

INTERACCIÓN PLANTA-HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

PLANT-ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI INTERACTIONS

Gabriel Camarena-Gutiérrez

Unidad de Morfología y Función, FES Iztacala, UNAM. Av. de los Ejidos Núm. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, MÉXICO.
C. P. 547090.

Correo-e: datura@servidor.unam.mx

RESUMEN

La simbiosis de la micorriza arbuscular está formada por las raíces de más del 80 % de las especies de plantas terrestres y los hongos Zigomicetes del Orden Glomales. Los efectos benéficos de esta simbiosis suceden como resultado de un diálogo molecular complejo entre los socios simbióticos. La identificación de las moléculas involucradas en este proceso es un prerrequisito para una mayor comprensión de la simbiosis. Hay evidencia de los eventos de señalización-reconocimiento en diferentes estados de las interacciones planta-hongo en la micorriza arbuscular, pero no se conoce la naturaleza de las moléculas señal y los procesos de percepción-transducción. Para conocer el potencial de la micorriza arbuscular en la agricultura sustentable, es preciso identificar las moléculas principales de la interacción planta-hongo. Existen numerosos métodos disponibles para el análisis molecular de los hongos arbusculares que ayudan a comprender la interacción dinámica entre las plantas y éstos.

Recibido: 13 de diciembre de 2011
Aceptado: 19 de abril de 2012
doi:10.5154/r.rchscfa.2011.11.093
<http://www.chapingo.mx/revistas>

PALABRAS CLAVE:

Micorriza, estrigolactonas, aparato de pre-penetración

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal symbiosis is formed between the roots of over 80 % of all terrestrial plant species and Zygomycete fungi of the order Glomales. The beneficial effects of this symbiosis occur as a result of a complex molecular dialogue between the two symbiotic partners. Identifying the molecules involved in this dialogue is a prerequisite for a better understanding of the symbiosis. Although there is evidence for an interplay of signaling-recognition events at different stages during plant-fungal interactions in arbuscular mycorrhiza, the nature of signaling molecules and signal perception/transduction processes are still not known. To unlock the potential of arbuscular mycorrhiza for sustainable agriculture, we must identify the key molecular players. A number of methods are available for those researchers considering the addition of molecular analyses of arbuscular fungi to their research projects and weighing the various approaches they might take. Increasingly powerful molecular methods for analyzing arbuscular communities make this area of research available to a much wider range of researchers.

KEYWORDS: Mycorrhiza, strigolactones, pre-penetration apparatus

INTRODUCCIÓN

Las plantas han desarrollado numerosas estrategias desde que colonizaron los ecosistemas terrestres, para hacer frente a los diversos retos bióticos y abióticos. Una de las más eficaces es la capacidad de los sistemas de raíces, para establecer relaciones simbióticas mutualistas benéficas con los microorganismos. La micorriza, una forma intrincada de asociación de las raíces con algunos grupos de hongos, es la más frecuente y representa a los órganos de absorción de la mayoría de las plantas en la naturaleza (Gianinazzi-Pearson, 1984). Esta asociación cumple una función muy importante en la explotación eficaz de los recursos minerales del suelo y en la protección de las raíces contra una serie de patógenos. Por ello, las micorizas son fundamentales para la supervivencia de muchos taxones de plantas en diversos ecosistemas, incluyendo muchas especies de cultivo (Bethlenfalvay & Linderman, 1992).

INTRODUCTION

Ever since they first colonized terrestrial ecosystems, plants have developed numerous strategies to address various biotic and abiotic challenges. One of the most effective is the ability of root systems to establish mutualistic symbiotic relationships with microorganisms. The mycorrhiza, an intricate form of association between the roots and some fungal groups, is the most common and represents the absorption organs of most plants in nature (Gianinazzi-Pearson, 1984). This association plays a very important role in the effective exploitation of mineral resources in the soil and in the protection of roots against a number of pathogens. Mycorrhizae are therefore essential for the survival of many plant taxa in diverse ecosystems, including many crop species (Bethlenfalvay & Linderman, 1992).

The term mycorrhiza describes the symbiotic association between plant roots and the hyphae of soil-

El término micorriza describe la asociación simbiótica de las raíces de plantas con hifas de hongos especializados del suelo, y se considera el órgano principal involucrado en la captación de nutrientes por la mayoría de las plantas terrestres. Se pueden distinguir siete tipos de asociaciones en función de su morfología y de los taxones de plantas asociados con hongos: 1) **Ectendomycorrizas**. Son asociaciones formadas entre un número limitado de ascomicetos y los géneros de coníferas *Pinus* y *Larix*; tienen un manto y una estructura compleja altamente ramificada llamada red de Hartig. Después de la formación de esta red, se desarrolla la hifa intracelular en células de la epidermis y en la corteza (Yu, Egger, & Peterson, 2001); 2) **Ericoide**. Representa un tipo único de micorrizas confinadas a varias familias del orden Ericales. Las plantas que desarrollan este tipo de micorriza forman raíces laterales muy finas que carecen de crecimiento secundario. Cada raíz consiste de un cilindro vascular delgado, una o dos capas de células corticales y una capa de epidermis. La asociación incluye la colonización de las células de la epidermis por la hifa, seguida de la formación de un complejo de hifas ramificadas (Cairney & Ashford, 2002); 3) **Arbutoide**. Dos géneros de la familia Ericaceae (*Arbutus* y *Arctostaphylos*) y varios géneros en Pyrolaceae forman micorrizas arbutoides típicas. Estas micorrizas tienen un manto, una red de Hartig y forman complejos hifales intracelulares confinados a la epidermis (Molina & Trappe, 1982); 4) **Monotropoide**. Las especies de plantas que tienen esta micorriza son no fotosintéticas. La evidencia sugiere que los hongos que forman este tipo de micorriza se asocian también a árboles vecinos fotosintéticamente activos, y que han desarrollado un mecanismo para obtener sus fotosintatos. Björkman (1960) demostró que se pueden mover fotosintatos desde árboles vecinos a *Monotropa hypopithys*; 5) **Orquideoide**. Sólo se desarrollan en la familia Orchidaceae. La principal característica de esta micorriza es la formación de pelotones dentro de las células de la planta (Smith & Read, 1997); 6) **Ectomicorriza**. Aunque hay mucha variación estructural y morfológica, se pueden distinguir tres características reconocidas para tipificar esta asociación: la formación de un manto o vaina de hifas que cubren porciones considerables de raíces laterales, el desarrollo de hifas entre las células de la raíz para formar la red de Hartig, y la hifa que emana del manto y crece en el suelo (Peterson, Massicote, & Melville, 2004); 7) **Arbuscular**. También llamada micorriza vesicular-arbuscular. Es una asociación entre las raíces de la mayoría de plantas vasculares y un grupo pequeño de hongos del nuevo phylum Glomeromycota (Schubler, Schwarzott, & Walker, 2001). Esta micorriza se caracteriza por la presencia de una hifa intra o intercelular, arbusculos (hifas finamente ramificadas que participan en el intercambio de nutrientes), micelio extra-radical que conecta a la raíz con el suelo, y esporas

specialized fungi, and it is considered the principal organ involved in nutrient uptake by most terrestrial plants. Seven types of associations based on their morphology and the plant taxa associated with fungi can be distinguished: 1) **Ectendomycorrhizae**. They are associations formed between a limited number of ascomycetes and the genera of *Coniferae*, *Pinus* and *Larix*; they have a mantle and a highly-complex branching structure called the Hartig net. After the formation of this net, the intracellular hypha develops in epidermal and cortical cell layers (Yu, Egger, & Peterson, 2001); 2) **Ericoid**. It represents a unique type of mycorrhizae confined to several families of the order Ericales. Plants that develop this type of mycorrhizae form very fine lateral roots that lack secondary growth. Each root consists of a thin vascular cylinder, one or two cortical cell layers and an epidermal layer. The association involves the colonization of the epidermal cells by the hypha, followed by formation of an arrangement of branching hyphae (Cairney & Ashford, 2002); 3) **Arbutoid**. Two genera of the family Ericaceae (*Arbutus* and *Arctostaphylos*) and several genera in Pyrolaceae form typical arbutoid mycorrhizae. These mycorrhizae have a mantle and a Hartig net, and they form intracellular hyphal arrangements confined to the epidermis (Molina & Trappe, 1982); 4) **Monotropoid**. Plant species that have this mycorrhiza are not photosynthetic. Evidence suggests that fungi that form this type of mycorrhiza are also associated with photosynthetically-active neighboring trees, and that they have developed a mechanism to obtain their photosynthates. Björkman (1960) showed that they can move photosynthates from neighboring trees to *Monotropa hypopithys*; 5) **Orchid**. They only grow in the family Orchidaceae. The main feature of this mycorrhiza is the formation of pelotons within plant cells (Smith & Read, 1997); 6) **Ectomycorrhiza**. Although there are many structural and morphological variations within this association, there are three recognized features that distinguish it: the formation of a mantle or sheath of hyphae that covers significant portions of lateral roots, the development of hyphae between root cells to form the Hartig net, and the hypha that emanates from the mantle and grows in the soil (Peterson, Massicote, & Melville, 2004); 7) **Arbuscular**. Also called vesicular-arbuscular mycorrhiza, it is a partnership between the roots of most vascular plants and a small group of fungi of the new phylum Glomeromycota (Schubler, Schwarzott, & Walker, 2001). This mycorrhiza is characterized by the presence of an intra- or intercellular hypha, arbuscles (finely-branched hyphae involved in nutrient exchange), extraradical mycelium which connects the root with the soil, and spores formed in the extraradical mycelium. Some species form structures called vesicles that are portions of hyphae filled with lipid bodies, thus giving this group the name of vesicular-arbuscular mycorrhiza.

formadas en el micelio extra-radical. Algunas especies forman estructuras llamadas vesículas que son porciones de hifa que se llenan de cuerpos lipídicos, dando a este grupo el nombre de micorriza vesicular-arbuscular.

Las micorrizas más abundantes y con una distribución amplia en el planeta son las ectomicorrizas y las arbusculares. En esta revisión se resaltan algunos conocimientos sobre el proceso de colonización en la micorriza arbuscular; las propiedades de la interfase simbiótica, los genes involucrados de la planta y una lista de oligonucleótidos que se están utilizando en la investigación molecular, para la identificación de las especies de hongos micorrízicos en esta interacción.

Colonización de la raíz

La compatibilidad de las plantas con los hongos micorrízicos es un fenómeno generalizado y antiguo. Aproximadamente 80 % de las familias de plantas son capaces de establecer micorrizas arbusculares (MA). La evidencia de fósiles sugiere que este tipo de simbiosis existía desde hace 400 millones de años en los tejidos de las primeras plantas terrestres (Pirozynski & Dalpé, 1989). Como tal, la capacidad de las plantas para formar MA debe estar bajo el control de mecanismos que se han conservado en los nuevos taxones de plantas. Esta compatibilidad también implica que en las plantas, los procesos de reconocimiento selectivo discriminen entre los microorganismos benéficos y perjudiciales y que los determinantes genéticos esenciales para el establecimiento de MA son comunes a una parte extensa del reino vegetal. En contraste con la gama amplia de hospedantes y, a pesar de sus antiguos orígenes, sólo seis géneros (Figura 1) de hongos pertenecientes al orden Glomales de los Zygomycetes han desarrollado la capacidad para formar MA (Morton & Benny, 1990).

Las esporas de muchas especies no requieren factores de la planta hospedante para la germinación e iniciación del crecimiento de la hifa. No obstante, el continuo crecimiento de ésta, la diferenciación en estructuras de infección y la penetración al hospedante son afectadas por señales de las plantas. Cuando una espora de un hongo micorrízico germina, ramifica en todas las direcciones para incrementar la oportunidad de encontrar raíces. Sin embargo, en ausencia del hospedante, el crecimiento de ésta se limita a un periodo de 20 a 30 días. Después de este lapso, varias modificaciones en la morfología como la retracción del citoplasma de los ápices, la producción de septos y el desarrollo de ramas laterales, indican la terminación del crecimiento de la hifa (Bonfante & Perotto, 1995). La percepción de las señales correctas, provenientes de las raíces de la planta, promueven la morfogénesis diferencial que consiste

The arbuscular mycorrhizae and the ectomycorrhizae are the most abundant and widely distributed mycorrhizae on the planet. This review highlights some of our existing knowledge about the colonization process in the arbuscular mycorrhiza, the symbiotic interface properties, the plant genes involved and a list of oligonucleotides that are being used in molecular research to identify the mycorrhizal fungal species in this interaction.

Root Colonization

The compatibility of plants with mycorrhizal fungi is a widespread and ancient phenomenon. Approximately 80 % of plant families are able to establish arbuscular mycorrhizae (AMs). Fossil evidence suggests that this type of symbiosis existed 400 million years ago in the tissues of the first land plants (Pirozynski & Dalpé, 1989). As such, the ability of plants to form AMs must be controlled by mechanisms that have been preserved in the new plant taxa. This compatibility also means that in plants, selective recognition processes discriminate between beneficial and harmful microorganisms, and that genetic determinants essential for establishing AMs are common to a large part of the plant kingdom. In contrast to the wide range of hosts and, despite their ancient origins, only six genera (Figure 1) of fungi belonging to the order Glomales of the Zygomycetes have developed the ability to form AMs (Morton & Benny, 1990).

The spores of several species do not require host plant factors for germination and initiation of hyphal growth. However, its continued growth, differentiation in infection structures and host penetration are affected by plant signals. When a mycorrhizal fungus spore germinates, it branches out in all directions to increase the chances of finding roots. However, in the absence of the host, this growth is limited to a period of 20 to 30 days. After this period, several morphological changes such as retraction of cytoplasm in the apices, septa production and development of lateral branches indicate the completion of hyphal growth (Bonfante & Perotto, 1995). Perception of the correct signals from the plant roots promotes differential morphogenesis that consists of profuse hyphal branching and proliferation. In the absence of such signals, neither morphogenesis nor appressorium formation occurs. It has been shown that flavones (heptena, naringenin and apigenin), the flavonoid quercetin and isoflavonoids stimulate hyphal growth *in vitro*. It is also suggested that these compounds promote interaction among cells during the early stages of arbuscular symbiosis (Sharma & Johri, 2002).

Rapid recognition of a potential invader is a prerequisite for initiating an effective plant defense. This is done by recognizing specific signal molecules called

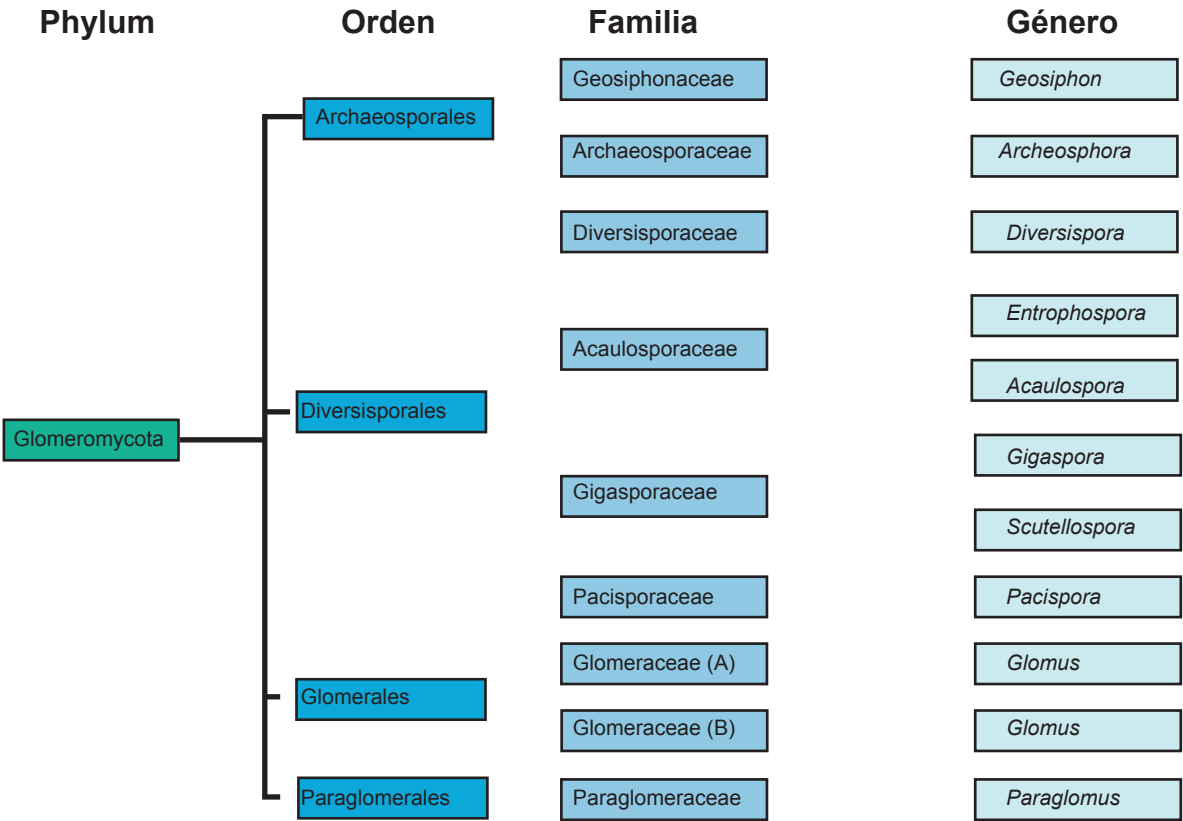


FIGURA 1. Clasificación de los hongos micorrizicos arbusculares. Tomado de Montaña, Camargo-Ricalde, García-Sánchez, y Monroy (2007).

en una ramificación profusa de hifas y su proliferación. En ausencia de tales señales, no ocurre ninguna morfogénesis ni formación del apresorio. Se ha demostrado que las flavonas (hepertina, naringenina y apigenina), el flavonoide quercitina y los isoflavonoides, estimulan el crecimiento de hifas *in vitro*. También se sugiere que estos compuestos promueven la interacción entre células durante las primeras fases de la simbiosis arbuscular (Sharma & Johri, 2002).

El reconocimiento rápido de un invasor potencial es un prerequisite para iniciar una defensa efectiva de la planta. Esto se realiza a través del reconocimiento de moléculas señal específicas conocidas como elicitores. Éstos pueden ser secretados por el microbio (elicitador exógeno) o generados como resultado de una ruptura física o química de la pared celular de la planta (elicitador endógeno). En la interacción planta-hongo micorrizogéno arbuscular se han encontrado algunos eventos similares a los de la interacción planta-patógeno. En una interacción compatible con micorrizas arbusculares (MA) se ha observado una respuesta hipersensitiva parecida a la que sucede cuando la planta es confrontada con un patógeno. También se ha detectado un estallido oxidativo en los sitios donde las puntas de las hifas de *Glomus intraradices* intentan penetrar una célula de la corteza

elicitors. These can be secreted by the microbe (exogenous elicitor) or generated as a result of a physical or chemical breakdown of the plant cell wall (endogenous elicitor). In plant-arbuscular mycorrhizal fungi interactions, some events similar to those involved in plant-pathogen interactions have been found. In an interaction compatible with arbuscular mycorrhizae (AMs), a hypersensitive response similar to what happens when the plant is confronted with a pathogen has been observed. Also, an oxidative burst has been detected in places where the hyphal tips of *Glomus intraradices* attempt to penetrate a cell of the root bark of *Medicago truncatula* (Zeze, Hosny, Tuinen, Gianinazzi-Pearson, & Dulieu, 1999). This hypersensitive response is characterized by a rapid, localized chemical defense, and by the death of plant cells surrounding the infection site.

During the early stages of arbuscular mycorrhiza formation, as in the case of tobacco mycorrhizae, a transient increase has been observed in the activity of catalase and peroxidase enzymes, which coincides with appressorium formation and fungal penetration of the root. The increased activity of these enzymes also coincides with the accumulation of salicylic acid (SA), a signal molecule involved in the signal transduction pathway activated in plant-pathogen reactions (Blilou, Bueno,

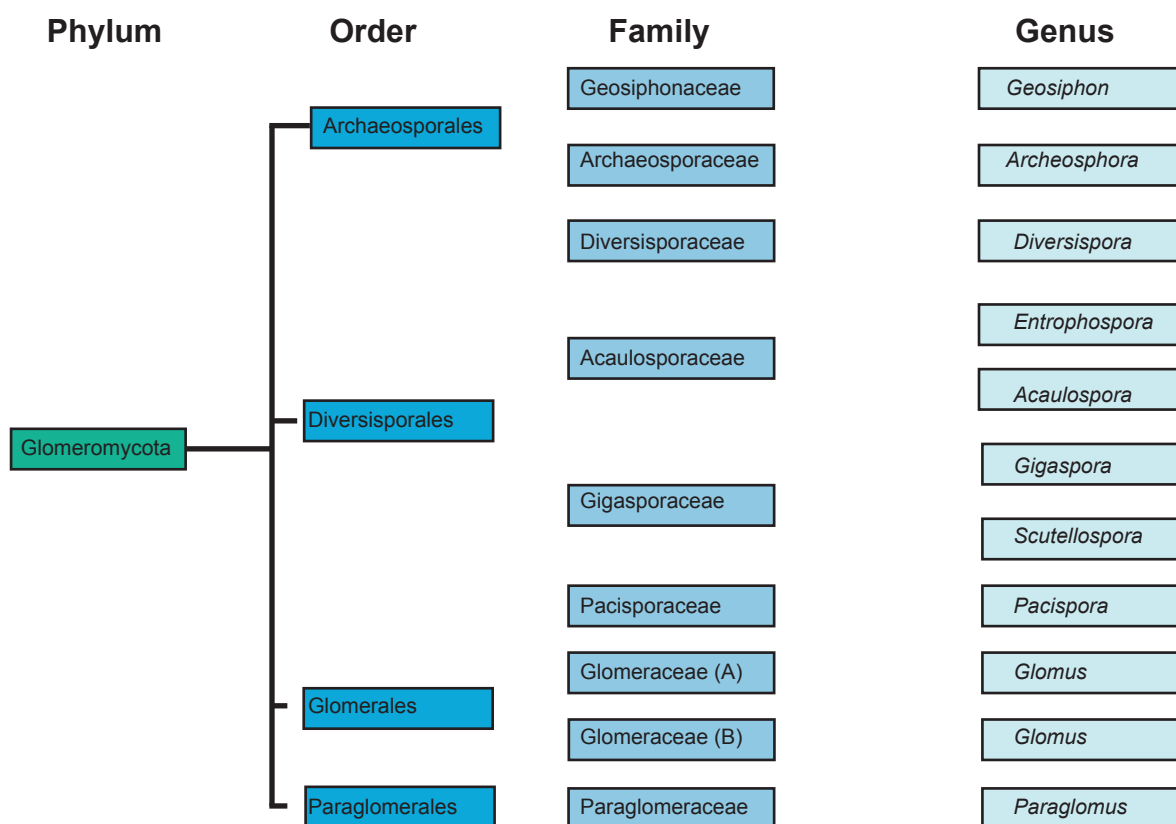


FIGURE 1. Classification of arbuscular mycorrhizal fungi. Taken from Montañó, Camargo-Ricalde, García-Sánchez, and Monroy (2007).

de la raíz de *Medicago truncatula* (Zeze, Hosny, Tuinen, Gianinazzi-Pearson, & Dulieu, 1999). Esta respuesta hipersensitiva está caracterizada por una defensa química rápida, localizada y por la muerte de células de la planta que rodean el sitio de infección.

Durante los primeros momentos de formación de la micorriza arbuscular, como en el caso de micorizas de tabaco, se ha observado un incremento transitorio de la actividad de las enzimas catalasa y peroxidasa, lo cual coincide con la formación del apresorio y la penetración del hongo en la raíz. El aumento de la actividad de estas enzimas también coincide con la acumulación de ácido salicílico (AS); una molécula señal involucrada en la vía de transducción de señales activadas en las reacciones planta-patógeno (Blilou, Bueno, Ocampo, & García-Garrido, 2000). Un posible mecanismo para atenuar la respuesta de defensa de la planta puede ser el bloqueo de los componentes de la vía de transducción de las señales, que activa dicha respuesta. Entre estos componentes se encuentran el ácido salicílico y las especies reactivas de oxígeno que participan como segundos mensajeros en las micorizas arbusculares (Figura 2). Aunque no se han medido los niveles de las especies reactivas de oxígeno y H_2O_2 , existen evidencias indirectas que sugieren que los niveles de este último en la micorriza son ele-

Ocampo, & García-Garrido, 2000). One possible mechanism for attenuating the plant defense response may be the blocking of the components of the signal transduction pathway, which triggers this response. These components include salicylic acid and reactive oxygen species involved as second messengers in arbuscular mycorrhizae (Figure 2). Although the levels of reactive oxygen species and H_2O_2 have not been measured, there is indirect evidence suggesting that the levels of the latter in mycorrhiza are elevated (Zeze et al., 1999). The increased catalase and peroxidase activity may be due to their function as antioxidants, for any active oxygen molecule that has been generated during the initial stages of fungal penetration. The H_2O_2 and other reactive oxygen species are involved in the signal transduction cascade in plant-pathogen interactions. It is therefore possible that H_2O_2 degradation by catalase in the arbuscular mycorrhiza is the mechanism for evading the activation of defense response genes (Van Camp, Van Montagu, & Inze 1998).

Arbuscule development

Simultaneously with the inter- or intracellular growth of the hypha in arbuscular mycorrhizal fungi, the terminal hypha differs in arbuscules within certain cortical cells. It

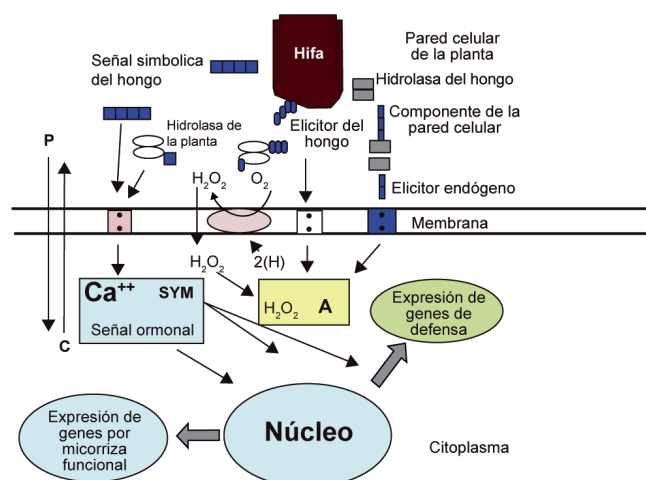


FIGURA 2. Modelo hipotético representando los mecanismos reguladores involucrados en la defensa de la planta durante el establecimiento de la simbiosis. Modificado de García-Garrido y Ocampo (2002).

vados (Zeze et al., 1999). El aumento en la actividad de la catalasa y peroxidasa se puede deber a la función que tienen como antioxidantes, para cualquier molécula activa de oxígeno que ha sido generada durante los estados iniciales de la penetración del hongo. El H_2O_2 y otras especies reactivas de oxígeno están involucradas en la cascada de transducción de señales en las interacciones planta-patógeno. Por tanto, es posible que la degradación de H_2O_2 por la catalasa en la micorriza arbuscular sea el mecanismo para evadir la activación de los genes de respuesta de defensa (Van Camp, Van Montagu, & Inzé, 1998).

Desarrollo del arbusculo

Simultáneamente al crecimiento inter o intracelular de la hifa del hongo micorrízico arbuscular, la hifa terminal se diferencia en arbusculos dentro de ciertas células corticales. Se ha sugerido que el desarrollo de arbusculos en estas células puede ser regulado por un gradiente de carbono debido a la proximidad con el sistema vascular (Blee & Anderson, 1998). Aun cuando la colonización de las células corticales es esencial para la diferenciación del arbusculo, no se conocen las señales que disparan las ramificaciones dicotómicas de la hifa para formarlo. La diferenciación del arbusculo está acompañada de varios cambios fisiológicos en la célula de la planta, cuyas vacuolas se fragmentan aumentando el volumen de citoplasma y el número de organelos (Bonfante & Perotto, 1995). Las células que contienen arbusculos muestran un núcleo hipertrofiado, número mayor de mitocondrias y niveles ligeros de actividad transcripcional (Fester, Strack, & Hause, 2001).

El carbono de la planta es transportado al hongo a través de dos membranas en la interfase simbiótica.

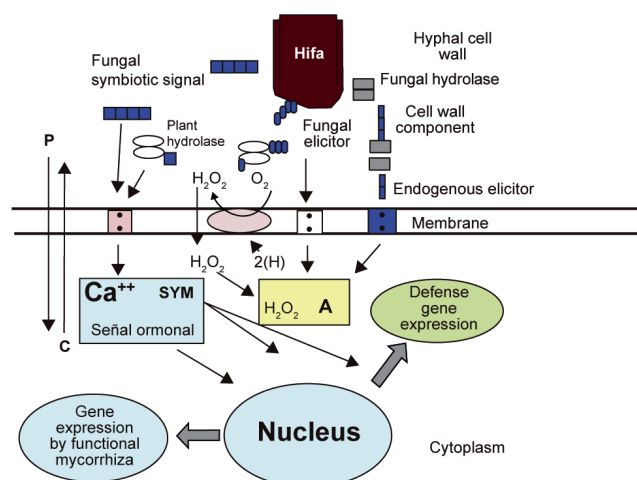


FIGURE 2. Hypothetical model depicting the regulatory mechanisms involved in plant defense during establishment of the symbiosis. Modified from García-Garrido and Ocampo (2002).

has been suggested that arbuscule development in these cells may be regulated by a carbon gradient due to the proximity of the vascular system (Blee & Anderson, 1998). Even though the colonization of cortical cells is essential for arbuscule differentiation, the signals that trigger dichotomous hyphal branching to form it are still not known. Arbuscule differentiation is accompanied by various physiological changes in the plant cell, whose vacuoles are fragmented to increase the volume of cytoplasm and the number of organelles (Bonfante & Perotto, 1995). Cells containing arbuscules show a hypertrophied nucleus, a higher number of mitochondria and low levels of transcriptional activity (Fester, Strack, & Hause, 2001).

Plant-derived carbon is transported to the fungus through two membranes at the symbiotic interface. This carbon is first released into the periarbuscular space, probably in the form of sucrose, then cleaved into hexoses and taken up by AM fungi through transport across the fungal plasma membrane. Within the fungal cytoplasm, hexoses are converted into glycogen granules and triglyceride droplets, which serve as suitable units for long-distance transport through the hyphal network.

Nutrients acquired by the fungus from the soil have to cross the plasma membrane, be transported to the intraradical hyphae, including the arbuscules, and finally pass through the periarbuscular membrane to reach the plant cytoplasm. Phosphate is mobilized by fungal phosphate transporters present in the extraradical hypha. It is then transported to the root and intraradical hypha in the form of phosphate granules wrapped in membrane vesicles. The negative charge of these granules likely makes them vehicles for transporting metals

Este carbono primero es liberado en el espacio periarbuscular, probablemente en la forma de sacarosa, después se fracciona en hexosas y es tomado por el hongo MA a través del transporte por la membrana del hongo. En el citoplasma del hongo, las hexosas son convertidas en gránulos de glucógeno y gotas de triglicéridos, que sirven como unidades disponibles para el transporte a larga distancia a través de la red de hifas.

Los nutrientes adquiridos por el hongo desde el suelo, cruzan la membrana plasmática, son transportados a la hifa intra-radical incluyendo los arbuscúlos, y finalmente atraviesan la membrana periarbuscular para alcanzar el citoplasma de la planta. El fósforo es movilizado por transportadores de fósforo del hongo que están presentes en la hifa extra-radical. Posteriormente, es transportado hacia la raíz y la hifa intra-radical, en forma de gránulos de fósforo envueltos en vesículas de membrana. La carga negativa de estos gránulos probablemente los hace vehículos para el transporte de metales y arginina. El nitrógeno es captado en la hifa extra-radical por transportadores de amonio, nitrato o aminoácidos, que lo transportan principalmente como arginina. Dentro de la hifa intra-radical el nitrógeno se libera de ella en forma de urea y puede ser transportado directamente a la planta o después ser transformado en amonio. Durante el desarrollo y senescencia del arbuscúlo se ha observado la activación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la biosíntesis de aminoácidos, ácidos grasos y apocarotenoides, indicando una fuerte inducción del metabolismo de la planta (Parniske, 2008). También se ha observado un re-arreglo del citoesqueleto (Lohse et al., 2005).

Harrison (2005) sugiere que ocurren al menos dos señales durante el desarrollo del arbuscúlo. Una señal autónoma de la célula que podría ser responsable de la activación de la expresión de ciertos genes exclusivamente en las células que contienen arbuscúlos (es decir, transportadores de fósforo específicos de micorrizas, una celulasa, una quitinasa, y una ATPasa). La señal no autónoma de la célula debe estar involucrada en la activación de genes específicos en células que contienen arbuscúlos (es decir, una proteína GST [Glutathione-S-transferasa], una quitinasa y una β -1,3-endoglucanasa). Los arbuscúlos son estructuras efímeras y su periodo de vida puede alcanzar de cuatro a diez días (Sanders, Tinker, Black, & Palmerly, 1977). Después de este periodo, se observa la formación de un septo en la hifa del arbuscúlo y la estructura se colapsa. Durante la senescencia y colapso del arbuscúlo se observa una producción localizada de especies reactivas de oxígeno. Después que los arbuscúlos se colapsan son degradados completamente y las células de la planta regresan a su fisiología normal.

and arginine. Nitrogen is captured in the extraradical hypha by ammonium, nitrate or amino acid transporters, which transport it mainly as arginine. Within the intraradical hypha, nitrogen is released as urea and can be transported directly to the plant or after being converted into ammonium. During arbuscule development and senescence, activation of the tricarboxylic acid cycle and biosynthesis of amino acids, fatty acids and apocarotenoids have been observed, indicating a strong induction of plant metabolism (Parniske, 2008). A rearrangement of the cytoskeleton has also been observed (Lohse et al., 2005).

Harrison (2005) suggests that at least two signaling events occur during arbuscule development. A signal acting in cell autonomous fashion could be responsible for activating the expression of certain genes only in cells containing arbuscules (that is, mycorrhiza-specific phosphate transporters, a cellulase, a chitinase, and a proton ATPase). A signal acting in cell non-autonomous fashion must be involved in the activation of specific genes in cells containing arbuscules (that is, a GST protein [glutathione-S-transferase], a chitinase and a β -1,3-endoglucanase). The arbuscules are temporary structures and their lifespan can be from four to ten days (Sanders, Tinker, Black, & Palmerly, 1977). After this period, the formation of a septum in the arbuscule hypha is observed and the structure collapses. During arbuscule senescence and collapse, localized production of reactive oxygen species is observed. After the arbuscules collapse, they are completely degraded and the plant cells return to their normal physiology.

Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi

Research initiated by Mosse (1973) on arbuscular mycorrhizal fungi was vigorously followed by numerous researchers worldwide. A large number of these studies deal with the beneficial aspects of this mycorrhiza on plant growth. This indicates the need to develop arbuscular fungi crops as bio-inoculants for use in agriculture, forestry and horticulture. There have been relatively few studies aimed at the cultivation, phylogeny, taxonomic aspects and nature of the symbiosis. There are three main reasons for this: 1) arbuscular mycorrhizal fungi are obligate symbionts and few authors have attempted to cultivate them in axenic medium, 2) there are no reliable characteristics for phylogeny and taxonomy because these fungi do not produce sexual states and only exist as an imperfect state; in the absence of spores, the intraradical structures only allow identification at the family level in the best of cases (Merryweather & Fitter, 1998), and 3) identifying current microsymbionts confers greater benefits to the host, since it finds a variety of AM fungal spores in the

Diversidad molecular de hongos micorrízicos arbusculares

La investigación de hongos micorrízicos arbusculares iniciada por Mosse (1973) fue seguida vigorosamente por numerosos investigadores en todo el mundo. Una gran cantidad de trabajos tienen que ver con aspectos benéficos de esta micorriza sobre el crecimiento de la planta. Esto indica la necesidad de desarrollar cultivos de hongos arbusculares como bio-inoculantes para la agricultura, forestería y horticultura. Se han producido relativamente pocos trabajos dirigidos al cultivo, filogenia, aspectos taxonómicos y naturaleza de la simbiosis. Las razones de ello son principalmente tres: 1) los hongos micorrízicos arbusculares son simbiontes obligados y pocos autores han hecho el intento de cultivarlos en medio axénico, 2) no hay características confiables para la filogenia y taxonomía debido a que estos hongos no producen estados sexuales y sólo existen en estado imperfecto; en ausencia de esporas, las estructuras intra-radicales permiten la identificación a nivel de familia en el mejor de los casos (Merryweather & Fitter, 1998), y 3) la identificación de los micosimbiontes actuales confiere mayores beneficios al hospedante, debido a que encuentra una variedad de esporas de hongos MA en la vecindad de la raíz. Los enfoques de la identificación molecular tienen el potencial para revolucionar nuestra comprensión del hongo micorrízico arbuscular. Este enfoque puede permitir la posibilidad de investigar acerca de su evolución, el diálogo cruzado entre los socios simbiontes, que es la base para el progreso futuro en el campo de las interacciones planta-microbio (Franken & Requena, 2001).

Tendencias de la investigación en las señales de la simbiosis micorrízica arbuscular

La pregunta de cómo se establece la interacción entre simbiontes sin disparar eventos de rechazo había frenado la investigación. Algunas de las razones fueron las características de la simbiosis MA, tales como la carencia de especificidad entre los simbiontes, el estatus obligado del hongo y el desarrollo asincrónico. Sin embargo, el trabajo de Akiyama (2005) hizo una aportación importante a la comprensión del inicio de la interacción entre los simbiontes. Akiyama identificó y caracterizó los compuestos químicos en los exudados de la raíz que producen cambios morfogenéticos en la misma. Estos cambios son cruciales al convertir los tubos germinales con potencial de crecimiento limitado, en micelio presimbótico que tiene la capacidad de iniciar la colonización de las raíces. Lo anterior significa un paso crucial en la vida de un simbionte obligado. Los cambios incluyen una alteración rápida en la expresión de genes y un aumento en la actividad mitocondrial (Lohse et al., 2005). Los compuestos activos son estrigolactonas (Figura 3) y son efectivas a concentraciones extremada-

vicinity of the root. Molecular identification approaches have the potential to revolutionize our understanding of the arbuscular mycorrhizal fungus. This approach may enable us research its evolution and the cross dialogue between symbiont partners, which is the basis for future progress in the field of plant-microbe interactions (Franken & Requena, 2001).

Research trends related to signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis

The question of how to set off the interaction between symbionts without triggering rejection events slowed research in the past. The reasons given included the characteristics of the AM symbiosis, such as lack of specificity between symbionts, the obligate nature of the fungus and asynchronous development. However, the work of Akiyama (2005) made an important contribution to our understanding of the onset of the interaction between the symbionts. Akiyama identified and characterized the chemical compounds in the root exudates that produce morphogenetic changes in the root. These changes are crucial to convert germ tubes with limited growth potential into pre-symbiotic mycelium with the ability to start root colonization. This represents a crucial step in the life of an obligate symbiont. Changes include rapid alteration in gene expression and increased mitochondrial activity (Lohse et al., 2005). The active compounds are strigolactones (Figure 3) and they are effective at very low concentrations. This behavior suggests that they act through signaling pathways that allow the catabolism of lipids as the main carbon source for the fungus. These findings will allow carrying out controlled research into the metabolic changes that occur in the germ tubes of the fungus. On the other hand, Genre (2005) showed how root epidermal cells assemble a special intracellular structure before penetration occurs. For this, the author studied *in vivo* cellular dynamics within *Medicago truncatula* root clones using green fluorescent protein (GFP) labeling of both the plant cytoskeleton and the endoplasmic reticulum. By using a confocal microscope, the author could follow the responses of the epidermal cells to fungal appressorium formation and hyphal penetration in living cells. The author observed that the nucleus of the epidermal cell migrates across the cell, allowing the formation of a special pre-penetration apparatus within a column of cytoplasm. The fluorescence showed a high-density array of microtubules and microfilament bundles running parallel to the column. This effect was associated with a very dense region of endoplasmic reticulum cisternae. Once the pre-penetration apparatus is formed, fungal entry and hyphal growth through the cell precisely follow the path defined by the cytoskeleton and the structures of the endoplasmic reticulum.

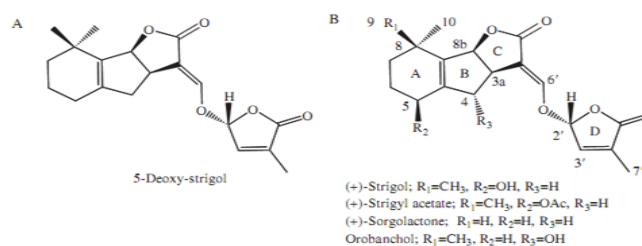


FIGURA 3. Estructuras químicas de estrigolactonas. (A) 5 desoxi-estrigol; (B) cuatro estrigolactonas naturales. Modificado de Akiyama (2005).

mente bajas. Este comportamiento sugiere que actúan a través de vías de señales que permiten el catabolismo de lípidos como la fuente principal de carbono para el hongo. Estos hallazgos permitirán desarrollar investigaciones controladas de los cambios del metabolismo que ocurren en los tubos germinales del hongo. Por otro lado, Genre (2005) demostró cómo las células de la epidermis de la raíz ensamblan una estructura intracelular especial antes de que ocurra la penetración. Para ello, usó clones de raíz de *Medicago truncatula* que expresan a la proteína verde fluorescente (GFP) en el citoesqueleto y retículo endoplásmico. Mediante la utilización del microscopio confocal pudo seguir las respuestas de las células de la epidermis para la formación del apresorio del hongo y la penetración de la hifa en células vivas. Observó que el núcleo de la célula de la epidermis se mueve permitiendo la formación de un aparato de pre-penetración especial que se forma dentro de una columna citoplásmica. La fluorescencia mostró un arreglo de alta densidad y un haz de microfilamentos paralelo a la columna. Este efecto se asoció con una región de cisternas densas del retículo endoplásmico. Una vez que el aparato de pre-penetración se forma; la entrada del hongo y el crecimiento de la hifa a través de la célula siguen precisamente el camino definido por el citoesqueleto y las estructuras del retículo endoplásmico.

Los métodos moleculares para la investigación de las micorrizas arbusculares

Además de la observación de las características morfológicas, frecuentemente se emplean técnicas bioquímicas y fisiológicas, principalmente en levaduras. Sin embargo, estos métodos son muy laboriosos, requieren de mucho tiempo y suministran una resolución taxonómica insuficiente en hongos filamentosos. En contraste, dos avances técnicos importantes han estimulado el uso de técnicas moleculares. El primero, la llegada de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) que ha permitido el análisis de pequeños grupos celulares o aun de una sola espora, material seco de herbario o de organismos extintos. El segundo, la selección de iniciadores (primers) específicos para hongos que han permitido un fácil acceso a las secuencias de nucleótidos.

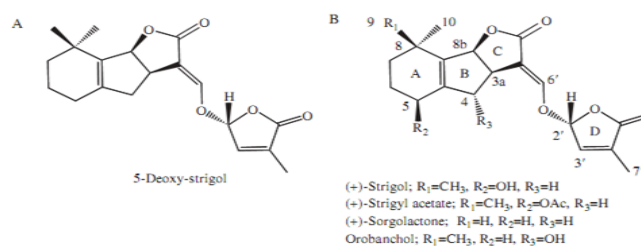


FIGURE 3. Chemical structures of strigolactones. (A) 5-deoxy-strigol (B) four natural strigolactones. Modified from Akiyama (2005).

Molecular methods for research on arbuscular mycorrhizae

In addition to morphological observation, biochemical and physiological techniques are frequently used, mainly in yeast. However, these methods are very laborious and time-consuming, and provide insufficient taxonomic resolution in filamentous fungi. By contrast, two major technical advances have stimulated the use of molecular techniques. The first was the arrival of PCR (Polymerase Chain Reaction), which has enabled the analysis of small cell groups or even a single spore, dry matter from a herbarium or extinct organisms. The second was the selection of fungi-specific primers that have allowed easy access to the nucleotide sequences.

Analysis of DNA base composition in nine species showed that genomes contain many repeated DNA sequences and that there is a low content of guanine and cytosine bases (35 %) with high methylcytosine levels. Significant progress has been made to reveal the mechanisms governing the symbiosis, particularly in relation to the molecular response of the host and the genes involved. The location of these genes and their low activation suggests that some signaling pathway in the arbuscular mycorrhiza and other plant-microbe interactions may be shared. The hypothesis to explain attenuated defense responses in plant includes the degradation of elicitors, cell signals through altered sugar flows and hormonal balance (Blee & Anderson, 2000).

Ribosomal DNA gene cluster

Molecular technologies have been particularly successful for studying ribosomal DNA sequences (rDNA) in arbuscular mycorrhizal fungi. A growing cell has millions of ribosomes for the production of proteins. Ribosomal RNA (rDNA) is the essential structural component of ribosomes. As a result, millions of copies of each type of 5S, 5.8S, 18S and 28S RNA molecule must be synthesized in each cell generation for the cell to meet the requirements for protein synthesis. The highly conserved multiple copies of the rRNA genes in a given chromoso-

El análisis de la composición de bases del ADN en nueve especies demostró que los genomas contienen muchas secuencias repetidas de ADN y que hay un contenido bajo de las bases guanina y citosina (35 %) con niveles altos de metilcitosina. Se han logrado avances significativos para revelar los mecanismos que gobiernan la simbiosis, particularmente, con relación a la respuesta molecular del hospedante y los genes involucrados. La localización de tales genes y su baja activación sugiere que alguna vía de señales en la micorriza arbuscular y otras interacciones planta-microbio puede ser compartida. La hipótesis para explicar las respuestas de defensa atenuadas en la planta incluyen la degradación de elicitors; señales celulares a través de flujos alterados de azúcares y balance hormonal (Blee & Anderson, 2000).

El grupo de genes del ADN ribosomal

Las tecnologías moleculares han sido exitosas, particularmente, para estudiar secuencias de ADN ribosomal (ADNr) en los hongos micorrízicos arbusculares. Una célula en crecimiento tiene millones de ribosomas para la producción de proteínas. El ARN ribosomal (ARNr) es el componente estructural esencial de los ribosomas. Debido a ello, millones de copias de cada tipo de molécula de RNA 5S, 5.8S, 18S y 28S tienen que ser sintetizadas en cada generación celular con el fin de que la célula llene los requerimientos para la síntesis de proteínas. Las copias múltiples altamente conservadas de los genes ARNr en un cromosoma dado están localizadas en tándem. Cada gen está separado del siguiente por regiones conocidas como DNA espaciador, el cual varía en tamaño

me are located in tandem. Each gene is separated from the next by regions known as spacer DNA, which vary in size and sequence between species. A group of genes consists of 18S, 5.8S and 28S rRNA molecules, which are separated by an inner transcribed spacer (ITS-1 and ITS-2) (Figure 4).

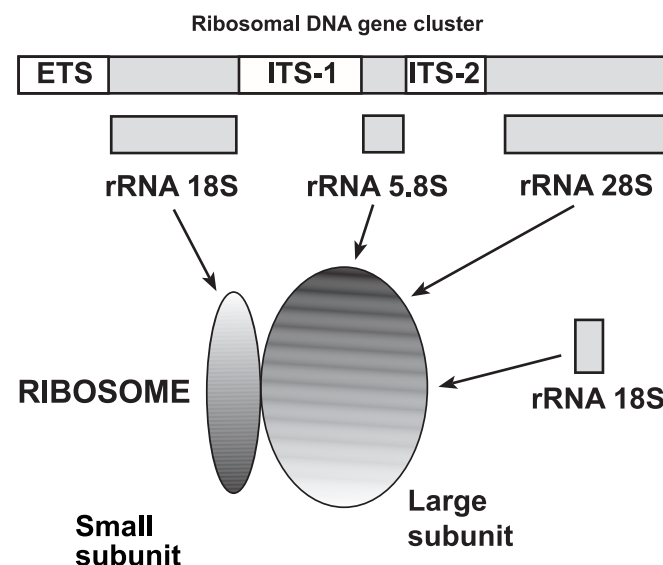


FIGURE 4. Ribosomal DNA gene cluster. The spacer DNA varies in size and sequence among species. One group consists of genes for ribosomal RNA molecules 18S, 5.8S and 28S, which are separated by an internal transcribed spacer (ITS-1 and ITS-2).

There is strong selective pressure (evolution) to maintain functional rDNA because its intact rRNA molecules are essential for the generation of ribosomes, protein synthesis and cell function. Ribosomal genes belong to the most conserved genes in eukaryotic cells, showing sequence similarity even between distant phylogenetic taxa. However, there is less homology in the ITS-1 and ITS-2 regions because these DNA areas do not contribute to structural RNA. Therefore, less selective pressure is applied to these regions, enabling one to find differences (point mutations) in the DNA sequence even between species of the same genus. Due to these features, rDNA molecular data are widely used for the determination of phylogenetic relationships or to discriminate between closely related species.

The earliest primers to gain wide acceptance for work with the ITS region were ITS1 and ITS4. These primers amplify in a large number of fungal species and adequately serve to analyze DNA isolated from individual organisms. However, these primers have a drawback since isolating nucleic acids from the plant-fungus interaction does not exclude plant sequences. Primers were later designed to exclude plants, such as ITS1-F and ITS4-B, which have gained wide use in fungal ITS

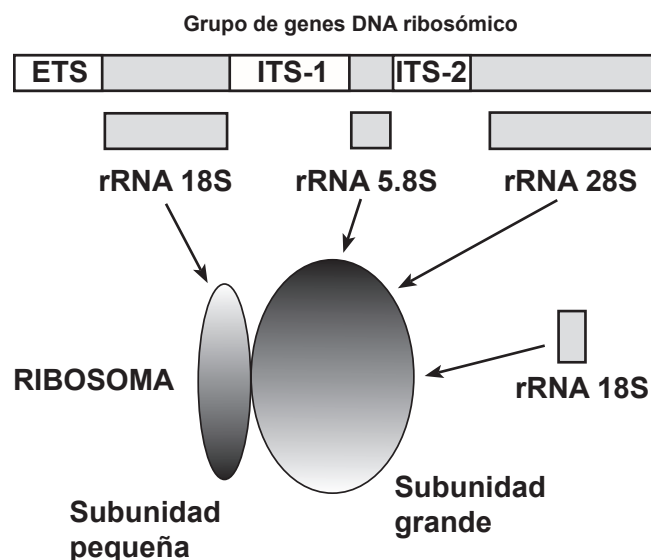


FIGURA 4. Grupo de genes de DNA ribosómico. El DNA espaciador varía en tamaño y secuencia entre especies. Un solo grupo consiste de genes para moléculas de RNA ribosomal 18S, 5.8S y 28S, las cuales están separadas por un espaciador interno transcrito, o ITS-1 e ITS-2 (Internal Transcribed Spacer).

y secuencia entre especies. Un grupo de genes consiste de moléculas de ARNr 18S, 5.8S y 28S, que están separadas por un espaciador interno transcrito ITS-1 e ITS-2 (Internal Transcribed Spacer) (Figura 4).

Existe una fuerte presión selectiva (evolución) para mantener funcional al DNAr, debido a que sus moléculas intactas de ARNr son esenciales para la generación de ribosomas, síntesis de proteínas y función celular. Los genes del ribosoma pertenecen a los genes más conservados en las células de eucariontes mostrando similitud de secuencias incluso entre taxones filogenéticos distantes. Sin embargo, en las regiones ITS-1 e ITS-2 se encuentra menos homología debido a que esas zonas de ADN no contribuyen al ARN estructural. Por lo tanto, se aplica menos presión selectiva en dichas regiones, pudiéndose encontrar diferencias (mutaciones puntuales) en la secuencia de ADN aun entre especies del mismo género. Debido a estas características los datos moleculares del ADN son muy utilizados para la determinación de relaciones filogenéticas o para discriminar especies estrechamente relacionadas.

CUADRO 1. Primers para amplificación de genes RNA ribosomal en hongos. Todos los primers son 5'. Las secuencias están escritas 5'-3'. Los tamaños de los productos son aproximados con base en los genes rRNA de *Saccharomyces cerevisiae*. (Inns, 1990)

Nombre del ITS	Secuencia de nucleótidos	Pares de bases
ITS1	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG	290
ITS5	5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	315
ITS2	5' GCTGCGTTCTTCATCGATGC	290
ITS3	5' GCATCGATGAAGAACGCAGC	330
ITS4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC	580
ITS1F	5' CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	700
TW13	5' GGTCCGTGTTTCAAGACG	1200

Inicialmente, los primers que ganaron una aceptación amplia para trabajar con la región ITS fueron los ITS1 e ITS4. Estos primers amplifican en un número elevado de especies de hongos y trabajan adecuadamente para analizar el ADN aislado de organismos individuales. Sin embargo, dichos iniciadores presentan un inconveniente ya que al aislar los ácidos nucleicos de la interacción planta-hongo, no excluyen las secuencias de las plantas. Posteriormente se diseñaron primers que excluyen a las plantas, como los ITS1-F e ITS4-B con un uso amplio en el análisis de ITS de hongos, aunque también se han desarrollado otros primers (Cuadro 1) (Ram, Pavan, & Reddy, 2005). Kendall y Rygielwicz (2005) publicaron recientemente un conjunto de primers para utilizarse en amplificaciones anidadas de secuencias de ITS. Este conjunto de primers para Dicarioromicota sirven como base para un intervalo amplio de sistemas de análisis de comu-

TABLE 1. Primers for amplification of ribosomal RNA genes in fungi. All primers are 5'. The sequences are written 5'-3'. Product sizes are approximated based on rRNA genes of *Saccharomyces cerevisiae*. (Inns, 1990)

ITS name	Nucleotide sequence	Base pairs
ITS1	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG	290
ITS5	5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	315
ITS2	5' GCTGCGTTCTTCATCGATGC	290
ITS3	5' GCATCGATGAAGAACGCAGC	330
ITS4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC	580
ITS1F	5' CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	700
TW13	5' GGTCCGTGTTTCAAGACG	1200

analysis, although other primers have also been developed (Table 1) (Ram, Pavan, & Reddy, 2005). Kendall and Rygielwicz (2005) recently published a set of primers for use in nested amplifications of ITS sequences. This suite of primers for Dicarioromicota serves as the basis for a wide-ranging system to analyze microbial communities, particularly in association with plants. These emerging methods for molecular analysis of microbial communities are allowing increased sampling. This increase, in turn, is the strength behind the characterization of these complex and spatially diverse groups.

Perspectives

Future studies of the symbiosis of arbuscular fungi will benefit from the development of molecular techniques. The coupling of these techniques with traditional physiological experimentation will help improve our understanding of the dynamic interaction between plants and fungi. The development of molecular methods allows us to perform phylogenetic studies that give historical consistency between groups of higher taxonomic levels. Moreover, it will also allow for diagnostic applications, that is, recognition of defined taxonomic entities, as well as epidemiology and population genetics. Furthermore, they can be used to track outbreaks of sub-specific entities in relation to population analysis and their mode of reproduction.

End of English Version

nidades microbianas, particularmente, en asociación con plantas. Estos métodos emergentes para el análisis molecular de las comunidades microbianas están permitiendo el aumento de los muestreos. A su vez, el aumento de éstos es la fuerza detrás de la caracterización de dichos grupos complejos y diversos espacialmente.

Perspectivas

En el futuro, los estudios de la simbiosis de los hongos arbusculares se beneficiarán del desarrollo de las técnicas moleculares. El acoplamiento de estas técnicas con la experimentación fisiológica tradicional, ayudará a la comprensión de la interacción dinámica entre plantas y hongos. El desarrollo de los métodos moleculares permitirá realizar estudios filogenéticos que den coherencia histórica entre los grupos de los niveles taxonómicos superiores. Por otra parte, también permitirá realizar aplicaciones para el diagnóstico; es decir, el reconocimiento de entidades taxonómicas definidas, así como la epidemiología y la genética de poblaciones. Además, se podrán vigilar los brotes de entidades sub-específicas con relación al análisis de poblaciones y su modo de reproducción.

REFERENCIAS

- Akiyama, K. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435, 824–827. doi:10.1038/nature03608
- Bethlenfalvay, G. J., & Linderman, J. A. (1992). *Mycorrhizae and crop productivity*. USA: Horticultural Crops Research Laboratory, USDA-ARS.
- Blee, K. A., & Anderson, A. J. (1998). Regulation of arbuscule formation by carbon in the plant. *Plant Journal*, 16, 523–530. doi: 10.1046/j.1365-3113x.1998.00315.x
- Blee, K. A., & Anderson, A. J. (2000). Defense responses in plant to arbuscular mycorrhizal fungi. In G. K. Podila, & D.D. Douds (Eds.), *Current advances in mycorrhizae research* (pp. 27–43). USA: APS Press.
- Bllilou, I., Bueno, P., Ocampo, J. A., & García-Garrido, J. M. (2000). Induction of catalase and ascorbate peroxidase activities in tobacco roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycological Research*, 104, 722–725. doi: 10.1017/S095375629900204X
- Björkman, E. (1960) *Monotropa hypopithys* L. An epiparasite on tree roots. *Physiologia Plantarum*, 13, 308–327. doi: 10.1111/j.1399-3054.1960.tb08034.x
- Bonfante, P., & Peroto, S. (1995). Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytologist* 130, 3–21. Obtenido de <http://www.jstor.org/stable/2558536>
- Cairney, J. W. G., & Ashford, A. E. (2002). Biology of mycorrhizal associations of epacrids (Ericaceae). *New Phytologist*, 154, 305–326. doi: 10.1046/j.1469-8137.2002.00398.x
- Fester, T., Strack, D., & Hause, B. (2001). Reorganization of tobacco root plastids during arbuscule development. *Planta*, 213, 864–868. doi: 10.1007/s004250100561
- Franken, P., & Requena, N. (2001). Analysis of gene expression in arbuscular mycorrhizas: New approaches and challenges. *New Phytologist*, 213(6), 517–523. doi: 10.1046/j.1469-8137.2001.00123.x
- García-Garrido, J. M., & Ocampo, J. A. (2002). Regulation of the plant defense response in arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Journal of Experimental Botany* 53, 1377–1386. doi: 10.1093/jexbot/53.373.1377
- Gianinazzil-Pearson, V. (1984). Host-fungus specificity, recognition and compatibility in mycorrhizae. In D. P. S., Verma & T. Hohon (Eds.), *Genes involved in microbe-plant interaction* (pp. 225–253). Springer-Verlag.
- Genre, A. (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi elicit novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell*, 17, 3489–3499. doi: 10.1105/tpc.105.035410
- Harrison, M. J. (2005). Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology*, 59, 19–42. doi: 10.1146/annurev.micro.58.030603.123749
- INN, N., GELFANG, J., Y WHITE, T. (Eds.) PCR Protocols: A Guide to methods and application. 1990 Academic Press.
- Kendall J. M., & Rygielwicz, P. T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*, 5, 28–38. doi: 10.1186/1471-2180-5-28.
- Lohse, S., Schliemann, W., Ammer, C., Kopka, J., Strack, D., & Fester, T. (2005). Organization and metabolism of plastids and mitochondria in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 139, 329–340. doi: 10.1104/pp.105.061457
- Merryweather, J. W., & Fitter, A. H. (1998). The arbuscular mycorrhizal fungi of *Hyacinthoides nonscripta* II. Seasonal and spatial pattern of fungal populations. *New Phytologist*, 138, 131–142. doi: 10.1046/j.1469-8137.1998.00888.x
- Molina, R., & Trappe, J. M. (1982). Lack of mycorrhizal specificity by the ericaceous host *Arbutus menziesii* and *Arctostaphylos uva-ursi*. *New Phytologist*, 90, 495–509. doi: 10.1111/j.1469-8137.1982.tb04482.x
- Montaño, N. M., Camargo-Ricalde, S. L., García-Sánchez, R., & Montroy A. (2007). Micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos (Arbuscular mycorrhizae in arid and semiarid ecosystems). México: Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT, Mundi-Prensa S.A. de C.V., UAM-Iztapalapa, FES Zaragoza, UNAM.
- Morton, J. B., & Benny, S. L. (1990). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon*, 37, 471–491.
- Mosse, B. (1973). Advances in the study of vesicular arbuscular mycorrhizae. *Annual Review Phytopathology*, 11, 171–196. doi: 10.1146/annurev.py.11.090173.001131
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 763–775. doi:10.1038/nrmicro1987
- Peterson, L., Massicote, H. G., & Melville L. H. (2004). *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. USA: NRC Research Press
- Pirozynski, K. A., & Dalpe, Y. (1989). Geological history of the Glomaceae with particular reference to mycorrhizal symbiosis. *Symbiosis*, 7, 1–36.

- Ram, R., Pavan, K. P., & Reddy, S. M. (2005). Molecular methods for research on arbuscular mycorrhizal fungi in India: Problems and prospects. *Current Science*, 89(10), 1699–1709. Obtenido de <http://www.iisc.ernet.in/currsci/nov252005/1699.pdf>
- Sanders, F. E., Tinker, P. B., Black, R. L. B., & Palmerly, S. M. (1977). Development of endomycorrhizal root systems: 1. Spread of infection and growth-promoting effects with 4 species of vesicular-arbuscular endophyte. *New Phytologist*, 78, 257–268. doi: 10.1111/j.1469-8137.1977.tb04829.x
- Sharma, A. K., & Johri, B. N. (2002). *Arbuscular Mycorrhizae*. USA: Science Publishers.
- Schubler, A., Schwarzott, D., & Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: Phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105, 1413–1421. doi: 10.1017/S0953756201005196
- Smith, S. E., & Read, D. J. (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. London: Academic Press
- Van Camp, W., Van Montagu, M., & Inzé, D. (1998). H₂O₂ y NO: Redox signals in disease resistance. *Trends in Plant Science*, 3, 330–334.
- Yu, T. E., Egger, K. N., & Peterson, R. L. (2001). Ectendomycorrhizal associations-characteristics and functions. *Mycorrhiza*, 11, 167–177. doi: 10.1007/s005720100110
- Zeze, A., Hosny, M., Tuinen, D. V., Gianinazzi-Pearson, V., & Dulieu, H. (1999). MYCDIRE, a dispersed repetitive DNA element in arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research*, 103, 572–576. doi:10.1017/S0953756298007497