10 Zaragoza	131.33 bcdef	12.00 bc	11.33 bcd	0.66 ab	84.00 ef	30.21 fgh	23.50 def	11.76 de	15.75 def
11 Zaragoza	118.00 cdef	12.00 bc	18.00 a	1.00 ab	197.33 a	83.53 a	37.33 bc	12.92 de	15.75 def
12 Parras	150.50 abcd	13.00 bc	8.00 def	0.66 ab	96.66 ef	27.37 gh	20.50 ef	8.81 e	18.60 cdef
13 Parras	115.66 efg	12.00 bc	9.00 cdef	1.00 ab	201.33 a	90.99 a	43.66 ab	24.15 a	25.80 bc
14 Parras	127.33 bcdef	18.00 a	11.66 bc	0.66 ab	115.00 cd	34.35 efgh	28.66 cdef	13.12 de	19.00 cde
15 Parras	132.33 bcdef	12.33 bc	11.00 bcde	0.66 ab	111.50 cde	33.48 fgh	33.66 bcd	14.94 bcd	28.75 ba
P	***	***	***	*	***	***	***	***	***
% CV	8.759	8.176	10.54	73.53	7.80	9.467	11.303	12.364	12.84

C = control; *** = $p \leq 0.001$ ANOVA; C.V = coefficient of variation.

3.7. Agronomic Characteristics of Tomato

The effects of monosporic inoculation of tomato plants with native AMF are presented in Table 7. Once again, the T5 Saltillo significantly improves PH (79.2%) and TFW (200%) when compared to the control. TDW and RDW were improved with T14 Parras inoculation by 2.6 and 5 times, respectively. T10 Zaragoza increased RFW by four times, while T15 Parras significantly increased RL by 104% over the control treatment. The LN parameter had no significant difference among treatments. The T2, T5, T6 Saltillo, and T7 Zaragoza had significant increases in FLN, when compared to the control.

Table 7. Average effects (Tukey, $p \leq 0.05$) of AMF on the agronomic parameters of greenhouse-grown tomato. The letter in the table is the result of the Tukey comparison test.

T	PH (cm)	SD (mm)	FLN	TFW (g)	TDW (g)	RFW (g)	RDW (g)	RL (cm)
C	57.00 h	7.00 abc	2.50 c	74.50 h	16.00 ij	11.00 fg	1.66 e	20.25 efg
1 Saltillo	59.00 gh	5.65 cd	4.00 bc	97.50 gh	11.00 j	9.0 g	2.66 de	16.33 fg
2 Saltillo	79.00 abcde	6.80 abc	8.00 a	131.0 defg	56.00 cdef	12.33 fg	2.66 de	25.00 cde
3 Saltillo	86.00 abc	7.40 ab	3.66 bc	168.0 bcde	68.00 abc	29.00 bc	5.66 ab	29.50 cd
4 Saltillo	77.00 bcde	7.33 ab	4.33 b	158.33 bcde	49.333 defg	27.66 bcd	3.33 cde	27.50 cde
5 Saltillo	91.00 a	7.50 ab	7.50 a	223.50 a	77.50 ab	23.00 bcde	5.00 abc	28.00 cd
6 Saltillo	89.50 ab	8.15 a	8.00 a	204.33 ab	62.00 bcde	29.50 b	3.66 bcde	27.50 cde
7 Zaragoza	85.00 abcd	7.30 abc	7.50 a	160.0 bcde	66.33 abcd	22.33 bcde	4.33 abcd	31.00 bc
8 Zaragoza	63.33 fgh	6.03 bcd	3.33 bc	169.00 bcde	31.66 hi	25.00 bcd	1.66 h	38.25 ba
9 Zaragoza	67.33 efgh	6.40 bcd	4.00 bc	128.00 efg	42.00 fgh	24.00 bcd	3.33 cde	22.50 defg
10 Zaragoza	87.66 abc	8.40 a	3.50 bc	187.00 abc	51.33 cdefg	44.00 a	3.33 cde	27.00 cde
11 Zaragoza	75.00 cdef	6.85 abc	4.00 bc	142.67 cdefg	51.66 cdefg	14.00 efg	3.00 cde	23.50 def
12 Parras	73.00 def	6.050 bcd	3.50 bc	177.0 abcd	47.50 efgh	19.00 def	3.50 bcde	22.25 defg
13 Parras	58.66 gh	4.93 d	3.50 bc	111.00 fgh	37.50 gh	12.00 fg	2.33 de	15.33 g
14 Parras	71.33 efg	4.93 abc	4.00 bc	135.00 defg	80.00 a	20.50 bcdef	6.00 a	29.66 cd

15 Parras	67.33efgh	4.93 bcd	4.00 bc	148.33 cdef	50.66 defg	19.66 cdef	3.00 cde	41.33 a
P	***	***	***	***	***	***	***	***
%CV	5.746	7.9771	12.6891	10.287	11.2045	15.04	20.97	9.1790

C = control; *** = $p \leq 0.001$ ANOVA; C.V = coefficient of variation.

3.8. Agronomic Characteristics of Onion

Table 8 summarizes the effects of AMF inoculation on greenhouse-grown onion plants. The T6 Saltillo significantly improved PH (89.03%), SD (four times), LN (100%) TFW and TDW (six times) RFW (three times) RL (132.12%), and LFW (ten times) compared to the control. The parameter did not have significant differences between treatments.

Table 8. Average effects (Tukey, $p \leq 0.05$) of AMF on the agronomic parameters of greenhouse-grown onion. The letter in the table is the result of the Tukey comparison test.

T	PH (cm)	SD (mm)	LN	TFW (g)	TDW (g)	RFW (g)	RL (cm)	LFW (g)
C	19.15 efd	1.30 h	3.00 b	2.66 e	1.29 d	1.23 ecd	11.61 gef	1.04 e
1 Saltillo	21.53 ecd	3.33 fbedc	4.66 ba	7.06 cbd	2.90 cb	1.51 becd	14.00 cefd	5.54 cb
2 Saltillo	17.86 ef	2.90 fgedc	3.66 b	4.29 ed	1.35 d	0.32 e	12.50 gefd	2.81 cebd
3 Saltillo	30.65 ba	4.79 ba	4.66 ba	7.91 cb	3.90 b	0.68 ecd	16.35 cebd	4.96 cbd
4 Saltillo	11.90 f	2.15 fgeh	3.33 b	3.16 e	1.59 d	0.453 ed	7.80 g	2.01 ced
5 Saltillo	22.80 becd	3.65 bdc	3.33 b	2.46 e	0.94 d	0.83 ecd	11.93 gef	1.14 e
6 Saltillo	36.20 a	5.42 a	6.0 a	16.09 a	7.88 a	3.65 a	26.95 a	10.90 a
7 Zaragoza	22.95 becd	3.40 bedc	3.33 b	3.49 e	1.37 d	0.683 ecd	21.0 b	3.72 cebd
8 Zaragoza	26.66 bcd	4.10 bac	3.33 b	5.10 ced	2.11 cd	0.98 ecd	15.75 ced	3.90 cebd
9 Zaragoza	23.56 becd	4.45 ba	4.0 b	7.48 cb	3.71 b	1.82 bcd	12.60 gefd	5.56 cb
10 Zaragoza	17.75 ef	4.65 ba	4.0 b	5.23 ced	2.18 cd	1.92 bc	17.00 cbd	1.65 ed
11 Zaragoza	11.40 f	1.93 fgh	3.0 b	3.08 e	0.94 d	0.55 ecd	10.25 gf	1.94 ced
12 Parras	27.87 bc	5.52 a	3.0 b	2.53 e	0.90 d	2.89 ba	9.75 gf	1.21 ed
13 Parras	18.25 ef	2.60 fgedh	3.3 b	2.82 e	1.05 d	0.44 ed	13.10 efd	0.90 e
14 Parras	27.36 bcd	4.76 ba	4.66 ba	8.54 b	4.10 b	1.08 ecd	18.20 cb	6.56 b
15 Parras	22.55 ecd	1.63 h	4.00 b	7.38 cb	3.86 b	1.80 bcd	13.04 efd	6.56 cebd
P	***	***	***	***	***	***	***	***
%CV	12.08	13.60	16.47	17.40	16.84	36.67	11.03	34.93

C = control; *** = $p \leq 0.001$ ANOVA; C.V = coefficient of variation.

4. Discussion

4.1. Effects of Host Species on AMF Colonization

AMF comprises more than one spore morphotype [21] and influences the growth and nutrient absorption of a certain plant species [22]. The physicochemical characteristics of soil that influence AMF diversity [23] are the pH, EC, OM, soil nutrients, and the host species [24,25]. There is evidence that each terrestrial plant species in symbiosis hosts more than one type of AMF [26]. However, the specificity of symbiosis can be at the species, family or ecological level [27,28]. Too little is known about the local and global distribution of AMF to understand their biogeography [29,30]. The results of this study demonstrate that the origin and physicochemical composition of the soil influences the diversity of AMF spores. Six treatments were collected from the Saltillo location, followed by five from Zaragoza and four from Parras. High genetic variation between species, and even between spores, has been shown at the molecular level, resulting in an increase in AMF diversity [27].

That being said, the morphological separation and monosporic inoculation carried out permits a deeper understanding of the true effects a single spore can have (a single species) on cucumber, melon, tomato, and onion plants. Nevertheless, the efficiency or inefficiency of the resulting symbiosis is regulated by the fertility of the soil at the time of inoculation, the level of disturbance at the site and probably, the co-adaptation with the partner species [28].

Based on the results obtained, T1 Saltillo in tomato has the necessary genetic conditions for greater sporulation and adaptation to greenhouse conditions compared to the other treatments and hosts. Studies show that the success of symbiosis and the development of spores is influenced by the environment, i.e., the ability to adapt to a new environment and period of inoculation [23]. Accordingly, the four host species are amenable to AMF spores. Previously, it was believed that the medium and host species had no effect on AMF [29]. However, the results obtained in this study demonstrate that the host species and environment play an important role in the successful establishment and sporulation of AMF. Chitin is known to stimulate the development and sporulation of AMF [30]. In this case, it may be that the tomato plant's chitinase defense mechanism presents a more localized or refined response to AMF colonization than the onion, cucumber, or melon plants [31].

In prior studies performed with greenhouse-grown wheat, 12 out to 21 native AMF morphotypes resulted in successful symbiosis following monosporic inoculation under conditions dissimilar to their natural habitat [25]. It can be said that the 15 evaluated AMF treatments possess the capacity to adapt to media completely different to their natural habitat with differing levels of affinity.

4.2. Effects of AMF Colonization on Host Species

The results are in line with the knowledge that AMF in mutualistic symbiosis stimulates the growth, photosynthesis, and absorption of nutrients in a wide range of host species. It should be emphasized that plants of the family *Cucurbitaceae* belong to those species in which the establishment of symbiosis is successful [32]. The T5 Saltillo increased cucumber plant vigor, as well as TFW and RFW, leading to a greater capacity for nutrient absorption as seen previously with spore inoculation under saline conditions [33]. In terms of FLN, PH, LN, and TDW parameters, the T8 Zaragoza, T10 Zaragoza, and T15 Parras were worse than the control, so they represent inocula without potential. Another study where three combinations of AMF, VT (*Claroideoglomus* sp., *Funneliformis* sp., *Diversispora* sp.,

Glomus sp., and *Rhizophagus* sp.), BF (*Glomus intraradices*, *G. microageregatum* BEG, and *G. Claroideum* BEG 210), and Fm (*Funneliformis mosseae*) were used to inoculate cucumber (*Cucumis sativus* L. cv.

Zhongnong No. 106) plants found successful symbioses at 46 days after inoculation. The PH, SD, TDW, and RL increased significantly compared to the non-inoculated control [7]. A different study inoculated *Cucumis sativus* cv. Super N3 with *Glomus mosseae* under hydroponic conditions and found that inoculation with 1000 or 2000 spores resulted in increased shoot and root fresh weight, compared to their control. The 1000 spore inoculum was also able to increase antioxidant activity and phenol content [34].

AMF improve the absorption and translocation of mineral nutrients thanks to their ability to reach beyond the rhizosphere, which is reflected in the growth and development of the melon plants and other Cucurbitaceae [35]. Nevertheless, the TFW parameter did not show significant differences between treatments. A separate experiment involving melon inoculated with *Glomus intraradices*, *Glomus mosseae*, *Glomus claroideum*, and *Glomus constrictum*, and challenged with *Fusarium* found a reduction in plant fresh weight and a failure to suppress the infection [8]. Regardless, the inoculation treatments in this experiment positively favored the melon plants.

A study of three tomato cultivars (PKM-1, Gaurav, and Monarch) inoculated with *Glomus fasciculatum* demonstrated improvements in plant height, fresh shoots, root length, and root dry weight compared to the non-inoculated control [9]. The Monarch cultivar benefited the most. After 30 days of cultivation, the dry shoot and root weights of inoculated Monarch plants were more than four times greater than the control. The Gaurav cultivar had the greatest biomass and dry weight production. In the present study, there was a significant, positive response (Tukey's, $p \leq 0.05$) in the PH, TFW, TDW, RFW, RDW, and RL of inoculated tomato plants.

Of the 15 inoculation treatments, four had outstanding effects on the previously mentioned parameters. These were the T5 Saltillo, T10 Zaragoza, T14 Parras and T15 Parras. A systematic quantitative analysis demonstrated that inoculation with AMF increases plant biomass by up to 34.9%, compared to non-inoculated plants. The same analysis found that inoculating with a single species yields an average improvement of 41.2% in plant growth, compared to inoculation with multiple species [30].

The genus *Allium* has been found to depend more on AMF than other plants due to their scarce radicular branching and lack of root hairs. There is also evidence that onion genetics influence the response to mycorrhizal symbiosis [36]. Based on the previous information, T6 Saltillo represents a promising inoculation candidate for the greenhouse production of onion.

5. Conclusions

The native endomycorrhizas associated with *Helianthus annuus* L. wild and accustomed to different soil physicochemical conditions were able to establish symbiosis with a single spore in the four horticultural crops. The growth and development of cucumber plants was favored by treatment with the T1 Saltillo, T5 Saltillo, T6 Saltillo, T9 Zaragoza, and T13 Parras AMF. The melon and onion plants benefited the most with the T6 Saltillo. The T5 Saltillo, T10 Zaragoza, T14 Parras, and T15 Parras treatments favored the tomato plants. Overall, the single spore treatments of AMF from Saltillo elicited the best responses in the greenhouse-grown crops.

Author Contributions: Conceptualization, R.M.-V.; methodology, A.G.; formal analysis, V.R.-T.; investigation, F.S.-H.; writing—original draft preparation, F.S.-H.; writing—review and editing, R.M.-V.; supervision, R.M.-V.; project administration, R.M.-V.

Funding: UAAAN for the economic support to the project 2157, and to the CONACyT for the Scholarship awarded to carry out the project.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Brundrett, M. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol. Rev.* **2004**, *78*, 473–495. [CrossRef]
2. Van Der, H.M.; Martin, F.M.; Selosse, M.A.; Sanders, I.R. Mycorrhizal ecology and evolution: The past, the present, and the future. *New Phytol.* **2015**, *205*, 1406–1423. [CrossRef]
3. Brundrett, M.; Tedersoo, L. Evolutionary history of mycorrhizal symbiosis and global host plant diversity. *New Phytol.* **2018**, *220*, 1108–1115. [CrossRef]
4. Gosling, P.; Jones, J.; Bending, G.D. Evidence for functional redundancy in arbuscular mycorrhizal fungi and implications for agroecosystem management. *Mycorrhiza* **2016**, *26*, 77–83. [CrossRef]
5. Baum, W.C.; Tohamy, N.G. Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi: A review. *Sci. Hort.* **2015**, *18*, 131–141. [CrossRef]
6. Santander, C.; Sanhueza, M.; Olave, J. Arbuscular Mycorrhizal Colonization Promotes the Tolerance to Salt Stress in Lettuce Plants through an Efficient Modification of Ionic Balance. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **2019**. [CrossRef]
7. Haghghi, M.; Mohammadnia, S.; Attai, Z.; Pessarakli, M. Effects of mycorrhiza inoculation on cucumber growth irrigated with saline water. *Plant Nutr.* **2016**, *40*, 128–137. [CrossRef]
8. Martínez-Medina, A.; Pascual, J.A.; Loret, E.; Roldán, A. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* and their effects on *Fusarium* wilt in melon plants grown in seedling nurseries. *Sci. Food Agric.* **2009**, *89*, 1843–1850. [CrossRef]
9. Vani, M.S.; Hindumathi, A.; Reddy, B.N. Beneficial effect of arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus fasciculatum* on plant growth and nutrient uptake in tomato. *Ind. Phytopathol.* **2018**, *71*, 115–122. [CrossRef]
10. Koyama, A.; Pietrangelo, O.; Sanderson, L.; Antunes, P.M. An empirical investigation of the possibility of adaptability of arbuscular mycorrhizal fungi to new hosts. *Mycorrhiza* **2017**, *27*, 553–563. [CrossRef]
11. Rúa, M.A.; Antonika, A.; Antunes, P.M.; Chaudhary, B.V.; Gehring, C.; Lamity, L.J.; Piculell, B.J.; Bever, J.D.; Zabinski, C.; Meadow, J.F.; et al. Home-field advantage? Evidence of local adaptation among plants, soil, and arbuscular mycorrhizal fungi through meta-analysis. *BMC Evol. Biol.* **2016**, *16*, 122. [CrossRef]
12. Lumini, E.; Orgiazzi, A.; Borriello, R.; Bonfante, P.; y Bianciotto, V. Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach. *Environ. Microbiol.* **2010**, *12*, 2165–2179. [CrossRef]
13. Caruso, C.; Maucieri, C.; Barco, A.; Barbera, A.C.; Borin, M. Effects of mycorrhizal inoculation and digestate fertilisation on triticale biomass production using fungicide-coated seeds. *Irish J. Agric. Food Res.* **2018**, *57*, 42–51. [CrossRef]
14. Bouyoucos, G.S. Directions for making mechanical analysis of soil by hydrometer method. *Soil Sci.* **1936**, *4*, 225–228. [CrossRef]
15. Olsen, S.R.; Cole, C.V.; Watanabe, F.S.; Dean, L.A. *Estimation of Available Phosphorus in Soils by Extraction with Sodium Bicarbonate*; U. S. Department of Agriculture Circular 939; Banderis, A.D., Barter, D.H., Anderson, K., Agricultural and Advisor; United States Department of Agriculture: Washington, DC, USA, 1954; pp. 344–348.
16. Bornemisza, E. Organic carbon determination by the Walkley-Black and dry combustion in surface soils and andepte profiles from Costa Rica. *Soil Sci.* **1979**, *43*, 78–83. [CrossRef]
17. *International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi*; INVAM: Morgantown, WV, USA, 2016.
18. Walker, C. A simple blue staining technique for arbuscular mycorrhizal and other root-inhabiting fungi. *Inoculum* **2005**, *56*, 68–69.
19. McGonigle, T.P.; Miller, M.H.; Evans, D.G.; Fairchild, G.L.; Swan, J.A. A new method that gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* **1990**, *115*, 495–501. [CrossRef]
20. Gerdemann, J.W.; Nicolson, T.H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br Mycol Soc* **1963**, *46*, 235–244. [CrossRef]

21. Oehl, F.; Sieverding, E.; Ineichen, K.; Mäder, P.; Boller, T.; Wiemken, A. Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of central Europe. *Appl. Environ. Microb.* **2003**, *69*, 2816–2824. [CrossRef]
22. Ruscitti, M.; Arango, M.; Beltrano, J. Improvement of copper stress tolerance in pepper plants (*Capsicum annuum* L.) by inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. *Theor. Exp. Plant Phys.* **2017**, *29*, 37–49. [CrossRef]
23. Hernández, H.F.S.; Mendoza, V.R.; Robledo, T.V.; Gallou, A.; Cardenas, F.A.; Valdez, A.L.A. Assessment and morphological characterization from isolates of native mycorrhizal associated with tomatillo. *Rev. Mex. Cienc. Agric.* **2015**, *12*, 2277–2289.
24. Abbott, L.K.; Robson, A.D. The role of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture and the selection of fungi for inoculation. *Aust. J. Agric. Res.* **1982**, *33*, 389–408. [CrossRef]
25. Abbott, L.K.; Robson, A.D.; Hall, I.R. Introduction of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi into agricultural soils. *Aust. J. Agric. Res.* **1983**, *34*, 741–749. [CrossRef]
26. Öpik, M.; Metsis, M.; Daniell, T.J.; Zobel, M.; Moora, M. Large-scale parallel 454 sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest. *New Phytol.* **2009**, *184*, 424–437. [CrossRef]
27. Stockinger, H.; Walker, C.; Schüßler, A. 'Glomus intraradices DAOM197198', a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not Glomus intraradices. *New Phytol.* **2009**, *183*, 1176–1187. [CrossRef]
28. Davison, J.; Moora, M.; Öpik, M.; Adholeya, A.; Ainsaar, L.; Bâ, A.; Burla, S.; Diedhiou, A.G.; Hiesalu, I.; Jairus, T. Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science* **2015**, *349*, 970–973. [CrossRef]
29. Hart, M.M.; Aleklett, K.; Chagnon, P.; Egan, C.; Ghignone, S.; Pickles, B.J.; Hart, M.M. Methods navigating the labyrinth: A guide to sequence-based, community ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* **2015**, *207*, 235–247. [CrossRef]
30. Van Geel, M.; De Beenhouwer, M.; Lievens, B. Crop-specific and single-species mycorrhizal inoculation is the best approach to improve crop growth in controlled environments. *Agron. Sustain. Dev.* **2016**, *36*, 37. [CrossRef]
31. Milan, G.; Jansa, J.; Hršelová, H.; Chvátalová, I.; Vosátka, M. Chitin stimulates development and sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Soil Ecol.* **2003**, *22*, 283–287. [CrossRef]
32. Ramírez, R.G.; Rodríguez, A. Plant defense mechanisms and responses in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: A review. *Rev. Colomb. Biotechnol.* **2012**, *14*, 271–284.
33. Elbon, A.; Whalen, J.K. Phosphorus supply to vegetable crops from arbuscular mycorrhizal fungi: A review. *Biol. Agric. Hortic.* **2015**, *31*, 73–90. [CrossRef]
34. Shuangchen, C.; Zhao, H.; Zou, C.; Li, Y.; Chen, Y.; Wang, Z.; Jiang, Y.; Liu, A.; Zhao, P.; Wang, M.; et al. Combined Inoculation with Multiple Arbuscular Mycorrhizal Fungi Improves Growth, Nutrient Uptake and Photosynthesis in Cucumber Seedlings. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2516. [CrossRef]
35. Haghghi, M.; Mozafariyan, M.; Abdolahi-pour, B. Effect of cucumber mycorrhiza inoculation under low and high root temperature grown on hydroponic conditions. *J. Crop Sci. Biotechnol.* **2015**, *18*, 89. [CrossRef]
36. Taylor, A.; Pereira, N.; Thomas, B. Growth and nutritional responses to arbuscular mycorrhizal fungi are dependent on onion genotype and fungal species. *Biol. Fertil Soils* **2015**, *51*, 801–813. [CrossRef]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

SEGUNDO ARTÍCULO

AISLAMIENTO E INOCULACIÓN DE HONGOS MICORRÍICOS
 ARBUSCULARES NATIVOS EN CUCURBITACEAE Y SOLANACEAE EN
 INVERNADERO

1 *Artículo 2*

2 AISLAMIENTO E INOCULACIÓN DE HONGOS MICORRÍMICOS ARBUSCULARES NATIVOS EN
3 CUCURBITACEAE Y SOLANACEAE EN INVERNADERO

4 ISOLATION AND INOCULATION OF NATIVE ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN
5 CUCURBITACEAE AND SOLANACEAE IN THE GREENHOUSE

6 Flor S. Hernandez Hernández¹; Rosalinda Mendoza Villarreal^{2*}, Valentín Robledo Torres², Miguel
7 Angel Pérez Rodríguez³, Pablo Preciado Rangel⁴

8 ¹Estudiante de Doctorado en Agricultura Protegida, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro,
9 Departamento de Horticultura, Saltillo, Coahuila, México.

10 ² Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Horticultura, Saltillo, Coahuila,
11 México.

12 ³ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Botánica, Saltillo, Coahuila,
13 México.

14 ⁴ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Horticultura Unidad laguna,
15 Torreón, Coahuila, México.

16 Correspondencia: *rosalindamendoza@hotmail.com 844-8067114

17 Flor Silvestre Hernández Hernández. <https://orcid.org/0000-0002-2069-2644>

18 Rosalinda Mendoza Villarreal. <https://orcid.org/0000-0002-0600-4358>

19 Valentín Robledo Torres. <https://orcid.org/0000-0001-5235-6584>

20 Miguel Angel Pérez Rodríguez. <https://orcid.org/0000-0001-8023-8489>

21 Pablo Preciado Rangel. <https://orcid.org/0000-0002-3450-4739>

22

23 RESUMEN

24 La presente investigación tiene como objeto identificar y evaluar tres aislados de HMA en hortalizas
25 de importancia económica bajo invernadero. Las esporas se extrajeron a través de tamizado
26 húmedo y decantación de la rizosfera de pepino (aislado a), melón (aislado b) y tomate (aislado c).
27 Se trabajó con seis tratamientos, 27 repeticiones bajo un diseño completamente al azar. Los
28 aislados se identificaron a nivel molecular a partir de una sola espora en la Mycothèque de
29 l'Université catholique de Louvain (MUCL). Se inocularon ± 35 esporas por planta y se fertilizaron
30 con solución Steiner modificada en fósforo al 50%. Se evaluó diámetro de tallo (DT), longitud de
31 tallo (LT), peso fresco total (PFT), longitud de raíz (LR), firmeza (FZA), rendimiento (RTO),
32 colonización y número de esporas. Los resultados de identificación molecular mostraron que la
33 secuencia de las tres clonas del aislado a, b y c muestran alta similitud con un 100%, 99.49% y
34 98.94% respectivamente, con secuencia de *Rizophagus irregularis*. Los resultados agronómicos a
35 través del análisis de varianza (ANOVA) factorial y prueba de comparación de medias Tukey (\leq
36 0.05) demostraron que la inoculación de *R. irregularis* favorece significativamente al cultivo de
37 tomate incrementando hasta en un 258.35% el RTO en comparación del factor 6 (tomate sin *R.*
38 *irregularis*) por lo que representa alto potencial de inóculo bajo condiciones de invernadero en
39 comparación de los demás tratamientos.

40 Palabras clave: *R. irregularis*, pepino, tomate, melón.

41 ABSTRACT

42 The objective of the present investigation is to identify and evaluate three AMF isolates in
43 vegetables of economic importance under greenhouse conditions. The spores were extracted

44 through humid sieving and decanting of the rhizosphere of cucumber (isolated), melon (isolated b)
45 and tomato (isolated c). We worked with six treatments, 27 repetitions under a completely random
46 design. The isolates were identified at the molecular level from a single spore in the Mycothèque
47 de l'Université catholique de Louvain (MUCL). They were inoculated \pm 35 spores per plant and
48 fertilized with Steiner solution modified in 50% phosphorus. Stem diameter (DT), stem length (LT),
49 total fresh weight (PFT), root length (LR), firmness (FZA), yield (RTO), colonization and number of
50 spores were evaluated. The results of molecular identification showed that the sequence of the
51 three clones of isolates a, b and c show high similarity with 100%, 99.49% and 98.94% respectively,
52 with sequence of *Rizophagus irregularis*. The agronomic results through the analysis of variance
53 (ANOVA) and factorial comparison test Tukey (≤ 0.05) showed that the inoculation of *R. irregularis*
54 significantly favors the tomato crop increasing up to 258.35% the RTO compared to the factor 6
55 (tomato without *R. irregularis*) so it represents high inoculum potential under greenhouse conditions
56 compared to the other treatments.

57 Keywords: *R. irregularis*, pepino, tomate, melon.

58

59 INTRODUCCIÓN

60 Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) son bioestimulantes naturales que en asociación
61 simbiótica ayudan a mejorar la eficiencia nutricional, tolerancia a estrés tanto biótico como abiótico,
62 mejorando así la calidad de las plantas (Lucini et al., 2019). Múltiples investigaciones reportan que
63 los HMA son altamente eficientes en el crecimiento de las plantas, sin embargo, esto puede variar
64 ampliamente provocando en algunos eventos depresiones de crecimiento micorrícico por las
65 cuales las plantas acumulan menos biomasa que una planta control no micorrizada (Watts et al.,

66 2019). Por lo tanto, es necesario tener conocimiento del funcionamiento de los HMA así como la
67 interacción planta-hongo para comprender los factores que influyen en su respuesta, por ejemplo,
68 maíz (*Zea mays*), el puerro (*Allium porrum*) y Medicago (*Medicago truncatula*) muestran respuestas
69 de crecimiento positiva cuando establecen simbiosis con HMA, particularmente en condiciones
70 deficientes de nutrientes del suelo (Plenchette et al.,1983). Sin embargo, existen reportes que
71 especies de trigo (*Triticum aestivum*) y cebada (*Hordeum vulgare*) no responden o incluso hay
72 respuesta negativa a la inoculación de HMA (Zhu et al., 2003, Watts et al., 2019).

73 La respuesta de la interacción hongo- planta es impresionantemente variable entre genotipos de la
74 misma especie de planta y entre especies o aislados de HMA (Watts et al.,2019). Existen reportes
75 que un alto porcentaje de hortalizas establecen simbiosis (Baum et al.,2015), sin embargo, la
76 mayoría de los estudios realizados están enfocados a la respuesta en campo abierto (Ávila et
77 al.,2015) pero hacen falta estudios bajo condiciones de invernadero y sustrato (Nelson y Nelson,
78 2015; Oseni et al., 2010; Carpio et al., 2005).

79 Cultivos vegetales como Amaryllidaceae (Cebolla, puerro), Apiaceae (Zanahoria), Asteraceae
80 (Lechuga), Cucurbitaceae (pepino), Fabaceae (Frijol y guisante) y Solanaceae (tomate y pimiento)
81 se han reportado con alta dependencia micorrícica (Baum et al.,2015), por lo tanto, la inoculación
82 de hortalizas con HMA puede ser rentable y existen productos de inoculación comercial disponible,
83 no obstante, el efecto que ejerza bajo condiciones de invernadero se verán influenciadas por la
84 cepa de HMA, la especie de la planta, así como las condiciones de crecimiento (Corkidiet al., 2004)
85 y es importante señalar que los HMA de origen comercial pueden estar en desventaja por la
86 competitividad con los microorganismos del suelo, por lo que se recomienda utilizar cepas nativas
87 (Caldera et al., 2013).

88 De acuerdo con lo citado anteriormente nos indica la necesidad de desarrollar bioinoculantes de
89 HMA en base a las necesidades del hongo como de la planta, por lo tanto, la presente investigación
90 tiene como objetivo identificar a nivel molecular un aislado de origen nativo e inocularlo en plantas
91 de pepino, melón y tomate bajo condiciones de invernadero y estudiar el efecto que ejercen a nivel
92 agronómico.

93 MATERIALES Y MÉTODOS

94 La investigación se desarrolló en 2016 y 2017 en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
95 ubicado en Saltillo, Coahuila, México (23° 37" N y 100° 38" O, con una altitud de 1581 m).

96 Material biológico

97 Las esporas (inóculo) de HMA utilizadas en el experimento se extrajeron de la rizosfera de plantas
98 de pepino (aislado a), melón (aislado b) y tomate (aislado c) siguiendo la metodología establecida
99 por Hernández et al., (2019). Las macetas eran bolsas de vivero negra de 5 litros de capacidad en
100 condiciones de invernadero en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en suelo franco
101 arenoso, pH promedio de 7.8, CE 2.8 ds/m, temperatura y humedad relativa promedio de 8
102 am=16.5 °C, 77%; 2pm=36.3 °C, 30 %; 8 pm=20.2 °C, 56%. La extracción de esporas se realizó
103 como lo describe Hernández et al. (2019).

104 Identificación molecular

105 La identificación se realizó de una sola espora por cada aislado en la Mycothèque de l'Université
106 catholique de Louvain (MUCL, parte de las colecciones coordinadas de microorganismos de
107 Bélgica (BCCM), basada en la secuencia de ADN utilizando una región de 1500 pb que cubre parte
108 de la SSU. Las regiones ITS y D1 / D2 del ADN ribosomal LSU, como lo describen Krüger et al.
109 (2009).

110 La edición y el ensamble de las secuencias se realizó en el programa BioEdit 7.2.0 (Hall, 1999).
111 Las secuencias correspondientes a cada región fueron depositadas en el GenBank y comparadas
112 por el "Basic Logic Alignment Tool" (BLAST) de la base de datos del National Center for
113 Biotechnology Information (NCBI).

114 Siembra de material vegetal

115 Se esterilizó en autoclave (modelo FE- 398) peat moss a 15 libras de presión (lb in⁻²) por 30 minutos
116 durante tres tiempos separados. Se germinó la semilla de pepino centauro, melón magno F1 y
117 tomate Hib MX7047 Syngenta en charolas de unicel de 200 cavidades y se mantuvieron por 15
118 días en la cámara de germinación, la plántula se trasladó al invernadero donde fueron
119 trasplantadas.

120 Las especies de estudio se trasplantaron en peat moss/ perlita estéril en una relación 2:1 en
121 macetas de vivero negras de 5 litros de capacidad, las macetas se regaron a capacidad de campo.
122 La inoculación monoespecífica se realizó colocando \pm 35 esporas en la raíz lateral de la planta un
123 día después del trasplante.

124 Diseño del experimento

125 El experimento se estableció con 6 tratamientos (\pm 35 esporas de HMA por planta por especie de
126 planta + fertilización Steiner modificada en fósforo al 50%) y control por especie de planta (sin
127 HMA+ fertilización Steiner modificada en fósforo al 50%) con 27 repeticiones bajo un diseño
128 completamente al azar de cada especie estudiada.

129 Manejo del cultivo

130 Las plantas se fertilizaron mediante un sistema de riego por goteo con una solución Steiner
131 modificada en fósforo al 50 %, se aplicaron 2 litros de solución nutritiva diariamente por maceta
132 distribuida en tres riegos (8:00 am, 2:00 y 8:00 pm). El pH promedio fue de 7.8, CE 2.8 ds/m,

133 temperatura mínima promedio de 26.5°C y máxima de 49.3 °C, humedad relativa promedio 88%.

134 Se realizaron labores de poda, control químico con imidacloprid para mosquita blanca y paratrioza,
135 clorotalonil y cúprico para cenicilla y tizón temprano.

136 Los cultivos se mantuvieron 90 días después del trasplante (ddt), donde se realizaron evaluaciones
137 de: diámetro de tallo con vernier digital Caliper (DT), longitud de tallo (LT), longitud de raíz (LR) con
138 cinta métrica, peso seco total (PST), peso fresco total (PFT) con balanza analítica (Mettler AJ100
139 y Ohaus EP114C), firmeza con penetrómetro (WAGNER), rendimiento (RTO), número de esporas
140 y colonización.

141 Determinación de porcentaje de colonización y número de esporas

142 Se lavaron las raíces de los 6 tratamientos x 27 repeticiones con agua corriente. Se fragmentaron
143 en porciones de 1 cm de longitud siguiendo la técnica de clarificación-tinción de raíces (Walker et
144 al., 2005). Posteriormente los fragmentos de raíz se montaron de manera vertical sobre porta
145 objetos (3 laminillas por planta con 100 observaciones) agregando una gota de glicerol acidificado.
146 Se observaron en microscopio compuesto (Olympus CX21) y para la estimación de colonización
147 se utilizó la metodología de McGonigle et al., (1990).

148 Se realizó una extracción de 100 gramos de sustrato por maceta por cultivo para conteo de
149 esporas, se utilizó un microscopio estereoscópico (Olympus SZ51) siguiendo la técnica modificada
150 de Gerdemann y Nicholson, (1963).

151 Análisis estadístico

152 Para el procesamiento de los datos se utilizó el paquete Statistical Analysis Systems (SAS) 2013,
153 que incluyó un análisis de varianza (ANOVA) bifactorial y prueba de comparación de medias Tukey
154 (≤ 0.05). sin interacciones (efectos principales e interacciones)

155 RESULTADOS

156 Identificación molecular.

157 El análisis realizado con la herramienta BLAST en la base de datos del NCBI mostró que la
158 secuencia de las tres clonas del aislado a, b y c muestran alta similitud con secuencia de *R.*
159 *irregularis* por ejemplo HF968934.1, JN417525.1 y JN417521.1 como se observa en la Tabla 1, 2
160 y 3 confirmando así su identificación como *R. irregularis*.

161 Variables agronómicas

162 En la Tabla 4 se observa que en la variable DT, LR y FZA la mejor interacción entre los niveles del
163 factor A y el factor B es la 1 (Melón con *R. irregularis*) superando al factor 4 (Melón sin *R. irregularis*)
164 incrementando hasta en un 126.3 %, 159.51 % y 121.59 % respectivamente.

165 En la variable LT, PFT y PST observamos que la interacción 2 (Pepino con *R. irregularis*) favorece
166 significativamente el incremento de estas hasta en un 136.34%, 121.26% y 130.84%
167 respectivamente en comparación con el factor 5 (Pepino sin *R. irregularis*), sin embargo, la
168 interacción 3 (Tomate con *R. irregularis*) es la mejor interacción en cuanto al incremento del RTO
169 hasta en un 258.35% en comparación del factor 6 (Tomate sin *R. irregularis*).

170 Como se puede observar en la Tabla 5 la mejor interacción entre los niveles del factor A y el factor
171 B es la numero 2 (Pepino con *R. irregularis*) mostrando diferencia significativa en la variable
172 colonización entre los demás tratamientos, sin embargo, en número de esporas no existe diferencia
173 significativa entre tratamientos.

174 DISCUSIÓN

175 La riqueza de HMA aún no se conoce bien y la identificación se ha basado históricamente en la
176 morfología de la espora (forma, tamaño, ornamentación superficial, color, paredes de la espora,
177 unión hifal y reacción a las soluciones de tinción, por ejemplo, Metzler), sin embargo, este análisis
178 requiere de tiempo y experiencia especializada debido a la limitada diferenciación fenotípica entre

179 taxones (Badri et al.,2016). Este problema impacta de forma negativa el desarrollo de inoculantes
180 comerciales, así como el monitoreo continuo de la calidad del producto, vida útil del producto
181 formulado, así como su monitoreo en suelo y raíz del cultivo. Estudios moleculares han permitido
182 mayor exactitud y precisión en cuanto a la identificación de HMA (Filion et al. 2003; Alkan et al.
183 2004; Isayenkov et al. 2004; Kiers et al. 2011, Thonar et al. 2012, Couillerot et al. 2013). Mismas
184 herramientas que permitieron la identificación del aislado de HMA a partir de una espora, donde de
185 acuerdo con el análisis molecular la cepa fue identificada como *Rhizophagus irregularis*.

186 La especie *R. irregularis* es una de las más difundidas y comunes que se han recuperado a nivel
187 mundial en suelos agrícolas y naturales, así como aislados (DAOM-197198) que se han utilizado
188 como inoculante comercial durante dos décadas (Badri et al.,2016). A pesar de la importancia
189 ecológica y económica de este taxón los marcadores específicos para cuantificación de propágulos
190 por PCR son extremadamente limitados y la identificación no deja de ser complicada por la
191 naturaleza de los HMA (Alkan et al. 2006; Gamper et al. 2008).

192 Estudios realizados sobre los efectos benéficos de *R. irregularis* y *Trichoderma asperellum* cepa
193 T34 sobre el crecimiento y el marchitamiento por *Fusarium* en plantas de tomate demostraron que
194 T34 y *R. irregularis* aumentaron la altura de la planta en la misma medida, en comparación con
195 las plantas control y las plantas enfermas. *R. irregularis* dio los niveles más altos de clorofila,
196 seguido de T34 y plantas de control; T34 y *R. irregularis* tuvieron efectos similares sobre la
197 captación de Ca, Mg, S, Mn, B y Si en las plantas de tomate, pero *R. irregularis* indujo una mayor
198 acumulación de P, K, Zn, Cu y Mo que T34 (Bidellaoui et al.,2018). En el presente estudio tras la
199 inoculación de *R. irregularis* en las variables DT, LT, PFT, PST, LR y FZA la interacción no mostró
200 diferencia significativa, sin embargo, el RTO se duplicó en comparación de los demás tratamientos.
201 El efecto promotor de crecimiento, mayor absorción de agua y nutrientes que proporciona el HMA,

202 se vio reflejado en el rendimiento de plantas de pepino explicando así la eficiencia de la cepa nativa
203 aislada.

204 Por otro lado, estudios realizados con el objetivo de determinar el efecto de mitigación de la HMA
205 sobre el crecimiento y los cambios metabólicos de pepino bajo estrés salino, inocularon cepas de
206 HMA (*Claroideoglossum etunicatum* ; *Rhizophagus intraradices* y *Funneliformis mosseae* aisladas
207 previamente y se demostró que la inoculación de HMA mejoró la biomasa, la síntesis de
208 pigmentos, la actividad de las enzimas antioxidantes, incluida la superóxido dismutasa, catalasa ,
209 peroxidasa de ascorbato y glutatión reductasa, y el contenido de ácido ascórbico, que podría ser
210 el resultado de una peroxidación lipídica de nivel inferior y fugas de electrolitos. Además, el ácido
211 jasmónico, el ácido salicílico y varios elementos minerales importantes (K, Ca, Mg, Zn, Fe, Mn y
212 Cu) se mejoraron con reducciones significativas en la absorción de iones nocivos como el Na
213 +; estos resultados sugieren que la HMA puede proteger el crecimiento del pepino del estrés por
214 sal (Hashem et al.,2018). En la presente investigación la cepa de *R. irregularis* mejoró
215 significativamente la LT, PFT y PST de las plantas de pepino bajo condiciones de invernadero y a
216 dosis baja de fertilización, además que las plantas de pepino establecieron mayor porcentaje de
217 colonización, por lo tanto, la evidencia de una mayor absorción de nutrientes en las plantas se
218 confirma a través de las acciones de los HMA (Kohler et al., 2009 , Tang et al., 2009),
219 desencadenando así la promoción del crecimiento de *C. sativus* , que se correlaciona con mayor
220 absorción de nutrientes (Hajiboland et al., 2010 , Porcel et al., 2015 , Yang et al., 2015) aunado a
221 ello mayor acumulación de biomasa. En el cultivo de melón con la inoculación de *R. irregularis* los
222 efectos se reflejaron en el DT, LR y firmeza lo que atribuimos el mismo modo de acción que en
223 pepino.

224

225 CONCLUSIONES

226 Se identificó a nivel molecular *Rhizophagus irregularis*. La cepa nativa de *R. irregularis* incrementa
227 el rendimiento del cultivo de tomate bajo condiciones de invernadero con 50% de fertilización
228 fosforada lo que representa una alternativa sustentable para la agricultura orgánica y un ahorro en
229 la economía al disminuir el costo de los fertilizantes fosfatados.

230 LITERATURA CITADA

231 Alkan N, Gadkar V, Coburn J, Yarden O, Kapulnik Y (2004) Quantification of the arbuscular
232 mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in host tissue using real-time polymerase chain
233 reaction. *New Phytol* 161:877–885.

234 Alkan N, Gadkar V, Yarden O, Kapulnik Y (2006) Analysis of quantitative interactions between two
235 species of arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus mosseae* and *G. intraradices*, by real-time
236 PCR. *Appl Environ Microbiol* 72:4192–4199.

237 Amine B, Franck OPS, Geneviève L, Line RA, Denis B, Agathe V, Mohamed H (2016) Molecular
238 diagnostic toolkit for *Rhizophagus irregularis* isolate DAOM-197198 using quantitative PCR
239 assay targeting the mitochondrial genome. *Mycorrhiza*. 26 (7): 721-33. doi: 10.1007 /
240 s00572-016-0708-1.

241 Ávila PO, Mendoza. VR, Valdez ALA, Rodríguez CM, Hernández PA y Cárdenas FA (2015)
242 Growth and nutritional status of tomato in response to organic substrates and mycorrhizal
243 fungi. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 12: 2409-2422.

244 Bidellaoui B, Segarra G, Hakkou, A (2019) Beneficial effects of *Rhizophagus*
245 *irregularis* and *Trichoderma asperellum* strain T34 on growth and fusarium wilt in tomato
246 plants. *J Plant Pathol*, 101: 121. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0159-y>.

- 247 Baum C, El-Tohamy W, Gruda N (2015) Increasing the productivity and product quality of vegetable
248 crops using arbuscular mycorrhizal fungi: A review, *Scientia Horticulturae*, 187:131-141
249 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.002>.
- 250 Caldera E, Acosta K, Garcés G, Petit B, Gutiérrez W. and Pérez C (2013) Response of a catatumbo
251 variety bean crop (*Vignaun guiculata* L. Walp) to native and commercial mycorrhizal
252 inoculant sunder controlled conditions. *Venezuela. Redie luz*. 3(1 y 2):157-164.
- 253 Carpio A.L, Davies FT and Arnold MA (2005) Arbuscularmycorrhizal fungi, organic and inorganic
254 controlled-release fertilizers: effect on growth and leachate of container-grown bush morning
255 glory (*Ipomoea carnea* ssp. f istulosa) under high production temperatures. *Estados*
256 *Unidos. J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130(1):131-139.
257 <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.10.033>.
- 258 Corkidi L, Allen EB, Merhaut D, Alle MF, Downer J, Bohn, J and Evans M. (2004) Assessing the
259 infectivity of commercial mycorrhizal inoculants in plant nursery conditions. *Corea. J.*
260 *Environ. Hort.* 22(3):149-154.
- 261 Couillerot O, Ramirez-Trujillo A, Walker V, Von Felten A, Jansa J, Maurhofer M, Défago G, Prigent-
262 Combaret C, Comte G, Caballero-Mellado J, Moënné-Loccoz Y (2013) Comparison of
263 Mycorrhiza Author's personal copy prominent *Azospirillum* strains in *Azospirillum-*
264 *Pseudomonas, Glomus* consortia for promotion of maize growth. *Appl Microbiol Biotechnol*
265 97:4639–4649.
- 266 Filion M, St-Arnaud M, Jabaji-Hare SH (2003) Direct quantification of fungal DNA from soil substrate
267 using real-time PCR. *J Microbiol Methods* 53:67–76.

- 268 Gamper HA, Young JPW, Jones DL, Hodge A (2008) Real-time PCR and microscopy: are the two
269 methods measuring the same unit of arbuscular mycorrhizal fungal abundance? *Fungal*
270 *Genet Biol* 45: 581–596.
- 271 Gerderman J. and Nicholson T (1963) Spores of mycorrhizal endogene species extracted from soil
272 by wet sieving and decanting *J. BMS.* 46, 235-244.
- 273 Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program
274 for
275 Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- 276 Hashem A, Alqarawi AA, Radhakrishnan R, Fahad AB, Aldehaish HA, Egamberdieva D, Fathi EAA
277 (2018) Arbuscular mycorrhizal fungi regulate the oxidative system, hormones and ionic
278 equilibrium to trigger salt stress tolerance in *Cucumis sativus* L. *Saudi Journal of Biological*
279 *Sciences.* 25:1102-1114. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.03.009>.
- 280 Hernández HFS, Mendoza VR, Robledo TV, Gallou A, Cardenas FA, Valdez AL (2015) A
281 Assessment and morphological characterization from isolates of native mycorrhizal
282 associated with tomatillo. *Rev. Mex. Cienc. Agr,* 12,2277-2289.
- 283 Isayenkov S, Fester T, Hause B (2004) Rapid determination of fungal colonization and arbuscule
284 formation in roots of *Medicago truncatula* using real-time (RT) PCR. *J Plant Physiol*
285 161:1379–1383.
- 286 Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah JA, Franken O, Verbruggen E, Fellbaum CR, Kowalchuk
287 GA, Hart MM, Bago A, Palmer TM, West SA, Vandenkoornhuysse P, Jansa J, Bucking H
288 (2011) Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science*
289 333:880–882.

- 290 Kohler J, Hernandez JAH, Fuensanta C, Roldán A (2009) Induction of antioxidant enzymes is
291 involved in the greater effectiveness of a PGPR versus AM fungi with respect to increasing
292 the tolerance of lettuce to severe salt stress. *Environ. Exp. Bot.*, 65 pp. 245-
293 252, 10.1016/j.envexpbot.2008.09.008.
- 294 Krüger M, Stockinger H, Krüger C and Arthur S (2009) DNA-based species level detection of
295 Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*,
296 183: 212–223. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02835.x.
- 297 Lucini L, Colla G, Miras MMB, Bernardo L, Cardarelli M, Terzi V, Bonini P, Roupheal Y (2019)
298 Inoculation of *Rhizoglyphus irregularis* or *Trichoderma atroviride* differentially modulates
299 metabolite profiling of wheat root exudates. *Phytochemistry* 157: 158-167.
- 300 Ming T, Hui C, Jichuan CH, Zhiqiang QT (2009) AM fungi effects on the growth and physiology
301 of *Zea mays* seedlings under diesel stress. *Soil Biol. Biochem.* 41:936-
302 940, 10.1016/j.soilbio.2008.11.007.
- 303 McGonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL and Swan JA (1990) A new method that gives
304 an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi.
305 *New Phytol.* 115, 495-501.
- 306 Nelson JC y Nelson JMA (2015). Uso y manejo de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y humus de
307 lombriz en tomate (*Solanum Tropicale*s. 36(1): 55-64.
- 308 Oseni TO, Shongwe N S and Masarirambi M T (2010) Effect of arbuscular mycorrhiza (AM) inoculation
309 on the performance of tomato nursery seedlings in vermiculite. *Pakistan. Int. J. Agr. Biol.*12: 789-792.

- 310 Plenchette C, Fortin JA and Furlan V (1983). Growth response of several plants species to
311 mycorrhiza in a soil of moderate P fertility. I. Mycorrhizal dependency under field conditions.
312 Plant and Soil. 70. 199-209. 10.1007/BF02374780.
- 313 Porcel R, Gómez R, Mateos NE, Aroca R, Garcia SR, Ruiz L (2015) Arbuscular mycorrhizal
314 symbiosis ameliorates the optimum quantum yield of photosystem II and reduces non-
315 photochemical quenching in rice plants subjected to salt stress J. Plant Physiol., 185 : 75-
316 83, 10.1016/j.jplph.2015.07.006.
- 317 Roghieh A. Aliasgharzadeh SF, Laiegh C (2010) Poschenrieder Colonization with arbuscular
318 mycorrhizal fungi improves salinity tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants
319 Plant Soil, 331: 313-327, 10.1007/s11104-009-0255-z.
- 320 Rosa PS, Redondo GE, Mateos NR. Aroca R, Garcia JM, Ruiz L (2015) Arbuscular mycorrhizal
321 symbiosis ameliorates the optimum quantum yield of photosystem II and reduces non-
322 photochemical quenching in rice plants subjected to salt stress J. Plant Physiol., 185 : 75-
323 83, 10.1016/j.jplph.2015.07.006.
- 324 Stephanie J. Watts-Williams BD, Emmett V (2019) Levesque-Tremblay et al., "Diverse *Sorghum*
325 *bicolor* accessions show marked variation in growth and transcriptional responses to
326 arbuscular mycorrhizal fungi," *Plant, Cell & Environment*.42:1758-1774.
- 327 Thonar C, Erb A, Jansa J (2012) Real-time PCR to quantify composition of arbuscular mycorrhizal
328 fungal communities—marker design, verification, calibration and field validation. *Mol Ecol*
329 *Resour* 12:219–232.
- 330 Walker C. (2005) A simple blue staining technique for arbuscular mycorrhizal and other root-
331 inhabiting fungi. *Inoc*, 56, 68-69.

332 Yurong Y, Han X, Liang Y, Ghosh A , Chen MJ (2015) Tang The Combined Effects of Arbuscular
333 Mycorrhizal fungi (AMF) and lead (Pb) stress on Pb accumulation, plant growth parameters,
334 photosynthesis, and antioxidant enzymes in *Robinia pseudoacacia* L PLoS One, 10 (12) .
335 p. e0145726, 10.1371/journal.pone.0145726.

336 Zhu YG and Miller RM (2003) Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil-plant
337 systems. *Trends Plant Sci.* 8, 407–409. doi: 10.1016/S1360-1385(03)00184-5.

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352 Tabla 1. BLAST del asilado a de la base de datos del NCBI.

Descripción	% similitud	Acceso
<i>Rhizophagus irregularis</i> clone 6.12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.	99.30	JN417525.1
<i>Rhizophagus irregularis</i> clone 8.21 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.17	JN417530.1
<i>Rhizophagus irregularis</i> genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, strain DAOM229456, isolate spore 1, clone 03I2_3_2	100.00	HF968934.1
Uncultured <i>Rhizophagus</i> genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, clone pb-pi-16	99.11	HE794047.1
<i>Rhizophagus irregularis</i> genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, strain DAOM229456, isolate spore 1, clone 03I2_3_24	99.93	HF968935.1
<i>Rhizophagus irregularis</i> clone 8.33 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA	98.92	JN417529.1

gene, partial sequence Uncultured *Rhizophagus* genomic DNA containing
 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, clone
 JavorIX4 98.98 HG425869.1

353

354 Tabla 2. BLAST del asilado b de la base de datos del NCBI.

Descripción	% similitud	Acceso
<i>Rhizophagus irregularis</i> clone 6.12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.	99.49	JN417525.1
<i>Rhizophagus irregularis</i> clone 8.21 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.36	JN417530.1
Uncultured <i>Rhizophagus</i> genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, clone pb-pi-16	99.30	HE794047.1
Uncultured <i>Rhizophagus</i> genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, clone JavorIX4	99.23	HG425869.1

Rhizophagus irregularis clone 8.33 18S ribosomal RNA gene, partial 99.11 JN417529.1
sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and
internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal
RNA gene, partial sequence

355

356 Tabla 3. BLAST del asilado 3 de la base de datos del NCBI.

Descripción	% similitud	Acceso
<i>Rhizophagus irregularis</i> clone 6.38 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	98.94	JN417521.1
<i>Rhizophagus irregularis</i> clone 6.23 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	98.87	JN417522.1
<i>Rhizophagus irregularis</i> clone 6.14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	98.87	JN417520.1

Rhizophagus irregularis clone 6.11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence 98.62 JN417523.1

98.83
Uncultured *Rhizophagus* genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, clone Olse K-X5 HG425871.1

Rhizophagus irregularis clone 6.12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence 97.34 JN417525.1

357 Tabla 4. Efecto de *R. irregularis* sobre variables agronómicas

Tratamientos	Variables evaluadas						
	DT	LT	PFT	PST	LR	FZA	RTO
1.Melón con <i>R. irregularis</i>	12.74 a	187.95 b	172.01 d	76.60 c	43.93 a	14.92 a	256.92 b
2.Pepino con <i>R. irregularis</i>	8.87 c	246.81 a	503.86 a	241.04 a	36.04 b	9.61 c	162.29 c
3.Tomate con <i>R. irregularis</i>	9.24 bc	163.41 cd	245.49 c	84.11 c	35.43 b	7.65 d	494.72 a

4.Melón sin <i>R. irregularis</i>	10.08 b	117.07 e	137.56 e	58.01 d	27.54 c	12.27 b	116.25 d
5.Pepino sin <i>R. irregularis</i>	7.51 d	181.02 bc	415.52 b	184.22 b	25.78 c	8.37 d	114.33 d
6.Tomate sin <i>R. irregularis</i>	8.41 c	147.77 d	129.74 e	51.39 d	27.22 c	4.98 e	191.21 c
P	***	***	***	***	***	***	***
C.V (%)	11.42	13.88	12.71	20.50	14.05	9.79	25.09

358 Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey ≤ 0.05). P= nivel de
 359 significancia; C.V= coeficiente de variación.

360 Tabla 5. Colonización y multiplicación de esporas de *R. irregularis*

FACTOR A*B	Variables	
	Colonización	Esporas /100 g
Tratamientos		
1.Melón con <i>R. irregularis</i>	17.42 c	98.15 b
2.Pepino con <i>R. irregularis</i>	25.02 a	176.37 a
3.Tomate con <i>R. irregularis</i>	21.77 b	178.59 a
4.Melón sin <i>R. irregularis</i>	0 d	0 c
5.Pepino sin <i>R. irregularis</i>	0 d	0 c
6.Tomate sin <i>R. irregularis</i>	0 d	0 c

P	***	***
C.V (%)	15.80	13.55

361 Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey ≤ 0.05). P= nivel de
362 significancia; C.V= coeficiente de variación.

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

CONCLUSIONES

Las endomicorrizas nativas asociadas a *Helianthus annuus L.* fueron capaces de establecer simbiosis con una sola espora en plantas de cebolla, pepino, tomate y melón, siendo el T6 proveniente de Saltillo quien favoreció el crecimiento y desarrollo de las plantas bajo invernadero.

En el segundo ciclo de cultivo la cepa T6 identificada como *Rhizophagus irregularis* logró incrementar el rendimiento del cultivo de tomate bajo invernadero con un 50% de fertilización fosforada lo que representa una alternativa sustentable para la agricultura orgánica y un ahorro en la economía al disminuir hasta en un 50% el costo de los fertilizantes fosfatados.

REFERENCIAS

- Agricultural and Advisor Olsson PA, Van Aarle IM, Allaway WG, Ashford AE, Rouhier H (2002) Phosphorus effects on metabolic processes in monoxenic arbuscular mycorrhiza cultures. *Plant Physiol* 130: 1162- 1171.
- Akiyama K, Matsuzaki KI, Hayashi H (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nat Resour J*.435:824–827
- Akiyama, K. and Hayashi, H. (2006) Strigolactones: Chemical Signals for Fungal Symbionts and Parasitic Weeds in Plant Roots. *Annals of Botany*: doi: 10. 093/aob/mcl063, available online at www.aob.oxfordjournals.Org.
- Allen, M.F. (1991) *The ecology of mycorrhizae*. Cambridge University Press.
- Allen, M.F. (1991) *The ecology of mycorrhizae*. Cambridge University Press. Cambridge, 184 pp
- Anderson R.C, A. E. Liberta and L.A Dickman (1984) Interaction of vascular plants and vesicular- arbuscular mycorrhizal fungi across a soil moisture- nutrient gradient. *Oecologia* (Berlin).64:111-117.
- Aono T, Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR, Harrison MJ, Saito M (2004) Expression of alkaline phosphatase genes in arbuscular mycorrhizas *New Phytol* 162: 525- 534.
- Azcón-Aguilar C., Barea J. (1996) Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Scientia Horticulturae* 68:1-24.
- Bago B, Pfeffer P, Schachar- Hill Y (2001) Could the urea cycle be traslocating nitrogen in the arbuscular mycorrhizal simbiosis *New Phytol* 149: 4-8.
- Bago B, Pfeffer PEZipfel W, Lammers P, Shachar- Hill Y (2002) Tracking metabolism and imaging transport in arbuscular mycorrhizal fungi.*Plant Soil* 244: 189:197.
- Bago, B; Azcon-Aguilar, C; Shachar-Hill; Pfefer, P.E. (2000) El micelio externo de la micorriza arbuscular como Puente simbiótico entre la raíz y su entono. En: *Ecología, Fisiología y Biotecnología de la micorriza arbuscular*. Eds. A. Alarcón y R. Ferrera-Cerrata. Mundi Prensa México, S.A. de C.V. 78-92.
- Barea JM (2000) Rhizosphere and mycorrhiza of field crops. En: Toutant J, Balazs E, Galante E, Lynch J, Scherpers J, Wemer D, Werry P (eds) *Biol. Resource Management: Connecting Science and Policy* (OECD). INRA, Springer, Heidelberg-Alemania, pp 110-125.
- Barea JM, Azcon R, Azcon-Aguilar C (1992) The use of 15N to assess the role of VA mycorrhiza on plant N nutrition and its applications to evaluate the role of mycorrhiza in restoring Mediterranean ecosystems. En: Read DJ, Lewia DH, Fitter AH, Alexander IJ (eds)

- Mycorrhizas in ecosystems: Structure and function. CAB International, Wallingford, UK, pp 190-197.
- Becard G, Doner LW, Rolin DB, Douds DD, Pfeffer PE (1991) Identification and quantification of trehalose in vesicular- arbuscular mycorrhizal fungi in vivo ^{13}C NMR and HPLC analyses. *New Phytol* 118: 547-552 Becard G, Fortin JA (1988) Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol* 108: 211-218.
- Bécard, G. and Piché, Y. (1989) Fungal Growth Stimulation by CO_2 and Root Exudates in Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Appl Environ Microbiol* 55: 2320–2325 70.
- Beck A, Haug I, Oberwinkler F, Kottke I (2007) Structural characterization and molecular identification of arbuscular mycorrhiza morphotypes of *Alzatea verticillata* (Alzateaceae), a prominent tree in the tropical mountain rain forest of South Ecuador. *Mycorrhiza*.17:607-625.
- Bielecki RL (1973) Phosphates pools, phosphates transports and phosphates availability. *Annu Rev Plant Physiol* 24: 225-252.
- Blee, K.A.; Anderson, A.J. (2000) Defense Responses in Plants to Arbuscular Mycorrhizal Fungi. In: Podila, G, K.; Douds, D., eds. *Current advances in mycorrhizae research*. Minnesota, USA: The Am. Phytopathol. Soc, 27–44.
- Blilou, I.; Ocampo, J.; García-Garrido, J. (2000a) Induction of Catalase and Ascorbate Peroxidase Activities in Tobacco Roots Inoculated with Arbuscular Mycorrhizal *Glomus Mosseae*. *Mycol. Res.* 104: 722–725.
- Blilou, I.; Ocampo, J.; García-Garrido, J. (2000b) Induction of Ltp (Lipid Transfer Protein) and Pal (Phenylalanine Ammonialyase) Gene Expression in Rice Roots Colonized by the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus Mosseae*. *J. Exp. Bot.* 51: 1969–1977
- Boby, V.; Balakrishna A.; Bagyaraj D. (2008) Interaction between *Glomus mosseae* and soil yeasts on growth and nutrition of cowpea. *Microbiological Research* 163: 693-700
- Bonanomi, A.; Oetiker, J.H.; Guggenheim, R.; Boller, T.; Wiemken, A.; Vögeli-Lange, R. (2001) Arbuscular Mycorrhizas in Minimycorrhizotrons: First Contact of *Medicago truncatula* Roots with *Glomus Intraradices* Induces Chalcone Synthase. *New Phytologist* 150: 573–582.
- Bonfante, P.; Genre, A.; Faccio, A.; Martini, I.; Schauser, L.; Stougaard, J.; Webb, J.; and Parniske, M. (2000) The *Lotus japonicus* LjSym4 Gene is Required for the Successful Symbiotic Infection of Root Epidermal Cells. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13: 1109–1120.
- Boomsa, C.R. and T. Vyn. (2008) Maize drought tolerance: Potential improvements through arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Field Crop Research.* 108: 14-31.

- Borie F, Rubio R, Morales A, Castillo C (2000) Relacion entre densidad de hifas de hongos micorrizógenos arbusculares y produccion de glomalina con las características físicas y químicas de suelos bajo cero labranza. *Revista Chilena de Historia Natural* 73: 663-670.
- Bornemisza E (1979) Organic carbon determination by the Walkley-Black and dry combustion in surface soils and andept profiles from Costa Rica. *Soil Sci.*43:78-83
- Boston: Academic Press.
- Bouyoucos G.S (1936) Directions for making mechanical analysis of soil by hydrometer method. *Soil Sci.*4:225-228.
- Bremner, J.M. (1960) Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method. *J.Agric. Sci.*55:11-33.
- Brrundrett, M.C. (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants.*New Phytol.* 154:275-304.
- Brrundrett, M.C. (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants.*New Phytol.* 154:275-304.
- Brundrett, M.C (1991) “Mycorrhizas in natural ecosystems”, *Advances in Ecological Research*, vol. 21: 171-213.
- Burrows, R.L, Pflieger FL (2002) Arbuscular mycorrhizal fungi respond to increasing plant diversity. *Can J Biochem Cell B.*80:120-130.
- Cambridge, 184 pp.
- Carreón Abud-Y, Jerónimo Treviño-E, Beltrán-Nambo MA, Martínez-Trujillo M, Trejo Aguilar-D, Gavito ME (2013) Isolation and propagation of pure cultures of arbuscular mycorrhizal fungi from avocado orchards by the minirhizotron technique. *Revista Mexicana Micología.*37:29-39. In Spanish.
- Carvalho L.M., Correia P.M., Ryel R.J. & Martins-Loução M.A (2003) Spatial variability of arbuscular mycorrhizal fungal spores in two natural plant communities. *Plant and Soil.*251:227-236
- Castillo, C.; Sotomayor, L.; Ortiz, C.; Leonelli, G.; Borie, F. and Rubio, R (2009) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on an ecological crop of chili peppers (*capsicum annum* L.). *Chilean Journal of Agricultural Research* 69 (1): 79-87.
- Castillo, C.; Sotomayor, L.; Ortiz, C.; Leonelli, G.; Borie, F. and Rubio, R (2009) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on an ecological crop of chili peppers (*capsicum annum* L.). *Chilean Journal of Agricultural Research* 69 (1): 79-87.

- Catoira, R.; Galera, C.; Billy, F.; Penmetsa, R.V.; Journet, E.; Maillet, F.; Rosenberg, C.; Cook, D.; Gough, C.; Denarie, J. (2000) Four Genes of *Medicago truncatula* Controlling Components of a Nod Factor Transduction Pathway. *Plant Cell*. 12:1647-65.
- Clark RB, Zeto SK (2000) mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *J Plants Nutr* 23: 867-902.
- Cress WA, Throneberry GO, Lindsey DL (1979) Kinetics of Phosphorus absorption by mycorrhizal and non- mycorrhizal tomato roots. *Plant Phys*. 64: 484- 487
- Dhillon, S.S.; Ampornpan, L. (1992) The influence of inorganic nutrient fertilization on the growth, nutrient composition and vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization of pretransplant rice (*Oryza sativa* L) plants. *Biol. Fertil. Soils* 3:85- 91.
- Douds, D.D.; Galvez, L.; Bécard, G.; Kapulnik, Y. (1998) Regulation of Arbuscular Mycorrhizal Development by Plant Host and Fungus Species in Alfalfa. *New Phytologist*. 138: 27–35.
- Drüge, U.; Schönbeck, F. (1992) Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on transpiration, photosynthesis and growth of flax-*Linum usitatissimum* L. In relation to cytokinin levels. *J. Plant Physiol*. 141:40-48.
- Egerton-Warburton, L.M., Johnson, N.C., and Allen, E.B (2007) Mycorrhizal community dynamics following nitrogen fertilization: a cross-site test in five grasslands. *Ecol. Monogr.* 77:527-544.
- Escobar-Acevedo CJ, Zuluaga-Pelaez JJ, Colorado-Gasca G, Paez D. (1998) Micorriza Vesicular Arbúscular (MVA) Recurso microbiológico para desarrollar una agricultura sostenible.
- Escobar-Acevedo CJ, Zuluaga-Pelaez JJ, Colorado-Gasca G, Paez D. (1998) Micorriza Vesicular Arbúscular (MVA) Recurso microbiológico para desarrollar una agricultura sostenible.
- Escobar-Acevedo CJ, Zuluaga-Pelaez JJ, Colorado-Gasca G, Paez D. (1998) Micorriza Vesicular Arbúscular (MVA) Recurso microbiológico para desarrollar una agricultura sostenible.
- Ezawa T, Cavagnaro TR, Smith Se, Smith FA, Ohtomo R (2004) Rapid accumulation of polyphosphate in extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus as revealed by histochemistry and a polyphosphate kinase / luciferase system. *New Phytol* 161: 387-392.
- Feng, G., Zhang, F.S., Li, X. L., Tian, C., Tang, C., RENGEL, Z. (2002) Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. *Mycorrhiza* 12,185–190.
- Fitter AH, Graves JD, Self GK, Brown TK, Bogie D, Taylor K (1998) Root production, turnover and respiration under two grassland types along an altitudinal gradient: influence of temperature and solar radiation. *Oecologia* 114: 20-30.
- Fitzsimons, M.S., Miller, R.M., Jastrow, J.D., (2008) Scale-dependent niche axes of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia* 158:117-127.

- Franken, P.; Requena, N.; Bütchorn, B.; Krajinski, F.; Kuhn, G.; Laponin, L.; Mann, P.;
from soil by wet sieving and decanting. *J. BMS.*46:235-244.
- García-garrido JM, Ocampo JA (2002) Regulation of the plant defence response in arbuscular
mycorrhizal symbiosis. *J Exp Bot.* 53: 1377-1386.
- García-garrido JM, Ocampo JA (2002) Regulation of the plant defence response in arbuscular
mycorrhizal symbiosis. *J Exp Bot.* 53: 1377-1386.
- García-Garrido, J.M.; Tribak, M.; Rejón-Palomares, A.; Ocampo, J.A.; García-Romero, I. (2000)
Hydrolitic Enzymes and Ability of Arbuscular Mycorrhizal Fungi to Colonize Roots. *J.
of Experimental Botany.* 51: 1443–1448.
- Gavito ME, Miller MH (1998) Early phosphorus nutrition, micorrhizae development, dry matter
partitioning and yield of maize. *Plant and Soil* 199: 177-186.
- Gemma, J., Carriero, T., and Koske, R. (1989) Seasonal dynamics of selected species of VA
mycorrhizal fungi in a sand dune. *Micology research*, 92, 317-321.
- Genre, A.; Chabaud, M.; Faccio, A.; Barker, D. and Bonfante, P. (2008) Prepenetration Apparatus
Assembly Precedes and Predicts the Colonization Patterns of Arbuscular Mycorrhizal
Fungi within the Root Cortex of Both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *The Plant
Cell.* 20:1407-1420.
- Genre, A.; Chabaud, M.; Timmers, T.; Bonfante, P. and Barkerb, D. (2005) Arbuscular
Mycorrhizal Fungi Elicit a Novel Intracellular Apparatus in *M. truncatula* Root Epidermal
Cells before Infection. *Plant Cell.* 17: 3489-3499.
- Gerderman, J; Nicholson, T (1963) Spores of mycorrhizal endogene species extracted
- Ginzberg, I.; David, R.; Shaul, O.; Elad, Y.; Wininger, S.; Ben-Dor, B.; Badani, H.; Fang, Y.; van
Rhijn, P.; Li, Y.; Hirsch, A.; Kapulnik, Y. (1998) *Glomus* Intraradices Colonization
Regulates Gene Expression in Tobacco Roots. *Symbiosis.* 25; 145 p.
- Goverde, M.; Van Der Heijden, M.A.; Wiemken, A.; Sanders, IR.; Erhardt A. (2000) Arbuscular
mycorrhizal fungi influence life history traits of a lepidopteran herbivore. *Oecologia*
125:362-369.
- Govindarajulu, M., P. E. Pfeffer, H. Jin, J. Abubaker, D.D. Douds, J.W. Allen, H. Bücking, O.J.
Lammers and Y. Shachar- Hill. (2005) Nitrogen transfer in the arbuscular Mycorrhizal
symbiosis. *Nat.* 435: 819: 823.
- Guadarrama P, Castillo S, Ramos-Zapata JA, Hernández-Cuevas LV, Camargo Ricalde SL.
(2014) Arbuscular mycorrhizal fungal communities in changing environments: The
effects of seasonality and anthropogenic disturbance in a seasonal dry forest.
*Pedobiologia.*57:87-95.

- Guerrero, E.; Azcón, C. y Barea, J. (1996) Micorrizas: Recursos biológicos del suelo. Fondo FEN. Colombia, Bogotá. p. 130 – 132.
- Haghighi, M.; Mohammadnia, S.; Attai, Z.; Pessaraki, M. Effects of mycorrhiza inoculation on cucumber growth irrigated with saline water. *Plant Nutr.* 2016, 40, 128–137.
- Harrison M and Dixon R, (1994) Spation Patterns of Expression of Flavonoid/isoflavonoid Pathway Genes During Interactions Between Roots of *Medicago truncatula* and the Mycorrhizal Fungus *G.versiforme*. *Plant J.* 6: 9–20.
- Harrison M, Dewbrw G, Liu J (2002) A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition og phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* 14: 2413- 2429
- Harrison, M. (1999) Molecular and Cellular Aspects of the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:361–389.
- Harrison, M.J. (2005) Signaling in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Annu Rev Microbiol.*59:19-42.
- Hause, B.; Mrosk, C.; Isayenkov, S. and Dieter, S. (2007) Jasmonates in Arbuscular Mycorrhizal Interactions. *Phytochem.* 68: 101-110.
- Hawkins H-J, George E. (2001) Reduced 15 N-nitrogen transport through arbuscular mycorrhizal hyphae to *Triticum aestivum* L. supplied with ammonium vs. nitrate nutrition. *Ann Bot London.*87:303–311.
- Hawkins HJ, Johansen A, George E (2000) Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 226: 275-285.
- Hawkins H-J, Johansen A, George E. (2000) Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil.* 226:275–285.
- Hendrix, J., Guo, B., and An, Z. (1995) Divergence of mycorrhizal fungal communities in crop production systems. *Plant and Soil* 170, 131-140.
- Herbers, K.; Meuwly, P.; Frommer, W.B.; Metraux, J.P.; Sonnewald, U. (1996) Systemic Acquired Resistance Mediated by the Ectopic Expression of Invertase, Possible Hexose Sensing in the Secretory Pathway. *The Plant Cell.* 8: S.P.
- Hernández-Cuevas LV, García-Sánchez R (2008) Propagation by spores: the case of arbuscular mycorrhize In *Techniques for the study of the mycorrhizal associations and its implications in restoration: 29-42.* Edited by ÁlvarezSánchez J, Monroy-Ata A. Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF. In Spanish.

- Hijri I, Sykorova Z, Oehl F, Ineichen K, Mader P, Wiemken A, Redecker D (2006) Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Molecular Ecology*.15:2277–2289
- Ho I, Trappe JM (1973) Translocation of ¹⁴C from *Festuca* plants to their endomycorrhizal fungi. *Nature* 244- 30-31.
- Horan, DP; Chilvers, GA (1990) Chemotropism the key to ectomycorrhizal formation. *New Phytol*.116:297-301
- Horn, R.; Lebert, M. (1994) Soil compactability and compressibility. In: Soon, S.D., Ouwkerk, C.van. Eds., *Soil Compaction in Crop Production*. Elsevier Publishers, Amsterdam, The Netherlands, pp. 45-69.
- Husband R, Herre A, Turner SL, Gallery R, Young JPW (2002) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and patterns of host association over time and space in a tropical forest. *Mol Ecol* 11: 2669- 2678.
- ICA, Instituto Colombiano Agropecuario (1992) Fertilization de different crops. Fifth approximation. Manual of Technical Extension No. 25. Bogotá: ICA. In Spanish.
- INVAM (International culture collection of VA mycorrhizal fungi). (In line). Viewed July 19, 2014. Available <http://invam.wvu.edu/the-fungi/species-descriptions>.
- INVAM (International culture collection of VA mycorrhizal fungi). (In line). Viewed July 19, 2014. Available <http://invam.wvu.edu/the-fungi/species-descriptions>.
- Jasper, D.A.; Robson, A.D.; Abbott, L.K. (1979) Phosphorus and the Formation of Vesicular-arbuscular Mycorrhizas. *Soil Biology and Biochemistry*. 11: 501–505.
- Jia Y, Gray VM, Straker CJ (2004) The influence of *Rhizobium* and arbuscular mycorrhizal fungi on nitrogen and phosphorus accumulation by *Vicia faba*. *Ann. Bot.* 94: 251-258.
- Johnson, C.R.; Hummel, RL. (1985) Influence of mycorrhizae and drought stress on growth of *Poncirus x Citrus* seedlings. *Hort. Sci.* 20:754-755.
- Johnson, N.C., Pflieger, F., Crookston, R., Simmons, S., and Copeland, P (1991) Vesicular-arbuscular mycorrhizas respond to corn and soybean cropping history. *New Phytologist* 133, 103-111.
- Johnson, N.C., Copeland, P., Crookston, R., and Pflieger, F (1992 a) Micorrhizae: Possible explanation for yield decline with continuous corn and soybean. *Agronomy Journal* 84, 387-390.
- Johnson, N; Tilman, D.; Wedind D (1992) Plant and soil controls on mycorrhizal fungal communities. *Ecology*.73: 2034-2042.

- Kabir Z, O'Halloran IP, Fyles JW, Hamel C (1997) Seasonal changes of arbuscular mycorrhizal fungi as affected by tillage practices and fertilization: Hyphal density and mycorrhizal root colonization. *Plant Soil* 192:285-293.
- Kernaghan G. (2005) Mycorrhizal diversity: Cause and effect *Pedobiologia*. 49: 511-520 Kistner, C.; Winzer, T.; Pitzschke, A.; Mulder, L.; Sato, S.; Kaneko, T.; Tabata, S.; Sandal, N.; Stougaard, J.; Webb, K.J. (2005) Seven Lotus japonicus Genes Required for Transcriptional Reprogramming of the Root During Fungal and Bacterial Symbiosis. *Plant Cell*. 17: 22-17.
- Kogel, K.H. (2008) Compatible Host–microbe Interactions: Mechanistic Studies Enabling Future Agronomical Solutions. *Plant Physiol*.165:1-8.
- Kosuta, S.; Chabaud, M.; Lounnon, G.; Gough, C.; Dénarié, J.; Barker, D. and Bécard, G. (2003) A Diffusible Factor from Arbuscular Mycorrhizal Fungi Induces Symbiosis-Specific MtENOD11 Expression in Roots of Medicago truncatula. *Plant Physiol*, 131: 952-962.
- Koyama, A.; Pietrangelo, O.; Sanderson, L.; Antunes, P.M. An empirical investigation of the possibility of adaptability of arbuscular mycorrhizal fungi to new hosts. *Mycorrhiza* 2017, 27, 553–563.
- Kurle JE, Pflieger FL. (1996) Management influences on arbuscular mycorrhizal fungal species composition in a corn-soybean rotation. *A J*.88:155-161.
- Lambais, M.R.; Mehdy, M.C. (1998) Spatial Distribution of Chitinases and β -1,3 Glucanase Transcripts in Bean Arbuscular Mycorrhizal Roots Under Low and High Soil Phosphate Conditions. *New Phytologist*. 140: 33–42.
- Lekberg, Y.L.V.A., Koide, R.T., Rohr, J.R., Aldrich-Wolfe, L.A.U.R., Morton, J.B., (2007) Role of niche restrictions and dispersal in the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Journal of Ecology* 95:95-105.
- Linderman, R.G (1992) Vesicular Arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. P.p. 45-70. In bethlenfalvay G.J y Linderman R.G Eds. *Micorrhizae in sustainable Agriculture*. ASA Special Publication No. 54. Madison.
- Lodge, DJ. (2000) Ecto- or arbuscular mycorrhizas - which are best? *New Phytol*. 146:353-354.
- López-Pedrosa, A., M. González-Guerrero, A. Valderas, C. Azcón-Aguilar, and N. Ferrol. (2006) GintAMT1 encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of Glomus intraradices. *Fungal Genet. Biol*. 43:102-110.
- Lumini, E.; Orgiazzi, A.; Borriello, R.; Bonfante, P.; y Bianciotto, V. Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach. *Environ. Microbiol*. 2010, 12, 2165–2179.

- Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR, Harrison MJ (2001) A phosphate transporter gene from the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Mol Plant- Microbe Interact* 14: 1140- 1148.
- Martínez-Medina, A.; Pascual, J.A.; Loret, E.; Roldán, A. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* and their effects on Fusarium wilt in melon plants grown in seedling nurseries. *Sci. Food Agric.* 2009, 89, 1843–1850.
- Mathesius, U. (2009) Comparative Proteomic Studies of Root–microbe Interactions Ulrike J. *Proteomics*. 72: 353-366.
- McGonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL, Swan JA (1990) A new method that gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 115:495–501.
- Morton JB, Benny J (1990) Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glominae and Gigasporinae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with and a mediation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37: 471- 491.
- Morton JB, Benny J (1990) Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glominae and Gigasporinae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with and a mediation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37: 471- 491.
- Morton, J.B., Redecker, D., (2001) Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93:181-195.
- Mummey, D.L., Rillig, M.C., (2008) Spatial characterization of arbuscular mycorrhizal fungal molecular diversity at the submetre scale in a temperate grassland. *FEMS microbiology ecology* 64:260-270.
- Oldroyd, G. and Downie, J.A. (2006) Nuclear Calcium Changes at the Core of Symbiosis Signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 9: 351–357.
- Oldroyd, G.; Harrison, M.; Paszkowski, U. (2009) Reprogramming Plant Cells for Endosymbiosis. *Science*. 324: 753-754.
- Olsen, S. R., C. V. Cole, F. S. Watanabe and L. A. Dean (1954) Estimation of Available Phosphorus in Soils by Extraction with Sodium Bicarbonate. U. S. Department of Agriculture Circular No. 939. Banderis, A. D., D. H. Barter and K. Anderson.
- Öpik, M. (2004) Diversity of arbuscular micorrhizal fungi in the roots of perennial plants and their effect on plant performance. *Dissertiones Biologicae Universitatis Tartuensis*. Tartu. pp80.

- Opik, M.A.A.R., Moora, M.A.R.I., Liira, J.A.A.N., Zobel, M.A.R.T., (2006) Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology* 94:778-790.
- Paillacho Cedeño, Fabián Isacc. (2010) Evaluación de la efectividad de las micorrizas arbusculares nativas sobre el desarrollo y estado nutritivo del Palmito (*Bactris gasipaes* HBK) en etapa de vivero, en Santo Domingo de los Tsáchilas. Carrera de Ingeniería de Ciencias Agropecuarias. ESPEIASA II. Sede Santo Domingo.
- Paillacho Cedeño, Fabián Isacc. (2010) Evaluación de la efectividad de las micorrizas arbusculares nativas sobre el desarrollo y estado nutritivo del Palmito (*Bactris gasipaes* HBK) en etapa de vivero, en Santo Domingo de los Tsáchilas. Carrera de Ingeniería de Ciencias Agropecuarias. ESPEIASA II. Sede Santo Domingo.
- Parniske, M. (2000) Intracellular Accommodation of Microbes by Plants: A Common Developmental Program for Symbiosis and Disease? *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 320–328.
- Parniske, M. (2004) Molecular Genetics of the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Curr Opinion Plant Biol.* 7: 414- 421.
- Parniske, M. (2008) Arbuscular Mycorrhiza: the Mother of Plant Root Endosymbioses. *Nat Rev. Microbiol.* 6: 10 – 763.
- Paszkowski, U. (2006) Mutualism and Parasitism: the Yin and Yang of Plant Symbioses. *Curr Opinion in Plant Biol.* 2006: 9: 364–37.
- Perez, A.; Fuentes, J. (2009) Regresión logística en la evaluación de la esporulación de micorrizas en pasto *Bothriochloa pertusa* (L) A. Camus. *Rev. Colombiana cienc. Anim* 1(1):1-18.
- Peroza, C.V, Perez, C.A (2010) Effect of physical, chemical and salinity parameters on population density and arbuscular mycorrhize colonization and Angletón grass in Tolú Sucre, Colombia. *Rev. Colombiana Cienc. Anim.*2:312-324. In Spanish.
- Pfeffer PE, Doudds DD, Bécard G, Shachar-hill Y (1999) Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol* 120: 587-598.
- Pozo, M.J.; Dumas-Gaudot, E.; Azcón-Aguilar, C.; Barea, J.M. (1998). Chitosanase and Chitinase Activities in Tomato Roots During Interactions with Arbuscular Mycorrhizal Fungi or *Phytophthora parasitica*. *J. Exp Bot.* 49: 1729–1739.
- Pozo, M.J.; Dumas-Gaudot, E.; Slezack, S.; Cordier, C.; Asselin, A.; Gianinazzi, S.; Gianinazzi-Pearson, V.; Azcón-Aguilar, C.; Barea, J.M. (1996) Detection of New Chitinase Isoforms in Arbuscular Mycorrhizal Tomato Roots: Possible Implications in Protection Against *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*. *Agronomie* 16: 689–697.
- Rajan SK, Reddy Bjb, Bagyaraj, DJ. (2000) Screenng of arbuscular mycorrhizal fungi for their symbiotic efficeicy with *Tectona grandis*. *Forest. Ecol. Manage.* 126:91.

- Rasmussen N, Lloyd DC, Ratcliffe G, Hansen PE, Jakobsen I (2000) ^{31}P NMR for the study of P metabolism and translocation in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 226: 245-253.
- Read, D.J. 1991. Mycorrhizas in ecosystems. *Experienta* 47:376-391. Sieverding, E. 1991. Vesicular Arbuscular Mycorrhiza in Tropical Agrosystem. Deutsche Gesellschaft für technische Zusammenarbeit (GTZ) GMBH, federal Republic of Germany. 371 p.
- Reinhardt, D. (2007) Programming Good Relations-development of the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*. 10: 98-105.
- Requena N, Serrano E, Ocon A, Breuninger M (2007) Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry*. 68:33.
- Requena, N., Breuninger, M., Franken, P., Ocón, A. (2003) Symbiotic Status, Phosphate, and Sucrose Regulate the Expression of Two Plasma Membrane H^+ -ATPase Genes from the Mycorrhizal Fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiology*, 132: 1540-1549.
- Requena, N.; Mann, P.; Hampp, R.; Franken, P. (2002) Early Developmentally Regulated Genes in the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus Mosseae*: Identification of *GmGin1* a Novel Gene with Homology to the C-terminus of Metazoan Hedgehog Proteins. *Plant Soil* 244: 129–139.
- Requena, N.; Serrano, E.; Oco'n, A.; Breuninger, M. (2007) Plant Signals and Fungal Perception During Arbuscular Mycorrhizae Establishment. *Phytochemistry*. 68: 33-40.
- Rhody, D.; Stommel, M. (2000) Molecular Analysis of the Arbuscular Mycorrhizas Symbiosis. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 45: 271–286.
- Rivillas O, C.A. (1995) The effects of arbuscular mycorrhizal fungi on two different coffee varieties from Colombia and their biochemical detection in roots. Kent, University of Kent. Research School of Biosciences. 88 p (Tesis: Magister Science).
- Rúa, M.A.; Antonika, A.; Antunes, P.M.; Chaudhary, B.V.; Gehring, C.; Lamity, L.J.; Piculell, B.J.; Bever, J.D.; Zabinski, C.; Meadow, J.F.; et al. Home-field advantage? Evidence of local adaptation among plants, soil, and arbuscular mycorrhizal fungi through meta-analysis. *BMC Evol. Biol.* 2016, 16, 122.
- Sachar-Hill, Y.; Pfeffer, P. E.; Douds, D. D.; Osman, S. F.; Doner, L. W.; Ratcliffe, R. G. (1995) Partitioning of intermediary carbon metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizal leek. *Plant Physiology*. 108: 7–15.
- Salzer, P.; Corbière, H.; Boller, T. (1999) Hydrogen Peroxide Accumulation in *Medicago Truncatula* Roots Colonized by the Arbuscular Mycorrhizaforming Fungus *Glomus Mosseae*. *Planta* 208: 319–325.

- Salzer, P.; Boller, T. (2000) Elicitor Induced Reactions in Mycorrhizae and their Suppression. In: Podila, G.K.; Douds, D.D. eds. Current Advances in Mycorrhizae Research. APS Press, St. Paul, pp. 1-10.
- Sánchez, P.A., Salinas, J.G. (1999) Low input technology for managing Oxisols and Ultisols in tropical America. *Advances in Agronomy*.34:279.
- Sánchez, P.A., Salinas, J.G. (1999) Low input technology for managing Oxisols and Ultisols in tropical America. *Advances in Agronomy*.34:279.
- Santander, C.; Sanhueza, M.; Olave, J. Arbuscular Mycorrhizal Colonization Promotes the Tolerance to Salt Stress in Lettuce Plants through an Efficient Modification of Ionic Balance. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 2019.
- Santos, J.C., Finlay, R.D., Tehler, A., (2006) Molecular analysis of arbuscular mycorrhizal fungi colonising a semi-natural grassland along a fertilisation gradient. *New Phytologist* 172:159-168
- Schenck, N.C. y Pérez, Y (1990) Manual for identification of VA Mycorrhizal Fungi, 3rd Edition, Synergistic Publications, Gainesville, USA.
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C. (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*.105:1413–1421.
- Schüßler and Walker (2010). Available In line http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo/Schuessler&Walker2010_Glomeromycota.pdf.
- Serralde O, A.M and M.M. Ramírez G (2004) Analysis of mycorrhizal populations in maize (*Zea mays*) cultivated in acid soils under varying agronomic treatments. *Revista Corpoica*.5:1-40. In Spanish.
- Shaul, O.; David, R.; Sinvani, G.; Ginzberg, I.; Ganon, D.; Wininger, S.; Ben-Dor, B.; Badani, H.; Ovdad, N.; Kapulnik, Y. (2000) Plant Defense Responses During Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. In: Podila, G.K.; Douds, D.D. eds, Current Advances in Mycorrhizae Research. APS Press, St. Paul, MN, pp. 61-68.
- Shinshi, H.; Mohnen, D.; Meins, F. (1987) Regulation of a Plant Pathogenesis related Enzyme: Inhibition of Chitinase and Chitinase mRNA Accumulation in Cultured Tobacco Tissues by Auxin and Cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 84: 89–93.
- Sieverding, E. (1989) Aspectos de la taxonomía y la identificación de hongos formadores de endomicorrizas V.A. In: Investigaciones sobre endomicorrizas en Colombia. 2 ed. Palmira, CIAT. P 209-223.

- Sieverding, E. (1989) Aspectos de la taxonomía y la identificación de hongos formadores de endomicorrizas V.A. In; Investigaciones sobre endomicorrizas en Colombia. 2 ed. Palmira, CIAT. P 209-223.
- Simard S, Durall D (2004) Mycorrhizal networks: a review of their extent, function and importance. *Can J Bot.*82:1140-65.
- Singh s, Kapoor kk. (1999) Inoculation with phosphate solubilizing microorganisms and a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. *Biol.Fertil. Soils*; 28:139–44.
- Smith S. E, Read D. R. (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd Edn. Amsterdam; New York; Boston: Academic Press.
- Smith S. E, Read D. R. (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd Edn. Amsterdam; New York;
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I (2004) Functional diversity in arbuscula mycorrhizal (AM) symbiosis: the contribution of the Mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytol.* 62: 511- 524.
- Smith, S.E., Read, D.J. (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London.
- Smith, S.E., Read, D.J. (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London.
- Smith. S.E., Jakobsen, I. (2000) Spatial differences in acquisition of soil phosphorus between two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. *New Phytologist* 147:357-366.
- Somssich, I.; Hahlbrock, K. (1998) Pathogen Defense in Plants: a Paradigm of Biological Complexity. *Trends in Plant Sci.* 3: 86–90.
- Stahl P. D, Williams S. E. and Christensen M (1988) Efficacy of native vesicular arbuscular mycorrhizal fungi after severe soil disturbance. *New Phytol.*110:347- 354.
- Steiner, A.A. (1973) The selective capacity of tomato plants for ions in a nutrient solution. pp. 43-53. In: *Proceedings 3rd International Congress on Soilless Culture*. Wageningen, The Netherlands.
- Sweatt MR.; Davies, F.T. (1984) Mycorrhizae, water relations, growth, and nutrient uptake of geranium grown under moderately high phosphorus regimes. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 109: 210-213.
- Van der Heijden MGA; JN Klironimos, M Ursic, P Moutoglis, R Streitwolf-Engle, R Boller, A Weimken y IR Sanders. (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72.

- Van der Heijden, M.G.A., (2004) Arbuscular mycorrhizal fungi as support systems for seedling establishment in grassland. *Ecology Letters* 7:293-303.
- Van tuinen, D., Dulieu, H., Zéze, A., and Gianinazzi- Pearson, V. (1994) Biodiversity and characterization of arbuscular mycorrhizal fungi at the molecular level. In "Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agricultura and natural ecosystems" (S. Gianinazzi and H. Shuep, eds.), pp. 13.23.
- Vani, M.S.; Hindumathi, A.; Reddy, B.N. Beneficial effect of arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus fasciculatum* on plant growth and nutrient uptake in tomato. *Ind. Phytopathol.* 2018, 71, 115–122.
- Varela F., L., D. Trejo, (2001) Los hongos micorrizógenos arbusculares como componentes de la biodiversidad del suelo en México. *Acta Zoológica Mexicana* 1:39–51.
- Verbruggen, E,W.F.M. Röling, H.A. Gamper, G.A. Kowalchuk, H.A. Verhoef, and M.G.A. van der Heijden (2010) Positive effects of organic farming on below- ground mutualists: large-scale comparison of mycorrhizal fungal communities in agricultural soils. *New Phytol.*186:968-979.
- Vierheilig H, Piché Y (2002) Signalling in arbuscular mycorrhiza: Facts and hypotheses, In: *Flavonoids in Cell Functions*, Eds. Buslig B, and Manthey J; Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York; p.23-39. ISBN 0-306-47254-6.
- Vierheilig, H.; Alt, M.; Mohr, U.; Boller, T.; Wiemken, A. (1994) Ethylene Biosynthesis and Activities of Chitinase and β -1,3-Glucanase in the Roots of Host and Non host Plants of Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungi After Inoculation with *Glomus mosseae*. *J. of Plant Physiology.* 143: 337–343.
- Walker C (2005) A simple blue staining technique for arbuscular mycorrhizal and other root-inhabiting fungi. *Inoculum.*56:68-69.
- Wang, B. and Y.L. Qiu. (2006) Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza.* 16:299-363.
- Wang, B. and Y.L. Qiu. (2006) Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza.* 16:299-363.
- Wolfe, B.E., Weishample, P.A., Klironomos, J.N., (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi and water table affect wetland plant community composition. *Journal of Ecology* 94:905-914.
- Xiaohong; L.; Koide, R. (1994) The effects of mycorrhizal infection on components of plant growth and reproduction. *New Phytol.* 128:211-218.
- Yano, K.; Yamauchi, A.; Iijima M.; Kono, Y. (1998) Arbuscular mycorrhizal formation in undisturbed soil counteracts compacted soil stress for pigion pea. *Appl. Soil. Ecol.* 10: 95-1022.