

**EFFECTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS PRODUCIDOS POR PLANTAS  
MICOTRÓFICAS SOBRE LA PROPAGACIÓN DE HONGOS  
MICORRIZÓGENOS**

**CAROLINA GARCÍA ÁVILA**

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA  
PROGRAMA DE FORMACIÓN AVANZADA  
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA CONVENIO UPB/UCO  
MEDELLÍN  
2014**

**EFFECTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS PRODUCIDOS POR PLANTAS  
MICOTRÓFICAS SOBRE LA PROPAGACIÓN DE HONGOS  
MICORRIZÓGENOS**

**CAROLINA GARCÍA ÁVILA**

**Trabajo de grado para optar al título de Magister en Biotecnología**

**Director  
Yesid Vélez Salazar  
Magister en Biotecnología**

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA  
PROGRAMA DE FORMACIÓN AVANZADA  
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA CONVENIO UPB/UCO  
MEDELLÍN**

**2014**

**NOTA DE ACEPTACIÓN:**

---

---

---

---

---

Firma del presidente del jurado

---

Firma

Nombre: Gustavo Adolfo Hincapié Llanos

Jurado

---

Firma

Nombre: Jorge Alberto Sierra Escobar

Jurado

Medellín, 28 de Febrero de 2014

**28 de Febrero de 2014**

**Carolina García Ávila**

“Declaro que esta tesis (o trabajo de grado) no ha sido presentada para optar a un título, ya sea en igual forma o con variaciones, en esta o cualquier otra universidad” Art 82 Régimen Discente de Formación Avanzada.

Firma



---

## DEDICATORIA

*Para criaturas pequeñas como nosotros, la  
inmensidad sólo es soportable con amor.*

**CARL SAGAN**

Con todo mi cariño y mi amor para las personas que  
han hecho todo en la vida para que yo pueda lograr  
mis sueños, por motivarme y darme la mano.

**Mis padres y mi hermano.**

## **AGRADECIMIENTOS**

El autor expresa sus agradecimientos a:

Yesid Vélez Salazar, docente investigador de la Facultad de Ingeniería Química (Universidad Pontificia Bolivariana) y coordinador del Laboratorio de Análisis Instrumental (Centro de Estudios y de Investigación en Biotecnología) por la asesoría y acompañamiento en el desarrollo del proyecto.

Grupo de investigación de las empresas Soluciones biotecnológicas y agroambientales S.A.S. y Abonamos S.A., coordinado por el Ingeniero Octavio González Murillo por el aporte técnico en la ejecución del trabajo de investigación.

Luisa Fernanda Grisales Rojas, profesional en biotecnología por el acompañamiento y la valiosa participación en el perfeccionamiento del documento escrito.

## CONTENIDO

|  | pág. |
|--|------|
| INTRODUCCIÓN   | 21   |
| 1. MARCO TEÓRICO   | 25   |
| 1.1 ECOLOGÍA QUÍMICA Y MICROBIANA EN EL SUELO  | 25   |
| 1.1.1 Ecología Química.  | 25   |
| 1.1.1.1 Factores de crecimiento.   | 27   |
| 1.1.1.2 Relaciones químicas entre microorganismos.   | 29   |
| 1.1.2 Intercambio de señales bioquímicas en la interacción planta-microorganismo.                    | 30   |
| 1.2 SEÑALIZACIÓN ENTRE RAÍCES Y HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES                                     | 37   |
| 1.2.1 Señalización en el establecimiento de la simbiosis micorrizal.                                 | 39   |
| 1.2.1.1 Intercambio de señales a nivel rizosférico en la precolonización.                            | 44   |
| 1.2.1.2 Intercambio de señales a nivel del sitio de adhesión en la penetración del hongo en la raíz. | 52   |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 1.2.1.3 | Intercambio de señales a nivel del sitio de la colonización intraradical y extraradical.                                      | 56 |
| 2.      | MATERIALES Y MÉTODOS  | 62 |
| 2.1     | INDUCCIÓN y BIOSÍNTESIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD MICOTRÓFICA  | 62 |
| 2.1.1   | Inducción y biosíntesis de metabolitos secundarios a partir de plantas micotróficas sembradas bajo condiciones <i>in vivo</i> | 62 |
| 2.1.2   | Inducción y biosíntesis de metabolitos secundarios a partir de semillas de especies vegetales micotróficas                    | 66 |
| 2.2     | EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS   | 68 |
| 2.3     | CARACTERIZACION DE METABOLITOS SECUNDARIOS  | 71 |
| 2.3.1   | Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución   | 71 |
| 2.4     | PRUEBA <i>in vitro</i> DEL EFECTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS SOBRE ESPORAS DE HONGOS MICORRIZALES                         | 72 |
| 2.4.1   | Aislamiento de hongos   | 72 |
| 2.4.2   | Medio de cultivo  | 73 |
| 2.4.3   | Contacto con metabolitos secundarios  | 73 |



|         |   |    |
|---------|---|----|
| 2.4.4   | Efecto de los metabolitos secundarios en el desarrollo del hongo  | 73 |
| 3.      | ANÁLISIS DE RESULTADOS  | 76 |
| 3.1     | INDUCCION y BIOSÍNTESIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD MICOTRÓFICA  | 76 |
| 3.1.1.  | Inducción y biosíntesis de metabolitos secundarios a partir de plantas micotróficas sembradas bajo condiciones <i>in vivo</i> | 77 |
| 3.1.2.  | Inducción y biosíntesis de metabolitos secundarios a partir de semillas de especies vegetales micotróficas                    | 83 |
| 3.2     | EXTRACCION DE METABOLITOS SECUNDARIOS   | 84 |
| 3.3     | CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS  | 89 |
| 3.3.1   | Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución   | 90 |
| 3.3.1.1 | Curva de Calibración para el análisis de Quercetina por HPLC.   | 90 |
| 3.3.1.2 | Cuantificación de Quercetina por HPLC en plantas micotróficas seleccionadas.  | 91 |
| 3.3.1.3 | Curva de Calibración para el análisis de Formononetina por HPLC.  | 93 |
| 3.3.1.4 | Cuantificación de Formononetina por HPLC en plantas micotróficas seleccionadas.   | 95 |

|         |  |     |
|---------|--|-----|
| 3.4     | PRUEBA <i>in vitro</i> DEL EFECTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS SOBRE ESPORAS DE HONGOS MICORRIZALES                          | 97  |
| 3.4.1   | Efecto de los metabolitos secundarios sobre <i>Glomus mosseae</i>  | 97  |
| 3.4.1.1 | Germinación.   | 97  |
| 3.4.1.2 | Elongación.  | 102 |
| 3.4.1.3 | Ramificación.  | 106 |
| 3.4.2   | Efecto de metabolitos secundarios sobre <i>Glomus mosseae</i> y <i>Glomus intraradices</i> a partir de plantas no micorrizadas | 110 |
| 3.4.2.1 | Germinación  | 110 |
| 3.4.2.2 | Elongación   | 115 |
| 3.4.2.3 | Ramificación   | 118 |
| 3.4.2.4 | Relación de los efectos  | 122 |
| 4.      | CONCLUSIONES   | 125 |
| 5.      | RECOMENDACIONES  | 127 |
|         | BIBLIOGRAFÍA   | 128 |

## LISTA DE FIGURAS

|  | pág. |
|--|------|
| Figura 1. Establecimiento de la simbiosis micorrizal y ciclo de vida de los hongos formadores de micorrizas  | 40   |
| Figura 2. Señalización en la simbiosis micorrizal  | 41   |
| Figura 3. Representación esquemática de la percepción de los hongos micorrízico arbusculares a las señales de las plantas durante el establecimiento de la micorriza | 45   |
| Figura 4. Espora germinada con ramificaciones en las hifas   | 48   |
| Figura 5. Relación entre la estructura química de los flavonoides y el efecto en esporas de <i>Gigaspora margarita</i>   | 50   |
| Figura 6. Crecimiento intrarradical de las hifas   | 54   |
| Figura 7. Crecimiento extrarradical de las hifas   | 55   |
| Figura 8. Inoculación de hongos micorrizógenos y siembra de plantas micotróficas   | 64   |

|   |    |
|---|----|
| Figura 9. Flujograma del proceso de inducción y biosíntesis de metabolitos secundarios con actividad microtrófica | 66 |
| Figura 10. Flujograma del proceso de extracción de metabolitos secundarios  | 70 |
| Figura 11. Colonización de hongos formadores de micorrizas en la inducción de metabolitos secundarios             | 82 |
| Figura 12. Curva de calibración para Quercetina   | 89 |
| Figura 13. Cromatograma de estándar de Quercetina   | 90 |
| Figura 14. Cromatogramas de Quercetina en muestras de Trébol rojo (30AE) y Trébol blanco (80AE)                   | 91 |
| Figura 15. Comportamiento de la producción de Quercetina para diferentes tratamientos                             | 92 |
| Figura 16. Curva de calibración para Formononetina  | 93 |
| Figura 17. Cromatograma de estándar de Formononetina  | 94 |
| Figura 18. Cromatogramas de Formononetina en muestras de Trébol rojo (FMNNT_M27) y Lotus (FMNNT_M57)              | 95 |
| Figura 19. Comportamiento de la producción de Formononetina para diferentes tratamientos                          | 96 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 20. Germinación de esporas bajo condiciones <i>in vitro</i>  | 97  |
| Figura 21. Germinación del hongo <i>Glomus mosseae</i> en presencia de extractos de plantas micotróficas  | 98  |
| Figura 22. Germinación de esporas de <i>Glomus mosseae</i> (%), al día siete a partir de la siembra, en función de la aplicación de metabolitos secundarios   | 101 |
| Figura 23. Elongación hifal bajo condiciones <i>in vitro</i>  | 102 |
| Figura 24. Efecto de los metabolitos secundario sobre la elongación hifal   | 103 |
| Figura 25. Elongación hifal de <i>Glomus mosseae</i> (mm), al día veintiuno a partir de la siembra, en función de la aplicación de metabolitos secundarios  | 104 |
| Figura 26. Ramificación de hifas bajo condiciones <i>in vitro</i>   | 105 |
| Figura 27. Efecto de los metabolitos secundario sobre la ramificación hifal   | 107 |
| Figura 28. Ramificación hifal de <i>Glomus mosseae</i> (%), al día veintiuno a partir de la siembra, en función de la aplicación de metabolitos secundarios   | 108 |
| Figura 29. Germinación de los hongos <i>Glomus mosseae</i> y <i>Glomus intraradices</i> en presencia de extractos de Trébol blanco  | 111 |
| Figura 30. Germinación de esporas de <i>Glomus mosseae</i> y <i>Glomus intraradices</i> (%), al día siete a partir de la siembra, en función de la aplicación individual y en mezcla de metabolitos secundarios | 112 |

Figura 31. Elongación de los hongos *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* en presencia de extractos de Trébol blanco. 115

Figura 32. Elongación hifal de *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* (mm), al día veintiuno a partir de la siembra, en función de la aplicación individual y en mezcla de metabolitos secundarios. 116

Figura 33. Ramificación de los hongos *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* en presencia de extractos de Trébol blanco. 118

Figura 34. Ramificación hifal de *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* (%), al día veintiuno a partir de la siembra, en función de la aplicación individual y en mezcla de metabolitos secundarios 120

## LISTA DE TABLAS

|   | pág. |
|---|------|
| Tabla 1. Propiedades de los disolventes orgánicos utilizados en la extracción de flavonoides                                  | 68   |
| Tabla 2. Matriz experimental para evaluación de porcentaje de germinación de semillas y porcentaje de colonización micorrizal | 76   |
| Tabla 3. Porcentaje de germinación de semillas de plantas micotróficas  | 78   |
| Tabla 4. Porcentaje de infección de hongos formadores de micorrizas arbusculares  | 83   |
| Tabla 5. Resultados cromatografía de capa fina para metabolitos secundarios   | 86   |
| Tabla 6. <b>Resultados cromatográficos para Quercetina en plantas micotróficas</b>  | 92   |
| Tabla 7. Resultados cromatográficos para Formononetina en plantas micotróficas  | 96   |

|  |     |
|--|-----|
| Tabla 8. Porcentaje de germinación del hongo <i>Glomus mosseae</i> en presencia de extractos de plantas micotróficas                             | 98  |
| Tabla 9. Elongación del hongo <i>Glomus mosseae</i> en presencia de extractos de plantas micotróficas  | 103 |
| Tabla 10. Porcentaje ramificación del hongo <i>Glomus mosseae</i> en presencia de extractos de plantas micotróficas                              | 107 |
| Tabla 11. Porcentaje de germinación de los hongos <i>Glomus mosseae</i> y <i>Glomus intraradices</i> en presencia de extractos de Trébol blanco. | 111 |
| Tabla 12. Elongación de los hongos <i>Glomus mosseae</i> y <i>Glomus intraradices</i> en presencia de extractos de Trébol blanco.                | 115 |
| Tabla 13. Porcentaje ramificación de los hongos <i>Glomus mosseae</i> y <i>Glomus intraradices</i> en presencia de extractos de Trébol blanco.   | 118 |
| Tabla 14. Relación del efecto de metabolitos secundarios sobre <i>Glomus mosseae</i> en términos de germinación, elongación, y ramificación      | 122 |



## GLOSARIO

**BIOESTIMULANTE:** Producto de origen biológico utilizado con fines de nutrición vegetal, manejo integrado de plagas o mejoramiento de las características biológicas del suelo. Incluye: agentes biológicos para el control de plagas, inoculantes biológicos, bioabonos, inóculos microbianos para compostaje y productos bioquímicos.

**ENDOMICORRIZA:** Asociación simbiótica micorrízico-arbuscular entre plantas y hongos, los cuales son biotrofos obligados que colonizan las células de la raíz para obtener fuentes de carbono de la planta hospedera. Además de crecer al interior de la raíz, el hongo desarrolla una red de hifas externas las cuales absorben y traslocan fosfato y otros nutrientes del suelo, a la raíz.

**ESPECIE:** Individuos que comparten características genéticas de alta similitud, pero lo bastante diferentes para ser identificados como un único individuo.

**ESPORA:** Estructuras que emite el hongo para garantizar su supervivencia en condiciones adversas (estrés). No todas las esporas producidas por el hongo germinan, es decir no todas emiten micelio para colonizar la raíz.

**ESPORAS VIABLES:** Aquella en la cual se aprecia claramente la emisión de un tubo germinativo que colonizará la raíz.

**ESPOROCARPO:** Es una estructura producida por la aglomeración de esporas en forma de racimo. Los esporocarpos son característicos solo de algunas especies de hongos formadores de micorrizas entre ellos *G. aggregatum*.

**FLAVONOIDES:** Metabolitos secundarios de plantas implicados en la señalización de diversas interacciones planta-microorganismo.

**GÉNERO:** Grupo de especies relacionadas.

**HIFAS EXTRARRADICALES:** Micelio que emite el hongo al exterior de la raíz una vez se ha establecido.

**HIFAS INTRARRADICALES:** Micelio del hongo que coloniza el interior de la raíz una vez se ha establecido la simbiosis.

**HONGO FORMADOR DE MICORRIZAS:** Microorganismo eucariótico, tipo hongo con la capacidad de asociarse con las raíces de las plantas para formar una micorriza.

**INÓCULO:** Producto elaborado con base en una o más cepas de microorganismos benéficos que, al aplicarse al suelo, promueve el crecimiento vegetal o favorece el aprovechamiento de los nutrientes en asociación con la planta o su rizósfera. Cantidad mínima de microorganismos requeridos para colonizar un ambiente.

**METABOLITOS SECUNDARIOS:** Compuestos que, sin ser esenciales para la supervivencia de células individuales, tienen un papel importante en la vida y supervivencia del organismo en su entorno ecológico.

**MICORRIZA:** El término micorriza, significa hongo-raíz; etimológicamente proviene del griego MYKOS (hongo) y del vocablo latín RHIZA (raíz). La palabra describe la asociación mutualista que existe entre un grupo de hongos del suelo y las raíces de las plantas.

**PORCENTAJE DE RAÍCES MICORRIZADAS:** Raíces que han sido infectadas (colonizadas) por las estructuras de los hongos formadores de micorrizas.

**PROPÁGULOS INFECTIVOS:** Los hongos formadores de micorrizas se caracterizan porque producen, a lo largo de su ciclo de vida, unas estructuras conocidas como arbuscúlos (en todos los casos), vesículas (en la mayoría de ellos), micelio externo y esporas; cada una de estas estructuras se constituye en un propágulo infectivo a partir del cual se puede formar un nuevo hongo, con capacidad de colonización.

**SEÑALIZACIÓN:** Comunicación bioquímica entre microorganismos, plantas y organismos. Generalmente dado a través de metabolitos secundarios.

## RESUMEN

Los hongos del orden Glomales conocidos como hongos micorrízicos arbusculares, forman asociaciones simbióticas con las raíces de la mayoría de las plantas vasculares. Existen diferentes eventos para el establecimiento de una micorriza, los cuales requieren el envío de señales apropiadas por parte de cada uno de los simbioses y del reconocimiento del otro. El efecto de algunos metabolitos secundarios emitidos por plantas micotróficas estimula los procesos de señalización en la simbiosis micorrizal. En el presente estudio se evaluó el efecto de metabolitos secundarios producidos por las plantas micotróficas *Lotus uliginosus* var. *Maku*, *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*, *Allium cepa* var. *Red creole* y *Leucaena leucocephala* sobre la propagación de los hongos micorrizógenos *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices*; mediante la inducción y obtención de metabolitos secundarios con actividad micotrófica. La extracción de metabolitos secundarios se ejecutó por medio de solventes orgánicos, se realizó cromatografía de capa fina, y caracterización de estos metabolitos mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución. El efecto de los metabolitos secundarios en el desarrollo de los hongos se evaluó a partir de la medición del porcentaje de germinación, porcentaje de ramificación, y elongación hifal. Finalmente, se encontró que el extracto con mayor actividad sobre los hongos micorrizógenos fue obtenido a partir de raíces de *Trifolium repens* sin inoculación micorrizal. Los metabolitos detectados en dicho extracto fueron los flavonoides Quercetina y Formononetina. Estos resultados sugirieron un efecto positivo de los metabolitos secundarios producidos por plantas micotróficas sobre el desarrollo de hongos micorrizógenos.

**PALABRAS CLAVES: HONGOS FORMADORES DE MICORRIZA ARBUSCULAR, QUERCETINA, FORMONONETINA, PLANTAS MICOTRÓFICAS.**

## INTRODUCCIÓN

El consumo mundial de fertilizantes, según la Organización de las Naciones para la Agricultura y la Alimentación (FAO), aumentó desde el año de 2001 aproximadamente un 7 %, alcanzando un nivel aproximado de 143 millones de toneladas de nutrientes. Desde el 2002, el consumo de fertilizantes se incrementó en los países en desarrollo un 7,8 % [1], pasando a un aumento del 4.5% anual en el 2006 al 6% en el 2008 [2]. La tendencia creciente de estas aplicaciones de fertilizantes sumada a prácticas de monocultivos ha disminuido la calidad del suelo; es común encontrar suelos que presentan alta fijación de nutrientes, salinidad, pH extremos, déficit biótico y un deterioro de las propiedades físicoquímicas, lo cual repercute en baja rentabilidad agrícola. Cerca del 43% de los suelos del trópico presenta problemas de deficiencias de nutrimentos para las plantas; Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), Zinc (Zn), Boro (B); toxicidad de elementos, como Aluminio (Al) y Manganeso (Mn), y una alta capacidad de fijación de Fósforo (a  $\text{pH} < 5,3$  y  $> 7,5$ ) [3].

En Colombia la utilización del suelo en sistemas agropecuarios presenta un limitante común en la mayor parte del territorio, el cual es la baja fertilidad que presentan sus suelos. Esta condición se manifiesta por alta acidez, altos contenidos de Aluminio (Al) intercambiable, bajo contenido de elementos nutricionales para las plantas como Fósforo (P), Potasio (K), Magnesio (Mg) y Calcio (Ca), baja capacidad de suministrar nutrientes como Nitrógeno (N) y Azufre (S) debido a la presencia de bajos contenidos de materia orgánica [4, 5]. La mayor parte de los suelos de Colombia son de baja fertilidad, ácidos, susceptibles a la erosión y con bajo contenido de materia orgánica. Estas características de los suelos del país, implica que se incorporen fertilizantes, materiales orgánicos e inóculos microbianos a fin de garantizar rentabilidad agrícola y la conservación del recurso suelo [1].

Como estrategia a este impacto negativo sobre el suelo se ha implementado la inoculación de hongos formadores de micorrizas. Sin embargo por la ruptura del equilibrio microbiológico del suelo muchas veces la inoculación micorrizal no es exitosa. Esto debido a que la brecha que existe entre cultivar organismos *in vitro* y luego reinocularlos al suelo puede resultar, en algunas ocasiones poco satisfactorio, probablemente porque los factores fisicoquímicos, bioquímicos y biológicos del suelo disminuyen la actividad microbiana y reducen su número después de la inoculación [1, 6].

En Colombia hay una baja oferta de bioinsumos formulados a partir de hongos formadores de micorrizas; para el año 2014 existen registrados en el Instituto Colombiano Agropecuario doce productos. La calidad de estos productos es certificada a partir de concentraciones mínimas de estructuras infectivas (esporas, raíces micorrizadas, y micelio externo, entre otros propágulos infectivos), es decir una composición netamente microbiana, la cual no contempla componentes bioquímicos. Por otra parte, las características del suelo y el desequilibrio ecológico de este requiere la aplicación de bioinsumos formulados a partir de un manejo integral de la ecología biológica del suelo y no solamente a partir de concentraciones microbianas, condición que minimiza el efecto en campo debido a una pérdida de la viabilidad de los propágulos infectivos [7].

La adaptación de muchas plantas a condiciones de estrés biótico, químico y físico del suelo (condiciones del trópico) se logra utilizando diferentes estrategias, una de ellas es la formación de micorriza. Algunas plantas no pueden llegar a un nivel de desarrollo óptimo sin la presencia de los hongos micorrizógenos, constituyéndose como dependientes obligadas al micotrofismo. Los beneficios demostrados de las micorrizas para los ecosistemas del suelo (biogeoquímicos) son una mayor área de exploración, mejor agregación del suelo, incremento en la tasa fotosintética de los hospederos, reducción en la proporción masa área – raíz,

aumento en la actividad microbiana del suelo, incremento a la resistencia de las plantas por estrés ambiental, producción de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, aumento de la tolerancia a la sequía y mediación entre interacciones de la microflora y microfauna del suelo. Teniendo como antecedente el desequilibrio ecológico del suelo es necesario la incorporación de metabolitos secundarios para estimular la simbiosis micorrizal y así obtener los beneficios de esta interacción a nivel de rentabilidad agrícola [3, 6, 8].

Las plantas producen metabolitos secundarios involucrados en una multitud de interacciones ecológicas. Un papel importante de estos compuestos está relacionado con los mecanismos de defensa de las plantas hacia patógenos, o bien con la atracción de organismos benéficos. Dentro de estos metabolitos secundarios se incluyen flavonoides, importantes en la transcripción de señales en microorganismos del suelo. En las leguminosas se relacionan los flavonoides como inductores de genes de nodulación en bacterias como *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. En los exudados radiculares de plantas micotróficas se encuentran diferentes metabolitos secundarios asociados al proceso de señalización micorrizal como las estrigolactonas (terpeno lactonas), flavonoides como la Quercetina (flavonol), Luteolina, Dihidroxiavona, e isoflavonas como Diadzeína y Formononetina [3, 8, 9, 10]. Estos metabolitos han sido reportados por su actividad en la promoción de la simbiosis micorrizal; aunque no se ha explorado completamente si solo algunos de estos flavonoides están involucrados en la asociación micorrizal o tienen interacción con otros microorganismos. A partir de esto se requiere de una comprensión detallada de los puentes de comunicación raíz – hongo micorrízico a fin de potencializar la simbiosis micorrizal y por tanto su acción benéfica.

La importancia económica y ecológica de los hongos formadores de micorrizas, ha enfocado las investigaciones a esta interacción simbiótica, donde los aspectos bioquímicos y moleculares son claves en la comprensión del dialogo estrecho y

coordinado que se establece entre ambos simbioses, cuyo intercambio define la compatibilidad funcional y eficacia de la simbiosis como tal. Una forma de mejorar la dinámica ecológica en suelos degradados es reconstruir el ambiente microbiano; mediante la incidencia de flavonoides como mensajeros moleculares en la señalización hongo – planta [8, 10, 11]. Es importante estudiar la actividad mensajera de algunos flavonoides como una posibilidad de “optimizar” la simbiosis micorrízica para potenciar los procesos de infección y así restablecer la baja cantidad de propágulos infectivos que se encuentra en suelos deteriorados. Partiendo que el efecto de algunos flavonoides emitidos por plantas hospederas de hongos formadores de micorrizas (HFM) estimula los procesos de señalización en la simbiosis hongo-planta, la aplicación conjunta de estos mensajeros bioquímicos con inóculos micorrizales puede convertirse en una estrategia biotecnológica amigable con el medio ambiente y económicamente rentable para mejorar la dinámica ecológica de las endomicorrizas y así la productividad del recurso suelo.

En el sector agrícola es necesario promover la utilización de inoculantes micorrizógenos, como medida alternativa a la fertilización tradicional; incentivar la utilización eficiente y racional de los fertilizantes; con miras a aumentar la productividad agrícola conservando el recurso suelo [12]. Las investigaciones en este sentido no solo brindan información sobre los mecanismos ecológicos que controlan la relación entre huésped y hospedero, sino que permiten valorar la posibilidad de extraer estos compuestos para promover la interacción. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de metabolitos secundarios producidos por plantas micotróficas sobre la propagación de hongos micorrizógenos, a partir de la extracción y caracterización de estos compuestos, y su evaluación *in vitro* sobre el desarrollo (germinación, elongación, y ramificación hifal) de hongos formadores de micorrizas.



## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 ECOLOGÍA QUÍMICA Y MICROBIANA EN EL SUELO

#### 1.1.1 Ecología Química.

La ecología señala que los organismos vivos se relacionan de diferentes formas con los factores del ambiente; teniendo una respuesta a ellos, y a su vez, causando un efecto sobre el medio [6]. Bajo algunas condiciones de interacción pueden existir cambios bien sea en la estructura o en la composición química de estos organismos; así mismo, los productos químicos liberados en el ambiente por los organismos impactan drásticamente el entorno e influyen sobre el crecimiento, la salud, la conducta y las poblaciones de plantas, animales y microorganismos [6, 13, 14]. Sin embargo, contrariamente a lo relacionado con la nutrición; este hecho indica la presencia de asociaciones bióticas particulares, las cuales son interacciones bioquímicas entre los organismos [15].

Las investigaciones sobre las interacciones bioquímicas planta-planta y planta-microorganismo da a entender que para que se den estas interacciones ecológicas deben ocurrir un sinnúmero de eventos entre los organismos y que el mundo natural tiene ciertas estructuras detectables y entendibles, donde se presentan características químicas de los organismos [16, 17]. El desarrollo de nuevas técnicas químicas de aislamiento, purificación y caracterización, en las dos últimas décadas de productos naturales en cantidades pequeñas y el interés de resolver ciertos paradigmas ecológicos de carácter urgente, enfocándose en las pérdidas económicas en la agricultura por la presencia de plagas y malezas, ha permitido el fortalecimiento del crecimiento de esta rama de la ecología [15,18].

La bioquímica deja observar con una mejor perspectiva estas complejas interacciones y las adaptaciones coevolutivas de los organismos, como lo es el hecho donde las plantas se relacionan fisiológicamente por medio de uniones bioquímicas con una gran variedad de individuos, estos puentes que probablemente serían formados por injertos naturales de raíces, hongos micorrízicos o haustorios [18, 19]. La planta saprófita *Monotropa hypopitys* interactúa con las raíces de pinos y abetos a través de sus hongos micorrízicos; a través de estos vínculos se transportan los nutrientes de los árboles hacia *Monotropa*. La ecología permite desarrollar un concepto racional de la gran diversidad del metabolismo secundario [18].

Los mecanismos de defensa que desarrollan las plantas hacia los organismos patógenos se ven influenciados por la presencia de los metabolitos secundarios producidos por ellas mismas, del mismo modo que la atracción benéfica de otros organismos [20]. Un evento conocido es la asociación de diferentes hongos del suelo con las raíces de diferentes plantas para formar micorrizas.

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 hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA), las plantas generan respuestas de defensa, que son débiles, localizadas en células específicas y no impiden la colonización del hongo. 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 [21].

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 elicitador ocurre una serie de cambios

bioquímicos que permiten una rápida respuesta de la célula del hospedero y llevan a la activación de genes relacionados con la respuesta de defensa de la planta. La compatibilidad de las plantas con los HFMA depende de las 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. 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 [21]. Las esporas de estos hongos tienen la particularidad de permanecer por tiempos muy prolongados desarrollando estados de latencia, esperando así el momento apropiado para su germinación con la presencia en el medio de alguna planta hospedera [17, 22, 23].

Una de las señales de que indican que las condiciones están dadas para estas esporas es la presencia de exudados de las raíces, los cuales funcionan como factores de inducción para promover la germinación [24]. Los estudios realizados en este campo no solo proporcionan información sobre los mecanismos que regulan esta asociación huésped y hospedero sino que también abre nuevos campos de desarrollo para sintetizar estos compuestos con el fin de promover estas asociaciones.

#### 1.1.1.1 Factores de crecimiento.

En una sucesión de microorganismos, las poblaciones autóctonas presentes se pueden ver afectadas por la presencia de poblaciones foráneas y que son capaces de crecer y desarrollarse en ambientes con poca cantidad nutricional, incluso en ausencia de fuentes de carbono de algún material orgánico [6]. Estos microorganismos excretan materiales orgánicos que pueden ser aprovechados por otras especies, ya presentes o por establecerse. El enriquecimiento bioquímico que desencadena el enriquecimiento biológico y la dinámica de la sucesión [8,13, 25].

Los organismos autótrofos y heterótrofos primarios que se establecen en hábitats como colonizadores, se caracterizan por excretar al medio ciertos metabolitos secundarios así como una gran variedad de compuestos vitales para otros organismos [26]. Dependiendo del tipo de metabolito secundario se ejerce en el medio un sistema selectivo excluyendo algunos organismos y permitiendo que otros predominen, este sistema depende del efecto que se produzca en otros microorganismos y de los requerimientos que son necesarios para ser excretados en el momento apropiado [13, 27]. En la simbiosis micorrízica arbuscular, por ejemplo, la primera señal es dirigida por la planta al hongo por medio de exudados de la raíz, en la fase asimbiótica se presentan señales bioquímicas relacionadas con compuestos volátiles que forman parte de los exudados de las raíces. Uno de ellos es el CO<sub>2</sub>, que es fundamental para la germinación de esporas y crecimiento de la hifa germinativa [21, 28, 29]. 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 [17]. Antes de que la hifa agote sus reservas debe ser capaz de localizar las raíces e iniciar la formación del apresorio, ya que aunque los exudados de las raíces estimulan el crecimiento de hifas, no pueden mantener en forma indefinida su crecimiento, ni la formación del apresorio. Por lo anterior se ha planteado la existencia de señales o metabolitos secundarios producidos por la planta, requeridos para el establecimiento de la simbiosis; existen abundantes datos disponibles sobre el efecto de los flavonoides en el crecimiento de las hifas, la diferenciación de hifas y colonización de las raíces; algunos de los flavonoides ejercen un efecto estimulante claro sobre los hongos formadores de micorrizas (HFM) en el crecimiento de las hifas y este efecto parece depender de la estructura química del compuesto [21, 28].

Además de los exudados de las raíces, la germinación de semillas tiene un significado importante en términos de sustrato debido a la liberación de sustancias

volátiles como etanol, metanol, acetaldehídos; debido a que actúan como factores de crecimiento para diversos microorganismos [5, 30]. La capacidad de concentrar nutrientes inorgánicos tiene un papel determinante en la regulación de la expresión o desaparición de algunas poblaciones en el medio [17, 30, 31].

El grado de estabilidad de una comunidad se ve determinada por la capacidad de establecerse en un determinado hábitat y resistir las condiciones cambiantes. El concepto de comunidad estable no significa que se encuentre en condiciones estáticas, debido a que las fluctuaciones regulares e irregulares pueden influenciar a las poblaciones individuales. Estas fluctuaciones responden a condiciones externas o internas y contribuyen al mantenimiento de la estabilidad global del ecosistema [6, 13, 14, 31].

En el suelo se presentan diversas actividades en las cuales se da un crecimiento localizado de microorganismos y un constante movimiento de los mismos, debido principalmente a los estímulos del medio químico. Estos estímulos e inhibiciones que dependen de nutrientes o sustancias químicas tienen incidencia sobre el crecimiento de los microorganismos [17, 32].

#### 1.1.1.2 Relaciones químicas entre microorganismos.

Los microorganismos se desarrollan en un ambiente químico el cual depende de compuestos externos casuales, sustancias auto-controladoras, la movilidad de nutrientes y metabolitos secundarios estimulantes o inhibitorios producidos por otros organismos [6, 18]. En el suelo un gradiente químico llamado quimiotaxis determina el control del movimiento microbiano generando una quimiotaxis negativa o positiva [30].

Las asociaciones simbióticas entre microorganismos generan vínculos que desencadenan proximidad física, alta especificidad, y frecuentemente uno de los miembros de la asociación no puede ser sustituido por otra especie relacionada

[14, 33]. Las relaciones mutualísticas permiten a los organismos colonizar hábitats que no podrían ocupar de manera aislada. Esto no significa que estas dos poblaciones necesariamente tengan que estar aisladas o compartir el mismo ambiente para su desarrollo [30]. Las actividades metabólicas y tolerancias fisiológicas de las poblaciones involucradas en relaciones simbióticas pueden variar totalmente cuando viven separadas. Estas asociaciones simbióticas dejan actuar a los microorganismos como uno solo [34].

### **1.1.2 Intercambio de señales bioquímicas en la interacción planta-microorganismo.**

La microbiota del suelo se establece, preferencialmente, en la rizósfera, región del suelo bajo la influencia inmediata de la raíz. En ella la cantidad de microorganismos disminuye al aumentar la distancia a partir de la superficie de la raíz de las plantas y al aumentar la profundidad en el suelo [5, 6]. La condición ecológica normal de las raíces de las plantas es el constante contacto y relación con organismos nativos del suelo. Lo anterior se entiende como una relación ecológica donde la planta resulta beneficiada por un diverso grupo de microorganismos y estos a su vez por la riqueza energética de la rizósfera, representada por la gran cantidad de sustancias orgánicas transferidas por la raíz como producto de su metabolismo [4].

La especificidad de muchas interacciones planta – microorganismo, involucra ciertos mecanismos de reconocimiento, entre los cuales se encuentran las señales moleculares entre el hospedero y el microorganismo. Estas señales pueden tener un efecto positivo o negativo sobre la interacción planta - microorganismo dependiendo del tipo de interacción y de la estructura de la molécula. Para que se establezca una interacción específica célula - célula, se requiere que una de las dos células reconozca a la otra, por medio de una molécula indicadora [35].

Las plantas producen metabolitos secundarios involucrados en una multitud de interacciones ecológicas, entre ellas las interacciones planta-planta, planta-microorganismos, planta-animales y plantas-insectos [18]. Dentro de estos metabolitos secundarios se incluyen flavonoides, importantes en la transcripción de señales en microorganismos del suelo [3, 15, 36, 37]. Estudios han aportado conocimientos sobre el papel de los flavonoides como moléculas de señalización en el establecimiento de asociaciones simbióticas con hongos [11]. Los flavonoides de las plantas se unen a los receptores de estrógeno, y en experimentos que han utilizado estrógenos y anti-estrógenos proporcionan evidencia preliminar de la presencia de un receptor fúngico capaz de unir Biocanina A (isoflavona) y estrógenos. A partir de las estructuras de estas moléculas, se ha sugerido que los anillos A y C de los isoflavonoides y el grupo hidroxilo en la posición A-7 son características importantes para el reconocimiento por el receptor. Adicionalmente, se ha encontrado que aunque los derivados de flavonoides pueden influir en las etapas iniciales del ciclo de vida de hongos, los experimentos con mutantes de maíz deficientes en flavonoides indican que no son esenciales para el desarrollo de la simbiosis. Es así como en ambientes naturales, la estimulación de las hifas mediada por flavonoides, el crecimiento y la ramificación en las proximidades de la raíz ayuda a asegurar el contacto y establecimiento de la simbiosis. Los efectos diferenciales de los flavonoides / isoflavonoides en diferentes especies de hongos pueden ser previstas para influir en las poblaciones de hongos asociados a plantas en particular [38].

Los exudados de las raíces no solo pueden funcionar como señales para los microorganismos del suelo, sino también como precursores en la producción de fitohormonas. En el caso de actuar como señales, se necesitan concentraciones bajas de ellos y en muchos casos los componentes activos son flavonoides liberados por las raíces. Una concentración de  $10^{-9}$  M de Luteolina es suficiente como señal de quimiotaxis para *Rhizobium* [10]. Otros flavonoides en los exudados de raíces leguminosas pueden simultáneamente actuar como

supresores de ciertos hongos fitopatógenos [20]. La existencia de plantas no hospederas es una de las evidencias de que los HFMA pueden generar respuestas de defensa en las plantas. En estados tempranos, una vez se percibe el elicitor del hongo, se presentan señales de transducción y activación de genes de defensa. Tal es el caso del hongo *Glomus intraradices*, el cual produce un elicitor capaz de generar síntesis de fitoalexinas en soya y *Medicago truncatula* inmediatamente después del primer contacto con el HFMA [21].

Adicionalmente, en el caso de asociaciones ectomicorrízicas los exudados de las raíces y extractos de Pino (*Pinus sylvestris*) mejoran la germinación de las esporas de varias especies de *Suillus*, involucradas en la simbiosis. Este efecto causado por un diterpeno conocido como Ácido Abiético, el cual es el principal componente de la resina de pino [10]. Las células de la cofia y su mucilago parecen desempeñar un papel importante en el establecimiento de interacciones específicas raíz – microorganismo. En *Eucalyptus* las células de la cofia son fuertemente quimiotácticas para el hongo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* [30]. En suma, el suelo puede contener diversos compuestos secundarios que provienen de la actividad de microorganismos, plantas y animales. Las interacciones entre el suelo, las plantas, otros organismos y las condiciones abióticas son tan complejas y numerosas que no conllevan a realizar una generalización de estas interacciones y todos los procesos involucrados en ellas [6, 13, 14, 33]. La variedad de compuestos quimiotácticos presentes en la rizósfera habla de la gran diversidad química que está asociada a la biológica del suelo [30].

Señalización bioquímica entre leguminosas y bacterias nodulantes.

Entre las simbiosis de mayor impacto para la agricultura y la ecología están las interacciones de las plantas con hongos micorrízicos y bacterias fijadoras de Nitrógeno [39, 40]. La fijación de Nitrógeno simbiótica más estudiada es la formada con leguminosas (*Fabaceae*) y bacterias gram negativas que pertenecen



a los géneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium* (llamados colectivamente rizobios) [41, 42].

En la asociación de leguminosas y rizobios, las bacterias promueven en las raíces de las plantas el desarrollo de un órgano denominado nódulo, dentro del cual se lleva a cabo el proceso de la fijación biológica de Nitrógeno; en esta estructura los rizobios están hospedados intracelularmente y fijan el Nitrógeno atmosférico que puede ser utilizado por las plantas [43]. Durante este proceso el Nitrógeno atmosférico poco asimilable para las plantas es reducido a amonio, produciendo así una forma de Nitrógeno utilizable para la planta el cual contribuirá a su crecimiento y desarrollo [40].

La formación del nódulo implica un reconocimiento específico entre los componentes procarióticos y eucarióticos de la asociación; la invasión de las células de la planta por la bacteria y otros muchos cambios en la estructura y bioquímica de ambos organismos [40, 43]. Por tanto, este proceso está asociado con cambios en la expresión de un grupo de genes. En los últimos años el principal objeto de la investigación sobre la simbiosis entre leguminosas y bacterias fijadoras de Nitrógeno es la disección genética de los factores de nodulación, también denominados factores Nod, encontrando que existe una función no solamente de señalización sino también de autorregulación de la simbiosis. Algunos de estos factores se comparten con los procesos de señalización inducidos durante la formación de micorrizas [42, 44].

Ahora es bien entendido que los rizobios poseen genes que controlan la síntesis, el intercambio del lipo-oligosacárido (factor Nod), la expresión de moléculas de la superficie celular como lipo-polisacáridos y exo-polisacáridos. Lo que conduce posteriormente a la infección bacteriana y la formación de nódulos [43, 44]. Estudios con diferentes sistemas radiculares han demostrado que la supresión de

la nodulación es una respuesta de retroalimentación, mediada por factores Nod [45, 46].

En contraste a la formación de micorrizas, la simbiosis entre leguminosas y bacterias fijadoras de Nitrógeno es limitada a pocas familias de las plantas. Los hongos formadores de micorrizas y los rizobios simbióticos, requiere un diálogo molecular entre las dos partes para coordinar los eventos que conducen a la simbiosis y evitar respuestas de defensa del hospedador [43]. Sin embargo, en la simbiosis con rizobios las respuestas de las plantas son inducidas por las bacterias; en los hongos micorrízicos las investigaciones conducen a respuestas diferentes. En este caso es la planta quien controla la simbiosis, involucrando moléculas comunes para un grupo de plantas hospederas [42]. No obstante, estudios genéticos han demostrado que la ruta de la señalización tanto para los hongos formadores de micorrizas como para los rizobios tiene pasos en común, encontrando características genéticas similares durante las etapas iniciales de las dos interacciones [43]. 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*. Esta similitud se observa a nivel molecular, citológico y genético. En consecuencia, los factores Nod requeridos en la simbiosis leguminosa-rizobios también son requeridos en la asociación planta-HFMA [21].

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa (bacteria-planta) especulativamente evolucionó a partir de una simbiosis mucho más antigua, la simbiosis micorrizal (hongo-planta), las similitudes que emergen en los eventos moleculares que ocurren durante el desarrollo apoyan esta idea. Los hallazgos de un número de mutantes de nodulación por lo general conducen a mutantes micorrízicos, lo que indica la presencia de genes esenciales para ambas simbiosis. El número de los genes tipo “nodulin” inducidos durante el desarrollo de nódulos también se inducen en la simbiosis micorrizal, aunque su función en este último no está clara [47]. En

*Vicia faba*, uno de los cuatro genes de leghemoglobina inducidos en los nódulos también se inducen en las raíces micorrizadas y otros tres genes tipo nodulin, *PsENOD12*, *MsENOD2* y *MsENOD40* se inducen en alverja micorrizada y en las raíces de alfalfa, respectivamente. En las raíces de alfalfa micorrizadas, transcripciones del gen *MsENOD40* se localizan en el periciclo, la epidermis y la corteza como se ve en las raíces inoculadas con rizobios, y co-localizado con las células que contienen arbusculos inmaduros. Las transcripciones del *MsENOD2* están presentes en las células que contienen arbusculos maduros, mientras que en los nódulos estas transcripciones se localizan en el parénquima nodular. La inducción de los genes *MsENOD2* y *40* se produce en respuesta a la citoquinina, que es elevada en las raíces durante la nodulación y aumenta en las raíces de alfalfa micorrizadas [47]. Es posible que la similitud de señalización de estas dos simbiosis se encuentre sólo en el aumento de la citoquinina y que las vías de inducción de esta sean distintas.

Las vías de señalización se expresan en grupos de genes convergentes. Es así como las señales iniciales de las dos simbiosis, bacteria-planta y hongo-planta, pueden diferir. Sin embargo, probablemente poco después de la señal inicial de ambas vías, estas convergen y conservan una serie de eventos denominados como “corriente abajo” [17, 47].

Las leguminosas pueden establecer interacciones simbióticas con hongos micorrízicos arbusculares y rizobios; por lo que son plantas ideales en el estudio de los eventos de señalización de estos dos sistemas endosimbióticos. La mayoría de los avances en la comprensión de las bases moleculares de la cascada de señalización que conducen la interacción simbiótica provienen de los estudios sobre el proceso de nodulación en las leguminosas, *Lotus japonicus* (Lotus) y *Medicago truncatula* (alfalfa) [42, 48, 49].

Los flavonoides liberados por las raíces de muchas plantas han recibido particular atención ya que se han catalogado como moléculas mensajeras clave en el proceso de nodulación de las leguminosas [50]. Estos compuestos emitidos por las raíces de plantas son una clase importante de moléculas de señalización inductoras de los genes de nodulación en las leguminosas, pueden actuar como quimioatrayentes y estimulantes del crecimiento de *Rhizobium*. [2]. Existen al menos tres evidencias que sugieren que las asociaciones *Rhizobium*-leguminosa y hongos micorrízico arbusculares-planta comparten similares mecanismos de acción en su interacción molecular:

- ✓ Algunas plantas de garbanzo mutantes Nod<sup>-</sup> (no nodulantes) también son mutantes Myc<sup>-</sup> (no micotróficos) [2].
- ✓ Algunas endomicorrizas (péptidos inducidos por los hongos formadores de micorrizas) presentan reacción inmunológica cruzada con las nodulinas, lo cual sugiere que las asociaciones planta-microorganismo comparten mecanismos comunes de interacción molecular [2, 51, 52, 53].
- ✓ La mutación que codifica un fenotipo de supernodulación a plántulas de *Pisum sativum* y *Medicago truncatula* también incrementa la susceptibilidad de dichos mutantes a la colonización por *Glomus mosseae* [45, 54].

Estas evidencias han motivado la investigación para determinar la naturaleza química de dichas moléculas, así como su efecto en el desarrollo de los HMA. La raíz emite señales, que alertan a los hongos a la presencia de un huésped potencial y por lo tanto una importante fuente de carbono orgánico [9].

## 1.2 SEÑALIZACIÓN ENTRE RAÍCES Y HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

Los hongos clasificados dentro del orden Glomales (*Glomus*, *Acaulospora*, *Entrophosphora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*) son ampliamente conocidos como hongos micorrízicos arbusculares (HMA), debido a que forman asociaciones con las raíces de la mayoría de las plantas vasculares, formando un órgano llamado micorriza arbuscular [8, 45, 55]. La adaptación de muchas plantas a condiciones de estrés biótico, químico y físico del suelo (condiciones del trópico) se logra utilizando diferentes estrategias, una de ellas es la formación de micorriza, la cual es una asociación de tipo simbiótica mutualista, entre ciertos grupos de hongos y las raíces de más del 80% de especies vegetales [14, 17, 21, 26, 56].

La colonización de las plantas por hongos micorrízicos parece ser un fenómeno universal que facilita la transferencia de nutrientes, especialmente Fósforo a la planta y la transferencia de hidratos de carbono para el hongo [3, 11, 14]. Los beneficios de las micorrizas para los ecosistemas del suelo, ambiente biogeoquímico [33], implican una mayor área de exploración y mejor agregación del suelo [3, 14], incremento en la tasa fotosintética de los hospederos [3, 57], reducción en la proporción masa área – raíz [34], aumento en la actividad microbiana del suelo (ejemplo: fijación biológica de Nitrógeno simbiótica) [3, 4, 55], incremento a la resistencia de las plantas por estrés ambiental [8, 55], producción de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal [4, 6, 58], aumento de la tolerancia a la sequía [34, 55] y se constituyen como mediadores de interacciones de la microflora y microfauna del suelo [14, 34, 55, 59].

La susceptibilidad, muy relacionada con la compatibilidad, trata de integrar el grado de asociación de los genomas de los simbioses, mediado por factores

edáficos, climáticos y ambientales [52]. En la simbiosis de endomicorrizas, el grupo de hongos involucrado son del filum *Glomeromycota* [16], los cuales perdieron la capacidad de desarrollar su ciclo de vida sin la presencia de una planta hospedera, por lo que se conocen como biotrofos obligados, situación dada debido a la coevolución de los simbioses [3, 14, 55, 60]. Por otra parte, algunas plantas no pueden llegar a un nivel de desarrollo óptimo sin la presencia de los hongos micorrizógenos, constituyéndose como dependientes obligadas al micotrofismo [26]. En esta simbiosis no existe especificidad ni desde el punto de vista del hongo ni de la planta; un sistema radical puede ser colonizado por varias especies que crecen en proximidad. A pesar de ello, distintas especies vegetales muestran un grado de susceptibilidad diferente ante la colonización por un mismo hongo formador de micorriza, lo cual puede interpretarse como diferencias en el grado de compatibilidad entre la planta y los distintos HMA [52]. Es así, como se ha demostrado que la presencia o diversidad de los hongos micorrizógenos pueden tener una fuerte influencia en la composición de las comunidades vegetales y el entorno donde se establecen [14].

El grado de actividad química de los compuestos estimulantes producidos por las raíces como los flavonoides y una estereo-especificidad, de estos puede variar entre los géneros de HMA e incluso tiene un efecto diferente sobre una especie específica [29, 61]. El estudio de estos hongos ha sido complicado debido a que no son capaces de crecer axénicamente, uno de los problemas en el estudio de las interacciones de las raíces con hongos micorrizógenos arbusculares es la ausencia de colonización sincrónica [62]. No obstante, el cultivo de raíces de zanahoria transformadas con el ADN-T del plásmido Ri (*Root-inducing*) de *Agrobacterium rhizogenes* ha permitido el crecimiento *in vitro* de algunas especies endomicorrízicas [3, 45, 61, 63, 64, 65].

Típicamente, los HMA forman estructuras denominadas arbusculos, y en algunos casos vesículas, en los tejidos de la raíz del hospedero. La aparición de dichas

estructuras dependerá del tipo de hospedero: en promedio de 13 a 18 días en especies no leñosas y de 30 a 40 días en especies leñosas [45]. Los propágulos infectivos de los hongos formadores de endomicorrizas son hifas extraradicales, intraradicales, micelio, esporocarpos y esporas [8, 55]. Estas últimas pueden permanecer en estado de latencia por largos periodos, ya que la germinación se efectúa en el momento apropiado, por ejemplo, cuando las raíces de algunas plantas hospederas estén presentes en el medio [9, 10, 11, 66].

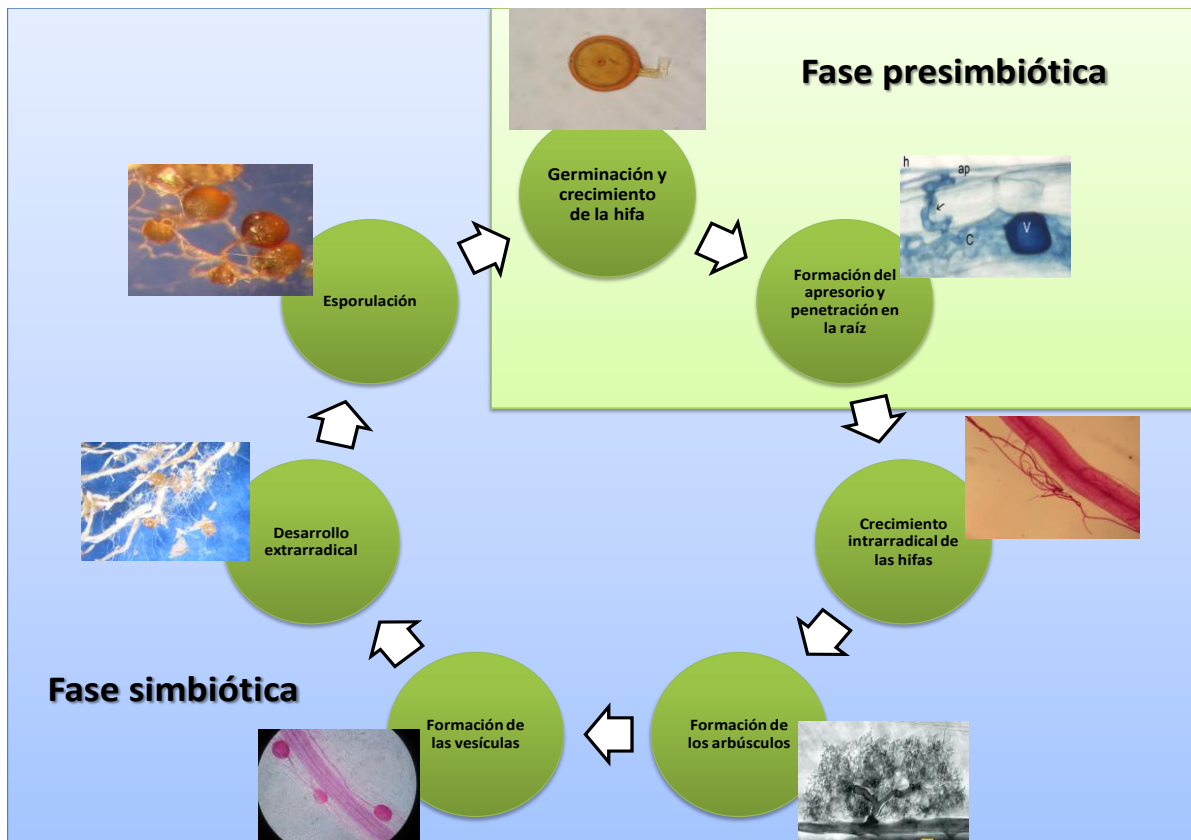
### **1.2.1 Señalización en el establecimiento de la simbiosis micorrizal.**

Uno de los interrogantes acerca de la simbiosis micorrizal es como las asociaciones entre los simbiositos, hongo-raíz hospedera, establecen la simbiosis sin generar rechazo. Las investigaciones han sido limitadas por algunas características clave en la simbiosis micorrizal: inespecificidad, el estado de biotrofos obligados de los hongos, la alta compatibilidad de la interacción y el desarrollo asincrónico de ésta [9]. Una micorriza funcional es aquella donde los arbusculos formados dentro de las células de la raíz del hospedero llevan a cabo un eficiente intercambio de fosfatos, carbohidratos y otros iones indispensables para el desarrollo de la simbiosis [45]. Cuando las hifas alcanzan las células corticales se desarrollan los arbusculos y más tarde las vesículas, tanto las hifas como las demás estructuras fúngicas quedan rodeadas de una interfase cuando atraviesan una célula vegetal, en esta interfase es la zona de mayor actividad de intercambio de nutrientes, y prueba de ello es su naturaleza altamente ácida debido a la intensa actividad de proteínas  $H^+$  - ATPasa que se detectan en la membrana peri-arbuscular. Estas proteínas están consideradas como las principales responsables del control del transporte iónico y molecular en plantas y hongos [17, 67]. Existen diferentes eventos para el establecimiento de una micorriza funcional, cada uno de los cuales requiere el envío de señales apropiadas por parte de uno de los simbiositos y del reconocimiento del otro, o el reconocimiento entre ambos simbiositos [8]. Por tanto, el intercambio efectivo de señales, se realiza durante las distintas etapas de la interacción, donde el establecimiento de la simbiosis va a depender de las

interacciones entre los tres componentes del sistema: el hongo, la planta y las condiciones ambientales [33, 68]. Su presencia implica que ocurran procesos de reconocimiento y compatibilidad entre los simbios, los cuales condicionan su expresión y conducen a la integración morfológica y funcional de los asociados [8, 52].

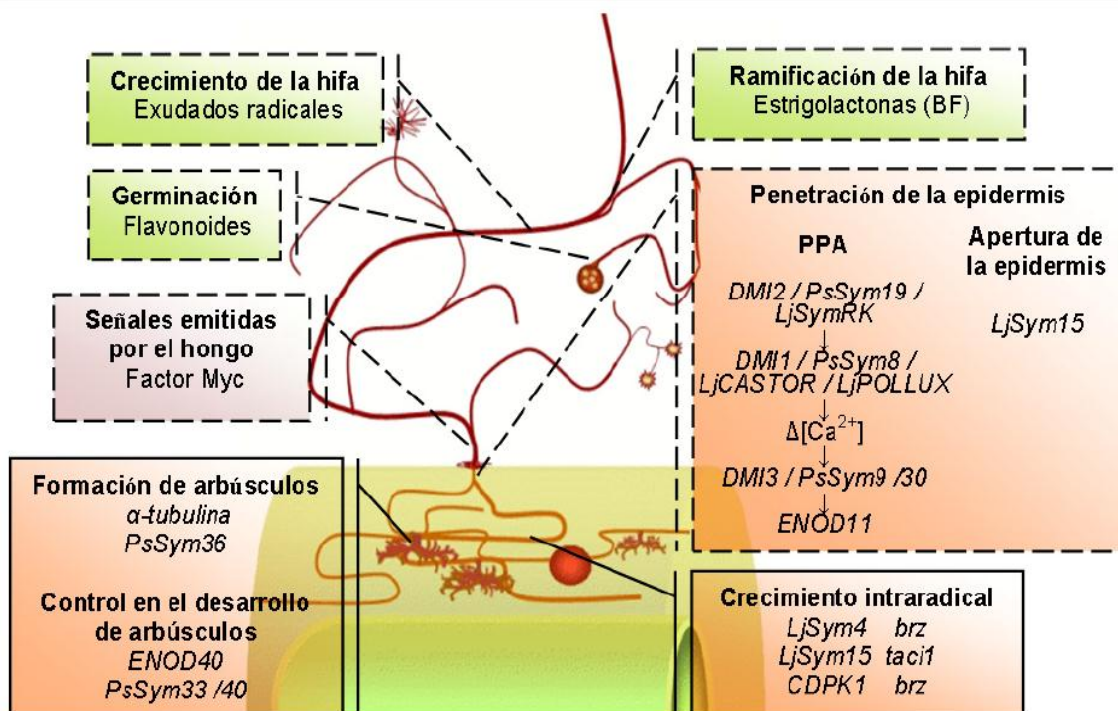
El ciclo de vida del hongo se divide en varias etapas (Figura 1) y estas se agrupan en dos fases, una fase presimbiótica o precolonización, la cual se refiere a las primeras etapas del desarrollo del hongo antes de unirse a la raíz (germinación de las esporas, crecimiento y ramificación de las hifas hasta alcanzar la raíz, y formación del apresorio). La segunda fase corresponde a la simbiótica, la cual se refiere a las etapas a partir del desarrollo del hongo dentro de la raíz [17]. En esta etapa de crecimiento intraradical de las hifas, el micelio crece en el interior de la raíz este puede crecer entre las células (tipo *Arum*) o por dentro de las células (tipo *Paris*), independientemente del tipo de crecimiento del micelio se da la formación de unas estructuras muy intrincadas llamadas arbusculos, exclusivas de estos hongos. A través de estas estructuras se realiza el intercambio de nutrientes. Cuando el micelio interno está bien desarrollado se producen vesículas entre las células vegetales, donde se almacenan sustancias de reserva. Una vez el hongo ha colonizado una raíz y ha formado los arbusculos, las hifas del hongo vuelven a salir de la raíz desarrollando un micelio extraradical que cubre gran parte de las raíces. Estas hifas se extienden por el suelo aumentando la superficie de absorción y alcanzando zonas a las que las raíces no pueden acceder. Estas hifas extraradicales son una de las fuentes principales de inóculo para nuevas infecciones. Así los hongos facilitan a la raíz la captación de nutrientes (sobre todo Fósforo), y ésta a cambio le facilita carbohidratos al hongo [67, 69].





**Figura 1.** Establecimiento de la simbiosis micorrizal y ciclo de vida de los hongos formadores de micorrizas. **Fuente:** García, Carolina. Evaluación de la simbiosis micorrizal. Empresa Soluciones Biotecnológicas y Agroambientales S.A.S. 2010.

Los datos expuestos sobre las señales participantes en el dialogo molecular hongo-planta se han obtenido mediante el estudio de las etapa presimbiótica y simbiótica. En la Figura 2 se representa un resumen de las señales establecidas en ambas fases [17, 69].



**Figura 1.** Señalización en la simbiosis micorrizal. Las viñetas con líneas discontinuas corresponden a la fase presimbiótica, y las de línea continua a la simbiótica. Los cuadros en púrpura representan a las señales emitidas por el hongo micorrízico; los cuadros verdes, a las señales emitidas por la raíz hospedadora; y los cuadros naranjas, a genes y señales de la raíz esenciales para el desarrollo de la micorrización correspondientes a las plantas: *M. truncatula* (DMI1/2/3, ENOD11/4 y CDPK1), alverja (PsSym 8/9/19/30/33/36/40), maíz (*taci1* y  $\alpha$ -tubulina) y *L.japonicus* (LjSym4/15/RK, LjCASTOR y LjPOLLUX). PPA, aparato de penetración. **Fuente:** Herrera Medina, María José (2008) Web Universidad de Granada España. [Online]. [digibug.ugr.es/bitstream/10481/1899/1/17493353.pdf](http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/1899/1/17493353.pdf).

El intercambio de señales entre el hongo y la planta hospedera ocurre a tres niveles: rizósfera, zona de adhesión y dentro de la raíz misma. A nivel rizosférico, se manifiesta mediante la estimulación del desarrollo del hongo por los exudados radicuales de plantas susceptibles de ser micorrizadas [45]. En la zona de adhesión cuando se producen los primeros contactos célula – célula, se evidencia por la

formación de apresorios sobre la epidermis radical de plantas hospederas sin generar una respuesta de defensa agresiva sobre el hongo micorrizógeno [9], ya que alrededor de los hongos cuando penetran la raíz, no se forman callos ni compuestos fenólicos [52]. A nivel de la zona colonizada, el hongo experimenta una morfogénesis diferente, según la zona de la corteza radical colonizada; en estos estados más avanzados de la simbiosis existe una comunicación molecular para alcanzar la integración de la fisiología propia de ambos simbioses y la redistribución de actividades enzimáticas como las desencadenadas por las plantas frente al ataque de patógenos, básicamente los mecanismos de defensa durante la micorrización se reducen a la activación de algunas proteínas, como enzimas hidrolíticas en las primeras etapas de la colonización (quinasas, exo y endo glucanasas, xiloglucanasas y enzimas pectolíticas), antioxidantes durante la micorrización y algunas durante la formación de apresorios, enzimas relacionadas con la síntesis de flavonoides (fenilalanina amonioliasa y calchona isomerasa) y enzimas relacionadas con la respuesta a patógenos (PR) [62,17, 38]. El fenómeno del reconocimiento se sustenta en puentes de comunicación moleculares, pues los cambios anatómicos y fisiológicos que suceden durante el proceso indican que los simbioses se reconocen [52]. Este reconocimiento planta – hongo es un proceso activo mediado por señales de la raíz hospedera, que guía sin ambigüedad la selección del hospedero- simbiote [70].

En los exudados radiculares de plantas hospederas se encuentran diferentes flavonoides, que pueden desencadenar la promoción de la simbiosis micorrizal; en este sentido no se ha explorado completamente si solo algunos de estos flavonoides están involucrados en la asociación micorrizal [22, 28, 53]. Además, se sabe poco si la respuesta a estos promotores es específica o selectiva por género de hongo, a partir de esto se requiere de una comprensión detallada de los puentes de comunicación raíz – hongo micorrizico [10]. Estudios dirigidos a los hongos micorrizógenos arbusculares se han centrado en determinar grupos de metabolitos presentes en raíces micorrizadas, por ejemplo, isoflavonoides, amidas

hidroxicinnamoil y apocarotenoides como compuestos de señalización que inducen la expresión de genes en los simbioses [37, 71, 72]. También se ha demostrado una relación con el cambio en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, donde se ha encontrado, predominantemente trehalosa en las raíces de hongos micorrizógenos [62].

La diferencia entre los hongos endomicorrizógenos y otros microorganismos simbióticos del suelo, como las bacterias nodulantes (*Rhizobium* y *Bradyrhizobium*), estriba en que los primeros exhiben poca especificidad por el hospedero. La falta de especificidad podría deberse básicamente a que las moléculas mensajeras necesarias en cada paso del proceso de colonización son producidas por todas las plantas micotróficas. También es factible que una amplia variedad de moléculas mensajeras promuevan la transducción de una misma señal que, finalmente, conlleva al establecimiento de la simbiosis [45].

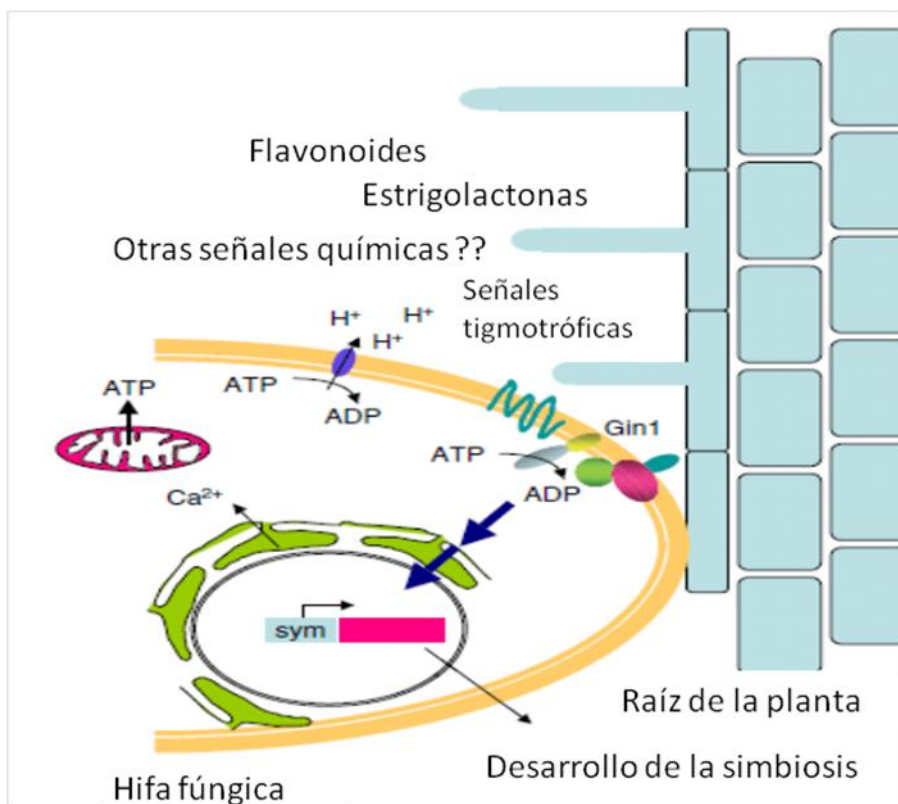
#### 1.2.1.1 Intercambio de señales a nivel rizosférico en la precolonización.

La precolonización se inicia a partir de las fuentes de propágulos infectivos de los hongos formadores de micorriza arbuscular que se encuentran en el suelo. Estos propágulos estimulados por los componentes bióticos, los exudados y las condiciones físico-químicas del suelo crecen en abundancia aumentando las posibilidades de contacto entre la raíz y el hongo [19, 70, 73]. La influencia de exudados de raíces de plantas en microorganismos del suelo, “efecto rizosférico”, ha sido reconocida por diferentes autores [61, 64, 74]. El intercambio de señales a nivel rizosférico está determinado por la influencia de exudados de las raíces de plantas, proceso previo a la colonización vesículo arbuscular [31, 53, 75]. Además, de involucrar la relación de la edad de la planta, la especie vegetal y la luz; con la producción de exudados radiculares y su efecto en la formación de micorrizas arbusculares [76].

Las evaluaciones del intercambio de señales a nivel rizosférico se realizan por medio de un bioensayo con un HMA para identificar y caracterizar químicamente los compuestos activos en exudados de raíces que conducen a cambios morfogénéticos en el avance de colonización de la raíz. Estos cambios parecen cruciales en la conversión de los tubos germinales con un potencial de crecimiento limitado en micelio presimbótico (precolonización) que tiene la capacidad de iniciar la colonización de las raíces [9]. Por otra parte, el compuesto activo desencadena un efecto de ramificación sobre las esporas germinadas. Aunque se desconoce cuál vía del receptor o de señalización es el blanco de los flavonoides, el efecto de flavonoides podría ser imitado por los estrógenos y bloqueado por anti-estrógenos. Esta es una fuerte evidencia de que un receptor específico, proteína de interacción, con un sitio de unión para los flavonoides o compuestos estructuralmente relacionados (estrógenos y antiestrógenos) existe en los hongos [35]. Los flavonoides tienen el potencial de adherirse a los sitios de unión del ATP de un gran número de proteínas que incluyen la ATPasa mitocondrial, ATPasa calcio de la membrana plasmática, la proteína quinasa A, la proteína quinasa C, y la topoisomerasa [37].

Las señales químicas exudadas por la planta, tales como flavonoides y estrigolactonas, junto con las señales de superficie o tigmotróficas de la rizodermis están posiblemente reconocidas por proteínas receptoras asociadas a la membrana plasmática de hongos. Tras la percepción de la señal las proteínas receptoras se modifican y posiblemente interactúan con los componentes “corriente abajo”. El factor Gin1 podría ser uno de los componentes “corriente abajo” que se encuentra en la membrana plasmática donde se modifica covalentemente mediante señales de la planta. A través de su actividad de la ATPasa, el factor Gin1 podría interactuar y/o modificar otras proteínas de la membrana para transmitir la señal hacia el núcleo. El calcio, liberado de orgánulos celulares, tales como el retículo endoplasmático, podría actuar como un segundo mensajero. La activación de la respiración mitocondrial y el aumento de la

actividad ATPasa, produciendo la hiperpolarización de la membrana que se produce después de la inducción transcripcional de los genes correspondientes. Algunos de los genes de los hongos se activan en respuesta a las señales de la planta, estos genes juegan un papel importante en la decisión de la detención del crecimiento programado y permite que el hongo entre en modo simbiótico (Figura 3).



**Figura 2.** Representación esquemática de la percepción de los hongos micorrízico arbusculares a las señales de las plantas durante el establecimiento de la micorriza. **Fuente:** Requena, Natalia, Serrano, Esther, Ocón, Aurora, and Breuninger, Magdalene. Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry*. vol. 68. no. 1. pp. 33-40. Enero 2007.

Por otro lado, diferentes técnicas moleculares han permitido la identificación exitosa de genes de plantas inducidos o reprimidos en respuesta a HMA, los pocos genes fúngicos identificados corresponden principalmente a genes de hongos constitutivos altamente expresados [77]. Los análisis sobre la expresión de genes tipo GmGin1 muestran que estos se reducen y regulan tras la entrada en simbiosis, lo que implica un rol en la fase de reconocimiento de la planta. Dada la similitud del terminal amino de GmGin1 (liberado como proteína madura) con GTPasas de plantas y animales que participan en el control de los procesos apoptóticos, se prevee dos escenarios de las funciones posibles para GmGin1. En uno, GmGin1 responde a una señal de la planta y se impide la interrupción preestablecida del crecimiento, que tiene lugar en ausencia de un hospedante compatible. En un segundo escenario, GmGin1 detecta la ausencia de una señal de la planta e induce un proceso de apoptosis con la tabicación de hifas desde el ápice y la degradación de los componentes del protoplasma dentro de los fragmentos tabicados. La muerte celular autofágica fúngica es necesaria para la formación de apresorios funcionales, por ejemplo en el hongo fitopatógeno *Magnaporthe grisea*, si el gen necesario para la autofagia es eliminado, los apresorios todavía estarán formados, pero no penetran la epidermis de la hoja [35, 69].

La actividad proteica del factor GmGin1 se constituye en un sensor para las señales de las plantas. Esta proteína se encuentra en la membrana celular y por medio de su extremo carboxilo terminal, que es el homólogo al extremo terminal carboxi de proteínas *auto-splicing* sufre un *splicing* en respuesta a señales procedentes de la planta. Después de esta respuesta, el extremo amino terminal se mantiene unido covalentemente a la señal de la planta actuando como un nucleófilo. La comunicación química con el simbionte planta no sólo modifica la expresión del gen fúngico, sino también es capaz de inducir la modificación post-transcripcional de las proteínas de hongos [35, 67].

Debido a las limitaciones tecnológicas para estudiar la respuesta de la hifa de los hongos micorrízico arbusculares a los exudados radicales, no ha sido posible distinguir completamente entre la respuesta a factores solubles en agua, volátiles o ambos [75, 78]. No obstante, se ha observado incremento en el crecimiento de las hifas de *G. mosseae* y *G. caledonium*, en respuesta a compuestos volátiles liberados por cultivos de células en suspensión de *Medicago sativa* [45, 79].

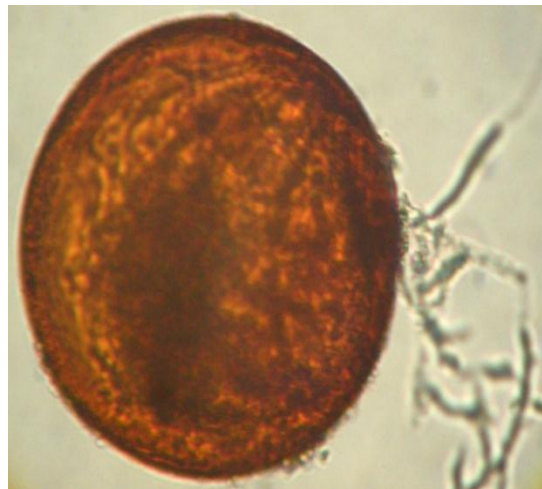
La etapa fisiológica presimbiótica activada requiere la presencia simultánea de compuestos volátiles, los exudados de la raíz y de CO<sub>2</sub> [29, 80]. Las esporas de HMA pueden fijar el CO<sub>2</sub> como fuente mineral de carbono [80]. Desde el punto de vista metabólico, el CO<sub>2</sub> tiene una gran importancia para la germinación de estos hongos, debido a que en esta etapa, el metabolismo fúngico depende predominantemente del catabolismo lipídico para su posterior biosíntesis. El catabolismo de lípidos conduce a la formación de acetil-CoA, dos moléculas de Carbono (C), las cuales se oxidan posteriormente en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT), lo que hace que el saldo neto de C sea teóricamente cero. Igualmente, el ciclo del glioxilato (CG) también se produce en los HMA, y este ciclo, a diferencia del ciclo del CAT, evita la pérdida de las dos moléculas de CO<sub>2</sub>. Además del ciclo del glioxilato, el CO<sub>2</sub> puede representar una entrada adicional de C y activar significativamente el crecimiento de los hongos [29]. El dióxido de carbono puede, por lo tanto, ser considerado como el primer compuesto estimulador no específico emitido por la raíz hospedera. De hecho, los estudios sobre los compuestos estimulantes radiculares más específicos a menudo se realizan en un ambiente enriquecido con CO<sub>2</sub> (es decir, las incubadoras ajustadas con CO<sub>2</sub> al 2%) [29, 80, 81].

Por otra parte, otros compuestos volátiles de la raíz están implicados durante el crecimiento presimbiótico de los HMA. La acción estimulante de los exudados de la raíz no volátiles, en la formación de células auxiliares y ramificación hifal se evalúa usando un sistema *in vitro*. Tal es el caso, de la actividad del plasmalema



H<sup>+</sup>-ATPasa, la absorción de fosfato, pH intracelular, y la actividad mitótica, los cuales correlacionan con la estimulación presimbiótica de los HMA [82].

Por otra parte, los exudados provenientes de plantas deficientes en Fósforo, también estimulan el crecimiento de los tubos germinativos hasta 36 veces más que el crecimiento inducido por exudados de plantas bien nutridas con Fósforo. Comúnmente, estos tubos germinativos son cuatro veces más largos y producen más ramificaciones en presencia de exudados. No obstante, es interesante señalar que mientras los exudados de algunas plantas estimulan la germinación, otros presentan un efecto inverso [74, 82, 83]. En la Figura 4 se muestra la germinación de una espора de HMA a partir de extractos de plantas con déficit de Fósforo.



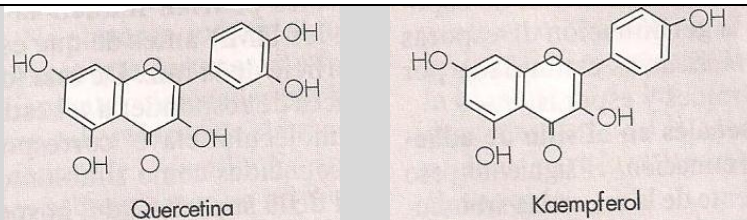
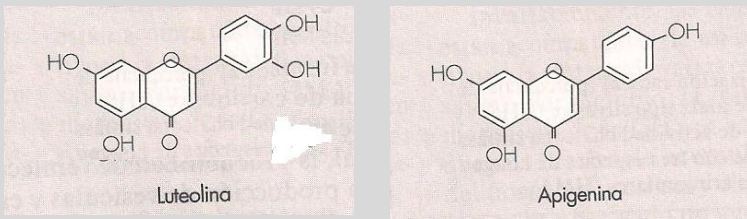
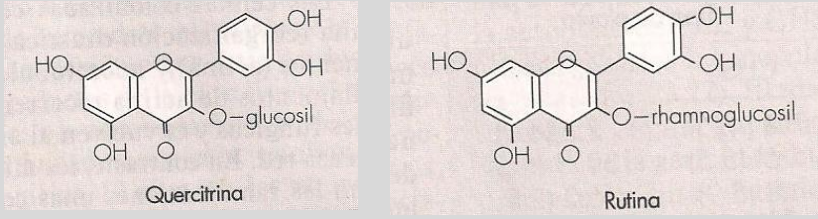
**Figura 3.** Espora germinada con ramificaciones en las hifas. Espora germinada del género de hongos micorrícicos *Entrophospora* cultivada y estimulada in vitro con extractos de raíces de cebolla (*Allium cepa*) deficiente en Fósforo, produciendo ramificación en las hifas. **Fuente:** García, Carolina. Evaluación de la simbiosis micorrizal. Empresa Soluciones Biotecnológicas y Agroambientales S.A.S. 2010.

Además del papel que puede jugar el CO<sub>2</sub>, compuestos fenólicos como los flavonoides y otros compuestos volátiles en la ocurrencia del proceso germinativo, la desinfección superficial de las esporas y la germinación previa de los propágulos en condiciones axénicas son relevantes. Estos factores se constituyen en un requisito de suma importancia para el exitoso establecimiento de la simbiosis bajo condiciones *in vitro*, ya que la germinación es uno de los procesos más importantes durante el ciclo de vida de los hongos micorrizógenos [81, 84]. Aunque la mayoría de las especies son capaces de germinar en ausencia de señales derivadas del hospedero, su crecimiento en condiciones axénicas constituye aún en la actualidad un gran problema. Inicialmente, por la alta posibilidad de contaminación del inóculo micorrízico, en segundo lugar, por el comportamiento del hospedero *in vitro* y, finalmente, por la naturaleza obligada del endófito [81].

La descontaminación se requiere tanto para evitar la proliferación de contaminantes, como para asegurar que los microorganismos asociados con las esporas de estos hongos no influyan en los resultados experimentales. Los agentes desinfectantes en el tratamiento de estos propágulos infectivos principalmente son: hipoclorito de calcio, cloramina T y Monooleato de Polioxietileno Sorbitan, solución antibiótica de estreptomina sulfatada y gentamicina sulfatada. Estos desinfectantes se constituyen en una metodología que garantiza la germinación rápida y exitosa de las esporas y fragmentos de raíces micorrizadas, en ausencia de contaminación [81, 84]. Sin embargo, las concentraciones y tiempos de exposición pueden variar según el inóculo utilizado.

Por otra parte, se ha relacionado la estructura química de los flavonoides con su efecto en el crecimiento miceliar. Así, la estimulación del crecimiento hifal en esporas de *Gigaspora margarita* debido a los flavonoles, quercetina y kaempferol, se ha contrastado con la nula respuesta a las flavonas, luteolina y apigenina, las cuales carecen de radical hidroxilo (HO<sup>-</sup>) en la posición tres. Por otro lado, los

glucósidos quercitrina y rutina, que tampoco han mostrado efectos estimulatorios, presentan glicosilada la posición 3 [64, 85]. Estas evidencias sugieren que el grupo hidroxilo, en dicha posición, es esencial para conferir actividad estimulatoria a la molécula; por lo que en términos generales, podría suponerse que los flavonoles son más estimulatorios que las flavonas [45]. La Figura 5 muestra de manera esquemática la relación entre la estructura química de los flavonoides y el efecto en esporas de *Gigaspora margarita*.

| Flavonoide | Formula  | Efecto        |
|------------|--|---------------|
| Flavonoles |  <p>Quercetina</p> <p>Kaempferol</p> | Estimulatorio |
| Flavonas   |  <p>Luteolina</p> <p>Apigenina</p>  | Inhibitorio   |
| Glucósidos |  <p>Quercitrina</p> <p>Rutina</p>  | Inhibitorio   |

**Figura 4.** Relación entre la estructura química de los flavonoides y el efecto en esporas de *Gigaspora margarita*. **Fuente:** Ferrera-Cerrato, Ronald y Alarcón, Alejandro. *Microbiología Agrícola*. México D.F.: Editorial Trillas. 2007. págs. 551.

Por último, es importante precisar que independiente del mecanismo con el cual se active o estimule la fase de precolonización el proceso seguido al activarse la espora es la emisión de varios tubos germinativos, cuyo conjunto forma el micelio, el cual crece de forma apical y radial, alrededor de la espora sin un crecimiento

direccionado a la raíz [23]. Dicho micelio se sustenta con las reservas nutricionales de la espora hasta llegar a la rizósfera. Lugar donde algunos autores han comprobado que el micelio es estimulado por los exudados lo que provoca que se forme una estructura de precolonización en forma de abanico o apresorio; a partir de la cual se produce la colonización propiamente dicha [83, 86].

#### 1.2.1.2 Intercambio de señales a nivel del sitio de adhesión en la penetración del hongo en la raíz.

En el sitio de adhesión en la penetración del hongo en la raíz, se presenta un intercambio de señales. Después de la germinación y de la ubicación de micelio en la zona proximal a la raíz, el contacto entre el tubo germinativo y las células de la raíz de la planta hospedera es un punto crítico de la simbiosis [36]. Este estado temprano de la interacción planta-hongo ilustra la complejidad del dilema de las plantas para distinguir entre hongos simbióticos y patogénicos. Dicho reconocimiento se da por medio de moléculas presentes en las células de la raíz [8]. Además, los exudados de la raíz pueden estimular la adhesión, penetración y colonización [87].

Como estrategia de defensa los hongos aseptados pueden formar septos ocasionales para protección del micelio, es el caso de lo observado en los HMA, en el momento de intercambiar información al contacto con las células radicales. Este cambio fenotípico podría deberse a compuestos fenólicos presentes en los exudados radicales [35]. Los hongos incapaces de responder a estos estímulos no serán reconocidos por las raíces del hospedero y es posible que a nivel de la superficie radicular el hongo sea rechazado [45].

A través de estudios realizados de la señalización en la simbiosis micorrizal se han descrito eventos dirigidos en la planta durante la etapa inicial de colonización de las hifas, es decir el contacto del hongo y la raíz [55]. En estos estudios se ha evidenciado como las células epidérmicas de *Medicago truncatula* forman una

estructura intracelular especial antes que se dé la penetración celular [9]. Primero, el núcleo de la célula epidérmica se coloca de inmediato en el marco del apresorio. Los perfiles de transcripción de los hongos durante la formación de apresorios ha mostrado que el contacto con la planta induce la activación de genes de diferentes categorías, incluyendo varios componentes relacionados con la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$ , un tipo de ATPasa, una calmodulina, una proteína leucina, y un  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por el inactivador Ras (CAPRI) [17, 35]. En contraste, la planta en simbiosis con bacterias fijadoras de Nitrógeno induce un aumento en la afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , un posterior flujo de salida de  $\text{K}^+$ , despolarización de la membrana plasmática y la alcalinización intracelular en los pelos radicales en la percepción de los factores Nod bacterianos. Por su parte, en apoyo de una cascada de señalización similar durante la percepción de las señales de la planta por los hongos, se da un aumento en la expresión de un gen  $\text{H}^+$ -ATPasa sobre la formación de apresorios. Por tanto cabe especular que  $\text{Ca}^{2+}$  podría jugar un papel importante en la transmisión de señales de la planta a la formación de apresorios en la simbiosis micorrizico arbuscular (Figura 3) [35].

Posterior a esto se originan eventos seguidos regulados, los cuales son dirigidos por nuevos movimientos del núcleo celular, dando lugar a la formación de un aparato especial de penetración, conocido como PPA [3]. El PPA es una estructura formada por microfilamentos, microtúbulos y retículo endoplasmático, relacionado con la penetración de la hifa, y que define el camino que seguirá la misma al atravesar la célula epidérmica. La mutación del PPA origina un bloqueo total o parcial de la penetración de la epidermis por el hongo micorrizico [17].

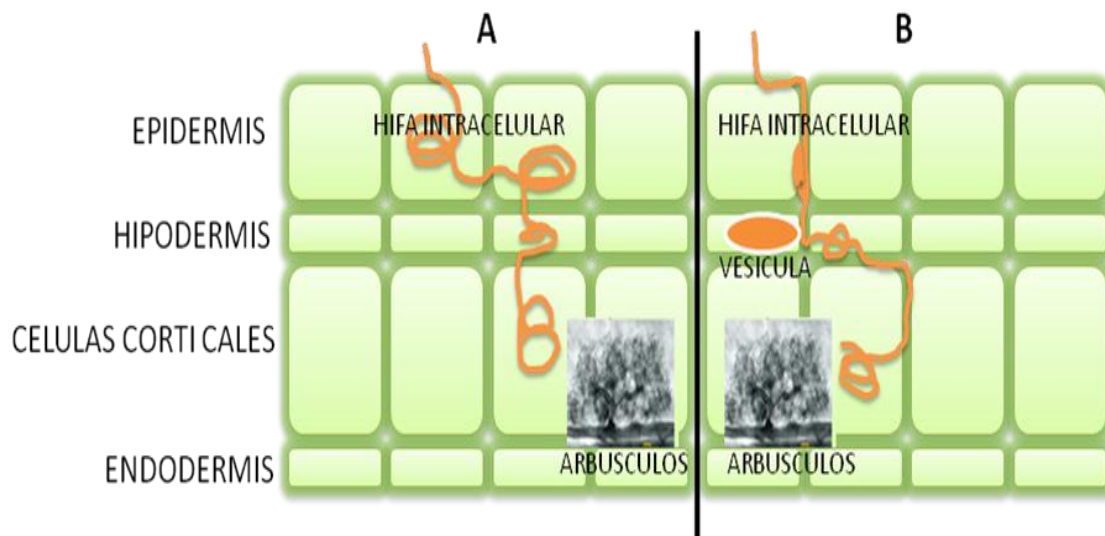
Antes y durante el montaje del PPA, la expresión de *ENOD11* se inicia en las células epidérmicas. Este gen codifica una proteína que se cree que es parte de la matriz extracelular vegetal. Adicionalmente, el PPA se constituye en una estructura transitoria responsable de la formación de una interfaz simbiótica intracelular, incluyendo una nueva estructura de la membrana que crea un

compartimiento apoplástico en la planta que separa el hongo invasor de la planta. El proceso de invasión de los HMA es paralelo a la forma de infección del *Rhizobium* spp., a través de los pelos radicales de leguminosas, para el establecimiento de los nódulos en la simbiosis fijadora de nitrógeno (SFN). Superposiciones fitogenéticas entre la simbiosis micorriza arbuscular (SMA) y la simbiosis fijadora de nitrógeno (SFN) están bien establecidas y se fortalecen por la demostración de la inducción de *ENOD11*, que también está implicado en el establecimiento de la SMA, y por el hallazgo de que no se forman los PPA en plántulas modificadas, las cuales no se infectan por los HMA o rizobios [9, 17]. Los hallazgos implican genes comunes de la simbiosis en la formación del PPA, pero también indican que estos no están involucrados en la penetración primaria porque el movimiento nuclear en las células de la epidermis se produce normalmente en plántulas modificadas [9]. Además, se han encontrado en plántulas modificadas que también se bloquea la micorrización en esta primera etapa de penetración. En *Lotus japonicus*, el desarrollo de la micorrización se detiene en el momento en el que la hifa penetra la célula epidérmica, posiblemente porque la planta se prepara para la infección mediante la percepción de una molécula fúngica denominada “factor *Myc*”.

Por otra parte, un grupo de genes codifican un canal iónico de membrana que actúa antes de la activación de los picos de Calcio, y media los cambios en los flujos iónicos activados en la membrana celular vegetal tras el reconocimiento del factor *Myc* [17]. La forma como los factores que perciben y traducen la señal para facilitar la penetración hifal a través del PPA se convierte en el puente de comunicación en la penetración del hongo a nivel del sitio de adhesión de la raíz [9]. Una vez establecido el punto de entrada la raíz se torna más susceptible, a la formación de nuevos sitios de colonización [86].

Ampliando el concepto de colonización, se tiene que en la etapa de crecimiento intrarradical de las hifas, una vez estas atraviesan la epidermis se dirigen hacia las

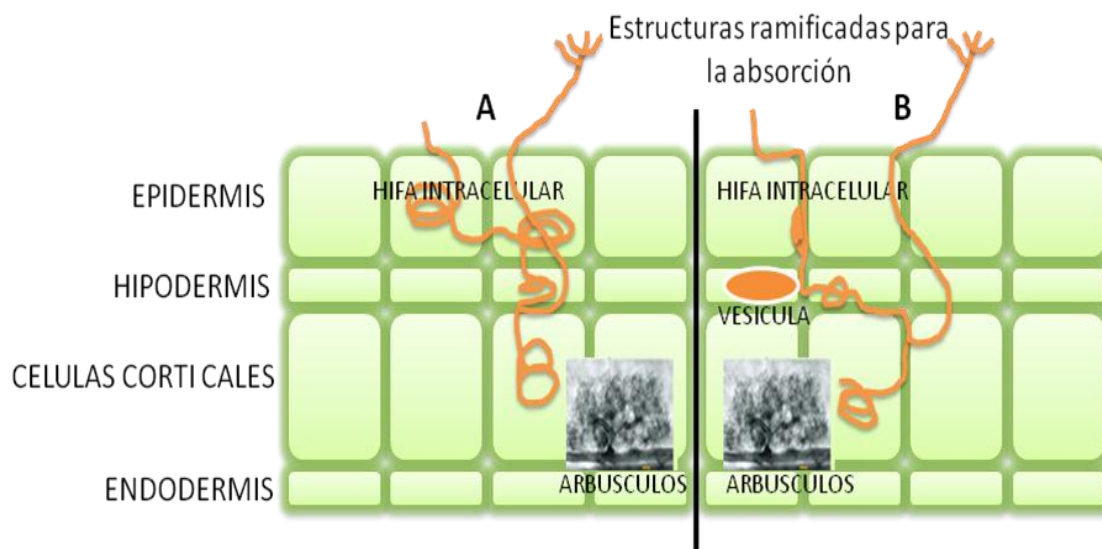
células corticales para desarrollar los principales órganos que caracterizan a la simbiosis micorrízico arbuscular, los arbuscúlos y las vesículas. Dependiendo de la planta hospedera implicada en la simbiosis, el micelio puede crecer en el interior de la raíz distinguiéndose así dos tipos de micorrizas: el tipo *Paris* (A), en el cual el micelio crece dentro las células; y el tipo *Arum* (B), en el cual el micelio crece entre las células. En el tipo *Arum* la hifa puede pasar hacia el córtex atravesando las primeras capas de las células corticales o por los espacios intercelulares. Por lo tanto el crecimiento intercelular en este tipo de micorriza es más rápido y permite una pronta extensión de la hifa a través del eje longitudinal de la raíz. Por el contrario en el tipo *Paris* la extensión de la hifa solo puede realizarse atravesando las células corticales, así la extensión de la micorrización en este tipo es más lenta (Figura 6).



**Figura 5.** Crecimiento intrarradical de las hifas. Tipos de micorrizas según el crecimiento intrarradical: el tipo *Paris* (A), en el cual el micelio crece dentro las células; y el tipo *Arum* (B). **Fuente:** García, Carolina. Evaluación de la simbiosis micorrizal. Empresa Soluciones Biotecnológicas y Agroambientales S.A.S. 2010.

### 1.2.1.3 Intercambio de señales a nivel del sitio de la colonización intraradical y extraradical.

En la colonización intraradical la integración fisiológica implica la formación de arbusculos, la tasa de transferencia de carbohidratos al hongo formador de micorriza, la tasa de crecimiento del hongo dentro del tejido radical, la probabilidad de reinfección, así como en la producción de vesículas y esporas [17, 63]. Dichos procesos requieren de señales dentro de la raíz que permitan la funcionalidad simbiótica de la micorriza, formación de arbusculos [45, 67]. Después de la formación del arbusculo éste se polimeriza y forma paredes funcionales como se muestra en la Figura 7. Esta simplificación de las barreras estructurales entre los simbioses crea condiciones propicias para el intercambio de nutrientes [19, 23, 56, 78].



**Figura 6.** Crecimiento extraradical de las hifas. El crecimiento del micelio, *Paris* (A) o *Arum* (B) no interfiere en la formación y desarrollo del micelio extraradical.

**Fuente:** García, Carolina. Evaluación de la simbiosis micorrizal. Empresa Soluciones Biotecnológicas y Agroambientales S.A.S. 2010.



Independientemente del tipo de crecimiento del micelio, *Paris* (A) o *Arum* (B) se da la formación y desarrollo del micelio extrarradical en el suelo con la formación de las estructuras ramificadas de absorción, estas estructuras realizan la absorción de nutrientes. A partir del micelio extrarradical se aumentan considerablemente la superficie de absorción de la planta y su capacidad para captar nutrientes y agua, ya que las hifas del hongo cubren una superficie mayor (al tener un diámetro menor) que la raíz y alcanza zonas de difícil acceso para el sistema radical.

En el sitio de colonización a nivel intrarradical, la interfase se forma en el área de contacto entre las superficies celulares de ambos simbioses, por lo que ambas membranas están separadas por una región apoplástica. La formación de este nuevo compartimento apoplástico involucra la síntesis *de novo* de las moléculas de la membrana y de la pared celular, dentro de las cuales se encuentran:  $\alpha$ -manosa,  $\beta$ -1,3-glucanos, poligalacturonanos no esterificados, xiloglucanos, glicoproteínas ricas en hidroxiprolina y arabinogalactanos enlazados a proteínas [6, 9].

Durante la etapa de crecimiento intrarradical se conoce poco de la señalización entre los simbioses, pero existen pruebas de la necesidad de un reconocimiento de la planta durante esta etapa: las mutaciones de los genes *LjSym4*, *LjSym15* y *LjSymRK* provocan un fenotipo en el que la hifa no puede profundizar en la raíz mas allá de las células epidérmicas de *L. japonicus*. En el caso de los mutantes *LjSym4* la hifa muere al penetrar en el córtex junto con las células corticales adyacentes, de forma similar a lo que ocurre con los mutantes de alverja (E107). También la mutación de los genes *tc1* y *CDPK1* de maíz y *M. truncatula* respectivamente, limita el crecimiento de la hifa a lo largo de los ejes horizontal y longitudinal de la raíz en cada caso [17].

En cuanto a la formación de arbusculos, se ha encontrado un gen codificante de una  $\alpha$ -tubulina en plantas de maíz que induce específicamente en las células en

las que se está desarrollando el arbusculo. En plantas de alverja también se hace patente la necesidad de una correcta señalización durante la formación de los arbusculos. La mutación de alverja del gen PsSym36 provoca la formación incompleta de arbusculos y además la membrana periarbuscular de estos arbusculos apenas presentan actividad ATPasa, por lo que probablemente no sean funcionales. Por otro lado la formación de arbusculos debe estar regulada por la planta hospedadora, ya que en mutantes HAAR1 de *L. japonicus* y en plantas de *M. truncatula* que sobre expresan el gen ENOD40, se incrementa la colonización de la raíz por el hongo arbuscular y la formación de arbusculos. Estos mutantes muestran alteraciones en el control y renovación de los arbusculos [17, 67].

Existe una íntima relación con la transducción de señales en la planta hospedera y el microsimbionte. Las células de la planta presentan un cambio en la organización de sus microfilamentos y microtúbulos. Los microfilamentos constituidos por actina crean una red que enrolla los arbusculos. Respecto a los microtúbulos (tubulina) la distribución de estos permite la conexión de las hifas con el córtex y el núcleo del hospedero [87].

Los arbusculos constituyen el sitio donde se produce el intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta, siendo las  $H^+$  - ATPasas membranales las enzimas que controlan, principalmente, el proceso de transporte iónico y molecular a nivel celular. Se conoce que en las células de las raíces no colonizadas, las ATPasas se encuentran distribuidas exclusivamente en la membrana, mientras que en las células micorrizadas se concentran en el plasmolema de la planta hospedera, que rodea el arbusculo. [6].

A partir de la penetración de la hifa y la formación del apresorio en raíces de garbanzo con *G. mosseae* se genera la emisión de ácido salicílico, como un componente integral del sistema de transducción de señales [6, 51, 59]. Posterior

a dicha señalización se genera un aumento metabólico en la membrana de las células de la planta, por medio de la actividad de la ATPasa, lo cual permite el incremento de la producción de fitohormonas [17, 45].

El proceso de colonización de los HMA induce en la planta un mecanismo de defensa, el cual no progresa debido al intercambio de señales y reconocimiento entre los simbioses, permitiendo, por otra parte, el establecimiento de la simbiosis. La respuesta de defensa se produce de forma transitoria y es de menor magnitud que la inducida por las interacciones planta-patógeno, las que frecuentemente son suprimidas en los estadios posteriores de la interacción. Este patrón de expresión sugiere la participación de compuestos que pueden actuar como elicitores en los primeros estadios de la formación de las micorrizas, constituyendo los glucanos, los oligómeros de N-acetil glucosamina, algunos péptidos de bajo peso molecular y los oligómeros pépticos posibles candidatos [6]. En estados tempranos, una vez se percibe el elicitador del hongo, se presentan señales de transducción y activación de genes de defensa, por ejemplo en *Glomus intraradices* produce un elicitador capaz de generar síntesis de fitoalexinas en soya y *Medicago truncatula*, inmediatamente después del primer contacto con el HMA [21]. La síntesis de fitoalexinas y otros compuestos de origen similar constituyen una de las respuestas primarias locales desencadenadas por las plantas frente al ataque de patógenos, la cual involucra enzimas que intervienen en la vía de los fenilpropanoides, como son: la fenilalanina amonio liasa (PAL), la chalcona sintasa (CHS) y la chalcona isomerasa (CHI), entre otras [6, 21].

Adicionalmente, es necesario en la asociación planta-HMA la reducción o existencia de un mecanismo de represión de la respuesta defensiva, que permita la colonización en las plantas susceptibles. Al respecto se han especulado tres posibles mecanismos de atenuación, 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.

I. Degradación de las moléculas elicitoras: se han reportan algunas hidrolasas que se expresan durante la simbiosis y pueden actuar rompiendo las moléculas de los elicitores del HMA. Estas hidrolasas deben ser producidas por la planta y estar reguladas por los niveles de Fósforo, ya que la primera señal de reconocimiento hongo-planta se produce en condiciones de deficiencia de P. La prevención de la formación de elicitores endógenos no parece ser el mecanismo de atenuación, debido a que los HMA producen cantidades muy bajas de enzimas capaces de degradar la pared celular del hospedero, las cuales son utilizadas para la penetración de la hifa [6, 21].

II. Alteración de la vía de señales de transducción: la producción de compuestos oxidativos en la colonización se refleja en alteraciones en los patrones de enzimas antioxidantes como catalasa y peroxidasa. La degradación de peróxido de hidrógeno por catalasas puede, potencialmente, ser un mecanismo para evadir la activación de genes de respuesta de defensa de las plantas; esta actividad está regulada por la capacidad de colonización del HMA y por las concentraciones de P. Además los productos de dichos genes pueden que induzcan en el hongo la síntesis de un supresor que bloquee la respuesta de defensa en planta [6, 21].

III. Flujos de nutrientes y hormonas: los niveles de fosfatos y carbohidratos en la planta están, respectivamente, negativa y positivamente relacionados con la colonización de HMA. Aunque el mecanismo preciso y las bases moleculares relacionadas con la posible inhibición de colonización en altos niveles de Fósforo se desconocen, es posible que exista un mecanismo de señalización que detecte los niveles de Fósforo, de forma tal que en plantas con altos niveles de fosfato se presente una sobre-regulación de los genes asociados con la defensa de la planta. Por otra parte, distintas fitohormonas, cuyas concentraciones pueden verse alteradas en las raíces micorrizadas, pueden actuar como señal en la respuesta de defensa [6, 17, 21].

De esta forma, el equilibrio entre los mecanismos de represión o inhibición de la respuesta defensiva y el control del desarrollo del microorganismo simbiote en la planta son la clave de la compatibilidad y funcionalidad de la asociación [21]. Esta situación es un poco diferente en las especies no micotróficas, las cuales no presentan arbusculos completamente desarrollados. Las especies no micotróficas están confinadas dentro de pocas familias vegetales como Cyperaceae, Juncaceae, Urticaceae, Chenopodiaceae, Caryophyllaceae y Brassicaceae. En Brassica, se exudan glucosinolatos que no están relacionados con la inhibición de la colonización micorrízica, ya que aunque no se forman arbusculos, si se observa la penetración fúngica [2, 70]. Algunos estudios sobre plantas no micotróficas han evidenciado la existencia de comunicación entre el HMA y la planta. Por ejemplo la presencia de raíces de especies micotróficas puede incrementar la penetración de los HMA en raíces de miembros pertenecientes a las familias Chenopodiaceae y Brassicaceae [31, 75, 88].

En el caso de algunas especies no micotróficas que pertenecen a familias vegetales ampliamente colonizadas por hongos endomicorrízicos, tal es el caso de algunas especies de *Lupinus* dentro de la familia Fabaceae [89]. Leguminosas del género *Lupinus* de la familia micotrófica Fabaceae no son huéspedes de los hongos micorrizógenos arbusculares. Este género ha recibido mayor atención en la investigación para determinar los factores que intervienen en el fracaso de la colonización micorrizal [52]. El conocimiento actual sugiere que el genotipo que codifica para la defensa de las plantas implica la incapacidad para activar la expresión de los genes de los hongos involucrados en la simbiosis. Sin embargo, los mecanismos que determinan porque *Lupinus* no es un huésped de hongos micorrizógenos son desconocidos [75, 89].

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 INDUCCIÓN Y BIOSÍNTESIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD MICOTRÓFICA

El experimento se realizó en el laboratorio de la empresa Sobitech S.A.S. ubicado en el municipio de Guarne (6° 16' 45" N, 75° 26' 31" O, altitud de 2.150 m), con una temperatura promedio de 17 °C y una humedad promedio de 70 %.

#### 2.1.1 Inducción y biosíntesis de metabolitos secundarios a partir de plantas micotróficas sembradas bajo condiciones *in vivo*

Para la obtención de metabolitos secundarios a partir de raíces de plantas micotróficas sembradas bajo condiciones *in vivo* se realizó siembra de seis especies vegetales: Alfalfa (*Medicago sativa*) [36], Lotus (*Lotus uliginosus* var. *Maku*), Trébol rojo (*Trifolium pratense*), Trébol blanco (*Trifolium repens*) [90], Cebolla (*Allium cepa* var. *Red creole*) y Leucaena (*Leucaena leucocephala*). Se utilizaron estas plantas debido a que han sido reportadas como hospederas en la simbiosis micorrizal y productoras de metabolitos secundarios con actividad micotrófica [10, 22, 36, 41, 66, 90, 91, 92].

Las semillas fueron desinfectadas superficialmente antes de su manipulación con el propósito de disminuir y/o evitar la proliferación de agentes contaminantes y patógenos. Por consiguiente, fueron lavadas con agua corriente, y desinfectadas con etanol al 70 % durante dos minutos, luego se sumergieron en una solución de Hipoclorito de Sodio al 1 % y Monooleato de Polioxietileno Sorbitan al 0.1 %, durante 15 min con agitación de 150 rpm. Posteriormente las semillas se enjuagaron con agua estéril para retirar los desinfectantes [9, 57, 62].

Adicionalmente, se realizó siembra de diluciones seriadas en placa para verificar la desinfección superficial de las semillas.

Antes de realizar la siembra, a las semillas se les realizó una prueba en cámara húmeda estéril para determinar su porcentaje de germinación. Para lo cual, se tomó una caja de Petri, a la cual se le ubicó en la base un disco de papel filtro Whatman N°1, se ubicaron cien semillas desinfectadas sobre el papel filtro, se hidrataron con agua destilada estéril y se cubrieron con un disco de papel filtro [62, 93]. El procedimiento se realizó bajo condiciones de asepsia y se realizó para las semillas de cada una de las especies vegetales analizadas en el presente estudio. La prueba se realizó a 27 °C durante 8 días.

El sustrato utilizado en la siembra se preparó a partir de la mezcla de una parte de arena y una parte de vermiculita (1:1). Luego, se tomaron 36 bolsas de polietileno y se pesaron 400 g de sustrato por bolsa, cada una con una dimensión de 12 cm de diámetro por 20 cm de altura; las cuales se esterilizaron en autoclave (121 °C y 15 psi) durante 15 min [17, 22], para finalmente disponer su contenido en macetas de 9 cm de diámetro por 10 cm de altura, desinfectadas con Hipoclorito de Sodio al 1%.

Posteriormente, el sustrato se llevó a un porcentaje de humedad del 50%, de su máxima capacidad de retención de agua (MCRA) [94]. La biodisponibilidad del Fósforo para las plantas y los hongos micorrizógenos se determinó por medio de una isoterma de adsorción de acuerdo al método de Fox y Kamprath (1970) [95], donde se estableció que el sustrato no requería ajuste, ya que su concentración sin la aplicación de Fósforo fue de 0.01 mg/L. La determinación de Fósforo disponible se realizó por el método de azul-molibdato descrito por Murphy & Riley (1962) [96]. Esta concentración ha sido reportada como óptima en la producción de metabolitos secundarios con actividad micotrófica [62, 97]. El pH del sustrato se

determinó según el método potenciométrico establecido en la Norma Técnica Colombiana 5167, encontrando un valor de pH de 6.2 (V: V – 2: 1) [94].

Los microorganismos inoculados fueron *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices*, cada uno de los cuales fue inoculado a una concentración de 0.25 %w/w, es decir 1 gramo de inóculo de cada tipo de hongo, para un total de dos gramos de inóculo crudo, constituido por esporas, fragmentos de hifas y raíces colonizadas en una matriz de arena (< 2 mm). La inoculación se realizó bajo condiciones de asepsia, mezclando superficialmente y en forma radial el inóculo en el sustrato. Del mismo modo, a los tratamientos que no llevaban inoculación se les agregó 2 g de arena estéril. Previamente, se codificaron los materos para tener control al aplicar los tratamientos con inoculación (dos especies de *Glomus* spp.) y sin inoculación.

Las semillas desinfectadas se sembraron en nueve puntos de la maceta, los cuales se distribuyeron en forma radial. En cada sitio de siembra se utilizaron tres semillas para un total de 27 semillas por maceta (Figura 8). La siembra correspondió a doce macetas por especie vegetal, seis inoculadas y seis sin inocular. El ensayo se ubicó en un lugar con incidencia de luz solar, con luz artificial ( $400\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 400–700 nm) y un ambiente aireado. La temperatura del ensayo correspondió a un rango de temperatura de 15 – 30 °C y una humedad relativa de 50 – 60 %, estas variables fueron medidas con un termohigrómetro. Los ciclos de luz fueron de 12 h al día con un promedio de 23 °C a 30 °C y 12 h en la noche con un promedio de 15 a 19 °C [3, 8, 98].





**Figura 7.** Inoculación de hongos micorrizógenos y siembra de plantas micotróficas. **Fuente:** Autor.

Las plántulas se sometieron a riego tres veces por semana y se fertilizaron una vez por semana con una solución nutritiva Hoagland libre de Fósforo (1 mL  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1M, 6 mL  $\text{KNO}_3$  1M, 4 mL de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1M, 1 mL  $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1M, y 1mL de micro elementos traza – formulación para un litro) [8]. El sustrato se mantuvo entre un 50-60 % de la máxima capacidad de retención de agua (23 y 28 % respectivamente), para lo cual se aplicó por maceta una cantidad de 61 a 74 mL de agua destilada estéril o de la solución nutritiva mencionada.

Las plantas fueron cosechadas seis semanas después de la siembra, ya que en este periodo (etapa vegetativa) se obtuvo una biomasa radicular y aérea suficiente para realizar los ensayos de extracción de metabolitos secundarios. [3]. Después de la cosecha se pesaron las raíces y la masa aérea de cada maceta (peso fresco) y se almacenaron por separado para realizar los ensayos de obtención de metabolitos secundarios a partir de plantas micotróficas sembradas bajo condiciones *in vivo*.

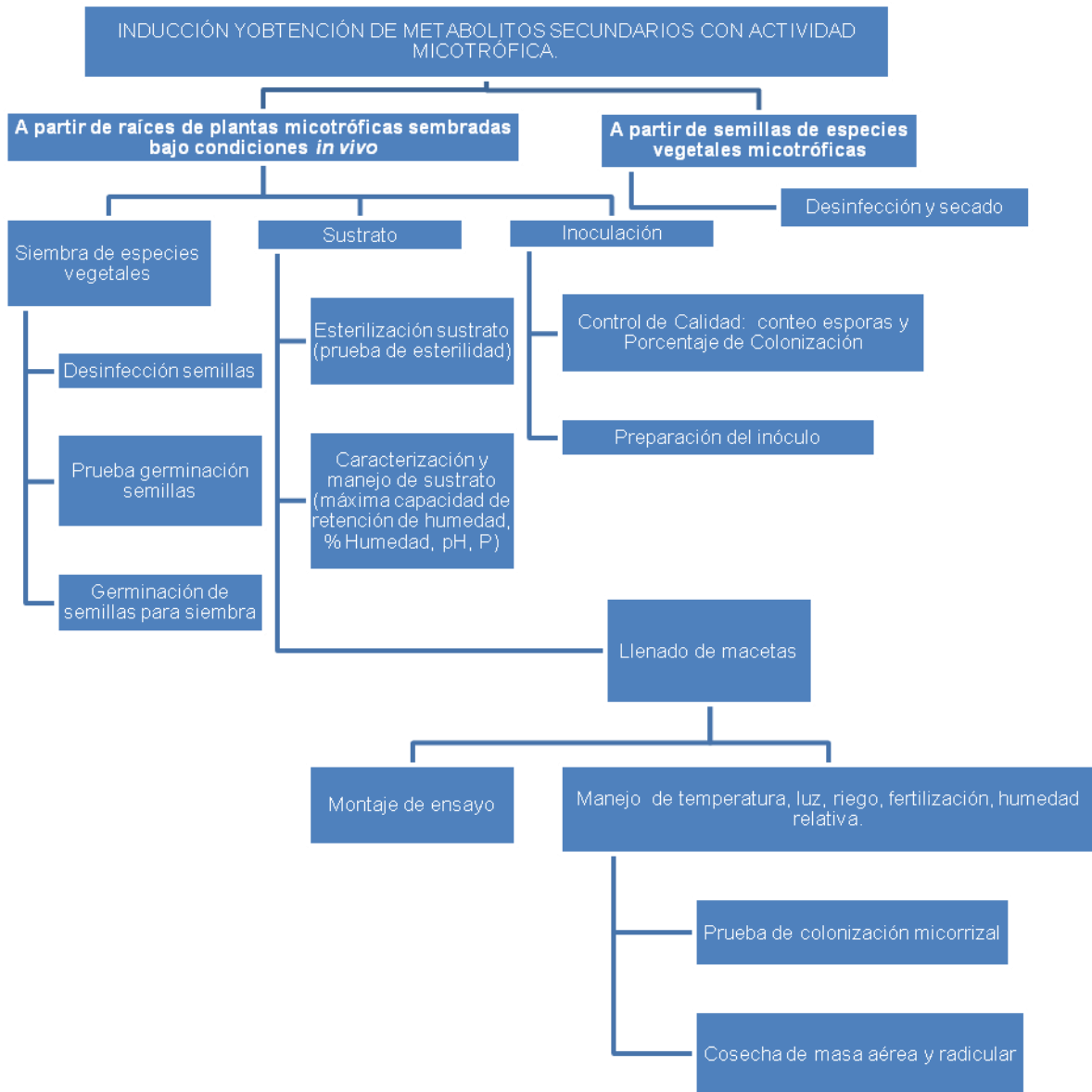
En el momento de la cosecha se tomó una muestra de 3 g de raíz para determinar el porcentaje de infección de hongos formadores de micorrizas arbusculares. El método utilizado fue clareado y tinción de raíces descrito por Sieverding (1983),

para lo cual se utilizó KOH al 10 %w/v (decoloración por 24 h), HCl al 10 % (acidificación durante 10 min) y fucsina ácida (tinción por 48 h) [99]. La determinación del porcentaje de colonización micorrizal se realizó según la técnica de Giovannetti y Mosse (1980), la cual se basa en la relación de la presencia de estructuras de hongos micorrizales en el total de interceptos leídos bajo microscopio de disección. Los conteos realizados se expresaron en porcentajes mediante la siguiente fórmula [100]:

$$\% \text{ de colonización} = \frac{\text{Número de intersecciones colonizadas}}{\text{Número total de intersecciones observadas}} \times 100$$

### **2.1.2 Inducción y biosíntesis de metabolitos secundarios a partir de semillas de especies vegetales micotróficas**

Las semillas de *Medicago sativa* [98], *Lotus uliginosus* var. *Maku*, *Trifolium pratense*, *Trifolium repens* [3], *Allium cepa* var. *Red creole* y *Leucaena leucocephala*, fueron desinfectadas antes de su manipulación con el propósito de disminuir y/o evitar la proliferación de agentes contaminantes y patógenos. Dicho proceso se realizó siguiendo el mismo protocolo descrito en el numeral 2.1.1. Finalmente, las semillas se secaron en estufa a 40 °C y se almacenaron por separado para realizar extracción de metabolitos secundarios. La Figura 9 muestra el flujograma del proceso.



**Figura 8.** Flujograma del proceso de inducción y biosíntesis de metabolitos secundarios con actividad microtrófica.

## 2.2 EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Previo a la extracción de los metabolitos secundarios se evaluaron tres solventes en cada suspensión acuosa de estándares de flavonoides [15, 22, 90, 101], como se muestra en la Tabla 1. Dicha evaluación se realizó con la finalidad de determinar el solvente orgánico a utilizar en la extracción de las muestras obtenidas en la fase de inducción de metabolitos secundarios. Se seleccionaron estándares de Quercetina (Alfa Aesar) y Formononetina (Sigma-Aldrich) para direccionar la evaluación a este grupo de metabolitos (flavonoles e isoflavonas, respectivamente), los cuales han sido reportados ampliamente como inductores de Micorrización [10, 57, 82, 102].

**Tabla 1.** Propiedades de los disolventes orgánicos utilizados en la extracción de flavonoides

| Propiedades           | Acetato de Etilo      | Diclorometano         | Butanol               |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Densidad              | 0,9 g/cm <sup>3</sup> | 1,3 g/cm <sup>3</sup> | 0,8 g/cm <sup>3</sup> |
| Punto de ebullición   | 77 °C                 | 40 °C                 | 118 °C                |
| Solubilidad en agua   | 10 mL / 100 mL        | 1.3 g / 100 mL a 20°C | 9 mL / 100 mL         |
| No. Carbonos          | 4                     | 1                     | 4                     |
| Tipo de disolvente    | Polar aprótico        | Polar aprótico        | Polar prótico         |
| Momento dipolar       | 1,88                  | 1,55                  | 1,52                  |
| Constante dieléctrica | 6,02                  | 8,93                  | 18                    |

**Fuente:** Grupo Prevenir Consulting. Fichas Internacionales de seguridad Química.

Se filtró cada suspensión de estándares de flavonoides con papel de filtro Whatman (banda negra), obteniendo 150 mL de sobrenadante, el cual se

fraccionó en tres embudos de separación (cada uno con 50 mL de sobrenadante). Al primer embudo, se le adicionó 25 mL de Acetato de Etilo (EtOAc), al segundo 25 mL de Diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) y al tercero 25 mL de Butanol ( $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_3\text{-OH}$ ). Posteriormente, cada embudo se agitó de forma vigorosa, teniendo cuidado de abrir la llave para liberar la presión generada. Al finalizar, se colocaron los embudos en el aro y se les retiró la tapa para facilitar la separación de las fases. A continuación se recogió la fase orgánica de cada embudo, se sometió a rotaevaporación, y se recuperó el precipitado obtenido en el balón que estaba sumergido en el baño de agua. Dicho precipitado no se dejó secar por completo, ya que este se utilizó para realizar cromatografía de capa fina (CCF). Posteriormente se procedió a seleccionar el mejor disolvente en base a lo encontrado en la CCF y las propiedades de los metabolitos de interés.

Para la extracción de los metabolitos secundarios, en las muestras obtenidas en la fase de inducción, se secó el material vegetal (biomasa radicular y aérea proveniente de plantas con inoculación micorrizal, biomasa radicular y aérea proveniente de plantas sin inoculación micorrizal, y semillas) [76, 90], en estufa a 75 °C durante 72 h [15, 90].

Las muestras vegetales secas se trituraron y se dejaron en digestión con Etanol (EtOH) a temperatura ambiente durante cuatro días (300 mL de Etanol al 90% por 20 gramos de material seco). Los extractos etanólicos obtenidos a partir de plantas se filtraron y se evaporaron a sequedad, después se resuspendieron en 150 mL de agua destilada [15, 22, 90, 101]. Luego, las suspensiones acuosas se transfirieron a un beaker, y se dispusieron en agitación magnética por 10 min a temperatura ambiente.

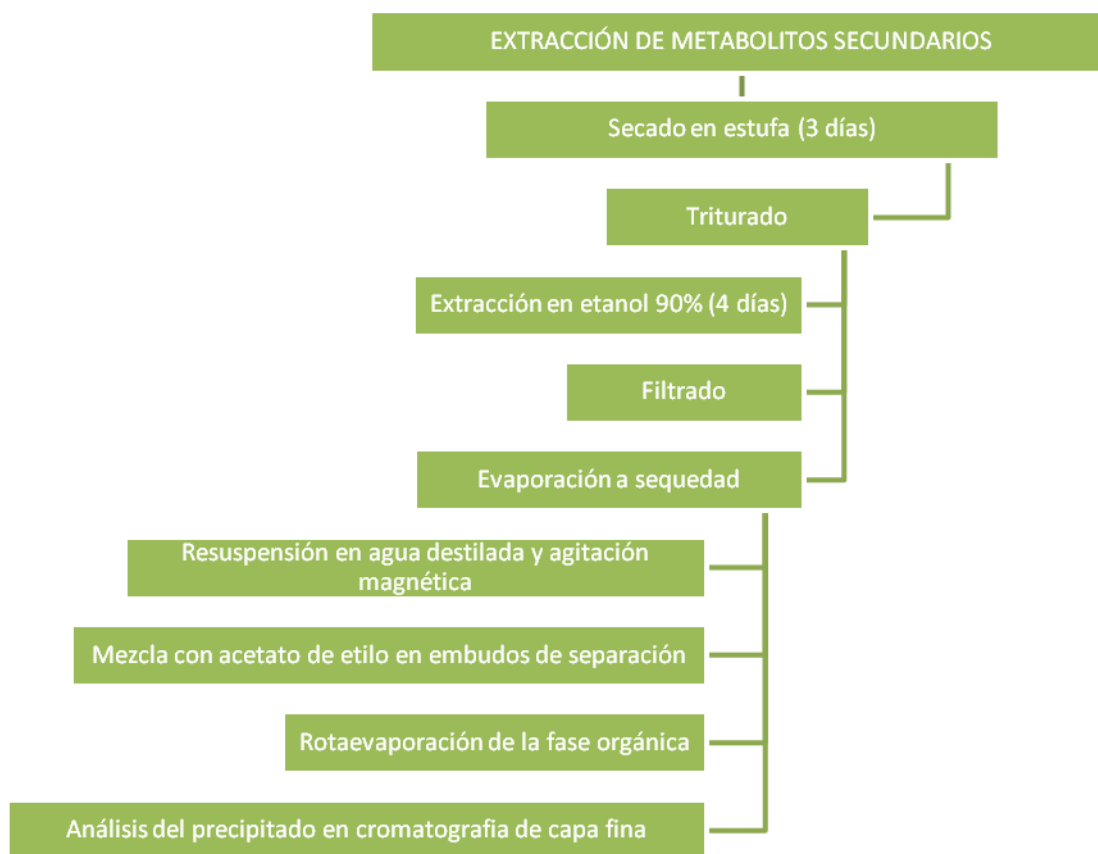
Seguidamente de la agitación se procedió a filtrar por papel de filtro Whatman (banda negra). Se obtuvieron 50 mL de sobrenadante de cada muestra, el cual se transfirió a un embudo de separación. Luego, se les adicionó 25 mL de Acetato de

Etilo (EtOAc) para tratar todas las muestras, ya que este fue el solvente previamente seleccionado en la prueba realizada con los estándares de Quercetina y Formononetina; cada embudo se agitó de forma vigorosa, teniendo cuidado de abrir la llave para liberar la presión generada. Al finalizar, se colocaron los embudos en el aro y se les retiró la tapa para facilitar la separación de las fases. A continuación se recogió la fase orgánica de cada embudo, se sometieron a rotaevaporación, y se recuperó el precipitado obtenido. Dicho precipitado no se dejó secar por completo, ya que este se utilizó para realizar la cromatografía de capa fina (CCF).

Los componentes orgánicos precipitados se analizaron individualmente por CCF, para lo cual se evaluaron dos sistemas cromatográficos diferentes:

- Cromatoplasmas de sílice 60F254 (Merck) eluyendo con EtOAc-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-HCO<sub>2</sub>H (8:12:01) [22, 90].
- Cromatoplasmas de sílice (Merck) eluyendo con CHCl<sub>3</sub>-MeOH (4:1) [6].

Las manchas fueron reveladas utilizando lámpara UV y una solución reveladora de 6 g de vainillina y 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en 197 mL de MeOH. Se determinaron los valores de R<sub>f</sub> para el análisis de CCF de las muestras [15, 90, 101]. Se seleccionaron las muestras con rangos de R<sub>f</sub> entre 0,60 y 0,70 para realizar la caracterización de metabolitos secundarios (flavonoles e isoflavonas). En la Figura 10 se puede observar el flujograma del proceso.



**Figura 9.** Flujograma del proceso de extracción de metabolitos secundarios.

## 2.3 CARACTERIZACION DE METABOLITOS SECUNDARIOS

### 2.3.1 Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Los análisis por HPLC se realizaron utilizando un cromatógrafo marca Shimadzu, dotado de una bomba LC-20AD, automuestreador SIL-20A, horno portacolumnas CTO-20A y detector DAD SPD-M20A. El método para la cuantificación de Quercetina se adaptó del método reportado por Liu HP *et al.* (2011) utilizando una columna Nova Pak® C18, 4 $\mu$ , 3.9 x 300 mm (Waters), fase móvil obtenida por mezcla de Ácido Fosfórico 0.2 %: Metanol (50:50), a un flujo de 0.7 mL/min, con una temperatura de 30°C y un sistema de detección por arreglo de diodos (DAD) a

una longitud de onda de 260 nm [103]. Para este método se construyó una curva de calibración en un rango entre 7.808 y 58.560 ppm.

El método para la cuantificación de Formononetina se adaptó del método reportado por Ku-Cükboyaci *et al.* (2013) utilizando una columna Nova Pak® C18, 4 $\mu$ , 3.9 x 300 mm (Waters), fase móvil obtenida por mezcla de Ácido Acético 0.3 %: Metanol (50:50), a un flujo de 0.8 mL/min, con una temperatura de 30°C y un sistema de detección por arreglo de diodos (DAD) a una longitud de onda de 270 nm [104]. Para este método se construyó una curva de calibración en un rango entre 1 y 30 ppm.

## **2.4 PRUEBA *in vitro* DEL EFECTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS SOBRE ESPORAS DE HONGOS MICORRIZALES**

### **2.4.1 Aislamiento de hongos**

Esporas de los hongos formadores de micorrizas *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* (Tomadas del cepario de Abonamos S.A. con referencia LMSS 009 I – INVAM y LINR 008 I – INVAM, respectivamente) fueron cultivadas previamente en potes de un volumen de 300 mL por un período de seis meses. La planta hospedera que se utilizó fue sorgo (*Sorghum bicolor* L.). El inóculo micorrizal fue llevado por 14 días a una temperatura de -12 °C para sincronizar la germinación de las esporas. Después de refrigerado el inóculo, se aisló las esporas por el método de tamizado, centrifugación en gradiente de sacarosa y observación estereoscópica (método adaptado de Genderman y Nicolson, 1963) [10, 22, 101]. Las esporas aisladas se transfirieron a tubos Eppendorf para desinfectar la superficie con Hipoclorito de Sodio 0.1 % por 10 min. Luego se pasaron a tubos Eppendorf para esterilizarlas con una solución de sulfato de estreptomina a una concentración de 200 ug/ml por 10 min. El procedimiento se verificó por el método



de siembra en placa por extensión, a partir de diluciones seriadas de una solución de esporas esterilizadas, utilizando como medios de cultivo Agar Nutritivo y Agar Sabouraud. Posteriormente, se lavaron cinco veces con agua estéril destilada para remover la solución de estreptomicina.

#### **2.4.2 Medio de cultivo**

El medio de cultivo, por cada litro se preparó con: KCl 4.0 mg, KNO<sub>3</sub> 6.4 mg, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 4.0 mg, Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 0.8 mg, FeNaEDTA 0.19 mg, tiamina 0.4 mg, biotina 0.04 mg, sacarosa 1.0 g y Agar-Agar 7.5 g. El medio fue ajustado a pH 6.4 y esterilizado por autoclavado. Se dispensaron 6 mL de medio en cada placa de Petri de plástico desechable (60 por 15 mm) [10, 17, 32, 85, 91].

#### **2.4.3 Contacto con metabolitos secundarios**

Las soluciones *stock* de metabolitos secundarios preparadas en metanol fueron adicionadas al medio a 56 °C para suministrar los metabolitos indicados. Las cajas de Petri se agitaron bajo condiciones de cámara de flujo laminar durante 30 min para favorecer la evaporación. Ningún medio se suplementó con más de 0.4 % de metanol. A los controles negativos se les adicionó una concentración de 0.4 % de metanol sin metabolitos secundarios para minimizar la variabilidad del experimento [10]. Cada placa fue sellada con parafina, la cual se cambió semanalmente para restaurar las condiciones atmosféricas y para reducir la deshidratación y los riesgos de contaminación [10, 22]. Las placas se incubaron en la oscuridad a una temperatura de 25 ± 1 °C verticalmente durante 21 días en una incubadora a 32 °C con 2 % de CO<sub>2</sub> [57, 82].

#### **2.4.4 Efecto de los metabolitos secundarios en el desarrollo del hongo**

Los metabolitos secundarios extraídos se evaluaron en el medio de cultivo descrito, con esporas del hongo *Glomus mosseae* (LMSS 009 I – INVAM). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar a partir de veinte tratamientos. Los tratamientos consistieron en trece extractos vegetales

seleccionados a partir del análisis de CCF y HPLC, los cuales provenían de la etapa de inducción y biosíntesis de metabolitos secundarios a partir de plantas micotróficas; tres concentraciones del estándar de Quercetina, tres concentraciones del estándar de Formononetina y un control negativo; cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones. Las unidades experimentales fueron placas Petri, cada una de las cuales se inocularon, por medio de una micropipeta, con 20 esporas del hongo *Glomus mosseae* (LMSS 009 I – INVAM). Se utilizó un estereomicroscopio de aumento 70x para medir las variables, las cuales fueron porcentaje de germinación, porcentaje de ramificación, y elongación hifal. Las mediciones se realizaron en los días 3, 7, 15 y 21 después de la siembra. El porcentaje de germinación de esporas se determinó a partir de la relación entre la cantidad de esporas con presencia de tubo germinal y el total de esporas inoculadas. Las esporas sin germinación no se incluyeron en los cálculos para hallar el porcentaje de ramificación y/o la longitud de elongación hifal. El porcentaje de ramificación de hifas se determinó a partir de la relación entre la cantidad de hifas ramificadas y el total de hifas primarias, las cuales se constituyen como estructuras filamentosas desarrolladas a partir de un tubo germinal. Para la medición de la longitud de las hifas (en mm) se utilizó una escala de 0,1 mm, partiendo desde el inicio del tubo germinal hasta la parte distal de las hifas. [10, 57, 82]. Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis de varianza (Prueba F) para determinar si existían diferencias significativas en función de los tratamientos y la prueba de rango múltiple de Duncan para determinar la separación de medias. Para los análisis estadísticos se empleó un nivel de significancia ( $P$ )  $\leq 0.05$  y se utilizó el paquete estadístico SAS®.

Posteriormente, se seleccionaron los tratamientos (T 6 y T 7), ya que estos tuvieron un mayor rendimiento en las variables de germinación, ramificación y elongación hifal con una diferencia significativa respecto a los demás tratamientos; a partir de estos metabolitos con actividad promotora del desarrollo de hongos formadores de micorriza, se evaluó el efecto individual y en mezcla de dichos

compuestos sobre inóculos formulados con esporas puras y combinadas de *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* (LMSS 009 I – INVAM y LINR 008 I – INVAM, respectivamente). En este ensayo se consideró un control negativo y se tuvieron las mismas condiciones de evaluación previamente descritas (porcentaje de germinación, porcentaje de ramificación y elongación hifal; en los días 3, 7, 15 y 21 después de la siembra). En esta segunda parte del ensayo se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Los tratamientos tuvieron un arreglo factorial 3x3 con cuatro repeticiones; los tratamientos consistieron en la combinación de tres niveles de extractos vegetales (extracto A de raíces de trébol blanco, extracto B de raíces de trébol blanco B, y un extracto a partir de la mezcla de A y B) y tres niveles de morfotipos de hongos formadores de micorriza (*Glomus mosseae*, *Glomus intraradices*, y un inóculo combinado de *G. mosseae*, *G. intraradices*). Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis de varianza (Prueba F) para determinar si existían diferencias significativas en función de los tratamientos y la prueba de rango múltiple de Duncan para determinar la separación de medias. Para los análisis estadísticos se empleó un nivel de significancia ( $P \leq 0.05$ ) y se utilizó el paquete estadístico SAS®.

### 3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1 INDUCCION Y BIOSÍNTESIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD MICOTRÓFICA

Se determinó la capacidad del hongo para colonizar el material vegetal estudiado (% colonización) y de forma paralela el porcentaje de germinación de las estructuras vegetales utilizadas. En este sentido se diseñó una matriz experimental que permitió medir el porcentaje de colonización por parte de los hongos formadores de micorriza en las raíces de *Medicago sativa*, *Lotus uliginosus* var. *Maku*, *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*, y *Allium cepa* var. *Red creole*. De igual forma se estableció el porcentaje de germinación de las respectivas semillas. El ensayo consistió en la evaluación de estos parámetros, como se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Matriz experimental para evaluación de porcentaje de germinación de semillas y porcentaje de colonización micorrizal

| Ensayo        | Variable respuesta según el tipo de material vegetal |                |         |            |         |
|---------------|--|----------------|---------|------------|---------|
|               | Semilla  | Masa radicular |         | Masa aérea |         |
|               |  | Con HFM        | Sin HFM | Con HFM    | Sin HFM |
| Cebolla       |  |                |         |            |         |
| Trébol rojo   | Porcentaje   | Porcentaje     |         |            | Pesaje  |
| Trébol blanco | de   | de             |         |            | de      |
| Lotus         | germinación  | Colonización   |         |            | Biomasa |
| Alfalfa       |  |                |         |            |         |

\*Con HFM: con inoculación de hongos formadores de micorriza-

\*Sin HFM: con inoculación de hongos formadores de micorriza-

Los ensayos se realizaron para cada planta micotrófica evaluada (5) y por triplicado, para un total de 75 unidades de inducción de metabolitos secundarios.

### **3.1.1. Inducción y biosíntesis de metabolitos secundarios a partir de plantas micotróficas sembradas bajo condiciones *in vivo***

En la determinación del tipo de plantas a utilizar como fuente de material vegetal para la obtención de metabolitos secundarios, las especies seleccionadas fueron: *Medicago sativa*, *Lotus uliginosus* var. *Maku*, *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*, y *Allium cepa* var. *Red creole*, ya que en estas se evidenció un manejo factible, bajo las características ambientales del sitio de experimentación, para proyectar los ensayos a nivel piloto y/o industrial. En el caso de *Leucaena leucocephala* no se encontró un óptimo desarrollo de la planta en términos de germinación y crecimiento. Inicialmente, el porcentaje de germinación encontrado correspondió a un 32 %, el cual es bajo si se tiene en cuenta que se realizó escarificación de la semilla. Dicho procedimiento se realizó debido al endurecimiento de la capa superficial o tegmen que caracteriza esta semilla, lo cual dificulta el intercambio de oxígeno, luz, y agua para el crecimiento del embrión. Posteriormente, se observó un desarrollo inhibido de las plántulas de *Leucaena leucocephala*, situación contraria en las otras especies tratadas, las cuales fueron sometidas bajo las mismas condiciones, encontrando una respuesta positiva en términos de germinación (Tabla 3) y crecimiento. Este comportamiento podría explicarse debido al área donde se desarrollaron los experimentos, ya que para el desarrollo de *Leucaena* el rango ideal respecto a la altitud es de 0 a 1600 m.s.n.m. y respecto a la temperatura es de 20 a 30 ° C [105], lo cual difiere de las condiciones de experimentación (2150 m.s.n.m. y una temperatura promedio de 17 ° C). Este contraste a nivel vegetal se constituyó en la base para considerar la utilización de *Medicago sativa*, *Lotus uliginosus* var. *Maku*, *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*, y *Allium cepa* var. *Red creole* en la obtención de metabolitos secundarios a partir de plantas micotróficas, ya que a nivel de aplicabilidad de los resultados obtenidos, *Leucaena leucocephala* no representaba una fuente

fácilmente replicable a escala piloto y/o industrial bajo las condiciones ambientales donde se realizó el estudio. La proyección a una escala mayor se consideró debido al interés de la empresa Sobitech S.A.S. en replicar los experimentos para fines industriales.

**Tabla 3.** Porcentaje de germinación de semillas de plantas micotróficas

| <b>Variedad vegetal</b>                   | <b>Porcentaje de germinación</b> |
|---|----------------------------------|
| <i>Allium cepa</i> var. <i>Red creole</i> | 100 %                            |
| <i>Trifolium repens</i>                   | 73 %                             |
| <i>Trifolium pratense</i>                 | 79 %                             |
| <i>Lotus uliginosus</i> var. <i>Maku</i>  | 91 %                             |
| <i>Medicago sativa</i>                    | 97 %                             |
| <i>Leucaena leucocephala</i>              | 32 %                             |

La cosecha de las plantas se determinó a las seis semanas de la siembra, ya que en este periodo se obtuvo una biomasa radicular y aérea suficiente para realizar los ensayos de extracción de metabolitos secundarios. Esto evidenció que las condiciones controladas de las plantas en términos de manejo del sustrato (esterilización), humedad del sustrato, fertilización fosfórica, incidencia de luz solar y artificial, pH del sustrato y humedad relativa fueron las ideales para el desarrollo de las cinco plantas micotróficas utilizadas.

Destacando la condiciones nutricionales a las que se sometieron las plántulas para la inducción de metabolitos secundarios es importante resaltar el nivel de fósforo establecido (0.01 mg/L). Este parámetro correlaciona con algunos estudios que han demostrado que la mayor colonización de la raíz por los hongos micorrizógenos y su efecto más marcado ocurre en suelos con baja disponibilidad de Fósforo; por el contrario, existe correlación negativa entre la alta concentración de Fósforo y la formación de micorrizas [3, 17, 106].

Sierra y colaboradores (2009) realizaron un experimento donde la dependencia micorrizal del laurel inoculado con *Glomus aggregatum* fue moderada. Los valores de dependencia micorrizal decrecieron al incrementar la concentración de Fósforo disponible en el suelo así: 40.3, 27.8, 22.2 % a los niveles de 0.002, 0.02, y 0.2 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente [3]. Por su parte González y Osorio (2008) obtuvieron resultados similares al realizar un experimento de invernadero para determinar la dependencia micorrizal del lulo, estos también consideraron tres niveles de fósforo en la solución del suelo (0,002, 0,02 y 0,2 mg L<sup>-1</sup>) con inoculación del hongo micorrizal *Glomus aggregatum* obteniendo como resultado que la dependencia micorrizal fue mayor a 0,002 mg L<sup>-1</sup> [106]; estas tres concentraciones de P en la solución del suelo en ambas investigaciones, se basaron según lo propuesto por Habte y Manjunath (1991) para estudios de dependencia micorrizal. Aun no hay claridad sobre el efecto inhibitorio del incremento del fósforo disponible sobre la asociación; algunos investigadores sugiere que se debe a que el contenido de este elemento al interior de la planta micorrizada regula la tasa de infección [35]; puede deberse también a la acción combinada de fosfatasa acumuladas y lectinas que bloquean la penetración del hongo [83]. Otros suponen que el bajo nivel de fósforo reduce la síntesis de fosfolípidos, las células se tornan más permeables y por tanto ocurre mayor exudación de aminoácidos y azúcares a la rizósfera, lo cual estimula la colonización de la raíz por los hongos micorrizógenos, efecto que se perdería en la medida que éste se incrementa, otra hipótesis sugiere que la mayor disponibilidad de Fósforo aumenta la concentración de azúcares en las células corticales, lo cual desfavorece la penetración y colonización de los hongos micorrizógenos [75, 107]. Adicionalmente, en estudios realizados se ha encontrado que el déficit de Fósforo incrementa la exudación radicular y la alta cantidad de exudados encontrados en la rizósfera aumenta la infección de hongos micorrizógenos [25]. Esto se debe a que como el Fósforo ocasiona cambios en la composición de los exudados que disminuyen la capacidad de estimular el crecimiento del hongo. Así, los exudados procedentes de plantas cultivadas en suelo con poco Fósforo accesible inducen el crecimiento de la hifa en mayor

proporción que los de plantas cultivadas con altas disponibilidad de fósforo [17]. Otro mecanismo de regulación de la micorrización activada por el Fósforo es con la participación de hormonas, en patata se ha comprobado que la actividad de la ACD oxidasa (ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico oxidasa, enzima que cataliza el último paso en la ruta de síntesis del etileno) aumenta linealmente junto con la actividad peroxidasa extracelular al aumentar las cantidades de fosfato en el sustrato, a la vez que se inhibe la micorrización. Esto sugiere que una activación de la respuesta de defensa durante la micorrización es inducida por el fósforo y en la que posiblemente participe el etileno [17]. A pesar de estas evidencias, sin embargo, se ha encontrado que no existe ninguna diferencia cualitativa en los exudados de plantas con déficit de Fósforo, en comparación con plantas sin déficit [25]. Estos resultados, sin embargo, no eliminan la posibilidad de que algún componente desconocido de los exudados radiculares de plantas deficientes en Fósforo sea producido al inicio de la deficiencia, el cual puede estar involucrado como un factor estimulador de la micorrización [34, 70]. Ratnayake y colaboradores (1978), citados por Elias y colaboradores (1987), colectaron exudados de plantas de *Sorghum drummondii* de 8 a 10 semanas de edad, demostrando que la exudación de raíces disminuye dramáticamente con la edad de la planta, una planta de 2 meses de crecimiento sin una fuente externa de Fósforo probablemente muere, y la probabilidad de establecer asociaciones benéficas con hongos micorrizógenos es mínima [76]. La probabilidad que un factor de señalización de los hongos micorrizógenos sea producido en estos casos, se debe buscar al inicio de la privación de Fósforo, ya que su presencia puede que sea transitoria y ha mostrado un efecto positivo en la elongación hifal, por lo que la optimización estaría ligada a esta etapa [76, 108].

De igual manera, altos niveles de otros nutrimentos, entre ellos el Nitrógeno, más en forma amoniacal que nítrica, pueden afectar negativamente el establecimiento de la simbiosis micorrizal [107]. En términos generales, todo parece indicar que la combinación balanceada de los nutrimentos favorece la actividad funcional de la



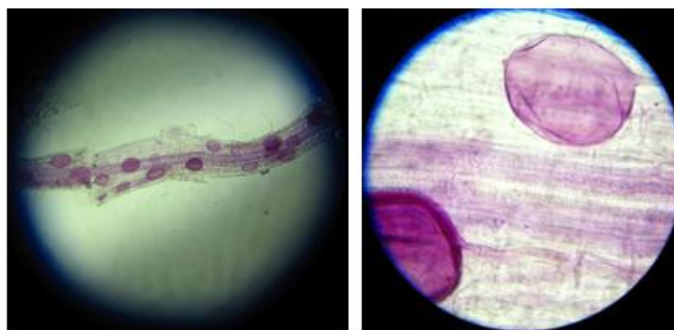
micorriza arbuscular, situación que va a depender del tipo de suelo, planta hospedera, micosimbionte y el manejo del cultivo, lo cual torna las situaciones específicas [19, 73]. En consecuencia, se encuentra concordancia con la condiciones experimentales de inducción de las plantas micotróficas, a las cuales se les balanceó la fertilización a cantidades controladas de nutrimentos (1 mL  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1M, 6 mL  $\text{KNO}_3$  1M, 4 mL de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1M, 1 mL  $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1M, y 1 mL de micro elementos traza).

Adicionalmente a las variables de experimentación mencionadas, se estableció respecto al pH del sustrato un rango óptimo de 6.2 a 7.0. Entre los factores físico-químicos que más influyen en el desarrollo de la micorriza se han registrado el contenido de arcillas y el pH. Los hongos formadores de micorrizas tienen amplia capacidad de adaptación a condiciones de pH, éstos se han registrado desde valores de 2.7 a 9.2 se encuentran diferencias entre especies y ecotipos en cuanto a su capacidad para colonizar un hospedero en función del pH [5]. En suelos ácidos el Aluminio es un factor restrictivo de la asociación, aun así se han encontrado algunas especies de hongos micorrizógenos que soportan esta condición limitante [30, 52].

Sieverding (1983) afirma que a valores de pH diferente la expresión de propágulos infectivos correspondientes a diferentes géneros varía; situación encontrada para esporas de *Glomus mosseae* y *Gigaspora margarita*, las cuales se encuentran en suelos tropicales nativos con pH menores de 5.5, aunque para la primera de ellas se ha señalado que necesita un pH del orden de 6; *Entrophospora colombiana* no ha sido observada en suelos con pH mayor a 5.5 y la presencia de estas especies no se ha encontrado relacionada con otras características del suelo, diferentes del pH [6, 55, 99]. Especies de *Acaulospora longula*, *A. scrobiculata*, *A. morrowae*, *A. spinosa*, *A. myriocarpa*, *Glomus aggregatum*, *G. versiforme* y *Scutellospora pellucida* se han encontrado en suelos con rangos de pH muy amplios, entre 3.8 y 8; *Gigaspora* spp y *A. laevis* pueden desarrollar su actividad a pH de 4.5 a 5 [10,

76, 32, 102, 107, 99]. Esto podría sugerir que a pesar de su gran dispersión los hongos micorrizógenos pueden agruparse en especies que se adaptan a condiciones muy específicas y particulares de un ecosistema, considerando las condiciones físicas, químicas y biológicas del suelo. Es así, como se podría pensar en la inoculación con inóculos de una gran diversidad de géneros, lo cual aumentaría las posibilidades de promover la inducción de metabolitos secundarios a partir de plantas sembradas en diferentes características agroecológicas.

Del mismo modo, las condiciones ambientales óptimas para la planta huésped lo son también para los hongos micorrizógenos, lo cual implica que el manejo integral de la ecología suelo – planta – hongo es la clave para optimizar y facilitar el establecimiento de la simbiosis. El inóculo de micorrizas se puede propagar con altas intensidades de luz y a temperaturas moderadas del suelo entre 15 y 30 °C, el aumento de la temperatura puede ocasionar pérdida de la viabilidad de los propágulos infectivos [55]. La combinación luz y temperatura, está directamente relacionada con la tasa de fotosíntesis del hospedero, por lo tanto la disponibilidad de carbohidratos, lo cual se constituye en uno de los factores aportados al hongo por parte de la planta, alterando considerablemente el equilibrio de la simbiosis micorrizal [38]. Otros factores como la humedad, luminosidad y aireación afectan directamente a los HMA a través del hospedero [109]. Dada la naturaleza aerobia de los micosimbiontes, la presencia de excesos de humedad limita el establecimiento de la simbiosis y los efectos benéficos de esta asociación [110, 65, 86]. Por último, en el momento de la cosecha se obtuvieron muestras de raíces de las plantas inoculadas con HMA para determinar la infección de hongos formadores de micorrizas arbusculares (Figura 11), encontrando valores de colonización entre un 6,0 y un 21,0 % (Tabla 4).



**Figura 10.** Colonización de hongos formadores de micorrizas en la inducción de metabolitos secundarios. Porcentaje de Colonización. Raíces de plantas micotróficas teñidas por el método de clareado y tinción descrito por Sieverding (1983) vistas bajo microscopio de disección. **Fuente:** Autor.

**Tabla 4.** Porcentaje de infección de hongos formadores de micorrizas arbusculares

| <b>Variedad vegetal</b>                   | <b>Porcentaje de colonización</b> |
|---|-----------------------------------|
| <i>Allium cepa</i> var. <i>Red creole</i> | 17,67 %                           |
| <i>Trifolium repens</i>                   | 21,00 %                           |
| <i>Trifolium pratense</i>                 | 17,00 %                           |
| <i>Lotus uliginosos</i> var. <i>Maku</i>  | 11,67 %                           |
| <i>Medicago sativa</i>                    | 6,00 %                            |

### **3.1.2. Inducción y biosíntesis de metabolitos secundarios a partir de semillas de especies vegetales micotróficas**

En el manejo de las semillas de *Medicago sativa*, *Lotus uliginosos* var. *Maku*, *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*, y *Allium cepa* var. *Red creole* se obtuvo una desinfección efectiva de  $< 1 \times 10^1$  UFC / g de semilla, respecto a la proliferación de agentes contaminantes y patógenos, esto con la finalidad de no causar interferencias en la extracción de metabolitos secundarios.

### 3.2 EXTRACCION DE METABOLITOS SECUNDARIOS

La expresión del metabolismo secundario se caracteriza en la especialización celular, o bien, en la formación de nuevas células especializadas que se integran en los programas de diferenciación y desarrollo del organismo productor. La importancia relativa para la célula sintetizadora como tal, y la mayor importancia para el organismo como un todo. Sin embargo, algunas de las anteriores características pueden ser aplicables a ciertos compuestos primarios como las proteínas; por ello, en algunos casos, es sumamente difícil establecer una frontera definida entre los metabolitos primarios y secundarios. El amplio rango de características químicas en los metabolitos secundarios deriva de un grupo de precursores reducido (ácido shikímico, aminoácidos y acetato) [30, 111, 112].

Los precursores de estos metabolitos secundarios, también son utilizados para la biosíntesis de ciertos metabolitos primarios: proteínas, ácidos grasos, etc. Es importante señalar que las reacciones biológicas que están involucradas con la síntesis de los metabolitos primarios y secundarios, están catalizadas por una multitud de enzimas diferentes y, en principio, son reversibles. Las enzimas, frecuentemente son específicas a un sustrato o grupo de sustratos particulares [11, 37].

Los flavonoides son importantes metabolitos secundarios de las plantas los cuales han sido ampliamente estudiados utilizando enfoques genéticos, bioquímicos y moleculares. Análisis recientes se han centrado en la comprensión del papel de los flavonoides en los procesos como la interacción planta-microorganismo y la protección contra los rayos ultravioleta (UV) [11, 112]. Estos estudios demuestran la utilidad de las estructuras de los flavonoides en una amplia gama de actividades, destacando el valor de la vía de los flavonoides como un paradigma

para el estudio de la evolución del metabolismo vegetal. Los flavonoides junto con los isoprenoides y alcaloides, conforman las tres principales clases de productos secundarios producidos por las plantas superiores. Estos metabolitos son exclusivos de las plantas y son una parte esencial de su éxito en la adaptación a la vida como organismos fijos que viven en un entorno diverso e inconstante. Los flavonoides son derivados de la fenilalanina, conocidos por la coloración que proporcionan los pigmentos azules, amarillos, rojos y púrpuras de las semillas [11].

En evento de divulgación tecnológica, el investigador Vega (2011) resaltó la importancia de los metabolitos secundarios para el aprovechamiento de la biodiversidad. Lo anterior sin olvidar las limitaciones por rendimientos de producción [111]. A partir de esto, y teniendo como base la biología de la micorriza arbuscular, los factores de la optimización de la simbiosis y las herramientas de la biotecnología se pudo encontrar un esquema de inducción de metabolitos secundarios para la estimulación micorrizal; tal es el caso de productos comerciales basados en los metabolitos secundarios asociados a la señalización entre raíces y hongos micorrízicos arbusculares [7]. Por consiguiente, se definió un protocolo de extracción de metabolitos secundarios con actividad micotrófica. Inicialmente, se determinó la metodología para obtener una adecuada extracción de flavonoides; especialmente del grupo de flavonoles e isoflavonas (Quercetina y Formononetina), ya que estos han sido reportados ampliamente como inductores de micorrización [10, 57, 64, 82, 113].

Posteriormente se obtuvieron los extractos en base a lo encontrado en los Rf de los estándares de Quercetina (0,67) y Formononetina (0,68) [60, 90]. Es así como se seleccionaron las muestras con rangos de Rf entre 0,60 y 0,70 para realizar la caracterización de metabolitos secundarios enfocados a flavonoides (Tabla 5).

**Tabla 5.** Resultados cromatografía de capa fina para metabolitos secundarios

| Tratamiento | Origen de la muestra        | Rf   |
|-------------|-----------------------------|------|
| 1           | Cebolla/Aérea/HFM           | 0,65 |
| 2           | Cebolla/ Aérea /HFM         | 0,68 |
| 3           | Trébol rojo/ Aérea /HFM     | 0,61 |
| 4           | Trébol rojo/ Aérea /Sin HFM | 0,63 |
| 5           | Trébol blanco/Raíz/HFM      | 0,67 |
| 6           | Trébol blanco/Raíz/Sin HFM  | 0,66 |
| 7           | Trébol blanco/Raíz/Sin HFM  | 0,65 |
| 8           | Trébol blanco/Raíz/Sin HFM  | 0,65 |
| 9           | Lotus/ Aérea /HFM           | 0,67 |
| 10          | Lotus/ Aérea /HFM           | 0,69 |
| 11          | Lotus/ Aérea /HFM           | 0,70 |
| 12          | Lotus/ Aérea /Sin HFM       | 0,68 |
| 13          | Alfalfa/ Aérea /Sin HFM     | 0,62 |

La extracción de metabolitos secundarios no conservó una tendencia respecto a la fuente de inducción, es decir el origen de la muestra fue variable. De manera que, se encontraron metabolitos en un rango de interés de un Rf entre 0,60 y 0,70 [15, 60, 90, 114], tanto en biomasa radicular (con y sin inoculación) como en biomasa aérea proveniente de plantas micorrizadas y sin micorrización. Adicionalmente, el tipo de especie vegetal correspondió a los cinco grupos evaluados: Alfalfa (*Medicago sativa*), Lotus (*Lotus uliginosus* var. *Maku*), Trébol rojo (*Trifolium pratense*), Trébol blanco (*Trifolium repens*), y Cebolla (*Allium cepa* var. *Red creole*). Comparativamente con otros estudios realizados por Scervino y colaboradores (2005) y T. Khaosaad y colaboradores (2008) la extracción de flavonoides se realizó a partir de raíces de tréboles micorrizados y no micorrizados, partiendo de un inóculo de hongos formadores de micorrizas con los géneros *Gigaspora rosea*, *Gigaspora margarita*, *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices*, en el caso del estudio realizado por T. Khaosaad y colaboradores

(2008) utilizaron solo la especie *Glomus mosseae*. En estos estudios la extracción se realizó con etanol, el resultado de la extracción fue analizado por cromatografía en capa fina, CCF, y visualizada por luz ultravioleta. La purificación del flavonoide fue comprobada por HPLC – NMR (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución - Resonancia Magnética Nuclear) usando 500 MHz. Los flavonoides fueron identificados por espectrometría de masas (EIMS y HREIMS) conforme con la fórmula molecular, lo cual se soportó con espectroscopia de resonancia magnética nuclear CNMR [22, 53]. Scervino y colaboradores (2005) hallaron que los flavonoides 5,6,7,8,9-hidroxi chalcona, 3,7-hydroxy-4 methoxy flavona, 5,6,7,8-hydroxy-4-methoxy flavona y 3,5,6,7,4-hydroxy flavona fueron detectados en las raíces no micorrizadas de trébol blanco, pero no en las raíces micorrizadas, mientras que el acacetin flavonoides, quercetina y ramnetina sólo estuvieron presentes en las raíces micorrizadas [22]. Por su parte T. Khaosaad y colaboradores (2008) hallaron que los principales componentes activos de los extractos de planta de trébol rojo fueron las isoflavonas tales como biochanina A, genisteína, daidzeína y formononetina [53]. La detección en estos estudios de los compuestos mencionados permite verificar que la metodología empleada para la extracción fue la adecuada.

En estudios realizados por Ponce y colaboradores (2009) con plántulas de *Lolium multiflorum* inoculadas y no inoculadas con el hongo micorrizal *Glomus intraradices* se realizó una extracción de flavonoides a partir de raíces. La extracción fue realizada a temperatura ambiente por cuatro días en etanol. Los extractos fueron filtrados, evaporados, secados y suspendidos en agua. La solución acuosa fue extraída con solventes orgánicos y analizados por CCF. Los valores R<sub>f</sub> para el análisis de CCF de los compuestos encontrados fueron los siguientes: rutina: 0, morina: 0.45, luteolina: 0.63, quercetina: 0.67, crisina: 0.88, apigenina: 0.77, kaempferol: 0.83 e isoramnetina: 0.88 [15].

Otros autores como Geneviève y colaboradores (2002) realizaron la extracción de flavonoides a partir de raíces liofilizadas de *Medicago sativa*; al igual que Nagahashi y colaboradores (2000) quienes concentraron exudados de raíces de maíz (*Zea mays* FRB6), los filtraron y liofilizaron para concentrar los exudados de las raíces; y Khaosaad y colaboradores (2008) quienes realizaron un análisis de isoflavonas a partir de material vegetal de trébol rojo (*T. pratense* L) de las hojas o raíces pulverizadas. Tanto Geneviève (2002) como Nagahashi y colaboradores (2000) extrajeron los flavonoides en acetona al 100% por doce horas a 4°C, para precipitar proteínas, oligosacáridos y polisacáridos, esta mezcla fue filtrada, dejando evaporar la solución para concentrar los flavonoides [53, 74, 98]. El concentrado fue disuelto en metanol y se analizó en una columna analítica en fase reversa (Kingsorb C<sub>18</sub>, 150 mm x 4.6 mm id., 3 µm). Los flavonoides fueron separados por 45 minutos en gradiente lineal de 20 a 75% de metanol con un caudal de 0.5 mL/min. La cromatografía fue corrida a 210, 250, 260 y 350 nm dependiendo de la máxima absorción UV de los componentes. La identificación del compuesto se basó en los tiempos de retención pico y la comparación con los espectros UV estándar. Los tiempos de retención de los compuestos encontrados fueron: ononin 14.74 min; 7,4'- dihidroxiflavona 15.50 min; daidzeína 17.20 min; 7,4'- dihidroxiflavonona 18.30 min; 4,4'- dihidroxi -2'- metoxichalcona 20.30 min; genisteína 23.11 min; coumestrol 23.21 min; isoliquiritigeína 26.30 min; formononetina 27.14 min; medicarpina 31.44 min; biocanina A 33.76 min [53, 98]. Del mismo modo, como se evidenció en los estudios anteriores la detección de los compuestos permite verificar que la metodología empleada para la extracción fue la adecuada.



### 3.3 CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

En diferentes estudios se han caracterizado los exudados radiculares de plantas hospederas asociados al proceso de señalización micorrizal como las estrigolactonas (terpeno lactonas) [89], flavonoides como la Quercetina (flavonol) [3], Luteolina, Dihidroxiavona [10], e isoflavonas como Diadzeína y Formononetina [8]. Se ha reportado la presencia de flavonoides, como la Formononetina y la Biocanina A en raíces de trébol (*Trifolium repens*); glucósidos, como la Malonil Medicarpina, en raíces de *M. truncatula*; así como los flavonoles Quercetina y Kaempferol en extractos y exudados de raíces de zanahoria transformadas con el ADN-T Ri y plántulas de la misma especie, respectivamente [22, 28, 38, 45, 85].

Bécard y Piché (1989) han resaltado el efecto de los exudados rizosféricos en la germinación de esporas de hongos micorrizógenos [80]. Situación debatida por algunos autores como Giovanetti y colaboradores (1994) quienes encontraron que el efecto de los exudados de las raíces o la presencia de raíces, no es determinante en la germinación de las esporas [19, 115]. Lo anterior sustentado porque dichas estructuras contienen el material genético y las capacidades biosintéticas para germinar e iniciar la formación de micelio en ausencia de la planta, sustancias minerales y orgánicas [52].

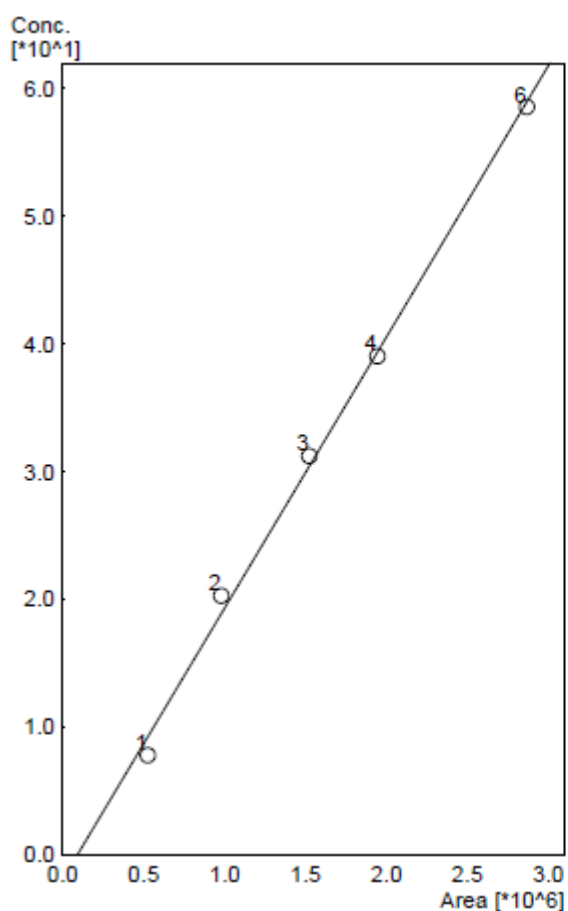
Schliemann y colaboradores encontraron que la diadzeína, precursor de la formononetina, estimula la germinación de las esporas de *G. mosseae* y *G. intraradices*. En estos estudios también se demostró que la daizeina actúa como uno de los inductores del gen Nod de la simbiosis entre *Bradyrhizobium*-soya [8, 116]. En contraste, se encontró en estudios in vitro con *Gigaspora* spp., que en la mayoría de las etapas presimbióticas solo se producen dos flavonoides, acacetina y rhamnetina; mostrando posteriormente efectos inhibitorios sobre *Gigaspora* y

*Glomus*, lo cual apunta hacia una posible implicación en la autorregulación de la micorrización [8, 101].

### 3.3.1 Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución

#### 3.3.1.1 Curva de Calibración para el análisis de Quercetina por HPLC.

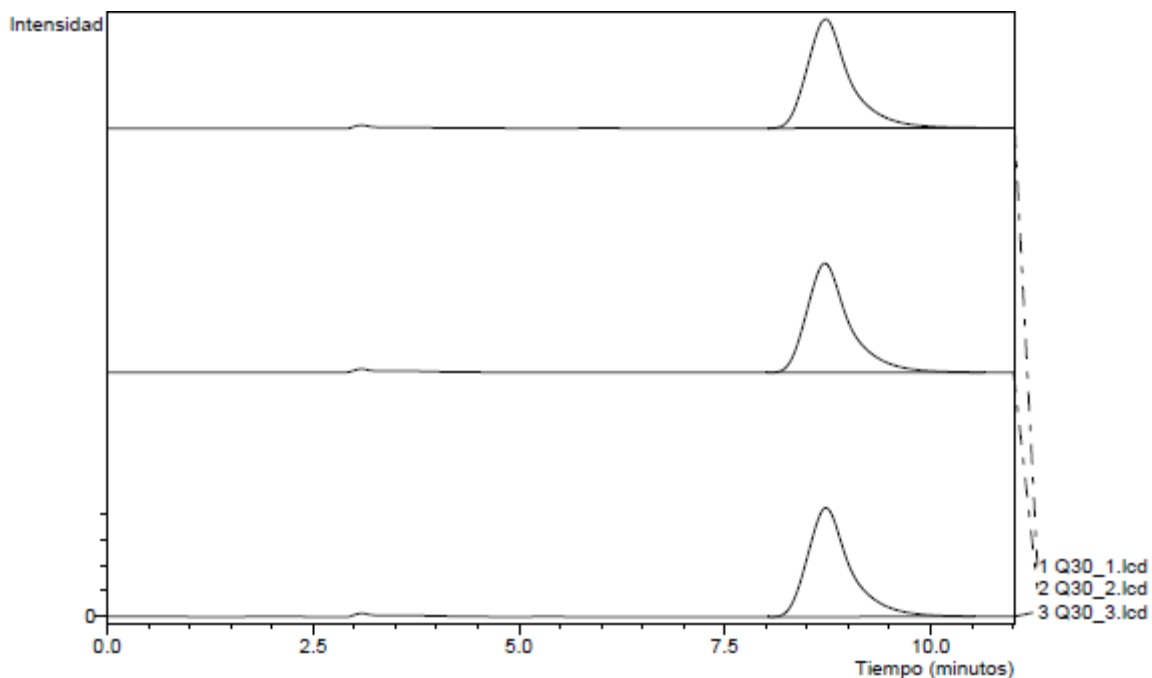
Para el análisis de Quercetina, se construyó una curva de calibración con seis niveles de concentración (7.808, 20.301, 31.232, 39.040 y 58.560 ppm), con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) equivalente a 0.9966111 y se obtuvo una ecuación de regresión lineal  $y = 2.12258e^{-0.005} x - 1.88349$  (Figura 12).



| # | Conc. (Ratio) | MeanArea  | Area    |
|---|---------------|-----------|---------|
| 1 | 7.808         | 525051.6  | 525593  |
|   |               |           | 522265  |
|   |               |           | 527297  |
| 2 | 20.301        | 978782.6  | 971275  |
|   |               |           | 985966  |
|   |               |           | 979106  |
| 3 | 31.232        | 1522911.1 | 1521771 |
|   |               |           | 1524920 |
|   |               |           | 1522042 |
| 4 | 39.040        | 1944326.2 | 1940829 |
|   |               |           | 1945319 |
|   |               |           | 1946831 |
| 6 | 58.560        | 2866495.0 | 2859195 |
|   |               |           | 2876565 |
|   |               |           | 2863725 |

**Figura 11.** Curva de calibración para Quercetina.

En la Figura 13 se muestran los cromatogramas de las tres réplicas del estándar de Quercetina en el punto central de la curva, correspondiente a una concentración de 31.232 ppm.



**Figura 12.** Cromatograma de estándar de Quercetina. Se observa una señal que eluye aproximadamente a 8.7 min, con un factor de capacidad ( $k'$ ) superior a 2.2 y un factor de coeulo cercano a 1.5

### 3.3.1.2 Cuantificación de Quercetina por HPLC en plantas micotróficas seleccionadas.

Del análisis por Cromatografía de Capa Fina (CCF), se seleccionaron las muestras que presentaron un  $R_f$  entre 0.60 y 0.70, para realizar la cuantificación de Quercetina, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 6 y la Figura 14. Los tratamientos realizados para el Trébol rojo sin HFM, en sus partes aéreas y la raíz de Trébol blanco con HFM, presentaron la mayor concentración de Quercetina, 20.061 y 16.561 ppm respectivamente (Figura 15).

Tabla 6. Resultados cromatográficos para Quercetina en plantas micotróficas

| Tratamiento | Origen de la muestra        | Quercetina (ppm) |
|-------------|-----------------------------|------------------|
| 1           | Cebolla/Aérea/HFM           | 0,000            |
| 2           | Cebolla/ Aérea /HFM         | 0,000            |
| 3           | Trébol rojo/ Aérea /HFM     | 0,000            |
| 4           | Trébol rojo/ Aérea /Sin HFM | 20,061           |
| 5           | Trébol blanco/Raíz/HFM      | 16,561           |
| 6           | Trébol blanco/Raíz/Sin HFM  | 7,337            |
| 7           | Trébol blanco/Raíz/Sin HFM  | 0,076            |
| 8           | Trébol blanco/Raíz/Sin HFM  | 0,000            |
| 9           | Lotus/ Aérea /HFM           | 0,000            |
| 10          | Lotus/ Aérea /HFM           | 1,452            |
| 11          | Lotus/ Aérea /HFM           | 4,642            |
| 12          | Lotus/ Aérea /Sin HFM       | 1,063            |
| 13          | Alfalfa/ Aérea /Sin HFM     | 0,000            |

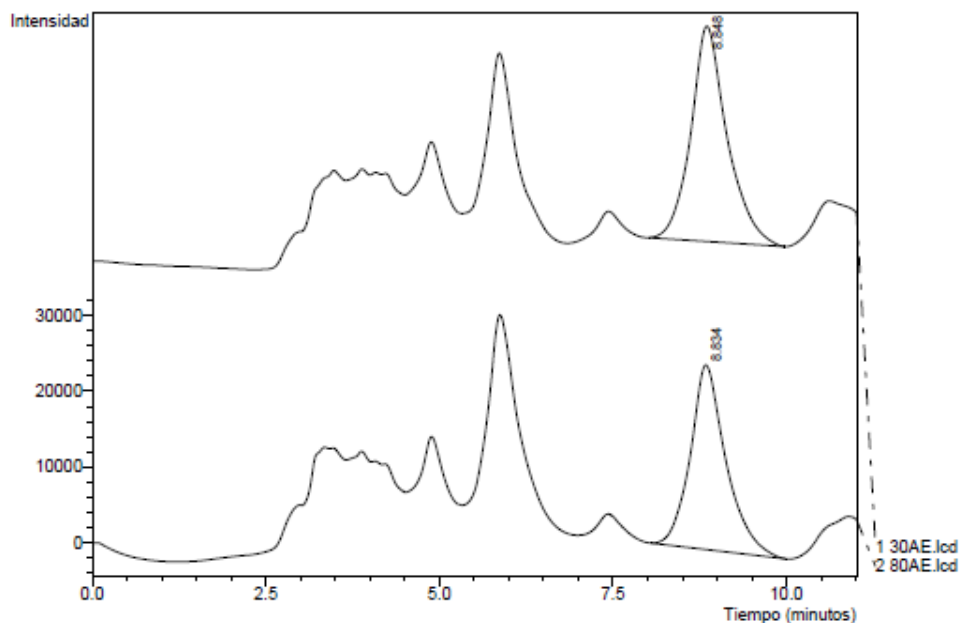
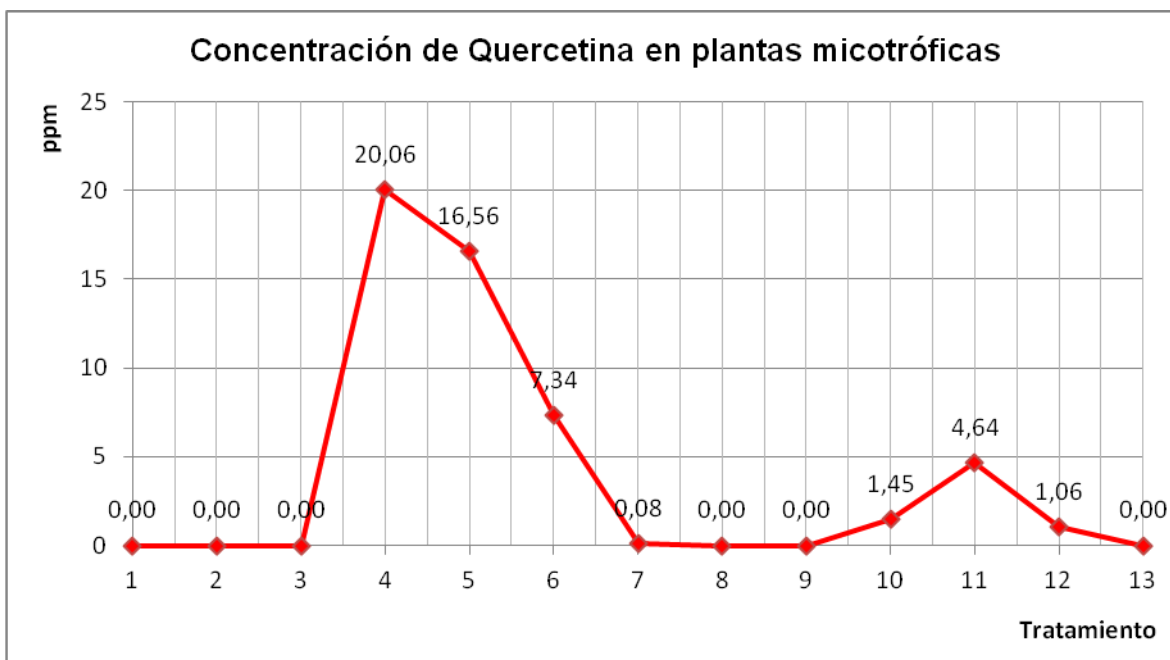


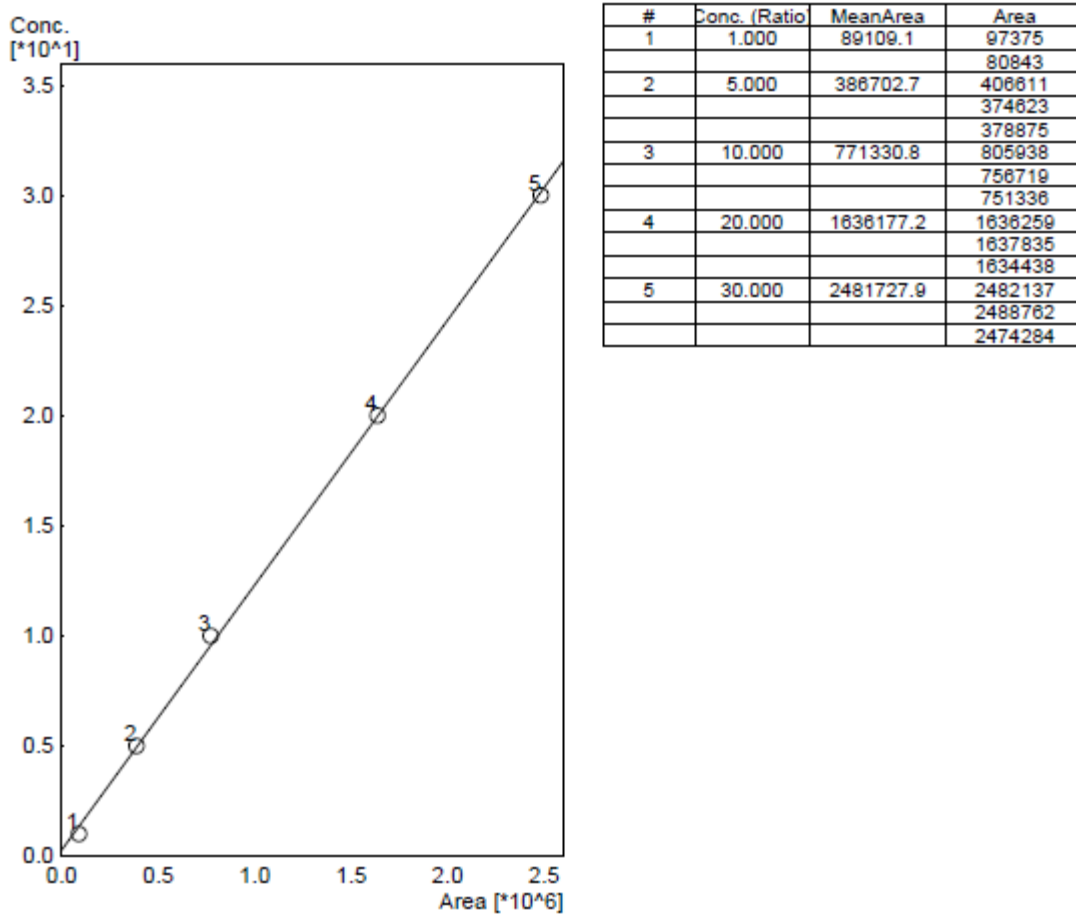
Figura 13. Cromatogramas de Quercetina en muestras de Trébol rojo (30AE) y Trébol blanco (80AE).



**Figura 14.** Comportamiento de la producción de Quercetina para diferentes tratamientos.

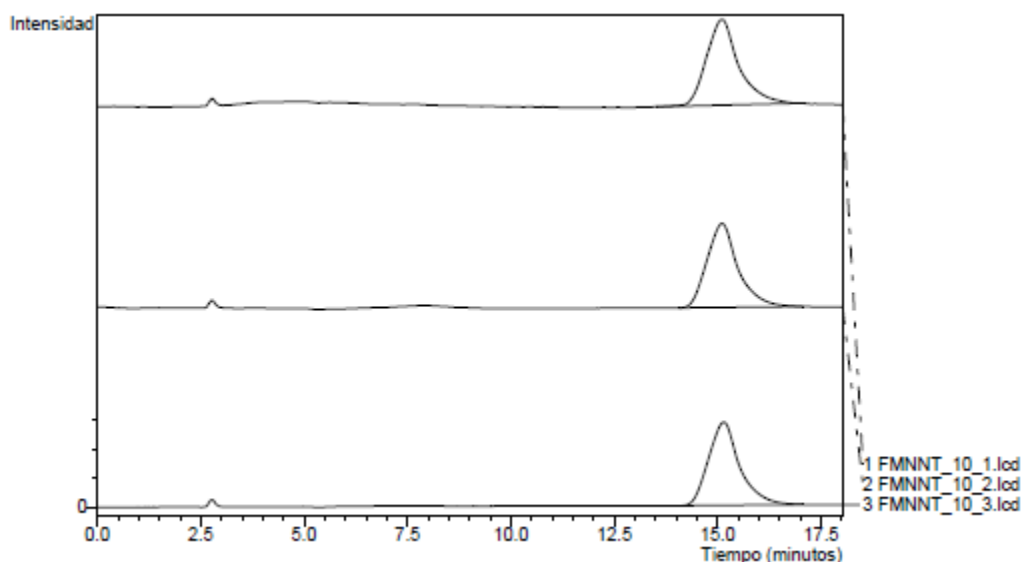
### 3.3.1.3 Curva de Calibración para el análisis de Formononetina por HPLC.

Para el análisis de Formononetina, se construyó una curva de calibración con cinco niveles de concentración (1.00, 5.00, 10.00, 20.00 y 30.00 ppm), con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) equivalente a 0.9993839 y se obtuvo una ecuación de regresión lineal  $y = 1.20292e^{-0.005} x + 0.292552$  (Figura 16).



**Figura 15.** Curva de calibración para Formononetina.

En la Figura 17 se muestran los cromatogramas de las tres réplicas del estándar de Formononetina en el punto central de la curva, correspondiente a una concentración de 10.0 ppm.

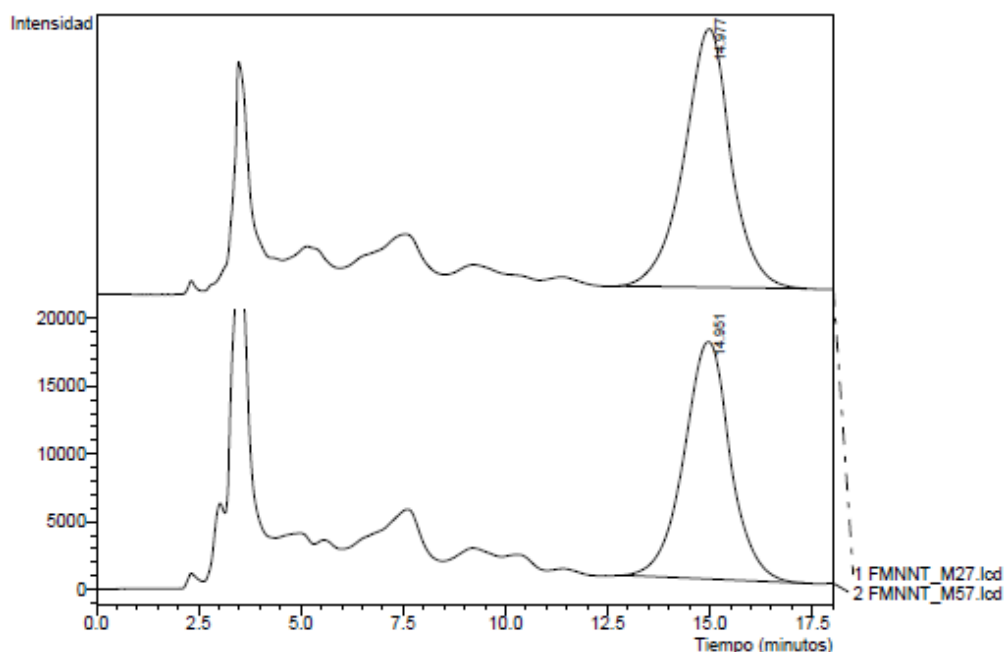


**Figura 16.** Cromatograma de estándar de Formononetina. Se observa una señal que eluye aproximadamente a 15 min, con un factor de capacidad ( $k'$ ) superior a 4.5 y un factor de coeio cercano a 1.3

#### 3.3.1.4 Cuantificación de Formononetina por HPLC en plantas micotróficas seleccionadas.

Del análisis por Cromatografía de Capa Fina (CCF), se seleccionaron las muestras que presentaron un  $R_f$  entre 0.60 y 0.70, para realizar la cuantificación de Formononetina, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 7 y la Figura 18. Los tratamientos realizados para el Trébol rojo con HFM, en sus partes aéreas y el Lotus con HFM en sus partes aéreas, presentaron la mayor concentración de Formononetina, 18.597 y 16.959 ppm respectivamente (Figura 19).

Ku-Cukboyac *et al.* (2013) reportaron concentraciones de Formononetina entre 175 y 251 ppm para la variedad *pratense* y entre 59 y 79 ppm para la variedad *sativa*; extractos obtenidos con Metanol y con Metanol ácido a través de hidrólisis. Esta diferencia puede radicar en el uso del proceso hidrolítico acoplado a la extracción metanólica.

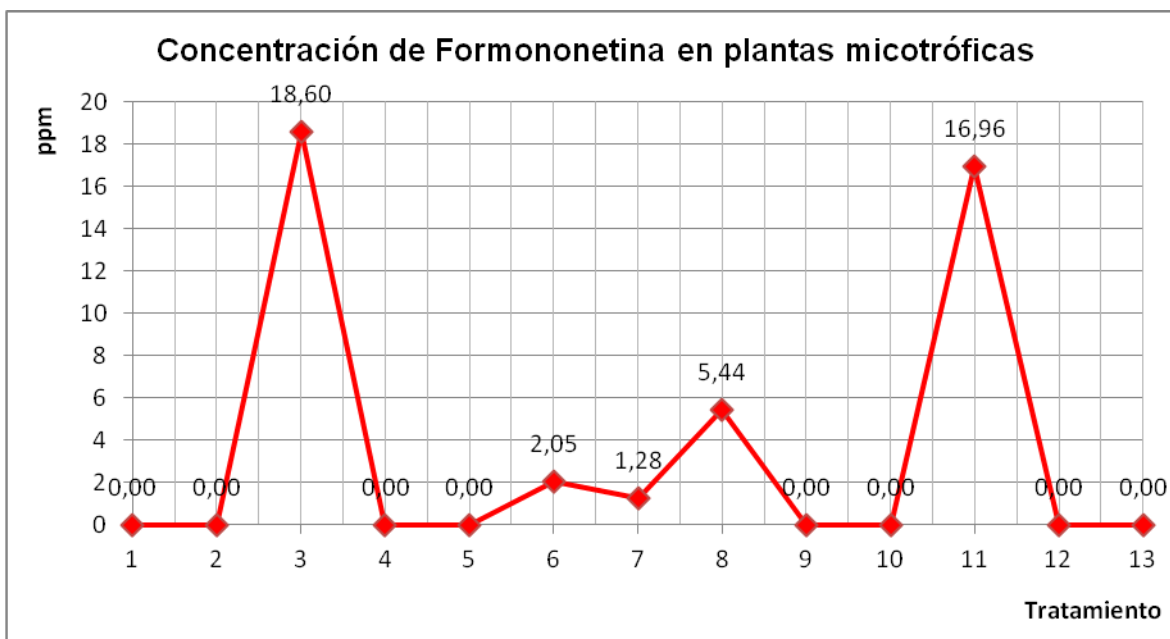


**Figura 17.** Cromatogramas de Formononetina en muestras de Trébol rojo (FMNNT\_M27) y Lotus (FMNNT\_M57).

**Tabla 7.** Resultados cromatográficos para Formononetina en plantas micotróficas

| Tratamiento | Origen de la muestra       | Formononetina (ppm) |
|-------------|----------------------------|---------------------|
| 1           | Cebolla/Áerea/HFM          | 0,000               |
| 2           | Cebolla/Áerea/HFM          | 0,000               |
| 3           | Trébol rojo/Áerea/HFM      | 18,597              |
| 4           | Trébol rojo/Áerea/Sin HFM  | 0,000               |
| 5           | Trébol blanco/Raíz/HFM     | 0,000               |
| 6           | Trébol blanco/Raíz/Sin HFM | 2,054               |
| 7           | Trébol blanco/Raíz/Sin HFM | 1,276               |
| 8           | Trébol blanco/Raíz/Sin HFM | 5,438               |
| 9           | Lotus/Áerea/HFM            | 0,000               |
| 10          | Lotus/Áerea/HFM            | 0,000               |
| 11          | Lotus/Áerea/HFM            | 16,959              |
| 12          | Lotus/Áerea/Sin HFM        | 0,000               |
| 13          | Alfalfa/Áerea/Sin HFM      | 0,000               |





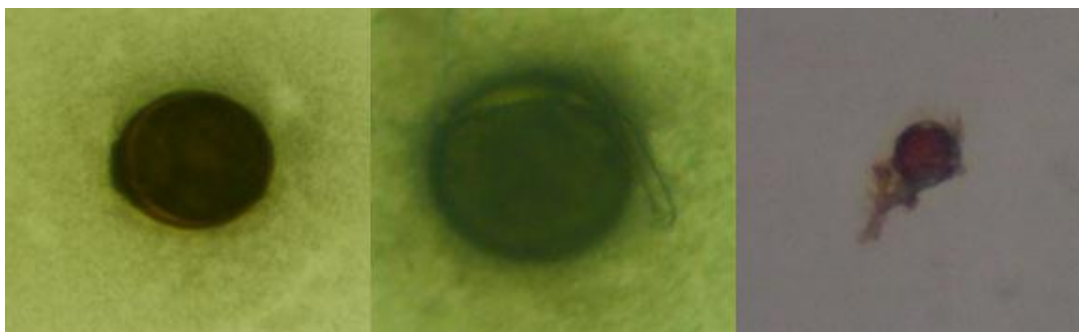
**Figura 18.** Comportamiento de la producción de Formononetina para diferentes tratamientos.

### 3.4 PRUEBA *in vitro* DEL EFECTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS SOBRE ESPORAS DE HONGOS MICORRIZALES

#### 3.4.1 Efecto de los metabolitos secundarios sobre *Glomus mosseae*

##### 3.4.1.1 Germinación.

En la Figura 20 y la Tabla 8, se evidencia la producción de esporas germinadas en condiciones *in vitro* bajo el efecto de metabolitos secundarios obtenidos a partir de extractos de plantas micotróficas, desarrollando tubo germinativo.



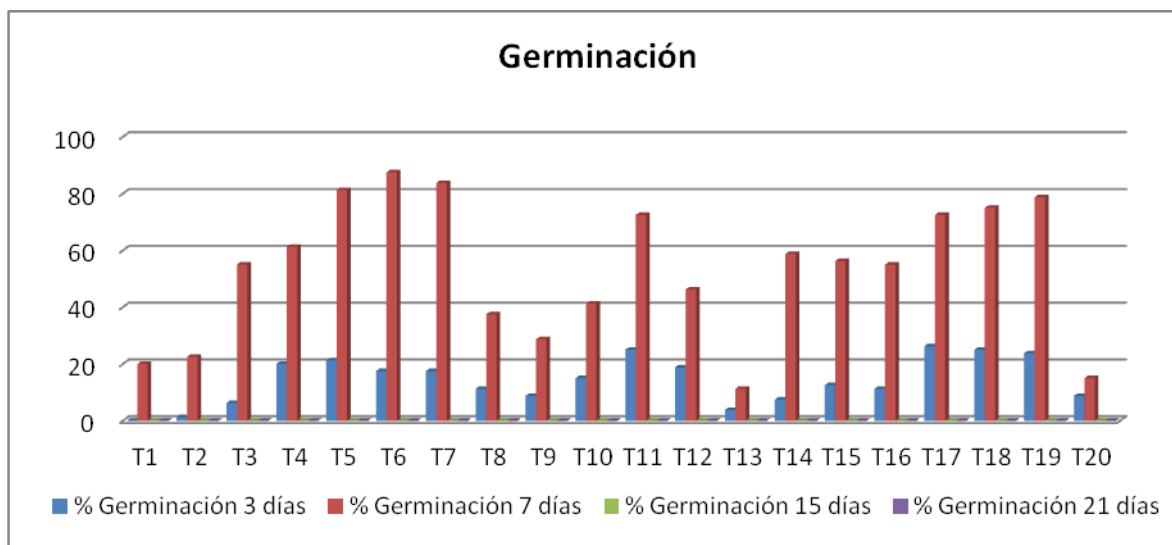
**Figura 19.** Germinación de esporas bajo condiciones *in vitro*.

**Tabla 8.** Porcentaje de germinación del hongo *Glomus mosseae* en presencia de extractos de plantas micotróficas

| Origen de la muestra                      | Tratamiento | Promedio de Germinación (%) |        |         |         |
|---|-------------|-----------------------------|--------|---------|---------|
|   |             | 3 días                      | 7 días | 15 días | 21 días |
| Cebolla/Áerea/HFM                         | T 1         | 0                           | 20     | 0       | 0       |
| Cebolla/Áerea/HFM                         | T 2         | 1,25                        | 22,5   | 0       | 0       |
| Trébol rojo/Áerea/HFM                     | T 3         | 6,25                        | 55     | 0       | 0       |
| Trébol rojo/Áerea/Sin HFM                 | T 4         | 20                          | 61,25  | 0       | 0       |
| Trébol blanco/Raíz/HFM                    | T 5         | 21,25                       | 81,25  | 0       | 0       |
| Trébol blanco/Raíz/Sin HFM                | T 6         | 17,5                        | 87,5   | 0       | 0       |
| Trébol blanco/Raíz/Sin HFM                | T 7         | 17,5                        | 83,75  | 0       | 0       |
| Trébol blanco/Raíz/Sin HFM                | T 8         | 11,25                       | 37,5   | 0       | 0       |
| Lotus/Áerea/HFM                           | T 9         | 8,75                        | 28,75  | 0       | 0       |
| Lotus/Áerea/HFM                           | T 10        | 15                          | 41,25  | 0       | 0       |
| Lotus/Áerea/HFM                           | T 11        | 25                          | 72,5   | 0       | 0       |
| Lotus/Áerea/Sin HFM                       | T 12        | 18,75                       | 46,25  | 0       | 0       |
| Alfalfa/Áerea/Sin HFM                     | T 13        | 3,75                        | 11,25  | 0       | 0       |
| Control positivo STD Quercetina 10 ppm    | T 14        | 7,5                         | 58,75  | 0       | 0       |
| Control positivo STD Quercetina 30 ppm    | T 15        | 12,5                        | 56,25  | 0       | 0       |
| Control positivo STD Quercetina 50 ppm    | T 16        | 11,25                       | 55     | 0       | 0       |
| Control positivo STD Formononetina 10 ppm | T 17        | 26,25                       | 72,5   | 0       | 0       |
| Control positivo STD Formononetina 30 ppm | T 18        | 25                          | 75     | 0       | 0       |
| Control positivo STD Formononetina 50 ppm | T 19        | 23,75                       | 78,75  | 0       | 0       |
| Control negativo                          | T 20        | 8,75                        | 15     | 0       | 0       |

\*STD: estándar.

La Figura 21 muestra el comportamiento de la germinación del hongo *Glomus mosseae* en presencia de plantas micotróficas por un período de 21 días.



**Figura 20.** Germinación del hongo *Glomus mosseae* en presencia de extractos de plantas micotróficas. Los tratamientos más relevantes en el efecto de los metabolitos secundarios sobre la germinación de esporas fueron T 5, T 6, T 7 y T 11 a los 7 días bajo condiciones *in vitro*.

Los resultados obtenidos bajo condiciones *in vitro* con esporas del hongo *Glomus mosseae* (LMSS 009 I – INVAM) puestas en contacto con los trece extractos seleccionados en la fase de inducción de metabolitos secundarios, tres concentraciones del estándar de Quercetina (10, 30, 50 ppm), tres concentraciones del estándar de Formononetina (10, 30, 50 ppm), y un control negativo; exhibieron un rango de comportamiento diverso, comprendido entre la nula germinación hasta germinaciones del 87,5 %. Este rango amplio se ha evidenciado en estudios realizados por otros autores, lo cual posiblemente puede indicar una correcta metodología que favorece la germinación de esporas. Sin embargo, los estudios más relevantes en términos de efecto de extractos que favorecen las etapas de desarrollo de los hongos formadores de micorriza arbuscular consideran un rango superior al 60% [10, 22, 32, 61, 76].

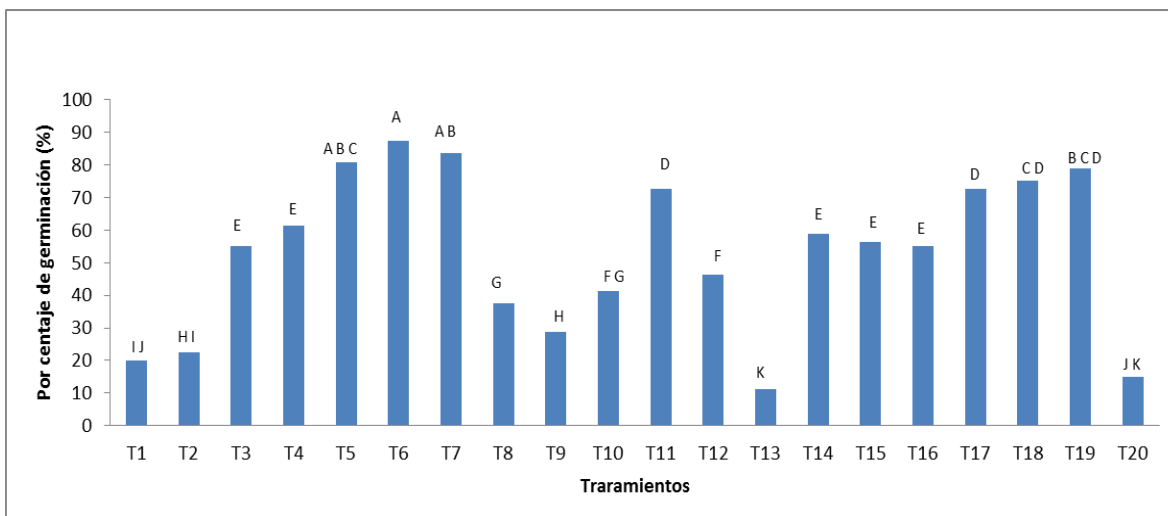
Adicionalmente, se encontró que la germinación de las esporas se realizó en un máximo de siete días. Por otra parte, en los ensayos de Kandula *et al.* (2006) la germinación de las esporas se produjo entre 44 y 60 días después de la inoculación independientemente del medio utilizado. Después de 60 días, la tasa de germinación fue del 16,6%.

En la etapa de precolonización de la micorriza arbuscular las esporas y otros propágulos podrían ser estimulados por componentes bióticos, exudados y condiciones fisico-químicas del suelo. La germinación de esporas puede ser independiente de la presencia de raíces hospederas o exudados radicales; a pesar del biotrofismo obligado, estas estructuras son generalmente capaces de germinar espontáneamente, siempre y cuando se cumplan algunas condiciones físicas y fisiológicas. En consecuencia, un ambiente con alta humedad puede constituirse en uno de los factores supresores más importantes sobre la germinación de esporas, así mismo un pH neutro podría estimular la germinación, mientras que un pH ácido podría disminuirla; complementariamente, una temperatura óptima para la germinación de las esporas podría estar en un rango de 20-30 ° C. De esta manera, es posible afirmar que el proceso de germinación es el resultado de un conjunto de factores, donde la falta de sincronización de uno de ellos puede inhibir la emisión de un tubo germinal [5, 64, 80, 107].

En estudios de tipo *in vitro* es importante considerar que aunque las esporas contienen el material genético y las capacidades biosintéticas para germinar e iniciar la formación del micelio en ausencia de una planta, las condiciones adecuadas para germinar dependen de la madurez y viabilidad de las esporas, lo cual podría explicar el motivo de la no germinación de algunas de estas estructuras. En algunos casos cuando las condiciones no son favorables, y se ha dado una germinación, el tubo germinal se retrae, y las esporas entran en una etapa de reposo. De la misma forma, en la germinación juega un papel fundamental fenómenos como la fungistasis, que pueden llevar a que sólo la mitad

de las esporas germinen. Igualmente, la acción de microorganismos edáficos puede ser fundamental para acelerar el ritmo de germinación, como las llamadas “bacterias helper”, las cuales ayudan a superar la inhibición fisiológica o ambiental de las esporas. Adicionalmente, respecto a los metabolitos secundarios se ha reportado un efecto sinérgico de algunos extractos como es el caso de la quercetina, y un efecto inhibitorio del grupo de metabolitos tipo isoflavonas. A pesar de esto, no se puede suponer estrictamente que el estímulo es solo debido al metabolito, y mas en condiciones *in vitro*, donde la ausencia de un ambiente rizósferico podría alterar el afecto [10, 82].

En la variable porcentaje de germinación T6 fue el tratamiento con mejor promedio, sin embargo no superó significativamente a los tratamientos T5 y T7. No obstante se evidenció que los tratamientos T5, T6, T7 y T11 tuvieron los mejores rendimientos, al día siete, respecto al total de extractos extraídos. (Figura 22). Esto sugiere un efecto entre el tiempo de desarrollo propio del hongo (ciclo de vida) y el estímulo externo del medio donde se encuentran los propágulos infectivos. Compuestos fenólicos (por ejemplo, varios flavonoides y ácidos fenólicos) han sido probados en la germinación de esporas axénicamente por diferentes investigadores [10, 32, 60, 80]. Los diferentes resultados han sugerido un grado de actividad química y una estéreo-especificidad, que puede variar entre las especies fúngicas. Por ejemplo los isoflavonoides biocanina A y formononetina que según lo informaron Nair y colaboradores (1991) estimulan algunas especies *Glomus* [60], pero Tsai y Phillips informaron que inhiben a *G. etunicatum* [10], así mismo Bécard y colaboradores encontraron que también inhiben a *G. rosea* [64]. Adicionalmente, también se ha demostrado por que los flavonoles como la quercetina, kaempferol, y miricetina estimulan fuertemente especies de *Gigaspora* [29, 32, 64].



**Figura 22.** Germinación de esporas de *Glomus mosseae* (%), al día siete a partir de la siembra, en función de la aplicación de metabolitos secundarios. Las barras representan el error estándar. Las columnas con las letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p \leq 0.05$ ).

En el caso de los controles positivos donde se probaron diferentes concentraciones se encontró un efecto contrario entre la Quercetina y la Formononetina. En el caso de la Quercetina las concentraciones crecientes del metabolito mostraron una tendencia a disminuir el porcentaje de germinación de un 58,75 % a un 55%. En cambio, en las concentraciones crecientes del flavonoide Formononetina el comportamiento de porcentaje de germinación aumentó de un 72,5 % a un 78,75% en relación directamente proporcional al aumento de su concentración (10, 30, 50 ppm).

#### 3.4.1.2 Elongación.

En la Figura 23 y la Tabla 9, se muestra el comportamiento de la elongación hifal de esporas en condiciones *in vitro* bajo el efecto de metabolitos secundarios obtenidos a partir de extractos de plantas micotróficas. Se observa el desarrollo distal de los micelios respecto a la espора germinada.



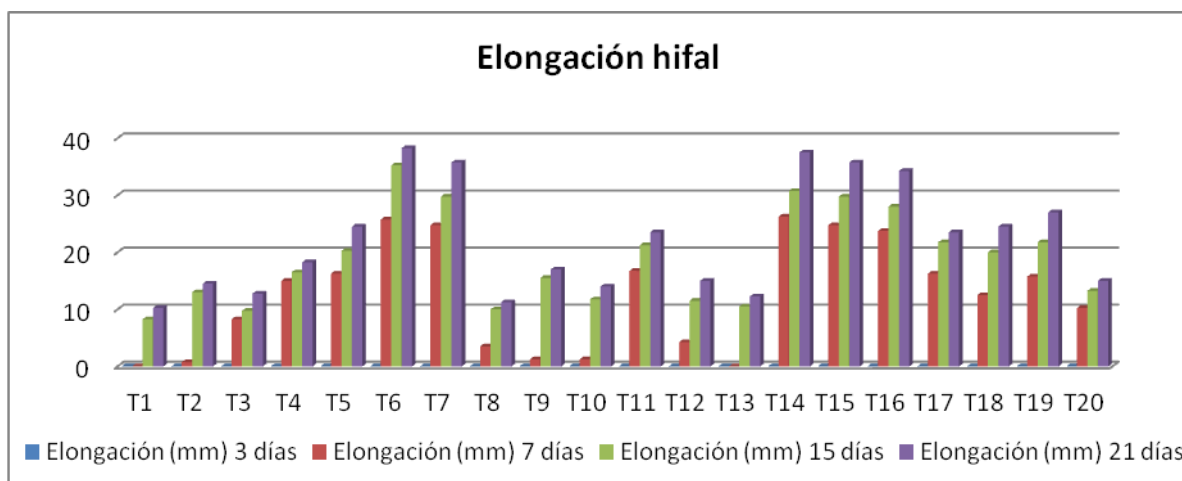
**Figura 23.** Elongación hifal bajo condiciones *in vitro*.

**Tabla 9.** Elongación del hongo *Glomus mosseae* en presencia de extractos de plantas micotróficas

| Origen de la muestra                      | Tratamiento | Promedio de Elongación (mm) |        |         |         |
|---|-------------|-----------------------------|--------|---------|---------|
|   |             | 3 días                      | 7 días | 15 días | 21 días |
| Cebolla/Áerea/HFM                         | T 1         | 0                           | 0      | 8,25    | 10,25   |
| Cebolla/Áerea/HFM                         | T 2         | 0                           | 0,75   | 13      | 14,5    |
| Trébol rojo/Áerea/HFM                     | T 3         | 0                           | 8,25   | 9,75    | 12,75   |
| Trébol rojo/Áerea/Sin HFM                 | T 4         | 0                           | 15     | 16,5    | 18,25   |
| Trébol blanco/Raíz/HFM                    | T 5         | 0                           | 16,25  | 20,25   | 24,5    |
| Trébol blanco/Raíz/Sin HFM                | T 6         | 0                           | 25,75  | 35,25   | 38,25   |
| Trébol blanco/Raíz/Sin HFM                | T 7         | 0                           | 24,75  | 29,75   | 35,75   |
| Trébol blanco/Raíz/Sin HFM                | T 8         | 0                           | 3,5    | 10      | 11,25   |
| Lotus/Áerea/HFM                           | T 9         | 0                           | 1,25   | 15,5    | 17      |
| Lotus/Áerea/HFM                           | T 10        | 0                           | 1,25   | 11,75   | 14      |
| Lotus/Áerea/HFM                           | T 11        | 0                           | 16,75  | 21,25   | 23,5    |
| Lotus/Áerea/Sin HFM                       | T 12        | 0                           | 4,25   | 11,5    | 15      |
| Alfalfa/Áerea/Sin HFM                     | T 13        | 0                           | 0      | 10,5    | 12,25   |
| Control positivo STD Quercetina 10 ppm    | T 14        | 0                           | 26,25  | 30,75   | 37,5    |
| Control positivo STD Quercetina 30 ppm    | T 15        | 0                           | 24,75  | 29,75   | 35,75   |
| Control positivo STD Quercetina 50 ppm    | T 16        | 0                           | 23,75  | 28      | 34,25   |
| Control positivo STD Formononetina 10 ppm | T 17        | 0                           | 16,25  | 21,75   | 23,5    |
| Control positivo STD Formononetina 30 ppm | T 18        | 0                           | 12,5   | 20      | 24,5    |
| Control positivo STD Formononetina 50 ppm | T 19        | 0                           | 15,75  | 21,75   | 27      |
| Control negativo                          | T 20        | 0                           | 10,25  | 13,25   | 15      |

\*STD: estándar.

La Figura 24 muestra el efecto de los metabolitos secundarios sobre la elongación hifal del hongo *Glomus mosseae* en presencia de plantas micotróficas por un período de 21 días.

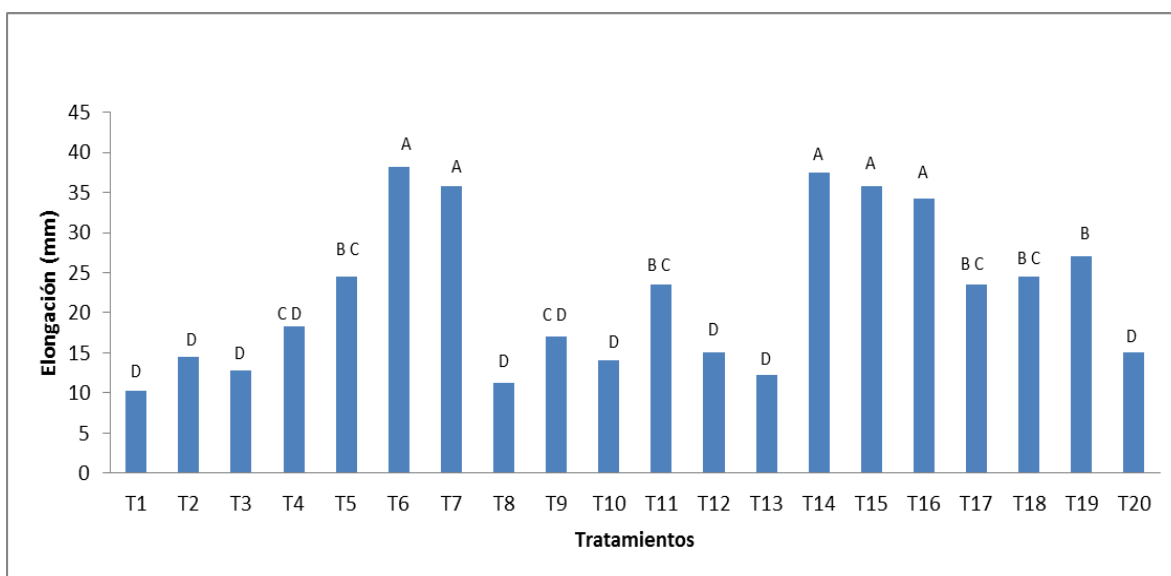


**Figura 214.** Efecto de los metabolitos secundario sobre la elongación hifal. En los tratamientos T 6, T 7, T 14, T 15 y T 16 se evidenció una mayor longitud hifal (mm) en presencia de metabolitos secundarios a los 21 días bajo condiciones *in vitro* .

En la medición de la longitud de las hifas (en milímetros) se partió desde el inicio del tubo germinal hasta la parte distal de las hifas. Es así como se encontró un rango de longitud hifal entre 10,25 mm a 38,25 mm. El máximo desarrollo de las hifas se dio en todos los casos en el día 21, dicho crecimiento se evidenció desde el día siete a partir de la inoculación. En la variable elongación hifal los tratamientos T6, T7, T14, T15 y T16 superaron significativamente a los demás tratamientos. No obstante, T6 fue el tratamiento de mejor promedio respecto a todos los tratamientos evaluados (Figura 25). Los tratamientos T 14, T 15 y T 16 correspondientes a dosis crecientes del flavonoide Quercetina exhibieron una tendencia de disminución de la tasa de crecimiento hifal de 37,50 mm a un 34,25 mm. En cambio, en las concentraciones crecientes de Formononetina el comportamiento de elongación hifal aumentó de 23,3 mm a 27 mm conforme se aumentó su concentración (10, 30, 50 ppm). Sin embargo, en estudios realizados



por Scervino *et al.*, determinaron el efecto que tiene la quercetina en el número de puntos de entrada y el porcentaje de la colonización (etapa simbiótica) de raíces de tomate (*Solanum lycopersicum*), por *G. rosea*, *G. margarita*, *G. mosseae* y *G. intraradices*, el cual aumentaba cuando se aplicaba una concentración de quercetina de 2 a 8  $\mu\text{M}$ . Si bien estas etapas se refieren a un estadio simbiótico del ciclo de hongos micorrizógenos su efecto se enfoca al estímulo hifal [61].



**Figura 25.** Elongación hifal de *Glomus mosseae* (mm), al día veintiuno a partir de la siembra, en función de la aplicación de metabolitos secundarios. Las barras representan el error estándar. Las columnas con las letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p \leq 0.05$ ).

Las diferencias encontradas en los estímulos efectuados por Quercetina y Formononetina pueden indicar un efecto diferencial entre metabolitos y el efecto en los diferentes estadios del ciclo de vida de los HMA. Pérez M. *et al.* 2011 discute la investigación de Vierheilig *et al.* 1998, los cuales postulan una cierta especificidad del efecto de la quercetina sobre los HMA. Algunos flavonoides pueden estar involucrados en un solo paso del desarrollo de los HMA, pero no en

el otro, Pérez M. *et al.* 2011 dan como ejemplo la investigación realizada donde la acacetina y ramnetina inhiben el número de puntos de entrada y la colonización de las raíces por *G. rosea* y *G. margarita* cuando son aplicados en una concentración de 2 a 8  $\mu\text{M}$ . Por otra parte, el flavonoide 3-methoxi-5,6,7,8-hidroxi- 4'hidroxi flavona no afecta el porcentaje de germinación de las esporas (etapa pre-simbiótica) de *G. rosea*, *G. margarita*, *G. mosseae* y *G. intraradices*; pero si afecta significativamente otros pasos en la etapa pre-simbiótica en esporas de *G. margarita* cuando es aplicado en una concentración de 2  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, cuando se aplica en concentraciones de 8  $\mu\text{M}$  se inhibe la longitud de las hifas en *G. rosea* (Scervino *et al.*, 2009) [72]. De acuerdo a lo anterior se puede inferir que el tipo de metabolito y la concentración de este afectan de manera diferencial el efecto sobre el hongo, en términos de estadios y tipo de efecto (positivo y negativo). Los resultados encontrados por Pérez M. *et al.* 2011 indican que los efectos de los flavonoides dependen no sólo del tipo de flavonoide, sino también de su concentración, y que estos podrían estar implicados en el proceso de regulación de los HMA. [84]

#### 3.4.1.3 Ramificación.

Ramificación de hifas de esporas en condiciones *in vitro* bajo el efecto de metabolitos secundarios obtenidos a partir de extractos de plantas micotróficas. Se observa la formación de hifas secundarias y terciarias originadas por ramificación del micelio (Figura 26 y Tabla 10).

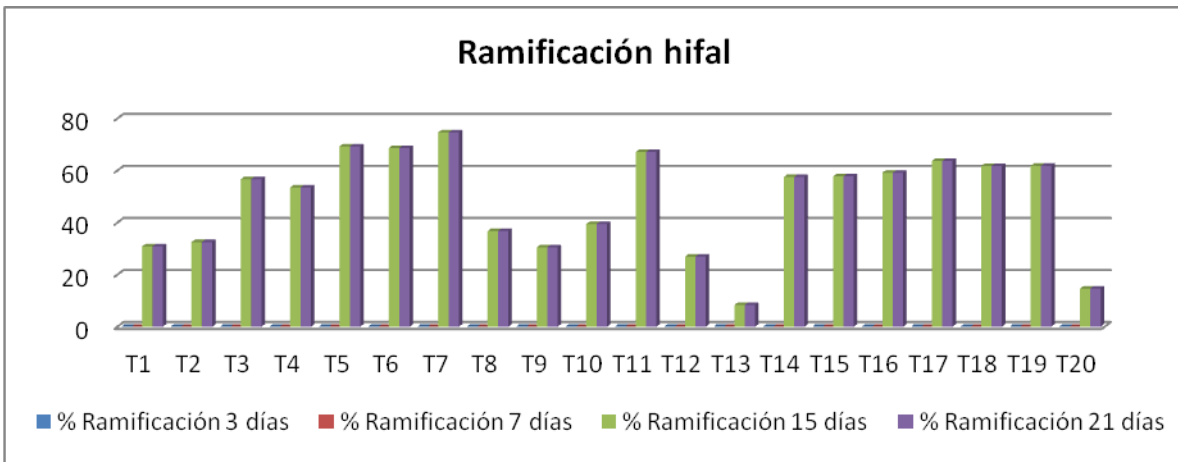


**Figura 226.** Ramificación de hifas bajo condiciones *in vitro*.

**Tabla 10.** Porcentaje ramificación del hongo *Glomus mosseae* en presencia de extractos de plantas micotróficas

| Origen de la muestra                  | Tratamiento | Promedio de Ramificación (%) |        |         |         |
|---------------------------------------|-------------|------------------------------|--------|---------|---------|
|                                       |             | 3 días                       | 7 días | 15 días | 21 días |
| Cebolla/Áerea/HFM                     | T 1         | 0                            | 0      | 30,8325 | 30,8325 |
| Cebolla/Áerea/HFM                     | T 2         | 0                            | 0      | 32,5    | 32,5    |
| Trébol rojo/Áerea/HFM                 | T 3         | 0                            | 0      | 56,6875 | 56,6875 |
| Trébol rojo/Áerea/Sin HFM             | T 4         | 0                            | 0      | 53,5125 | 53,5125 |
| Trébol blanco/Raíz/HFM                | T 5         | 0                            | 0      | 69,2475 | 69,2475 |
| Trébol blanco/Raíz/Sin HFM            | T 6         | 0                            | 0      | 68,62   | 68,62   |
| Trébol blanco/Raíz/Sin HFM            | T 7         | 0                            | 0      | 74,63   | 74,63   |
| Trébol blanco/Raíz/Sin HFM            | T 8         | 0                            | 0      | 36,7525 | 36,7525 |
| Lotus/Áerea/HFM                       | T 9         | 0                            | 0      | 30,475  | 30,475  |
| Lotus/Áerea/HFM                       | T 10        | 0                            | 0      | 39,4625 | 39,4625 |
| Lotus/Áerea/HFM                       | T 11        | 0                            | 0      | 67,1375 | 67,1375 |
| Lotus/Áerea/Sin HFM                   | T 12        | 0                            | 0      | 26,9425 | 26,9425 |
| Alfalfa/Áerea/Sin HFM                 | T 13        | 0                            | 0      | 8,3325  | 8,3325  |
| Control positivo Quercetina 10 ppm    | T 14        | 0                            | 0      | 57,5025 | 57,5025 |
| Control positivo Quercetina 30 ppm    | T 15        | 0                            | 0      | 57,8    | 57,8    |
| Control positivo Quercetina 50 ppm    | T 16        | 0                            | 0      | 59,165  | 59,165  |
| Control positivo Formononetina 10 ppm | T 17        | 0                            | 0      | 63,685  | 63,685  |
| Control positivo Formononetina 30 ppm | T 18        | 0                            | 0      | 61,695  | 61,695  |
| Control positivo Formononetina 50 ppm | T 19        | 0                            | 0      | 61,8    | 61,8    |
| Control negativo                      | T 20        | 0                            | 0      | 14,5825 | 14,5825 |

La Figura 27 muestra el efecto de los metabolitos secundarios sobre la ramificación hifal del hongo *Glomus mosseae* en presencia de plantas micotróficas por un período de 21 días.

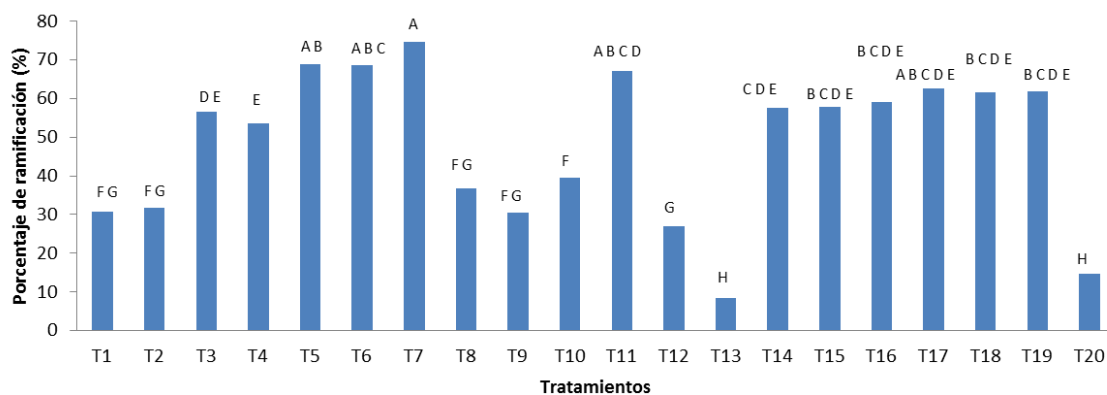


**Figura 237.** Efecto de los metabolitos secundario sobre la ramificación hifal. Los tratamientos T 5, T 7 y T 11 mostraron una mayor ramificación hifal bajo el efecto de metabolitos secundarios a los 15 y 21 días bajo condiciones *in vitro*.

El porcentaje de ramificación del hongo *Glomus mosseae* en presencia de extractos de plantas micotróficas exhibieron un rango de comportamiento amplio, comprendido entre una porcentaje de ramificación de 8,33 hasta un porcentaje de 74,63. Adicionalmente, se encontró que la ramificación de las hifas se realizó en un máximo de quince días.

En la variable de ramificación hifal tanto al día quince como el día veintiuno, T7 se constituyó en el tratamiento de mejor promedio. Sin embargo, no superó significativamente a los tratamientos T5, T6, T11, y T17 (Figura 28). Esto sugiere un efecto entre el tiempo de desarrollo propio del hongo (ciclo de vida) y el estímulo externo del medio donde se encuentran las hifas. En el caso de los controles positivos donde se probaron diferentes concentraciones se encontró un efecto homogéneo entre la Quercetina y la Formononetina. En el caso de la Quercetina las concentraciones crecientes del metabolito mostraron una tendencia creciente en el porcentaje de ramificación de un 57,50 % a un 59.16%. En cambio, en las concentraciones crecientes del flavonoide Formononetina el comportamiento de porcentaje de ramificación disminuyó de un 63,68 % a un

61,69% conforme se aumentó la concentración del principio activo (10, 30, 50 ppm).



**Figura 28.** Ramificación hifal de *Glomus mosseae* (%), al día veintiuno a partir de la siembra, en función de la aplicación de metabolitos secundarios. Las barras representan el error estándar. Las columnas con las letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p \leq 0.05$ ).

Ponce y colaboradores (2009) encontraron algunas variaciones respecto a la presencia de metabolitos secundarios en todo el proceso de colonización micorrizal. En la precolonización encontraron altos niveles de coumestrol, medicarpina, ononin y diadzeína. En la etapa de adhesión al sistema radical encontraron la presencia de coumestrol, el cual también fue detectado en la etapa de colonización intrarradical, fase en la que también se identificó medicarpina y ácido salicílico [15, 51]. Esto podría significar que diferentes flavonoides podrían estar involucrados en las diferentes etapas de la señalización micorrizal. Mientras que el coumestrol parece desempeñar un papel en todas las etapas de la colonización. Probablemente, medicarpina juega un papel en el inicio de la colonización y en una etapa posterior. Los metabolitos ononin y diadzeína parecen jugar un rol al principio de colonización de las raíces [36]. Sin embargo, en el

estudio realizado se encuentra un efecto benéfico por parte de los extractos que contienen Quercetina y Formononetina en las tres etapas de estímulos de los hongos (germinación, elongación, y ramificación). Dicho efecto de estimulación no corresponde a un comportamiento generalizado de los metabolitos secundarios, es el caso de la Licoisoflavona B y la soporaisoflavona A que inhiben tanto el crecimiento del tubo germinal como la ramificación de las hifas inducidas por estrigolactona en *G. margarita*, mientras que otras isoflavonas de *Lupinus* inhiben el crecimiento del tubo germinal pero promueven la ramificación hifal del hongo [7]. En consecuencia, el efecto de los metabolitos secundarios no corresponde a un estímulo de tipo global, sino que considera la fuente de producción, el simbionte objetivo, las concentraciones del principio activo, y el ciclo de vida del simbionte hospedero y/o del simbionte colonizador.

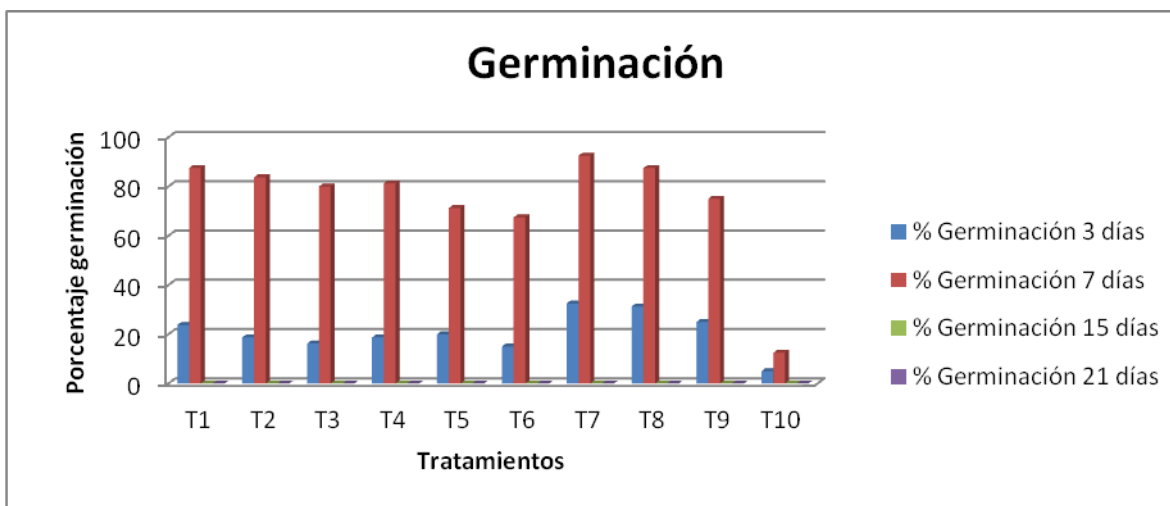
### **3.4.2 Efecto de metabolitos secundarios sobre *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* a partir de plantas no micorrizadas**

#### **3.4.2.1 Germinación**

Los resultados obtenidos en la medición de la germinación de esporas de *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* (%), a los días tres, siete, quince, y veintiuno a partir de la siembra, en función de la aplicación individual y en mezcla de metabolitos secundarios se presentan compilados en la Tabla 11 y Figura 29.

**Tabla 11.** Porcentaje de germinación de los hongos *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* en presencia de extractos de Trébol blanco.

| Origen de la muestra                                   | Tratamiento | Promedio de Germinación (%) |       |      |      |
|--|-------------|-----------------------------|-------|------|------|
|  |             | 3                           | 7     | 15   | 21   |
|  |             | días                        | días  | días | días |
| Extracto A Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/LMSS             | T 1         | 23,75                       | 87,5  | 0    | 0    |
| Extracto A Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/LINR             | T 2         | 18,75                       | 83,75 | 0    | 0    |
| Extracto A Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/LMSS + LINR      | T 3         | 16,25                       | 80    | 0    | 0    |
| Extracto B Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/LMSS             | T 4         | 18,75                       | 81,25 | 0    | 0    |
| Extracto B Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/ LINR            | T 5         | 20                          | 71,25 | 0    | 0    |
| Extracto B Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/LMSS + LINR      | T 6         | 15                          | 67,5  | 0    | 0    |
| Extractos A + B Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/LMSS        | T 7         | 32,5                        | 92,5  | 0    | 0    |
| Extractos A + B Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/LINR        | T 8         | 31,25                       | 87,5  | 0    | 0    |
| Extractos A + B Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/LMSS + LINR | T 9         | 25                          | 75    | 0    | 0    |
| Control negativo                                       | T 10        | 5                           | 12,5  | 0    | 0    |

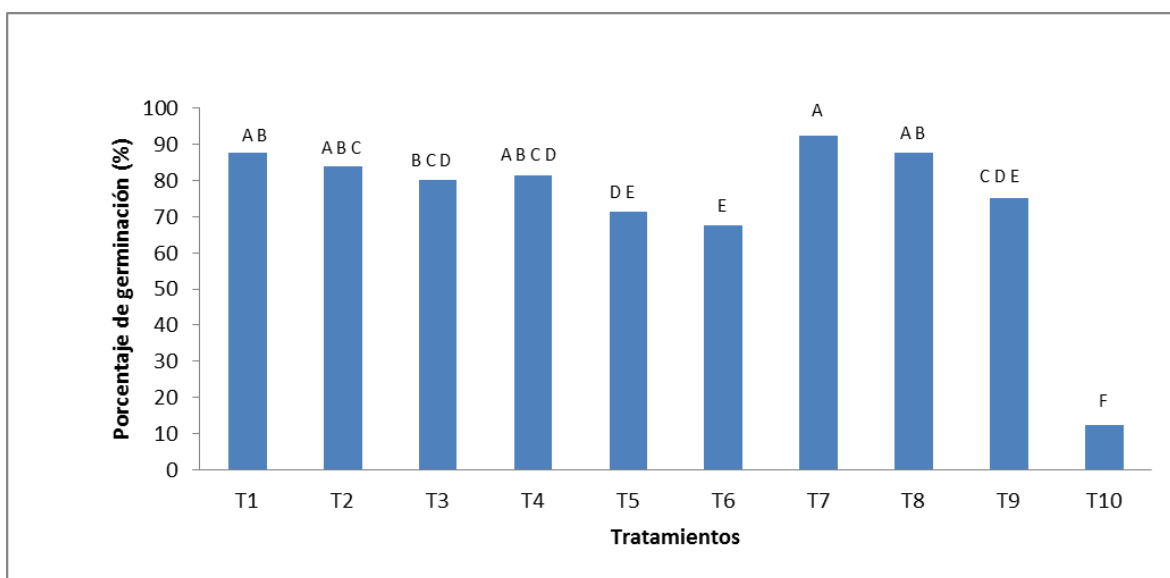


**Figura 249.** Germinación de los hongos *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* en presencia de extractos de Trébol blanco. Los tratamientos a partir de extractos de trébol blanco sobre la germinación de esporas presentaron un comportamiento homogéneo.

Los resultados obtenidos bajo condiciones *in vitro* con esporas puras y combinadas de *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* (LMSS 009 I – INVAM y LINR 008 I – INVAM) puestas en contacto con los mejores tratamientos previamente evaluados y definidos: dos extractos correspondientes a la extracción de raíces de Trébol blanco sin inoculación micorrizal (en el ensayo anterior correspondieron a los tratamientos T 6 y T 7); estos exhibieron un rango de comportamiento homogéneo, comprendido entre una germinación del 67,5% hasta 92,5 %. Este rango estrecho evidenció que aunque se cambiaron las condiciones de inoculación micorrizal, ya que se evaluaron dos hongos de manera independiente y en mezcla, los resultados en cuanto a porcentaje de germinación no tuvieron un cambio representativo respecto al efecto de los extractos probados previamente, todos los tratamientos estuvieron por encima del 60% de germinación, tasa de germinación encontrada en el ensayo realizado con los trece metabolitos inicialmente seleccionados. En la variable de germinación, T7 se constituyó en el tratamiento de mejor promedio. Sin embargo, no superó



significativamente a los tratamientos T1, T2, T4, y T8 (Figura 30). Lo anterior puede indicar que en términos de germinación la mezcla de metabolitos, rangos de días, y combinación de especies de HMA no se evidencia diferencias representativas. En consecuencia, la utilización de extractos vegetales que contengan los flavonoides Quercetina y Formononetina pueden estimular la emisión del tubo germinal en esporas de *Glomus* spp.



**Figura 30.** Germinación de esporas de *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* (%), al día siete a partir de la siembra, en función de la aplicación individual y en mezcla de metabolitos secundarios. Las barras representan el error estándar. Las columnas con las letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p \leq 0.05$ ).

No obstante, Scervino *et al.* (2005) describieron que en su investigación la quercetina aumentó la germinación de las esporas de *G. rosea* y *G. margarita* en presencia de las dosis de 2 y 8  $\mu\text{M}$ , mientras que este flavonoide no afectó la germinación de las esporas de *G. mosseae* y *G. intraradices* en ninguna de las dosis probadas. La acetina y rhamnina no mostraron ningún efecto sobre el porcentaje de germinación de las esporas [22]. Tsai y Phillips (1991) hallaron que

algunos, pero no todos, los flavonoides liberados por las semillas de alfalfa y las raíces aumentó significativamente la germinación de esporas de *G. etunicatum* y *G. macrocarpum* después de 21 días. Entre los flavonoides de semillas, la quercetina aglicona y quercetina-3-O-galactósido causaron la promoción máxima de germinación en ambas especies. Los dos flavonoides en exudados de las raíces, 4',7-dihydroxiflavona y liquiritigenin, también aumentaron la germinación de esporas en *G. etunicatum*, pero no tuvieron ningún efecto significativo sobre la germinación de *G. macrocarpum*. Uno de flavonoides exudado por las raíces estresadas alfalfa, formononetina, en la germinación de esporas, inhibió ambas especies fúngicas [10].

Por otra parte, el análisis de los porcentajes de germinación, realizados por Fernández *et al.* (2005) en tratamientos de Agar Agua con Cloramina T y antibiótico (Cefalexina) como agentes desinfectantes, independientemente de los tiempos empleados y de los medios en los que se incubaron las esporas, siempre indicó el mejor comportamiento de esta variable en relación con los controles sin desinfectar. En cuanto a los tratamientos que solo contaron con la aplicación del antibiótico, aunque su comportamiento fue superior a los controles, no superaron el mejor tratamiento de desinfección en cualquiera de los dos medios estudiados por Fernández *et al.* [81]. Es importante mencionar que algunos microorganismos del suelo producen sustancias que estimulan la germinación de esporas de los HMA. Se ha postulado que además de los sustratos de origen vegetal, los microorganismos rizosféricos también están implicados en la estimulación del micelio [19, 21]. Así, la germinación de esporas *G. versiforme* y *G. mosseae* es estimulada por bacterias asociadas a raíces y esporas [45]. Lo anterior, implica una reflexión desde el punto de vista del concepto de ecología microbiana y las condiciones de asepsia, ya que el rol de otras comunidades e incluso de diversidad de géneros de hongos micorrizales pueden potencializar las señales de comunicación entre los simbioses. Por tanto, si bien en el ensayo se consideró conservar las superficies de las esporas desinfectadas para no introducir

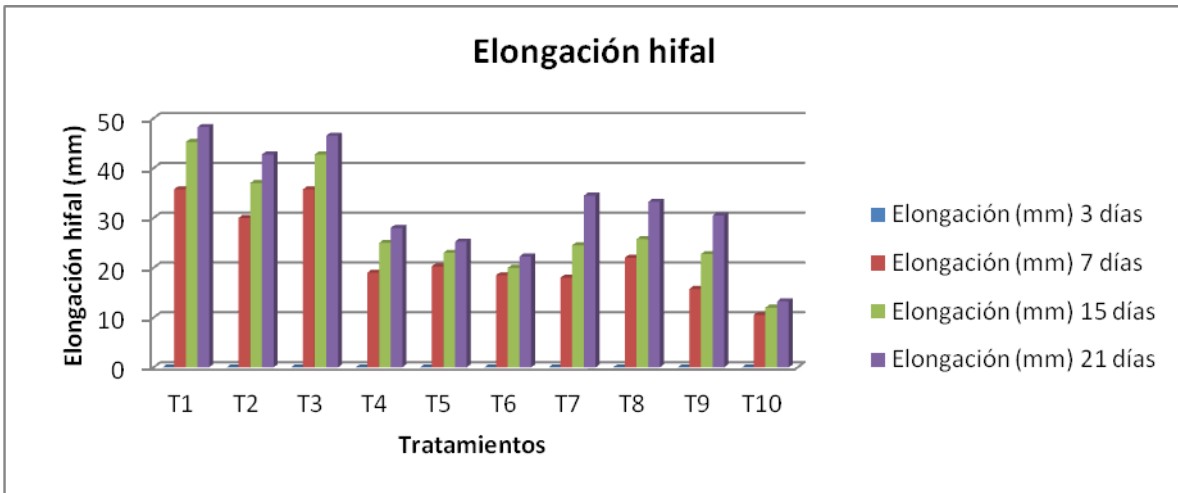
variabilidad experimental, es posible que algunos grupos microbianos asociados a la pared de la espora actúen como promotores del desarrollo de los HMA [27, 110].

### 3.4.2.2 Elongación

Los resultados obtenidos en la medición de la elongación de las hifas de *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* (%), a los días tres, siete, quince, y veintiuno a partir de la siembra, en función de la aplicación individual y en mezcla de metabolitos secundarios se presentan compilados en la Tabla 12 y Figura 31.

**Tabla 12.** Elongación de los hongos *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* en presencia de extractos de Trébol blanco.

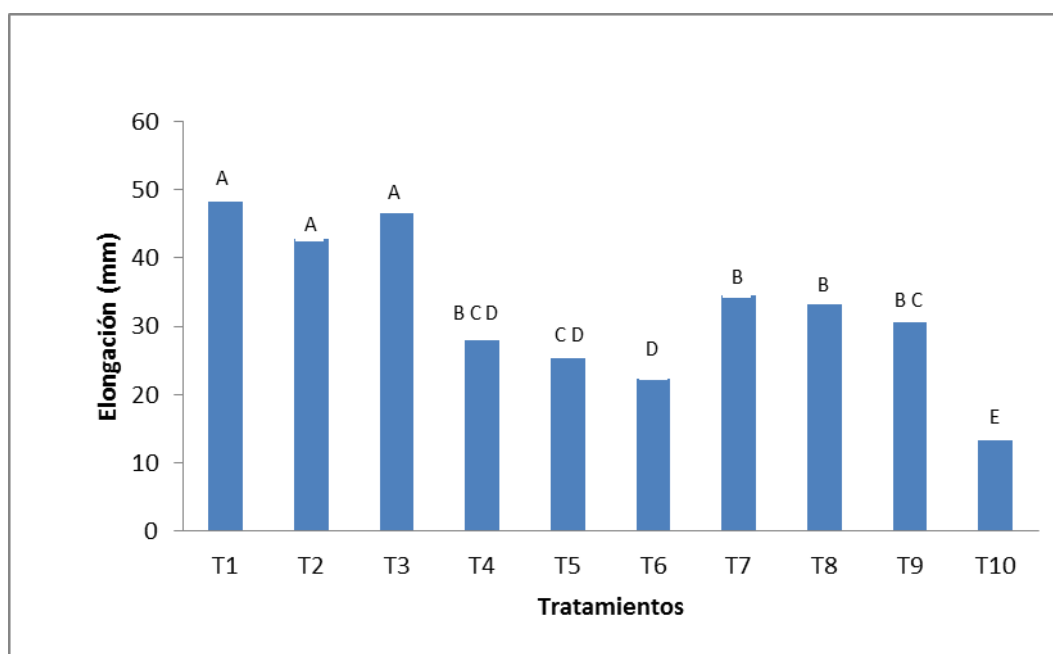
| Origen de la muestra                                   | Tratamiento | Promedio de Elongación (mm) |        |         |         |
|--|-------------|-----------------------------|--------|---------|---------|
|  |             | 3 días                      | 7 días | 15 días | 21 días |
| Extracto A Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/LMSS             | T 1         | 0                           | 35,75  | 45,25   | 48,25   |
| Extracto A Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/LINR             | T 2         | 0                           | 30     | 37      | 42,75   |
| Extracto A Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/LMSS + LINR      | T 3         | 0                           | 35,75  | 42,75   | 46,5    |
| Extracto B Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/LMSS             | T 4         | 0                           | 19     | 25      | 28      |
| Extracto B Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/ LINR            | T 5         | 0                           | 20,25  | 23      | 25,25   |
| Extracto B Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/LMSS + LINR      | T 6         | 0                           | 18,5   | 20      | 22,25   |
| Extractos A + B Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/LMSS        | T 7         | 0                           | 18     | 24,5    | 34,5    |
| Extractos A + B Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/LINR        | T 8         | 0                           | 22     | 25,75   | 33,25   |
| Extractos A + B Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/LMSS + LINR | T 9         | 0                           | 15,75  | 22,75   | 30,5    |
| Control negativo                                       | T 10        | 0                           | 10,5   | 12      | 13,25   |



**Figura 31.** Elongación de los hongos *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* en presencia de extractos de Trébol blanco. En los tratamientos T 1, T 2 y T 3 se evidenció una mayor longitud hifal (mm) de las esporas en presencia de extractos de Trébol blanco a los 21 días bajo condiciones *in vitro*.

En la elongación de los hongos *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* en presencia de extractos de Trébol blanco se encontró un rango de longitud hifal entre 13,25 mm a 48,25 mm. El máximo desarrollo de las hifas se dio en todos los casos en el día 21, dicho crecimiento se evidenció desde el día siete a partir de la inoculación. Los tratamientos T 1, T 2 y T 3 correspondientes al extracto de Trébol blanco (A) con una concentración de 7,337 ppm de Quercetina y 2,054 ppm de Formononetina combinados respectivamente con *Glomus mosseae*, *Glomus intraradices*, y la mezcla de ambos hongos exhibieron una mayor tasa de crecimiento hifal en un rango de 42,75 mm a un 48,25 mm, respecto al resto de tratamientos. En consecuencia, en la variable elongación hifal los tratamientos T1, T2, y T3 superaron significativamente a los demás tratamientos, siendo el tratamiento de mejor promedio T1 (Figura 32). En cambio, en otros estudios se ha observado que la longitud de las hifas de *G. rosea* y *G. margarita* se incrementó con la dosis de 2  $\mu$ M de quercetina, pero este flavonoide no afectó la longitud de las hifas de *G. mosseae* y *G. intraradices*, es posible que los extractos evaluados

presentaran un comportamiento diferente según el hongo evaluado, sin embargo los rangos encontrados de crecimiento hifal entre los tratamientos de un mismo extracto no variaron considerablemente. Esto se evidencia en dos grupos de tratamientos conformados según el extracto A y B obtenido de raíces de Trébol blanco sin micorrización, el primer grupo correspondió a T 1, T 2, y T 3 (extracto A) y el segundo a T 4, T 5, y T 6 (extracto B). Al observar la tendencia de estos dos grupos y teniendo presente que fueron inoculados con diferentes hongos, se evidencia un rango de elongación hifal similar para cada grupo. En el caso de la diferencia entre T 1 y T 4, donde en T 1 se inoculó *Glomus mosseae* y se obtuvo una elongación hifal de 48,25 mm y en T 4 se se inoculó *Glomus mosseae* y se obtuvo una elongación hifal de 28,00 mm se puede percibir que el efecto no se debe al tipo de hongo inoculado sino al tipo de extracto [22, 61].



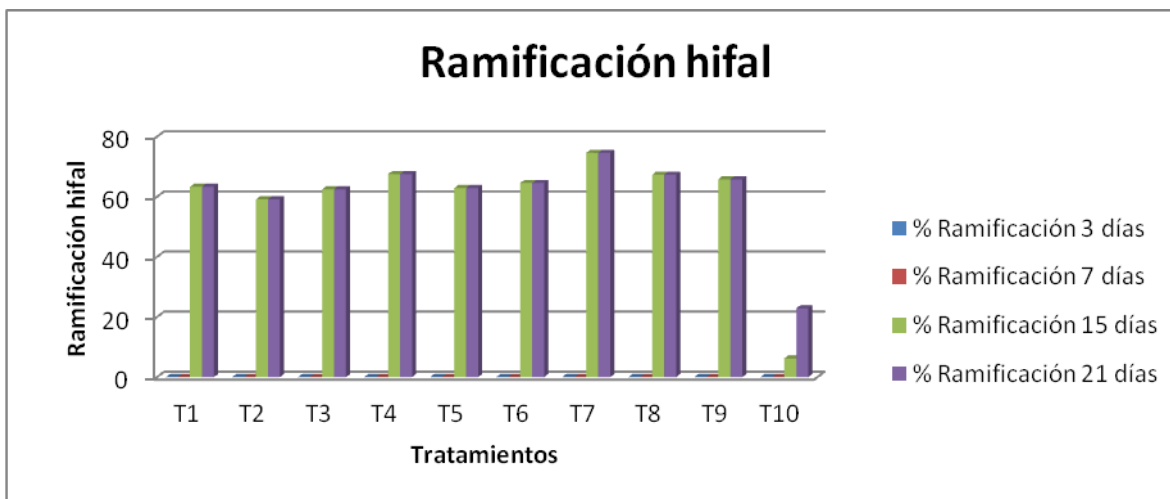
**Figura 32.** Elongación hifal de *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* (mm), al día veintiuno a partir de la siembra, en función de la aplicación individual y en mezcla de metabolitos secundarios. Las barras representan el error estándar. Las columnas con las letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.4.2.3 Ramificación

Los resultados obtenidos en la medición del porcentaje de ramificación de las hifas de *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices*, a los días tres, siete, quince, y veintiuno a partir de la siembra, en función de la aplicación individual y en mezcla de metabolitos secundarios se presentan compilados en la Tabla 13 y Figura 33.

**Tabla 13.** Porcentaje ramificación de los hongos *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* en presencia de extractos de Trébol blanco.

| Origen de la muestra                                   | Tratamiento | Promedio de Ramificación (%) |        |         |         |
|--|-------------|------------------------------|--------|---------|---------|
|  |             | 3 días                       | 7 días | 15 días | 21 días |
| Extracto A Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/LMSS             | T 1         | 0                            | 0      | 63,330  | 63,330  |
| Extracto A Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/LINR             | T 2         | 0                            | 0      | 59,165  | 59,165  |
| Extracto A Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/LMSS + LINR      | T 3         | 0                            | 0      | 62,500  | 62,500  |
| Extracto B Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/LMSS             | T 4         | 0                            | 0      | 67,567  | 67,567  |
| Extracto B Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/ LINR            | T 5         | 0                            | 0      | 62,915  | 62,915  |
| Extracto B Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/LMSS + LINR      | T 6         | 0                            | 0      | 64,580  | 64,580  |
| Extractos A + B Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/LMSS        | T 7         | 0                            | 0      | 74,630  | 74,6350 |
| Extractos A + B Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/LINR        | T 8         | 0                            | 0      | 67,375  | 67,375  |
| Extractos A + B Trébol blanco/Raíz/Sin HFM/LMSS + LINR | T 9         | 0                            | 0      | 65, 30  | 65,830  |
| Control negativo                                       | T 10        | 0                            | 0      | 6,250   | 22,915  |

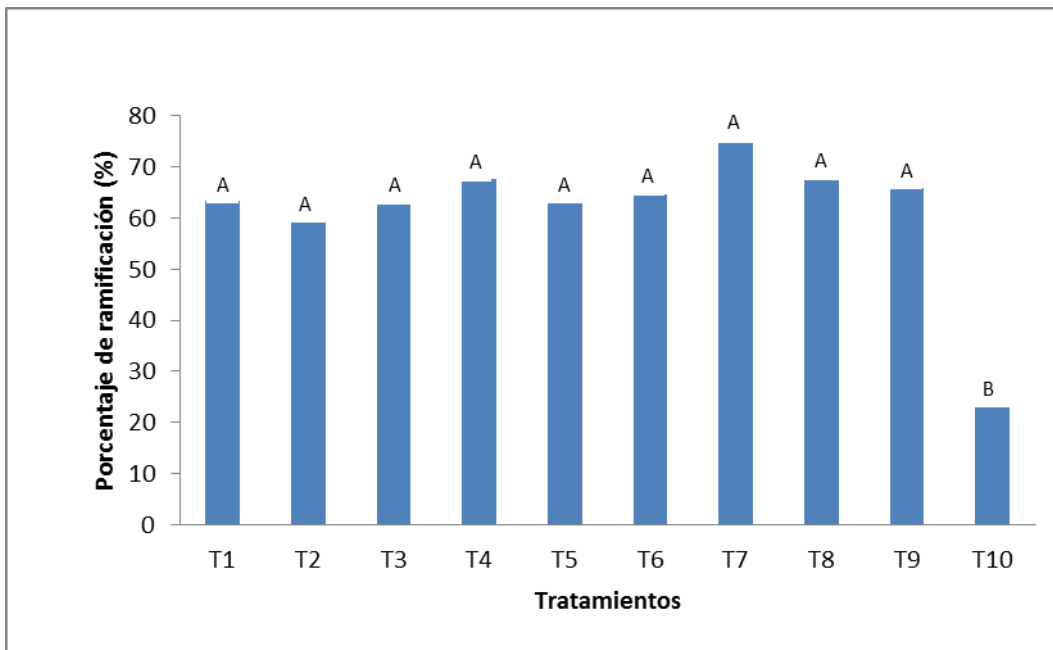


**Figura 33.** Ramificación de los hongos *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* en presencia de extractos de Trébol blanco. Los tratamientos mostraron una ramificación hifal similar bajo el efecto de extractos de Trébol blanco a los 15 y 21 días bajo condiciones *in vitro*.

Los resultados obtenidos bajo condiciones *in vitro* con esporas puras y combinadas de *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* (LMSS 009 I – INVAM y LINR 008 I – INVAM) puestas en contacto con los mejores tratamientos previamente evaluados y definidos: dos extractos correspondientes a la extracción de raíces de Trébol blanco sin inoculación micorrizal (en el ensayo anterior correspondieron a los tratamientos T 6 y T 7); estos exhibieron un rango de comportamiento homogéneo, comprendido entre una ramificación del 59,165% hasta 74,63 %, sin contar el tratamiento testigo. Este rango estrecho evidenció que aunque se cambiaron las condiciones de inoculación micorrizal, ya que se evaluaron dos hongos de manera independiente y en mezcla, los resultados en cuanto a porcentaje de germinación no tuvieron un cambio representativo respecto al efecto de los extractos probados previamente, todos los tratamientos estuvieron por encima del 59 % de ramificación. En la variable ramificación hifal todos los tratamientos superan significativamente al control negativo (T10). Sin embargo, entre los tratamientos correspondientes a la aplicación individual y en mezcla de

metabolitos secundarios no se encontraron diferencias significativas. No obstante T7 fue el tratamiento de mejor promedio (Figura 34). Lo anterior puede indicar que en términos de ramificación la mezcla de metabolitos, rangos de días, y combinación de especies de HMA no se evidencia diferencias representativas. En consecuencia, la utilización de extractos vegetales que contengan los flavonoides Quercetina y Formononetina pueden estimular la ramificación de hifas primarias y secundarias de *Glomus* spp. En estudios se ha reconocido el papel que desempeña los flavonoides, así como concentraciones de CO<sub>2</sub>, en el crecimiento micelial de esporas germinadas de *Gi. margarita* [64]. Las flavonas, flavononas e isoflavonas no estimulan el crecimiento micelar de dichas esporas; en contraste, bajo las mismas condiciones, flavonoles como la quercetina promueven hasta 260 mm de crecimiento hifal [64]. Tsai y Phillips (1991) cuando probaron diferentes concentraciones de Quercetina obtuvieron un máximo de germinación de esporas a concentraciones de 1.0 a 2,5 µM después de 21 días. La longitud hifal y el porcentaje de hifas ramificadas se maximizaron con una concentración de Quercetina de 2.5 µM. Algunas hifas individuales alcanzaron una longitud de 7 mm [10].





**Figura 34.** Ramificación hifal de *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* (%), al día veintiuno a partir de la siembra, en función de la aplicación individual y en mezcla de metabolitos secundarios. Las barras representan el error estándar. Las columnas con las letras diferentes son significativamente diferentes entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.4.2.4 Relación de los efectos

La correlación entre los resultados obtenidos respecto a la medición de germinación, elongación, y ramificación de los hongos *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices*, en función de la concentración de metabolitos secundarios tipo Quercetina y Formononetina se presentan compilados en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Relación del efecto de metabolitos secundarios sobre *Glomus mosseae* en términos de germinación, elongación, y ramificación

| Tratamiento                  | Germinación (%) | Elongación (mm) | Ramificación (%) | HPLC             |                     |
|------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|---------------------|
|                              |                 |                 |                  | Quercetina (ppm) | Formononetina (ppm) |
| Cebolla/Áerea/HFM            | 20,00           | 10,25           | 30,83            | 0,000            | 0,000               |
| Cebolla/Áerea/HFM            | 22,50           | 14,50           | 32,5             | 0,000            | 0,000               |
| Trébol rojo/Áerea/HFM        | 55,00           | 12,75           | 56,68            | 0,000            | 18,597              |
| Trébol rojo/Áerea/Sin HFM    | 61,25           | 18,25           | 53,51            | 20,061           | 0,000               |
| Trébol blanco/Raíz/HFM       | 81,25           | 24,50           | 69,24            | 16,561           | 0,000               |
| A Trébol blanco/Raíz/Sin HFM | 87,50           | 38,25           | 68,62            | 7,337            | 2,054               |
| B Trébol blanco/Raíz/Sin HFM | 83,75           | 35,75           | 74,63            | 0,076            | 1,276               |
| Trébol blanco/Raíz/Sin HFM   | 37,50           | 11,25           | 36,75            | 0,000            | 5,438               |
| Lotus/Áerea/HFM              | 28,75           | 17,00           | 30,47            | 0,000            | 0,000               |
| Lotus/Áerea/HFM              | 41,25           | 14,00           | 39,46            | 1,452            | 0,000               |
| Lotus/Áerea/HFM              | 72,50           | 23,50           | 67,13            | 4,642            | 16,959              |
| Lotus/Áerea/Sin HFM          | 46,25           | 15,00           | 26,94            | 1,063            | 0,000               |
| Alfalfa/Áerea/Sin HFM        | 11,25           | 12,25           | 8,33             | 0,000            | 0,000               |

El reconocimiento planta-HMA es un proceso complejo en el que las señales emitidas y percibidas por cada uno de los simbioses, en cada etapa, marcan el

progreso y el éxito en el establecimiento de la simbiosis. Tanto para la planta como para los HMA, el reconocimiento, establecimiento y funcionamiento de la simbiosis es fundamental para su crecimiento y desarrollo. Para la planta, el asociarse con HMA le aporta una serie de ventajas que la llevan a iniciar la comunicación con el hongo. Sin embargo, también se ha indicado que la planta puede regular sus mecanismos de defensa y localizarlos a nivel celular para controlar la colonización y formación de arbusculos de acuerdo con sus necesidades, de tal forma que aparentemente es la planta quien controla la simbiosis [28, 35, 67]. Según, lo evidenciado en los ensayos este control no implica necesariamente altas concentraciones de los metabolitos, sino una coordinada emisión de señales según la etapa de reconocimiento. Por tanto, correlacionando las variables se encuentran mejores resultados a partir de extractos con una mezcla de flavonoides, aun considerando que cada flavonoide tenga una concentración menor, que extractos con un solo flavonoide en concentraciones mayores. En consecuencia, extractos de trébol blanco cultivados sin inoculación micorrizal presentaron mejores efectos en términos de germinación, elongación hifal, y ramificación hifal cuando se detectó la presencia de Quercetina en un rango de 0,076 a 7,337 ppm y Formononetina en un rango de 1,276 a 2,054. Sin embargo, en extractos donde la Quercetina se obtuvo en concentraciones entre un 16,561 ppm a 20,061 ppm los efectos no fueron deletéreos pero sí menores que en extractos con concentraciones menores de Quercetina y en combinación con Formononetina. Adicionalmente, se obtuvo sobre el efecto de los hongos a partir del estímulo de extractos de cebolla y alfalfa una baja respuesta del hongo, lo cual correlaciona con la ausencia de Quercetina y Formononetina en ambos extractos.

Como en otras interacciones, los procesos de respuesta de la planta al HMA están regulados tanto por el tipo de señal emitida, su concentración y combinación. Sin embargo, estos análisis conducen a experimentaciones particulares que aún no engloban completamente los mecanismos de defensa activados bajo la simbiosis,

la alteración de expresión de genes de defensa y el establecimiento de la simbiosis micorrizal [8, 17, 53].

#### 4. CONCLUSIONES

- El tipo y nivel de estimulación de los hongos formadores de micorriza arbuscular, debido a la exposición de concentraciones de flavonoides emitidos por las plantas, sugiere que estos compuestos son importantes en las etapas de desarrollo de estos hongos.
- Las plantas con actividad micotrófica bajo un modelo de inducción en condiciones de estrés hídrico y nutricional, efectivas en la obtención de flavonoides fueron Trébol rojo, Trébol blanco, y Lotus.
- Los flavonoides con mayores efectos sobre los estadios de germinación, elongación y ramificación hifal fueron extraídos como productos de plantas microtróficas sin inoculación micorrizal, propiamente a partir de Trébol blanco.
- El efecto de los metabolitos tipo flavonoide sobre el desarrollo de los hongos formadores de micorrizas varia según la cantidad de moléculas presentes mas no según la concentración de estas. El estímulo de los hongos formadores de micorriza se ve potencializado en presencia de combinaciones de Quercetina y Formononetina, independiente de la concentración de cada una.
- La exposición de los hongos formadores de micorriza ante Quercetina y Formononetina de manera independiente estimula los procesos de germinación, elongación y ramificación hifal. Sin embargo, el efecto independiente de estos flavonoides no es superior al efecto en mezcla de ambos.
- Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que los flavonoides presentes en raíces micorrizadas o no micorrizadas están involucrados en la regulación de diferentes etapas de la simbiosis micorrizal. Es así como los

flavonoides se constituyen en un factor clave, que juega un papel relevante en la estimulación del crecimiento de los hongos formadores de micorriza.

## 5. RECOMENDACIONES

- La simbiosis micorrizal implica un alto grado de coevolución, donde no solamente están involucrados los simbiosiontes, sino también los ecosistemas biogeoquímicos. Por lo tanto, se recomienda valorar la señalización micorrizal teniendo en cuenta factores de tipo físicos, químicos y bióticos. Es decir, realizar evaluaciones bajo condiciones de campo que validen los resultados obtenidos en el sistema *in vitro*.
- Según la evaluación realizada se recomienda ampliar la experimentación con la leguminosa Trébol blanco, y con las moléculas de señalización formononetina y quercetina en términos de mezclas y concentraciones efectivas.
- Los resultados obtenidos se pueden constituir en una base para realizar nuevos proyectos, los cuales se pueden enfocar al desarrollo de un bioestimulante de la simbiosis micorrizal. Dicho desarrollo podría estar dirigido a obtener un producto, a nivel piloto o industrial, que beneficie al sector agroindustrial.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Bogotá (Colombia) *et al.* (2009. Marzo) Departamento Nacional de Planeación. [Online]. [www.dnp.gov.co/PortalWeb/Portals/0/archivos/documentos/.3577.pdf](http://www.dnp.gov.co/PortalWeb/Portals/0/archivos/documentos/.3577.pdf)
- [2] Mermut, A. R. and Eswaran, H. Some major developments in soil science since the mid-1960s. *Geoderma*. vol. 100. no. 3-4. pp. 403-426. Mayo 2001.
- [3] Sierra Escobar, Jorge A., Castro, Dagoberto, and Osorio, Walter. Dependencia Micorrizal de Laurel (*Ocotea Sp.*). *Revista colombiana forestal*. vol.12. pp. 17-24. Diciembre 2009.
- [4] Zapata Hernández, Raúl D. *La química de la acidez del suelo*. Medellín. Colombia: Universidad Nacional de Medellín, 2004.
- [5] Becard, Guillaume, Taylor, Loverine P , Douds, David D , Pfeffer, Philip E , and Doner, Landis W. Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. vol. 8. no. 2. pp. 252-258. Noviembre 1995.
- [6] Rodríguez, Yakelin. Aspectos relacionados con las bases bioquímicas de la simbiosis micorrizica arbuscular. *Cultivos tropicales*. vol. 26. no. 1. pp. 11-19. 2005.
- [7] Amaranthus, Michael P., Nair, Muraleedharan G., Reid, Taylor C., and Steinfeld, David. Improved Rhizopogon Mycorrhizal Colonization and Foliar Nutrient Levels in Ponderosa Pine and Douglas-Fir with Myconate®. *Journal of Sustrainable Forestry*. vol. 20. no. 3. p. 1. 2005.
- [8] Salas, Eduardo. (2009. Mayo) Universidad Nacional Costa Rica. [Online]. [www.una.ac.cr/inis/docs/suelos/Eduardo%20Salas.pdf](http://www.una.ac.cr/inis/docs/suelos/Eduardo%20Salas.pdf)
- [9] Smith, Sally E., Barker, Susan J., and Zhu, Yong-Guan. Fast moves in arbuscular mycorrhizal symbiotic signalling. *Trends in Plant Science*. vol. 11.



- no. 8. pp. 369-371. Agosto 2006.
- [10] Tsai, Siu M. and Phillips, Donald A. Flavonoids Released Naturally from Alfalfa Promote Development of Symbiotic Glomus Spores In Vitro. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 57. no. 5. pp. 1485-1488. Mayo 1991.
- [11] Shirley, Brenda W. Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway. *Trends in Plant Science*. vol. 1. no. 11. pp. 377-382. Noviembre 1996.
- [12] Melgar, Ricardo. (2008. Julio) Fertilizando. [Online]. <http://www.fertilizando.com/articulos/Los%20Fertilizantes%20en%20Hall%20de%20Fama.asp>
- [13] Larose, Geneviève *et al.* Flavonoid levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Plant Physiology*. vol. 159. no. 12. pp. 1329-1339. Junio 2002.
- [14] Sivakumar, M.V.K. Interactions between climate and desertification. *Agricultural and Forest Meteorology*. vol. 142. no. 2-4. pp. 143-155. Febrero 2007.
- [15] Babujia, L.C., Hungria, M., Franchini, J.C., and Brookes, P.C. Microbial biomass and activity at various soil depths in a Brazilian oxisol after two decades of no-tillage and conventional tillage. *Soil Biology and Biochemistry*. vol. 42. no. 12. pp. 2174-2181. Diciembre 2010.
- [16] Podmanicky, L *et al.* Modelling soil quality changes in Europe. An impact assessment of land use change on soil quality in Europe. *Ecological Indicators*. vol. 11. no. 1. pp. 4-15. Enero 2011.
- [17] Palacios, Natalia, Burtin, Daniel, and Leech, Mark. Biología molecular, una herramienta para la bioprospección del metabolismo secundario de plantas en Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*. vol. 6. no. 2. pp. 67-77. Diciembre 2004.

- [18] Corkidi, Lea, Evans, Mike, and Bohn, Jeff. An introduction to propagation of arbuscular mycorrhizal fungi in pot cultures for inoculation of native plant nursery stock. *Native Plants Journal*. vol. 9. no. 1. pp. 29–38. 2008.
- [19] Kahiluoto, Helena, Ketoja, Elise, and Vestberg, Mauritz. Promotion of utilization of arbuscular mycorrhiza through reduced P fertilization 1. Bioassays in a growth chamber. *Plant and Soil*. vol. 227. no. 1-2. pp. 191-206. Julio 2000.
- [20] Stotzky, G. Soil as an environment for microbial life. in *Modern Soil Microbiology*. New York: Marcel Dekker, 1997. ch. 1. pp. 1-10.
- [21] Akiyama, Kohki, Tanigawa, Fumiaki, Kashihara, Takanori, and Hayashi, Hideo. Lupin pyranoisoflavones inhibiting hyphal development in arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytochemistry*. vol. 71. no. 16. pp. 1865-1871. Noviembre 2010.
- [22] Schliemann, Willibald, Ammer, Christian, and Strack, Dieter. Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry*. vol. 69. no. 1. pp. 112-146. Enero 2008.
- [23] Ponce, María A., Scervino, José M. , Erra-Balsells, Rosa, Ocampo, Juan A., and Godeas, Alicia M. Flavonoids from shoots and roots of *Trifolium repens* (white clover) grown in presence or absence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Phytochemistry*. vol. 65. no. 13. pp. 1925-1930. Julio 2004.
- [24] Rillig, Matthias C. Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem processes. *Ecology Letters*. vol. 7. no. 8. pp. 740–754. 2004.
- [25] Group, FNCA Biofertilizer Project. (2006. Marzo) FNCA. [Online]. [www.fnca.mext.go.jp/bf/bfm/pdf/4\\_3\\_Mycorrhiza0403.pdf](http://www.fnca.mext.go.jp/bf/bfm/pdf/4_3_Mycorrhiza0403.pdf)
- [26] ICA, Unidad de Bioinsumos. (2011. Abril) Instituto Colombiano Agropecuario. [Online]. <http://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Fertilizantes-y-Bioinsumos-Agricolas/Listado-de-Bioinsumos/2009/> PRODUCTOS -

BIOINSUMOS-MAYO-13-DE-2008.aspx

- [27] Blilou, Ikram, Bueno, Pablo, Ocampo, Juan A., and García-Garrido, José M. Induction of catalase and ascorbate peroxidase activities in tobacco roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal *Glomus mosseae*. *Mycological Research*. vol. 104. no. 6. pp. 722-725. Junio 2000.
- [28] Elias, Karol S. and Safir, Gene R. Hyphal elongation of *Glomus fasciculatus* in response to root exudates. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 53. no. 8. pp. 1928-1933. Agosto 1987.
- [29] Jaramillo Jaramillo, Daniel Francisco. Los suelos de Colombia. *Introducción a la ciencia del suelo*. Medellin. Colombia, 2002. ch. 24. pp. 573-593.
- [30] Shimada, Norimoto, Akashi, Tomoyoshi, Aoki, Toshio, and Ayabe, Shin-ichi. Induction of isoflavonoid pathway in the model legume *Lotus japonicus*: molecular characterization of enzymes involved in phytoalexin biosynthesis. *Plant Science*. vol. 160. no. 1. pp. 37-47. Diciembre 2000.
- [31] Hause, Bettina, Mrosk, Cornelia, Isayenkov, Stanislav, and Strack, Dieter. Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry*. vol. 68. no. 1. pp. 101-110. Enero 2007.
- [32] FAO. (2011. Junio) Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. [Online]. <ftp://ftp.fao.org/agl/agll/docs/cwfto09s.pdf>
- [33] Anaya Lang, Ana Luisa. *Ecología Química*. México D.F: Plaza y Valdéz S.A. 2003.
- [34] Davies Jr., Fred T., Calderón, Constantino M., Huaman, Zosimo, and Gómez, Rene. Influence of a flavonoid (formononetin) on mycorrhizal activity and potato crop productivity in the highlands of Peru. *Scientia Horticulturae*. vol. 106. no. 3. pp. 318-329. Agosto 2005.
- [35] Becard, G., Douds, D. D. , and Pfeffer, P.E. Extensive In Vitro Hyphal Growth of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Presence of CO<sub>2</sub> and Flavonols. *Applied and environmental microbiology*. vol. 58. no. 3. pp. 821-825.

Marzo 1992.

- [36] Williams, Robert J., Spencer, Jeremy, P. E., and Evans, Catherine Rice. Flavonoids and Isoflavones (Phytoestrogens): Absorption, Metabolism, and Bioactivity. *Free Radical Biology & Medicine*. vol. 36. no. 7. pp. 838-849. Enero 2004.
- [37] Ponce, María A. *et al.* Flavonoids, benzoic acids and cinnamic acids isolated from shoots and roots of Italian rye grass (*Lolium multiflorum* Lam.) with and without endophyte association and arbuscular mycorrhizal fungus. *Biochemical Systematics and Ecology*. vol. 37. pp. 245-253. Marzo 2009.
- [38] Chabout, S., Bel-Rhild, R., Chenevert, R., and Piché, Y. Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO<sub>2</sub> enriched conditions. *New Phytologist*. vol. 122. no. 3. pp. 461-467. Julio 1992.
- [39] Nair, Muraleedharan G., Safir, Gene R., and Siqueira, Jose O. Isolation and Identification of Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza-Stimulatory Compounds from Clover (*Trifolium repens*) Roots. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 57. no. 2. pp. 434-439. Febrero 1991.
- [40] Buee, M., Rossignol, M., Jauneau, A., Ranjeva, R., and Bécard, G. The Pre-Symbiotic Growth of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Is Induced by a Branching Factor Partially Purified from Plant Root Exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. vol. 13. no. 6. pp. 693-698. Marzo 2000.
- [41] Becard, G. and Piché, Y. New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular—arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist*. vol. 112. no. 1. pp. 77-83. Febrero 1989.
- [42] Siqueira, J. O., Safir, G. R., and Nair, M. G. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. *New Phytologist*. vol. 118. no. 1. pp. 87-93. Mayo 1991.
- [43] Schreinert, R. Paul and Koide, Roger T. Stimulation of Vesicular-Arbuscular

- Mycorrhizal Fungi by Mycotrophic and Nonmycotrophic Plant Root Systems. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 59. no. 8. pp. 2750-2752. Agosto 1993.
- [44] Herrera Medina, María José. (2008) Web Universidad de Granada España. [Online]. [digibug.ugr.es/bitstream/10481/1899/1/17493353.pdf](http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/1899/1/17493353.pdf)
- [45] Rodríguez, Yakelín, Fernández, Arais, Solórzano, Ernestina, Peteira, Belkis, and Fernández, Félix. Inducción de enzimas de defensa en dos variedades de arroz (*Oryza sativa*) por el hongo micorrízico arbuscular *G. mosseae*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. vol. 8. no. 2. pp. 35-49. Diciembre 2006.
- [46] Ferrera-Cerrato, Ronald and Alarcón, Alejandro. *Microbiología Agrícola*. México D.F.: Editorial Trillas. 2007.
- [47] Gadkar, Vijay and Adholeya, Alok. Intraradical sporulation of AM *Gigaspora margarita* in long-term axenic cultivation in Ri T-DNA carrot root. *Mycological Research*. vol. 104. no. 6. pp. 716-721. Junio 2000.
- [48] Scervino, Jose M. *et al.* Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth of *Gigaspora* and *Glomus*. *Mycological Research*. vol. 109. no. 7. pp. 789-794. Julio 2005.
- [49] Requena, Natalia, Serrano, Esther, Ocón, Aurora, and Breuninger, Magdalene. Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry*. vol. 68. no. 1. pp. 33-40. Enero 2007.
- [50] Gemma, J. N. and Koske, R. E. Arbuscular Mycorrhizae in Sand Dune Plants of the North Atlantic Coast of the U.S.: Field and Greenhouse Inoculation and Presence of Mycorrhizae in Planting Stock. *Journal of Environmental Management*. vol. 50. no. 3. pp. 251-264. Julio 1997.
- [51] Herrera Medina, María José *et al.* Root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi is affected by the salicylic acid content of the plant. *Plant Science*. vol. 164. no. 6. pp. 993-998. Febrero 2003.

- [52] Osorio Vega, N. W. (26 de Julio de 2011). Señalización entre raíces y hongos micorrizico-arbusculares. (C. Garcia Avila, Entrevistador)
- [53] Khaosaada, Thanasan *et al.* Effect of mycorrhization on the isoflavone content and the phytoestrogen activity of red clover. *Journal of Plant Physiology*. vol. 165. pp. 1161-1167. 2008.
- [54] Sagan, Muriel, Morandib, Dominique, Tarenghib, Elisabeth, and Due, Gkard. Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* (Gaertn.) after  $\gamma$ -ray mutagenesis. *Plant Science*. vol. 111. no. 1. pp. 63-71. Octubre 1995.
- [55] Azcón-Aguilar, C. and Barea, J. M. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Scientia Horticulturae*. vol. 68. no. 1-4. pp. 1-24. Marzo 1997.
- [56] Barea, J. M. *et al.* Ecological and functional roles of mycorrhizas in semi-arid ecosystems of Southeast Spain. *Journal of Arid Environments*. pp. 1-10. Junio 2011.
- [57] Bonfante, Paola and Genre, Andrea. Plants and arbuscular mycorrhizal fungi an: evolutionary-developmental perspective. *Trends in Plant Science*. vol. 13. no. 9. pp. 492-496. Agosto 2008.
- [58] Ramírez Gómez, Margarita and Rodríguez Villate, Alia. Señales de reconocimiento entre plantas y hongos formadores de micorrizas arbusculares. *Corpoica Ciencia Tecnología Agropecuaria*. vol. 11. no. 1. pp. 53-60. Junio 2010.
- [59] Giovannetti, Manuela, Sbrana, Cristina, and Logi, Cable. Early processes involved in host recognition by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. vol. 127. no. 4. pp. 703-709. Agosto 1994.
- [60] Vega, F. (29 de Julio de 2011). Aspectos ingenieriles para la producción de metabolitos secundarios. (C. Garcia Avila, Entrevistador)
- [61] Harrison, Maria J. Molecular and cellular aspects of the arbuscular

- mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. vol. 50. pp. 361-389. 1999.
- [62] Scervino, Jose M. *et al.* Flavonoids exclusively present in mycorrhizal roots of white clover exhibit a different effect on arbuscular mycorrhizal fungi than flavonoids exclusively present in non-mycorrhizal roots of white clover. *Journal of Plant Interactions*. vol. 1. no. 1. pp. 15-22. Marzo 2005.
- [63] Boovaraghan, Balaji, Poulin, Marie Josée, Vierheilig, Horst, and Piché, Yves. Responses of an Arbuscular Micorrhizal Fungus, *Gigaspora margarita*, to exudates and volatiles from the Ri T- DNA-Transformed roots of Nonmicorrhizal and Micorrhizal Mutants of *Pisum sativum* L. Sparkle. *Experimental Mycology*. vol. 19. pp. 275-283. 1995.
- [64] Steinkellner, Siegrid *et al.* Flavonoids and Strigolactones in Root Exudates as Signals in Symbiotic and Pathogenic Plant-Fungus Interactions. *Molecules*. vol. 12. pp. 1290-1306. 2007.
- [65] Carr, G. R. *et al.* Improved hyphal growth of two species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of suspension-cultured plant cells. *New Phytologist*. vol. 101. no. 3. pp. 417-426. Noviembre 1985.
- [66] Dongxue, Li Kinkema, Mark and Gresshoff P. M. Autoregulation of nodulation (AON) in *Pisum sativum* (pea) involves signalling events associated with both nodule primordia development and nitrogen fixation. *Journal of Plant Physiology*. vol. 166. no. 9. pp. 955-967. Junio 2009.
- [67] Pawlowska, Teresa E., Douds, David D., and Charvat, Iris. In vitro propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*. *Mycological Research*. vol. 103. pp. 1549-1556. 1999.
- [68] Cuesta, Ihosvanni, Ferrer, Anairad, and Rengifo, Melina. [www.fao.org](http://www.fao.org). [Online]. <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1064/cuf0112s.pdf>
- [69] Nagahashi, Gerald and Douds, David D. Partial separation of root exudate components and their effects upon the growth of germinated spores of AM

- fungi. *Mycological Research*. vol. 104. no. 12. pp. 1453-1464. Diciembre 2000.
- [70] Eskandari, A. and Danesh, Y. R. Study on life cycle of Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices* using in vitro culturing technique. *Journal of Phytology*. vol. 2. no. 6. pp. 69-75. 2010.
- [71] Fernández, Félix *et al.* Evaluación de inoculantes de Hongos Micorrízicos Arbusculares de *Glomus clarum* y *Glomus Fasciculatum* en medio líquido (Licomic). *Agricultura Andina*. vol. 12. pp. 67-83. Enero 2007.
- [72] St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M., and Fortin, J. A. Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an in vitro system in the absence of host roots. *Mycological Research*. vol. 100. no. 3. pp. 328-332. Marzo 1996.
- [73] Abdoulaye, Tahir. In vitro culture of arbuscular mycorrhizal fungi: advances and future prospects. *African Journal of Biotechnology*. vol. 2. no. 12. pp. 692-697. Diciembre 2003.
- [74] Jolicoeur, Mario, Bouchard-Marchand, E., Bécard, G., and Perrier, M. Regulation of mycorrhizal symbiosis: development of a structured nutritional dual model. *Ecological Modelling*. vol. 163. no. 3. pp. 247-267. Mayo 2003.
- [75] Genre, A. and Bonfante, P. Actin versus tubulin configuration in arbuscule-containing cells from mycorrhizal tobacco roots. *New Phytologist*. vol. 140. no. 4. pp. 745-752. Diciembre 1998.
- [76] Khaosaad, T., García-Garrido, J. M., Steinkellner, S., and Vierheilig, H. Take-all disease is systemically reduced in roots of mycorrhizal barley plants. *Soil Biology & Biochemistry*. vol. 39. no. 3. pp. 727-734. Marzo 2007.
- [77] Allen, Michael F. The ecology of arbuscular mycorrhizas: a look back into the 20th century and a peek into the 21st. *Mycological Research*. vol. 100. no. 7. pp. 769-782. Julio 1996.
- [78] Rillig, Matthias C. and Allen, Michael F. Arbuscular Mycorrhizae of *Gutierrezia*



- sarothrae and elevated carbon dioxide: evidence for shifts in C allocation to and within the mycobiont. *Soil Biology & Biochemistry*. vol. 30. no. 14. pp. 2001-2008. Abril 1998.
- [79] Quilambo, Orlando António. The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *African Journal of Biotechnology*. vol. 2. no. 12. pp. 539-546. Diciembre 2003.
- [80] Berta, G. *et al.* Arbuscular mycorrhizal induced changes to plant growth and root system morphology in *Prunus cerasifera*. *Tree Physiology*. vol. 15. no. 5. pp. 281-293. Mayo 1995.
- [81] Aguilera Gómez, Luis I., Olalde Portugal, Víctor, Rubí Arriaga, M., and Contreras Alonso, Rogelio. Micorrizas Arbusculares. *Ciencia Ergo Sum*. vol. 14. no. 3. pp. 300-306. Febrero 2007.
- [82] Vega M., Alexis, Mu, and oz S., Carlos. Presencia de Micorrizas en Ericaceas Chile. *Agricultura Técnica*. vol. 54. no. 3. pp. 332-339. Julio 1994.
- [83] Sanchez de Prager, Marina. *Endomicorrizas en agroecosistemas colombianos*. Cali. Colombia: Universidad Nacional. 1999.
- [84] Antunes, Pedro M., De Varennes, Amarilis, Rajcan, Istvan, and Goss, Michael J. Accumulation of specific flavonoids in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) as a function of the early tripartite symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Jordan. *Soil Biology & Biochemistry*. vol. 38. pp. 1234-1242. Junio 2006.
- [85] Scervino, Jose M. *et al.* Arbuscular mycorrhizal colonization of tomato by *Gigaspora* and *Glomus* species in the presence of root flavonoids. *Journal of Plant Physiology*. vol. 162. no. 6. pp. 625-633. Junio 2005.
- [86] Harrison, Maria J. Development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant-microbe interactions*. vol. 1. no. 4. pp. 360-365. Agosto 1998.
- [87] Abdel Latefa, A.A. H. and Chaoxingb, He. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. *Scientia Horticulturae*. vol. 127. no. 3.

- pp. 228-233. Enero 2011.
- [88] Neil P.J. Price. Carbohydrate determinants of *Rhizobium*–legume symbioses. *Carbohydrate Research*. vol. 317. no. 1- 4. pp. 1-9. Abril 1999.
- [89] Gough, Clare. Rhizobium Symbiosis: Insight into Nod Factor Receptors. *Current Biology*. vol. 13. no. 24. pp. R973-R975. Diciembre 2003.
- [90] Feddermann, Nadja, Finlay, Roger, Boller, Thomas, and Elfstrand, Malin. Functional diversity in arbuscular mycorrhiza – the role of gene expression, phosphorous nutrition and symbiotic efficiency. *Fungal Ecology*. vol. 3. no. 1. pp. 1-8. 2010.
- [91] Hoffmann, Dana *et al.* Nodulation deficiency caused by fast neutronmutagenesis of the model legume *Lotus japonicus*. *Journal of Plant Physiology*. vol. 164. no. 5. pp. 460-469. Abril 2007.
- [92] Antunes, Pedro M., Rajcan, Istvan, and Goss, Michael J. Specific flavonoids as interconnecting signals in the tripartite symbiosis formed by arbuscular mycorrhizal fungi, *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Jordan and soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Soil Biology & Biochemistry*. vol. 38. no. 3. pp. 533-543. Marzo 2006.
- [93] Shirliffe, Steven J. and Vessey, J. Kevin. A nodulation (Nod<sup>-</sup>/Fix<sup>-</sup>) mutant of *Phaseolus vulgaris* L. has nodule-like structures lacking peripheral vascular bundles (Pvb<sup>-</sup>) and is resistant to mycorrhizal infection (Myc<sup>-</sup>). *Plant Science*. vol. 118. no. 2. pp. 209-220. Agosto 1996.
- [94] Küster, Helge *et al.* Construction and validation of cDNA-based Mt6k-RIT macro- and microarrays to explore root endosymbioses in the model legume *Medicago truncatula*. *Journal of Biotechnology*. vol. 108. no. 2. pp. 95-113. Marzo 2004.
- [95] Subramanian, Senthil, Stacey, Gary, and Yu, Oliver. Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in Plant Science*. vol. 12. no. 7. pp. 282-285. Julio 2007.

- [96] Morales Vela, G., Molinero-Rosales, N., Ocampo, J. A., and García Garrido, J. M.. Endocellulase activity is associated with arbuscular mycorrhizal spread in pea symbiotic mutants but not with its ethylene content in root. *Soil Biology & Biochemistry*. vol. 39. no. 3. pp. 786-792. Marzo 2007.
- [97] Franken, Philipp *et al.* Gene expression analysis of arbuscule development and functioning. *Phytochemistry*. vol. 68. no. 1. pp. 68-74. Junio 2007.
- [98] Parniske, Martin. Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*. vol. 7. no. 4. pp. 414-421. Agosto 2004.
- [99] Havsteen, Bent H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*. vol. 96. no. 2-3. pp. 67-202. Noviembre 2002.
- [100] Limpens, Erik and Bisseling, Ton. Signaling in symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*. vol. 6. no. 4. pp. 343-350. Agosto 2003.
- [101] Sieverding, Ewald. *Manual de metodos para la investigación de la Micorriza Vesículo - Arbuscular en el laboratorio*. Palmira. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. 1983.
- [102] J. André Fortin, Guillaume Bécard, Stéphane Declerck, Yolande Dalpé, Marc St-Arnaud, Andrew P. Coughlan, and Yves Piché. Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Canadian Journal of Botany*. vol. 80. no. 1. pp. 1–20. Enero 2002.
- [103] Urley Adrian Pérez M., María Margarita Ramírez G., Lina Margarita Moreno C., Marcela Franco C. Metodología para la desinfección y germinación de esporas y fragmentos de raíces micorrizadas con *Glomus* sp. (GEV02) para su uso bajo condiciones *in vitro*. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. vol. 12. no. 2. pp. 143-150. Octubre 2011.
- [104] Kalyanne Fernández, F. Fernández, R. Rivera y V. Olalde. Metodología para la germinación de esporas de *Glomus mosseae*. *Cultivos Tropicales*. Vol. 26. no. 2. pp. 11-16. 2005.

- [105] Philips, J. M. y Hayman, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British mycological Society*, vol. 55. pp. 158–161.1970.
- [106] Fátima Moreira E. Jeroen Huising David Bignell. Manual de biología de suelos tropicales. Muestreo y caracterización de la biodeversidad bajo suelo. N° de edición, 1. cap.7. 2011.
- [107] Horst Vierheilig, Andrew P. Coughlan, Urs Wyss, And Yves Piche. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and environmental microbiology*. vol. 64. no. 12. pp. 5004-5007. Diciembre 1998.
- [108] Octavio González y Walter Osorio. Determinación de la dependencia micorrizal del lulo. *Acta biol. Colomb.* vol. 13. no. 2. pp. 163 - 174. Junio 2008.
- [109] Habte M. and Manjunath A. Categories of vesicular-arbuscular mycorrhizal dependency of host especies. *Mycorrhiza*. vol. 1.pp. 3-12. 1991.
- [110] Jairo Ricardo Barreto Reyes. (2004. Mayo) Norma Técnica Colombiana 5167. [Online]. [http://www.tecnicana.orgpdf2006tec\\_v10\\_no17\\_2006\\_p31-38.pdf](http://www.tecnicana.orgpdf2006tec_v10_no17_2006_p31-38.pdf).
- [111] Murphy J, Riley Jp. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta*. vol. 27. pp. 31-35.1962.
- [112] Toso, R. E. y Skliar, M. I. Aislamiento, identificación y cuantificación de compuestos con actividad Gastro protectora presentes en *Centaurea solstitialis*. *Ciencia Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias*. pp. 17-27. 2002.
- [113] De oliveira Costa A. C. (2012. Junio). Caracterização e quantificação de marcadores químicos do extrato hidroetanólico das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess. [Online]. <http://repositorio.ufrn.br:8080/jspui/handle/1/9535>.

- [114] Bermejo, P., M.A E. Carretero & T. Ortega. Isoflavones in *Echinopartum barnadesii* (Graells) Rothm. I. Preliminary study. *Anales Jard. Bot. Madrid*. vol. 43. no. 1. pp 113-119. 1986.
- [115] Meena M.C. and Patni V. Isolation and identification of flavonoid "quercetin" from *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad. *Asian J. Exp. Sci*, vol. 22. no. 1. pp. 137-142. 2008
- [116] Gordana S. Četković, Sonja M. Dilas, Jasna M. Čanadanović-Brunet and Vesna T. Tumbas. Thin-layer chromatography analysis and scavenging activity of marigold (*Calendula officinalis* L.) extracts. *Acta Periodica Technologica*. vol. pp. 93–102. 2003
- [117] Ashok Kumar B.S. *et al.* Estimation of gallic acid, rutin and quercetin in *Terminalia chebula* by HPTLC. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 3. no. 1. pp. 63-68. Mayo 2010.
- [118] Enrique Aguilar F. y Pablo Bonilla R. Actividad antioxidante e inmunológica de flavonoides aislados de hojas de *Smallanthus sonchifolius* (YACÓN). *Ciencia e Investigación*. vol. 12. no. 1. pp. 15-23. 2009.
- [119] Moreno-Romero C. A. y Plazas-Bonilla C. E. Validación de una metodología analítica para la cuantificación por HPLC de quercitina en una matriz vegetal. *Rev. Col. Cienc. Quim. Farm.* vol 34. no. 1. pp.58-68. 2005
- [120] Ajit Varma. Mycorrhiza. State Of The Art, Genetics And Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology , Eco-Physiology, Structure And Systematics. Editions 3. India: Editorial Springer -Verlag. 2008.
- [121] Stéphane Declerck, Désiré- Georges Strullu and J.-André Fortin. In vitro Culture of Mycorrhizas. Vol. 1. Editorial Springer -Verlag.2005
- [122] Liu HP, Shi XF, Zhang YC, Li ZX, Zhang L, Wang ZY. Quantitative analysis of quercetin in *Euphorbia helioscopia* L by RP-HPLC. *Cell Biochem Biophys*. Sep;61(1):59-64, 2011

- [123] Nurgiin Ku-Cükboyaci, Onur Kadioğlu, Nezaket Adigüzel, Uğur Tamer, Ayşegiil Güvenç, B ans Bani. Determination of isoflavone content by HPLC-UV method and in vitro antioxidant activity of Red clover (*Trifolium pratense* L.). *Turk Journal Pharmaceutical Science* 10(3), 463-472, 2013
- [124] Córdoba Betancourt, María de los Ángeles. (2010) Instituto Politécnico Nacional. [Online].[http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56\\_1UAQGarciaNava.pdf](http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava.pdf).
- [125] Luis H. Franco Q., David Calero Q. y Carlos V. Durán C. Evaluación de tecnologías por métodos participativos para la implementación de sistemas ganaderos sostenibles en el norte del departamento del Valle del Cauca. *Manual de establecimiento de pasturas*. 2007.
- [126] Fox R, Kamprath E. Phosphate sorption isotherms for evaluating the phosphate requirements of soils. *Soil Sci Soc Am Proc.* vol. 34. nº 902-907. 1970.