



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto del cambio de metabolismo de fijación
de carbono (C3 y CAM) en la colonización por
hongos micorrízico arbusculares asociados a**

***Ananas comosus* L. (Merr.)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

OSCAR ZÁRATE MARTÍNEZ



DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. JULIETA ALVAREZ MANJARREZ

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. DATOS DEL ALUMNO

ZÁRATE

MARTÍNEZ

OSCAR

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA

414082322

2. DATOS DEL TUTOR

M. EN C.

JULIETA

ALVAREZ

MANJARREZ

3. DATOS DEL SINODAL 1

DR.

ALFONSO

VALIENTE

BANUET

4. DATOS DEL SINODAL 2

DR.

JORGE

NIETO

SOTELO

5. DATOS DEL SINODAL 3

M. EN C.

SILVIA MARGARITA

CARRILLO

SAUCEDO

6. DATOS DEL SINODAL 4

DRA.

MARÍA DEL ROCÍO

CRUZ

ORTEGA

7. DATOS DEL TRABAJO ESCRITO

Efecto del cambio de metabolismo de fijación de carbono (C3 y CAM) en la colonización por hongos micorrízico arbusculares asociados a *Ananas comosus* L. (Merr.)

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme los recursos para mi formación académica y profesional, sin dejar nunca de lado los problemas que rodean a nuestra sociedad.

A la M. en C. Julieta Alvarez Manjarrez, quien asesoro y dirigió esta tesis.. Por todo lo que aprendí de ti, pero sobre todo por creer en mí y permitirme crear y escribir algo de lo que me siento orgulloso.

Al Dr. Roberto Garibay Orijel, por sus constantes aportaciones y apoyo al desarrollo de esta tesis. También, gracias por confiar.

Al los Drs. Alfonso Valiente Banuet, Jorge Nieto Sotelo, María del Rocío Cruz Ortega y Silvia Margarita Carrillo Saucedo, por su comentarios y correcciones a esta tesis, y a los dos primeros por su apoyo en el uso de las cámaras de crecimiento vegetal.

A la Dra. María del Pilar Ortega y a la maestra Iris Suarez, por el apoyo en la técnicas de tinción de raíces y material para la extracción de esporas del suelo.

A la Dra. Dora Trejo, por proporcionar el inóculo micorrízico comercial.

A la Dra. Laura Hernandez Cuevas, por su apoyo en la identificación morfológica de las esporas de HMA.

A la Dra. Margarita Villegas Ríos, Dr. Rodolfo Salas y al Bio. Eduardo Choreño Parra por su apoyo en la recolección del suelo de los Tuxtlas.

Al Dr. Jesus A. Badillo Corona y a su alumna Alejandra Rodriguez por facilitar el uso de una cámara de crecimiento vegetal en la Upibi, IPN.

A los profesores y compañeros del taller "DAEMSEL" que aportaron comentarios constructivos en la realización de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, Lucila Martínez Torres y Oscar Zárate Morales, por permitirme hacer lo que me gusta, por confiar en mí, darme herramientas para vivir y seguir adelante. Por su amor incondicional a pesar de nuestras diferencias.

A mis hermanas Lucila y Edith, porque a nuestra manera nos mostramos afecto y preocupación por el triunfo de los otros.

A les “Jóvenes Ilustres” (May, Itzel, Elena, Maru) por convertirse en más que el grupo de apoyo para los exámenes de Marche, por ser mis amigas y compartirme de su tiempo y conocimientos. Por tantos momentos juntos. Por todo lo que aprendí de ustedes y por impulsarnos a seguir adelante.

A los miembros, ex-miembros y anexos del C-103. Al Rodis, la Noemí, Andrés, Amaranta, Gala, Vale, Mariana, Abraham. Por hacerme disfrutar el laboratorio, los conocimientos que adquirí de cada uno, y compartir su pasión por los hongos y otras cosas. Para mí todos son la alegría del laboratorio.

A mis profesores de Biología de Hongos, la Dra. Margarita Villegas y el M. en C. Eduardo Pérez Pasos, que más tarde también serían mis profesores en el taller. Gracias por esas clases que me permitieron apasionarme por los hongos, y que hasta el momento no dejan de intrigarme y querer saber más de ellos.

Al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Química, y su coordinadora Mayte Olivera, por cumplir mi demanda de 400 piñas, pero sobre todo por aceptarme, enseñarme y darme su amistad.

Araceli Arandal, Ara, a ti te toca especial por ser la dueña de esas manos prolíferas que le dieron vida a mis hijas. Gracias por apoyarme en esos momentos feos de mi vida, por burlarte de mí, y aconsejarme. Gracias por mostrarme que se puede buscar ayuda cuando la necesitas y darme tu amistad.

A mis amigos de toda la vida, porque a pesar de alejarnos y tomar distintos caminos siempre están ahí: Liz, Vale Alday, Ana, Mona, Ray, Josie, Lucero, Betsy, Karina Rivas.

DEDICATORIA

To my former companion though time and space. Hello sweetie. Happy ever after doesn't mean forever, it just means time, little time. I get it now. You were fantastic, and so was I. Laugh hard, run fast, be kind.

“Die Kunst ist lang, und kurz ist unser Leben.”

Johann Wolfgang von Goethe, Faust.

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Metabolismo de fijación de carbono	2
2.2 Ananas comosus	5
2.3 Medicago sativa	6
2.4 Hongos micorrízicos	6
2.5 Hongos micorrízico arbusculares	7
2.6 Selección de simbioses	8
III. OBJETIVOS	10
IV. HIPÓTESIS	10
V. MÉTODOS	11
5.1 Plantas modelo	11
5.2 Inóculos micorrízicos y sustrato	12
5.3 Experimento “Cambio de metabolismo C3 a CAM”	14
5.4 Colonización de raíces por HMA	19
5.5 Análisis de datos	19
VI. RESULTADOS	21
6.1 Comunidad potencial de HMA en muestras de suelo de los Tuxtlas	21
6.2. Metabolismo fotosintético de la piña durante el desarrollo del experimento	23
6.3. Cambio de metabolismo fotosintético y crecimiento de A. comosus y M. sativa	26
6.4. Colonización en plantas de piña y alfalfa	34
VII. DISCUSIÓN	37
7.1 Comunidad potencial de HMA	37
7.2 Metabolismo fotosintético de las plantas de piña durante el desarrollo del experimento	38
7.3 Cambio de metabolismo fotosintético y crecimiento de A. comosus y M. sativa	39
7.4 Colonización en plantas de piña y alfalfa	43
7.5 Metabolismo de la fijación de carbono en el contexto de los cambios ambientales mundiales	46
VIII. CONCLUSIONES	48
IX. PERSPECTIVAS	48

X. REFERENCIAS	50
ANEXOS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de metabolismo C3 (modificado de Taiz et al., 2014).	4
Figura 2. Esquema de metabolismo CAM (modificado de Taiz et al., 2014).	4
Figura 3. Diseño experimental	16
Figura 4. Morfotipo de Acaulospora sp.	21
Figura 6. Espora Acaulosporoide. Se observan dos estratos (E1 y E2) y no se observa ornamentación. No presentan una reacción al reactivo de Melzer.	22
Figura 7. Espora de Gigaspora sp. Se observan dos estratos y con coloración amarilla. No presentan una reacción al reactivo de Melzer.	23
Figura 8. Efecto de la condición Alta (28°C, 50%HR, irrigación baja), condición Baja (25°C, 80%HR, irrigación alta) sobre el peso seco (g) de las piñas (n=2) durante las 12 semanas de tratamiento; A) grupo control B) con inóculo determinado (C) con inóculo del suelo de los Tuxtlas.	24
Figura 9. Efecto de la condición Alta (28°C, 50%HR, irrigación baja), condición Baja (25°C, 80%HR, irrigación alta) sobre el área foliar (cm ²) de las piñas (n=2) durante las 12 semanas de tratamiento; A) grupo control B) con inóculo determinado (C) con inóculo del suelo de los Tuxtlas.	24
Figura 10. Efecto de la condición Alta (28°C, 50%HR, irrigación baja), condición Baja (25°C, 80%HR, irrigación alta) sobre la densidad estomática (mm ⁻²) de las piñas (n=2) durante las 12 semanas de tratamiento; A) grupo control B) con inóculo determinado (C) con inóculo del suelo de los Tuxtlas.	25
Figura 11. Efecto de la condición Alta (28°C, 50%HR, irrigación baja), condición Baja (25°C, 80%HR, irrigación alta) sobre la ganancia de carbono (No. equivalentes/g) de las piñas (n=2) durante las 12 semanas de tratamiento; A) grupo control B) con inóculo determinado (C) con inóculo del suelo de los Tuxtlas.	25
Figura 12. Ganancia de carbono (No.equivalentes de ácido/g de tejido) del periodo luminoso en la condición Alta (28°C, 50%HR, irrigación baja) y condición Baja (25°C, 80%HR, irrigación alta) al final del experimento (N=60 para cada condición).	26
Figura 13. Ganancia de carbono (No.equivalentes de ácido /g de tejido) en las plantas de piña en la condición Alta (28°C, 50%HR, irrigación baja) y condición Baja (25°C, 80%HR, irrigación alta), al inicio y final del período luminoso. A) Grupo control B) con inóculo determinado (C) con inóculo del suelo de los Tuxtlas. (N= 20 en cada condición y tiempo). Las letras minúsculas diferentes indican diferencias entre los grupos de acuerdo a prueba de Tukey (p<0.05).	27
Figura 14. Logaritmo natural del área foliar de piñas con los tres tipos de inóculo. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias entre los grupos de acuerdo a prueba de Tukey (p<0.05). (N= 20 en cada tratamiento)	28

Figura 15. Logaritmo natural del área foliar de piñas en las dos condiciones. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias entre los grupos de acuerdo a prueba de Tukey ($p < 0.05$). (N=20)	29
Figura 18. Índice de succulencia (g/cm^2) de las piñas en condición Alta (28°C , 50%HR, irrigación baja) y la condición Baja (25°C , 80%HR, irrigación alta). (N=20).	31
Figura 20. Altura de las plantas de alfalfa(cm) en cada tratamiento de alfalfa. (N=25).	33
Figura 21. Área foliar de las plantas de alfalfa (cm^2) en cada tratamiento.(N=25).	34
Figura 22. Muestra de raíz micorrizada. A) Se observa la presencia de micelio (I) y de arbuscúlos (II). B) Muestra de raíz micorrizada donde se observa presencia de micelio (I) y vesículas (III).	34
Figura 23. Respuesta de interacción condición:inóculo en colonización. Las barras representan los intervalos de confianza al 95%.	35
Figura 24. Respuesta de interacción inóculo:planta en colonización. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias entre los grupos de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$), las barras representan los intervalos de confianza al 95%.	36
Figura 25. Respuesta de interacción planta:condición en la colonización. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias entre los grupos de acuerdo a prueba de Tukey ($p < 0.05$), las barras representan los intervalos de confianza al 95%.	36

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Condiciones ambientales que se mantuvieron en las cámaras de crecimiento. 15

Cuadro 2. Variables medidas y resultados esperados en la piña y alfalfa. 18

I. RESUMEN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) (Glomeromycotina) son simbioses obligados de plantas terrestres que obtienen carbono de su planta hospedera a cambio de beneficios como nutrientes del suelo. Algunos trabajos han mostrado que la asociación micorrízica es afectada por diferencias en las capacidades fotosintéticas de las plantas, y que estas diferencias pueden influenciar las comunidades de HMA asociados a las plantas y la colonización por estos.

Ananas comosus (Bromeliaceae), la piña, es reportada por Aragón *et al.* (2012) como una CAM facultativa, cuya expresión de metabolismo C3 y CAM depende de las condiciones ambientales. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto que tiene el metabolismo fotosintético de *A. comosus* en la colonización de sus raíces por HMA cuando ésta se comporta como C3 o CAM. Para esto se realizó un bioensayo utilizando a la piña y a la alfalfa (*M. sativa*) como modelo. Estas plantas crecieron durante 12 semanas bajo dos condiciones ambientales: una con (28 °C), baja irrigación y humedad; y otra con baja temperatura (25 °C) y alta irrigación y humedad, condiciones que indujeron la expresión de un metabolismo CAM y C3 (respectivamente) en la piña. En cada condición se agregaron dos inóculos micorrízicos, uno comercial y uno natural. Al final de las 12 semanas se encontraron diferencias en el crecimiento, metabolismo de carbono entre las piñas bajo las dos condiciones ambientales, sugiriendo la expresión de un metabolismo CAM y C3 en cada condición. La colonización resultó afectada por la interacción entre el tipo de inóculo y la especie de planta, así como por la interacción entre la especie de planta y condición.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Metabolismo de fijación de carbono

La fotosíntesis es el conjunto de reacciones de captación y transformación de energía lumínica en energía química (ATP) y poder reductor (NADPH). Este proceso se puede dividir en dos fases, la fase fotoquímica y la fase bioquímica. Durante la primera ocurren los procesos de fotólisis de agua y transporte de electrones que generan al final ATP y NADPH. Durante la fase bioquímica ocurre la fijación de carbono del CO_2 por la RuBisCO, formando el 2,3-fosfoglicerato. A este metabolismo, donde la primera molécula formada es una molécula de 3 carbonos, se le conoce como metabolismo C3 (Figura 1). Diferentes metabolismos fotosintéticos al C3 han surgido en varios grupos de plantas y algunos de ellos favorecen el crecimiento de las plantas bajo ciertos tipos de estrés (Taiz *et al.*, 2014). El tipo de metabolismo CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas), se caracteriza por una separación temporal de los procesos de fijación de carbono. Durante la noche, ocurre la apertura estomática y la absorción de CO_2 , se fija carbono por la acción de la fosfoenolpiruvato carboxilasa y se almacena en forma de ácidos orgánicos; durante el día los ácidos orgánicos salen de la vacuola, se descarboxilan y el C es utilizado en el ciclo de Calvin-Benson, permaneciendo los estomas cerrados. Debido a que la apertura estomática ocurre en periodos de oscuridad, cuando disminuye la temperatura, hay una menor pérdida de agua en comparación con la que se tendría al abrir los estomas en el periodo de luz (Taiz *et al.*, 2014) (Figura 2). La separación temporal de los procesos de carboxilación en las plantas CAM, en comparación con plantas C3 y C4, permite optimizar la

ganancia de carbono y el uso de agua en ambientes cambiantes (Borland *et al.*, 2011), pero la productividad en biomasa de las plantas CAM es menor comparada con plantas C3 y C4 (Lüttge, 2004).

La expresión del metabolismo CAM está determinada por la especie de planta, el estado de desarrollo de la planta y en particular de las hojas, y por las condiciones ambientales (Borland *et al.*, 2011), y da lugar a diferentes comportamientos en la expresión de este tipo de metabolismo, las cuales han sido descritas por Cockburn (1985) como *CAM idling* y *CAM cycling*. La primera describe a las plantas en condiciones de alto estrés hídrico, cuyos estomas permanecen cerrados durante el día y la noche, y el CO₂ es reciclado a través del metabolismo CAM, siendo fijado el C en forma de ácido orgánico y siguiendo la ruta ya descrita. *CAM cycling* se refiere al metabolismo CAM donde durante el periodo de oscuridad los estomas permanecen cerrados, pero los ácidos orgánicos son sintetizados a partir de C del CO₂ producto de la respiración celular. Durante el periodo de luz los estomas se abren y el CO₂ atmosférico es absorbido y reducido por la vía C3, paralelamente a la asimilación de C fijado en forma de ácido durante el periodo de oscuridad (Ting, 1985; Lüttge, 2004).

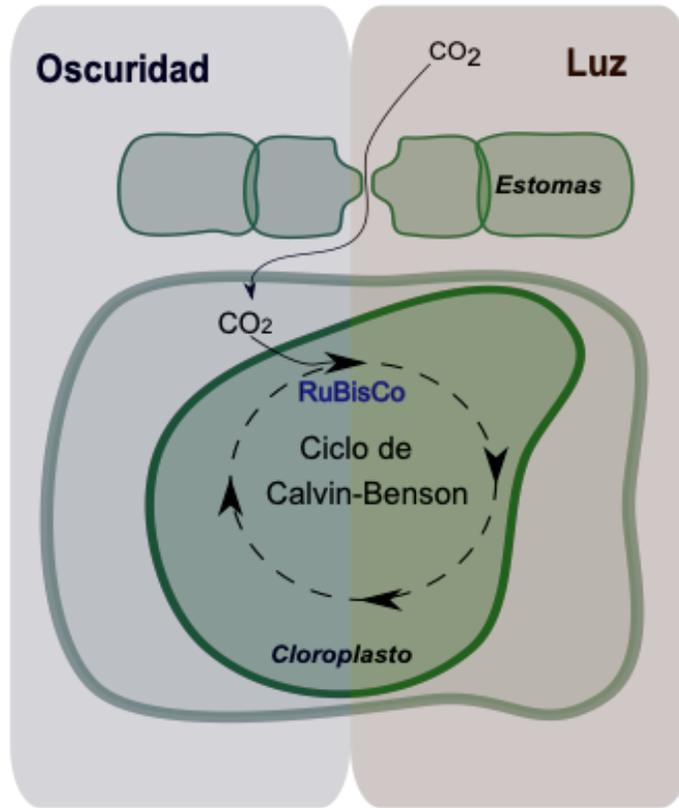


Figura 1. Esquema de metabolismo C3 (modificado de Taiz *et al.*, 2014).

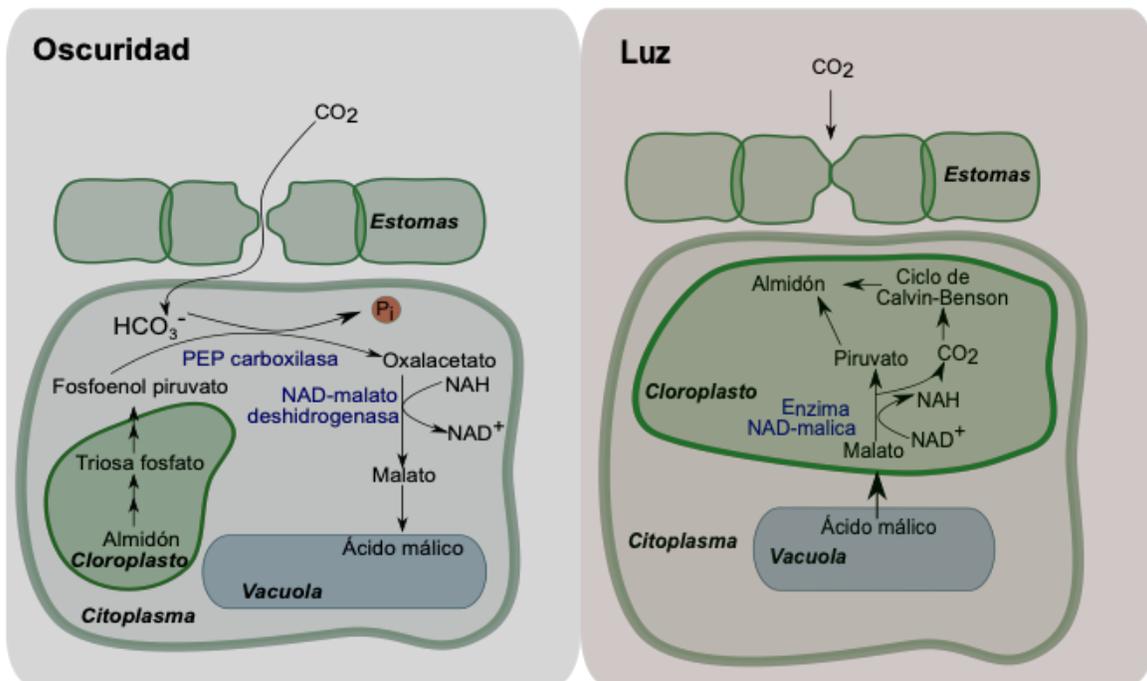


Figura 2. Esquema de metabolismo CAM (modificado de Taiz *et al.*, 2014).

La expresión de un metabolismo C3, C4 o CAM puede ser obligada, es decir siempre expresan un tipo de metabolismo, o facultativa, donde las especies de plantas tienen la capacidad de expresar un tipo de metabolismo fotosintético (e.g. C3 o CAM). Esta expresión es inducida o regulada por factores ambientales (estrés hídrico, salino), o de desarrollo (Qiu *et al.*, 2015). Plantas CAM facultativas han sido reportadas en especies de familias de plantas como Crassulaceae, Piperaceae, Montiaceae, Portulacaceae, Talinaceae y Bromeliaceae (Winter y Holtum, 2014).

2.2 *Ananas comosus*

Ananas comosus (L.) Merr. (Bromeliaceae) es una planta tropical terrestre nativa de regiones del sur y sureste de Brasil, Argentina y Uruguay (Melo *et al.*, 2006). Algunas variedades de esta planta han sido reportadas como CAM facultativas por Aragón *et al.* (2012) y más tarde por Couto y colaboradores (2016). La expresión del metabolismo CAM en ambos estudios estuvo relacionada con las condiciones ambientales en las que las plantas crecieron, específicamente la temperatura, la humedad relativa, irrigación e intensidad lumínica, que fueron las variables controladas por estos autores. La combinación de mayor disponibilidad de agua, menor temperatura y menor intensidad lumínica indujeron la expresión del metabolismo C3 en sus estudios.

Al ser una especie de interés comercial, la colonización por hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en piña ha sido estudiada con fines agronómicos y para mejorar la supervivencia de plantas micropropagadas (Moreina *et al.*, 2015).

El cambio de metabolismo de carbono de la piña inducido por condiciones ambientales fácilmente controlables y su colonización por HMA es la razón por la que proponemos esta planta como un modelo de estudio para explorar el efecto del tipo de metabolismo de fijación de carbono en la simbiosis micorrízica arbuscular.

2.3 *Medicago sativa*

Medicago sativa L. es una planta perenne perteneciente a la familia Fabaceae, la cual posee un alto interés económico debido a la capacidad de formar nódulos fijadores de nitrógeno y por ser un alimento rico en proteína (Trinh *et al.* 1998). Al ser una planta de fácil reproducción y mantenimiento, esta especie ha sido utilizado como un modelo para estudio de la simbiosis micorrízica arbuscular desde aspectos fisiológicos, moleculares y ecológicos. Al ser una planta C3 obligada y por ser un modelo de la simbiosis con HMA, proponemos a esta planta como un modelo para explorar el efecto de dos ambientes contratantes en la colonización por HMA, cuando el metabolismo de fijación de carbono es constante.

2.4 Hongos micorrízicos

Los hongos son organismos cuya diversidad se estima en 5.1 millones de especies (Blackwell, 2011). Estos organismos presentan varias formas de vida, de aquí los diferentes papeles que tienen en los ecosistemas. Uno de estos papeles es su influencia en los ciclos de carbono, nitrógeno y fósforo. Algunos estilos de vida pueden ser saprobios, es decir descomponedores de materia orgánica

muerta, parásitos o mutualistas al interactuar directamente con otros organismos (McLaughlin y Spatafora, 2014). La asociación micorrízica es un tipo de mutualismo que se presenta entre las raíces de las plantas y los hongos del subphylum Glomeromycotina (Spatafora *et al.*, 2016), y de los phyla Basidiomycota y Ascomycota (Smith y Read, 2008). En esta interacción se da un intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo asociado, al existir una translocación de fotosintatos hacia el hongo, a cambio de N y P (Smith y Read, 2008). Se reconocen cuatro grandes tipos de micorrizas, basados en su estructura y función: la micorriza arbuscular, la ectomicorriza, la micorriza ericoide y la micorriza orquidioide, presentándose respectivamente en el 71%, 2%, 1.4% y 10% de las plantas terrestres (Brundett y Tedersoo, 2018). Esta asociación tiene consecuencias en el crecimiento y reproducción de las plantas (Koide y Kabir, 2000), participan en los mecanismos de tolerancia de la planta a factores de estrés como: hídrico (Auge, 2001), metales pesados (Bothe *et al.*, 2009), los patógenos, entre otros, pero estas cualidades dependen del contexto abiótico (e.g. pH, niveles de P y N del suelo) y biótico (e.g. identidad de los simbiositos, grupos funcionales, competencia) (Hoeksema *et al.*, 2010).

2.5 Hongos micorrízico arbusculares

Los hongos que forman la asociación micorrízica arbuscular pertenecen al subphylum Glomeromycotina (Spatafora *et al.*, 2016). Se estima entre 300 y 1 600 el número de especies de HMA (Öpik *et al.*, 2013). Las plantas con las que se

asocian estos hongos pertenecen a grupos de angiospermas, gimnospermas y esporofitos o gametofitos de Pteridophyta, pero también se ha encontrado esta interacción en gametofitos de plantas hepáticas, que carecen de raíces (Smith y Read, 2008). A pesar de su gran número de especies, usualmente solo se encuentra una diversidad de 20 a 30 taxones de HMA en la mayoría de las comunidades vegetales. La riqueza de estos hongos varía dependiendo del tipo de vegetación, y está en gran parte regulada por factores ambientales como: el pH, contenido de fósforo, nitrógeno y carbono orgánico en el suelo, así como por y la temperatura y precipitación (Davison *et al.*, 2015). Por otro lado, la presencia de HMA en las raíces de una planta está determinada por factores como: la cantidad de luz y nutrientes disponibles en el suelo (Liu *et al.*, 2015), las condiciones climáticas, la capacidad fotosintética de ésta (Davidson *et al.*, 2015), la identidad taxonómica de la planta (Koorem *et al.*, 2017) y su grupo funcional (Seep *et al.*, 2018). Estos factores dan lugar a diferencias en las comunidades de los hongos que están asociados a las plantas que coexisten en un espacio (Koorem *et al.*, 2017), revelando que la asociación de especies de HMA con sus plantas simbiotes no ocurre de manera aleatoria (Seep *et al.*, 2018).

2.6 Selección de simbiotes

El intercambio de nutrientes que ocurre entre los simbiotes de la asociación micorrízica arbuscular ha sido estudiado como uno de los factores que modela las comunidades de HMA en las raíces de las plantas. Los experimentos realizados por Kiers *et al.* (2011) mostraron que la regulación en el intercambio de nutrientes está dada tanto por la planta como por el hongo. Los hongos pueden discriminar

entre plantas que translocan más o menos C, lo cual se ve reflejado en los porcentajes de colonización de las raíces. Al mismo tiempo, la planta puede discriminar entre hongos que translocan más fósforo, o los que transfieren más carbono (Kiers *et al.*, 2011). Este sistema ha sugerido modelar la selección de hospederos en esta relación como un “mercado biológico” (Wyatt *et al.*, 2014). En este modelo, las especies de hongos que aportan más nutrientes reciben más carbono de su simbionte, mostrando un sistema de recompensa. Este sistema se ha propuesto como uno de los factores que da lugar a la selección planta-hongo en la simbiosis micorrízica, donde se da una preferencia por seleccionar y translocar más recursos a los simbiontes que aportan mayores beneficios (Werner y Kiers, 2015).

Algunos de estos mecanismos que pueden generar la selección de simbiontes se han puesto a prueba con diferentes experimentos *in vitro*, los cuales han mostrado que la translocación de carbono a los HMA asociados se ve afectada por la reducción del metabolismo fotosintético de la planta al ser sometidas a sombra (Fellbaum *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2015); también puede ser afectada por el tipo de metabolismo de fijación de carbono de diferentes especies de plantas, que tienen metabolismo C3 o C4 (Walder *et al.*, 2012). Por ejemplo, se ha mostrado que existen diferencias en las comunidades y en la colonización por HMA asociados a plantas con diferentes hábitats y con distintas capacidades fotosintéticas, es decir, tolerantes a sombra y evasivas a la sombra (Koorem *et al.* 2017), donde se muestra que la capacidad fotosintética de la planta se relaciona con la cantidad de C que puede aportar a los hongos asociados y cómo ésta modifica a la comunidad y colonización de HMA que se establece en las raíces.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto que tiene el metabolismo fotosintético de *Ananas comosus*, la cual es CAM facultativa, en la colonización de sus raíces por hongos micorrízicos arbusculares (HMA) cuando ésta se comporta como C3 o CAM.

Objetivos particulares

1. Identificar la riqueza de esporas de HMA en muestras de suelo de la Estación de Biología “Los Tuxtlas”.
2. Evaluar el metabolismo de fijación carbono de *A. comosus* bajo dos condiciones experimentales contrastantes en temperatura y disponibilidad de agua.
3. Evaluar el efecto del tipo de metabolismo de fijación de carbono (C3 o CAM) sobre variables morfológicas y fisiológicas y sobre la colonización por HMA en *A. comosus* y en *Medicago sativa*.

IV. HIPÓTESIS

Dado que plantas con metabolismo C3 pueden fijar una mayor cantidad de carbono que plantas CAM, el porcentaje de micorrización será mayor en *A. comosus* con metabolismo C3, en comparación con plantas CAM, al tener los HMA la capacidad de seleccionar a sus simbiontes más benéficos. En *M. sativa* la colonización en dos ambientes contrastantes será similar al expresar siempre un metabolismo C3.

V. MÉTODOS

5.1 Plantas modelo

Para conocer el efecto del tipo de metabolismo de fijación de carbono (C3 o CAM) en la colonización por HMA se utilizaron a dos plantas modelo: *A. comosus* y *M. sativa*. La especie *A. comosus* se seleccionó por ser una CAM facultativa, cuyas condiciones de expresión de metabolismo C3 o CAM ya había sido reportadas por Aragón *et al.* (2012). Por otra parte, *M. sativa* también conocida como alfalfa, es una C3 obligada que fue utilizada para separar los efectos del tipo de metabolismo (C3 o CAM) de las alteraciones que pueda propiciar el ambiente en la colonización por HMA. Es decir, si el tipo de metabolismo C3 o CAM es el principal factor que influye en la colonización, la colonización en una planta C3 será similar en diferentes condiciones ambientales.

Obtención de plántulas. Los individuos de *A. comosus* se obtuvieron mediante el cultivo de tejidos vegetales en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Química de la UNAM. Las plantas de piña aclimatizadas en sustrato estéril se transfirieron a cada uno de los suelos correspondientes. Los individuos de *M. sativa* se obtuvieron mediante la germinación de semillas comerciales (Semillas Hortaflor) en los respectivos sustratos. Para eliminar posibles propágulos de HMA y para favorecer la germinación, previamente las semillas se sometieron a un proceso de escarificación-desinfección, lavándolas durante 5 minutos en detergente, 5 minutos en etanol (70%), 5 minutos en agua oxigenada (3%) y 10 minutos en hipoclorito de sodio comercial (20%).

5.2 Inóculos micorrizícos y sustrato

El sustrato seleccionado para el crecimiento de las plantas consistió en una mezcla 2:1 vermiculita-suelo de los Tuxtlas. Este suelo se seleccionó ya que presentaba las condiciones necesarias para el crecimiento de las plantas de piña y la comunidad de esporas de HMA de la región, la cual ya había sido descrita por Varela-Fregoso *et al.* (2008), trabajo en donde se identificaron 60 morfoespecies de HMA.

Recolecta de suelo. En junio de 2016 se recolectaron 40 litros de suelo en la zona forestal, en el sendero Darwin dentro de la estación de biología tropical de los Tuxtlas. El suelo se deshidrató con ayuda de gel de sílice y lámparas incandescentes, se tamizó y se guardó en bolsas selladas hasta su procesamiento.

Para conocer la comunidad potencial de HMA en las muestras de suelo las esporas presentes en la muestra de suelo se extrajeron mediante la técnica de tamizado húmedo, siguiendo el protocolo de Álvarez-Sánchez y Monroy-Ata (2008). Para esto, dos muestras de 100 g de suelo se diluyeron en 750 ml de agua, que posteriormente fueron cribadas en una serie de tamices de 0.149, 0.841 y 0.089 mm de apertura. El material capturado en los dos últimos tamices se colocó en tubos de 50 ml y se aforaron con 35 ml de agua; posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 minutos y finalmente se eliminó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en una solución de sacarosa al 40% y se repitió el proceso de centrifugado. El sobrenadante se extrajo y se colocó en cajas

Petri, donde las esporas fueron separadas y categorizadas por morfotipos bajo un microscopio estereoscópico. Las esporas aisladas fueron montadas en preparaciones permanentes en Polivinil-Lacto-Glicerol (PVLG) y PVLG-Reactivo de Melzer 1:1 (INVAM, 2016).

La identificación de las esporas se llevó a cabo bajo la asesoría de la M. en C. Laura Hernández Cuevas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala y siguiendo las descripciones de Varela-Fregoso *et al.* (2008), así como las descripciones y la clasificación del “*International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi*” (<https://invam.wvu.edu>).

Inóculos micorrizicos. Se utilizaron dos fuentes de inóculo de HMA: 1) un inóculo natural que consistió en propagados presentes en el suelo de la región de los Tuxtlas, Ver., (T), y 2) inóculo con una comunidad de HMA determinada (D) proporcionado por la Dra. Dora Trejo Aguilar (Universidad Veracruzana), compuesto por esporas, micelio y fragmentos de raíz colonizados por *Acaulospora scrobiculata*, *Acaulospora spinosa*, *Claroideoglossum etunicatum*, *Funneliformis geosporus*, *Funneliformis mosseae*, *Gigaspora decipiens*, *Gigaspora rosea*, *Glomus aggregatum*, *Glomus macrocarpum*, *Rizhophagus intraradices*, y *Scutellospora pellucida*. Además, se incluyó un tratamiento control sin inóculo micorrizico.

La vermiculita utilizada se esterilizó mediante la irradiación de rayos γ a 50 kGy en la Unidad de Irradiación del Instituto de Ciencias Nucleares de la Universidad Autónoma de México (UNAM). Una fracción de suelo de los Tuxtlas fue esterilizada de la misma forma para su uso en los controles negativos y para el tratamiento que utiliza el inóculo con la comunidad conocida.

5.3 Experimento “Cambio de metabolismo C3 a CAM”

Planeamiento general.

Para inducir el metabolismo C3 y CAM en la piña se utilizaron las condiciones ambientales ya reportadas por Aragón *et al.* (2012) (Cuadro 1). Las plantas de piña y de alfalfa se mantuvieron durante 12 semanas en cámaras de crecimiento controladas para mantener estas condiciones (Marcas: Sanyo MLR-351, Thermo Fisher Scientific Precision Model 818 Incubator, Revco).

Para la piña se tuvieron un total de 6 tratamientos, dado por los dos tipos de inóculo y el control sin inóculo (x3), en las dos condiciones ambientales (x2), con una N final de 20 plantas en cada uno de los tratamientos. En el caso de la alfalfa se tuvo un total de 4 tratamientos, dados por los dos inóculos (x2) y las dos condiciones ambientales (x2), con un N final de 25 plantas en cada tratamiento. Este planteamiento se resume en la Figura 3.

Cuadro 1. Condiciones ambientales que se mantuvieron en las cámaras de crecimiento.

	Condición Alta	Condición Baja
Temperatura	28 °C	25 °C
Humedad relativa	50%	90%
Intensidad lumínica	105 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ *
Irrigación	Escasa	Constante

Las plantas de la condición B permanecieron en tres cámaras con diferente intensidad lumínica. Cuatro semanas con 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, dos semanas con 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y las seis restantes con 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La irrigación escasa se realizó regando con 10 ml de agua dos días a la semana y la irrigación constante se realizó manteniendo el sustrato saturado de agua durante los siete días de la semana.

*Variables de cambio de metabolismo fotosintético y crecimiento de A. comusus y M. sativa. El cambio del metabolismo de *A. comusus* se evaluó calculando la ganancia de carbono, el índice de succulencia, la densidad estomática y el área foliar. La ganancia de carbono se calculó tomando dos hojas (hoja madura y hoja joven) al inicio y al final del fotoperiodo luminoso, y se almacenaron en etanol al 80% a 4 °C hasta la extracción de ácidos orgánicos de las hojas, en el caso de la piña ácido málico.*

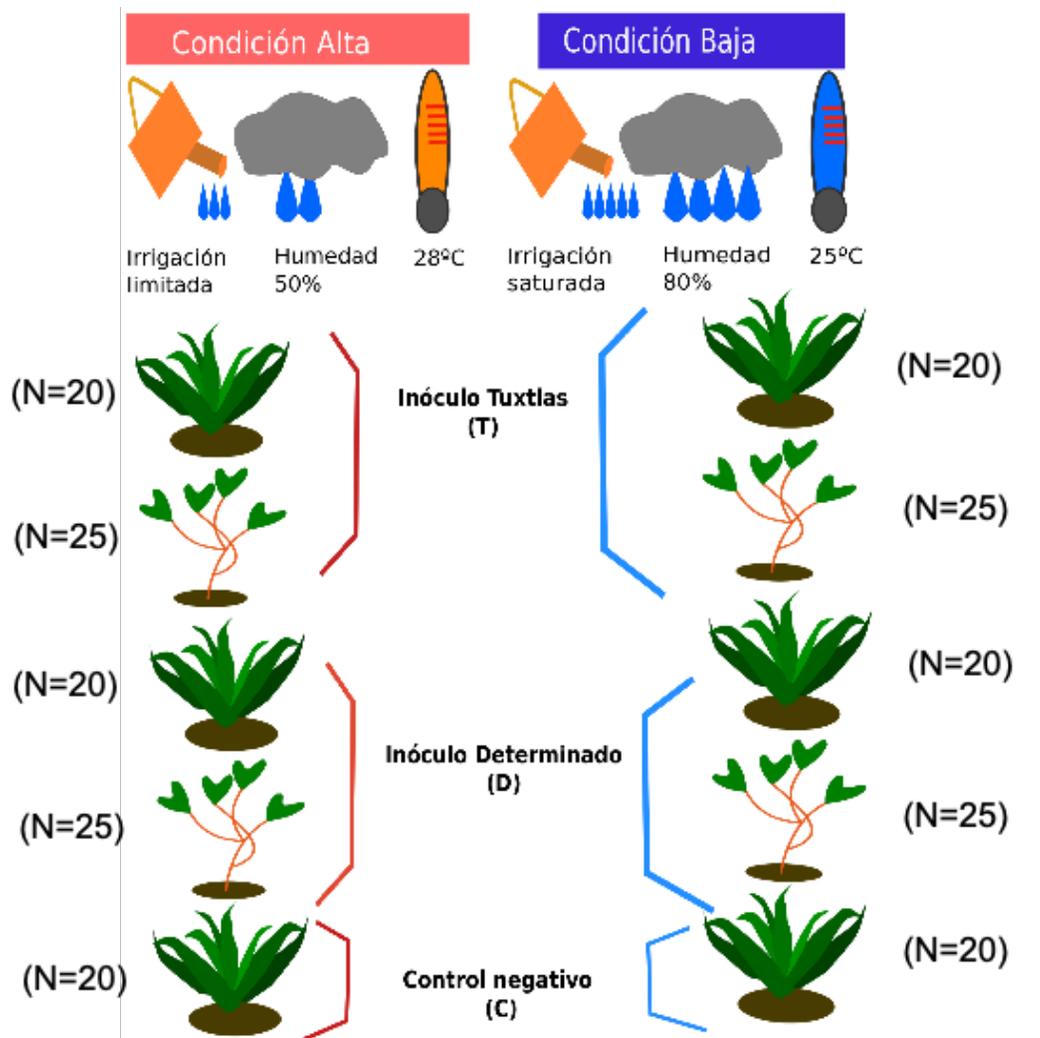


Figura 3. Diseño experimental

La extracción se realizó siguiendo una modificación a la metodología propuesta por Sortibrán-Martínez R. L. (1999). Las muestras se calentaron en una parrilla eléctrica hasta evaporar la mayor parte del etanol, el extracto se llevó a un volumen de 20 ml con agua destilada, y se tituló con KOH 0.01N hasta un pH de 7, y el volumen utilizado para la titulación se empleó para calcular el número de equivalentes de ácido por muestra, utilizando la fórmula de Nobel y Hartsock (1983):

$$Equivalentes = (N)(ml)/g$$

Donde:

N = Normalidad del amortiguador

ml = mililitros de solución utilizados

g = gramos de la muestra

El área foliar se midió a partir de fotografías de todas las hojas de las plantas y utilizando el software ImageJ. El índice de succulencia (IS) se calculó para conocer la proporción entre la biomasa y la cantidad de agua en las hojas. Se utilizó la fórmula de Ogburn y Edwards (2012):

$$IS = (PF - PS)/A$$

Donde:

PF = Peso fresco (g)

PS = Peso seco (g)

A = Área foliar (cm²)

La densidad estomática se calculó tomando impresiones de la cara abaxial de las hojas cubiertas con esmalte de uñas y observando cinco campos al azar de la impresión bajo el microscopio óptico (Olympus BX51). El promedio de número de estomas por campo fue dividido entre el área del campo para calcular la densidad estomática por mm².

El crecimiento de *M. sativa* en cada tratamiento se analizó tomando: peso seco de la parte área (g), altura (cm) y área foliar (cm²). Las variables medidas a las piñas y alfalfas se resumen en el Cuadro 2.

Durante cada semana del experimento se muestrearon sin remplazo dos plantas de cada tratamiento de piña para seguimiento al cambio de metabolismo fotosintético, midiendo las variables del Cuadro 2. Al final del experimento se muestrearon 20 plantas de piña y 25 de alfalfa para medir las variables del Cuadro 2.

Cuadro 2. Variables medidas y resultados esperados en la piña y alfalfa.

Variable Medida	Unidades	Resultado esperado	Planta		Referencia
			Piña	Alfalfa	
Peso seco	g	Mayor peso en plantas C3	x	x	Aragón <i>et al.</i> (2012)
Área foliar	cm ²	Mayor en plantas CAM	x	x	Aragón <i>et al.</i> (2012)
Densidad estomatica	No. estomas/ mm ²	Mayor en plantas CAM	x		Males y Griffiths (2017)
Ganancia de carbono	No. equivalentes/ g	Diferencias al inicio y final del fotoperíodo en plantas CAM	x		Aragón <i>et al.</i> (2012)
Índice de succulencia	g/cm ²	Mayor en plantas CAM	x		Ogburn y Edwards (2012)
Altura	cm	Mayor en plantas micorrizadas		x	Heinemeyer y Fitter, (2004)

5.4 Colonización de raíces por HMA

Para conocer la colonización por HMA al final de las 12 semanas de tratamiento, la mitad del peso fresco de las raíces se fijó en formaldehído-alcohol-ácido acético (FAA), se lavaron en H₂O₂ al 3% durante 7 días y se fijaron en PVLG-Azul de tripano. El porcentaje de colonización se midió utilizando el método de la intersección con rejilla (modificado de Brundrett, 1996). Se seleccionaron diez segmentos de raíz al azar, y se registró la presencia de estructuras micorrizicas (arbusculos, ovillos, esporas y vesículas) en 10 intersecciones, obteniendo un total de 100 campos observados por muestra.

5.5 Análisis de datos

Los datos de las variables de piña medidas (Cuadro 2) durante las 12 semanas del experimento fueron graficados utilizando el paquete ggplot2 (Wickham 2016). Debido a la baja N en estos datos (N=2) no se realizaron pruebas estadísticas para probar diferencias entre tratamientos y durante el transcurso del tiempo. Los datos se analizaron utilizando estadística descriptiva.

Al finalizar el experimento, analizamos las diferencias estadísticas de los datos de ganancia de carbono, área foliar, densidad estomática e índice de succulencia de las plantas de piña. La ganancia de carbono entre las piñas de la condición Alta y Baja fue analizado con una *t* de Student, y en cada tipo de inóculo los equivalentes del inicio y fin del fotoperíodo con un ANOVA.

Los datos de crecimiento de piña (área foliar, número de estomas, peso seco e índice de succulencia) fueron analizados con una ANOVA factorial. Cuando los datos no cumplieron los supuestos de un ANOVA fueron transformados para cumplir los supuestos (Anexo). Mientras que los datos de crecimiento de alfalfa se analizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

La respuesta de la colonización a las condiciones, el tipo de inóculo y a la especie de planta fue analizada con un ANOVA factorial. El cumplimiento de los supuestos para este análisis se muestra en Anexos.

Los análisis estadísticos fueron realizados en R Core Team v 3.5.1, y los gráficos fueron realizados con el paquete ggplot2 (Wickham 2016).

VI. RESULTADOS

6.1 Comunidad potencial de HMA en muestras de suelo de los Tuxtlas

En total se fijaron 9 esporas de HMA en PVLG y PVLG-Reactivo de Melzer, de estas esporas cinco fueron identificadas como *Acaulospora* sp. (Figura 4). Dos esporas fueron identificadas como morfotipos Acaulosporoides, pero debido a su estado de maduración la identificación no se pudo realizar (Figura 5 y 6). Una espora fue identificada como *Gigaspora* sp. (Figura 7).

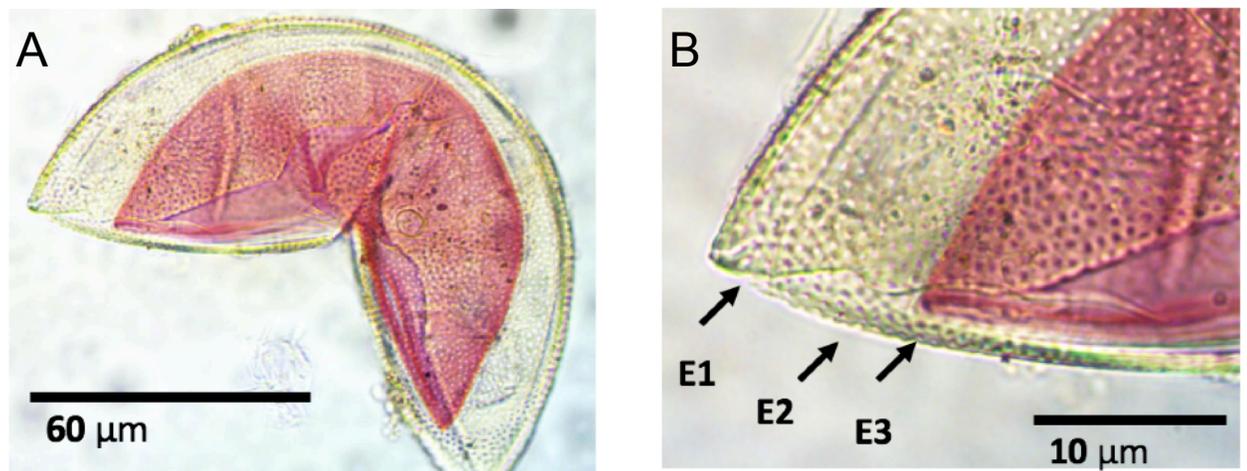


Figura 4. Morfotipo de *Acaulospora* sp.

A) Se observa ornamentación en la capa externa del estrato más externo y reacción dextrinoide al reactivo de Melzer en la capa más interna del estrato interno. B) Acercamiento del morfotipo de *Acaulospora* sp. El estrato externo (E1) se encuentra ornamentado en su capa más externa, seguida de un estrato medio (E2) y un estrato más interno (E3), que presenta reacción al reactivo de Melzer y ornamentación tipo “beaded”.

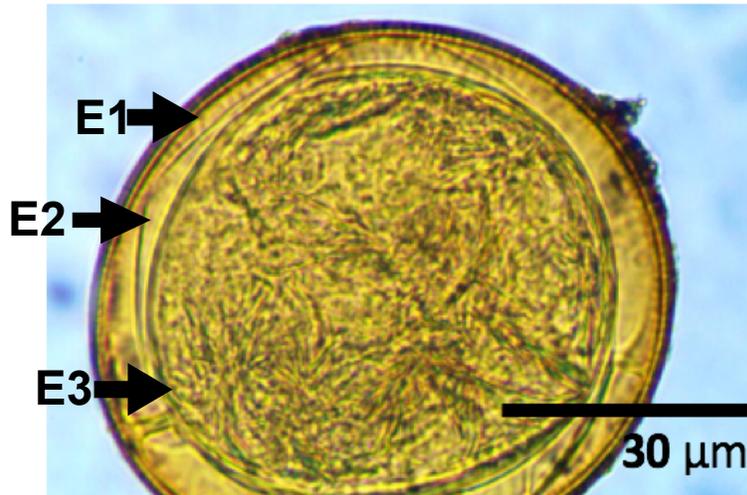


Figura 5. Espora Acaulosporoide. Se observan tres estratos (E1, E2 y E3) y no hay ornamentación. No presentan una reacción al reactivo de Melzer.

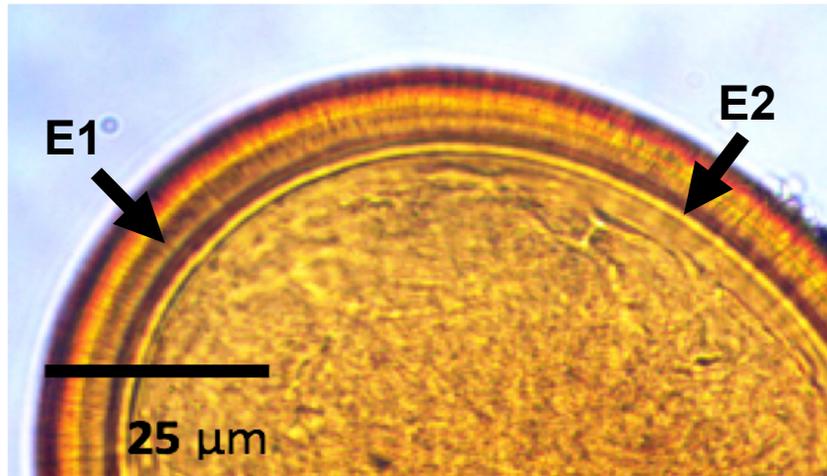


Figura 6. Espora Acaulosporoide. Se observan dos estratos (E1 y E2) y no se observa ornamentación. No presentan una reacción al reactivo de Melzer.

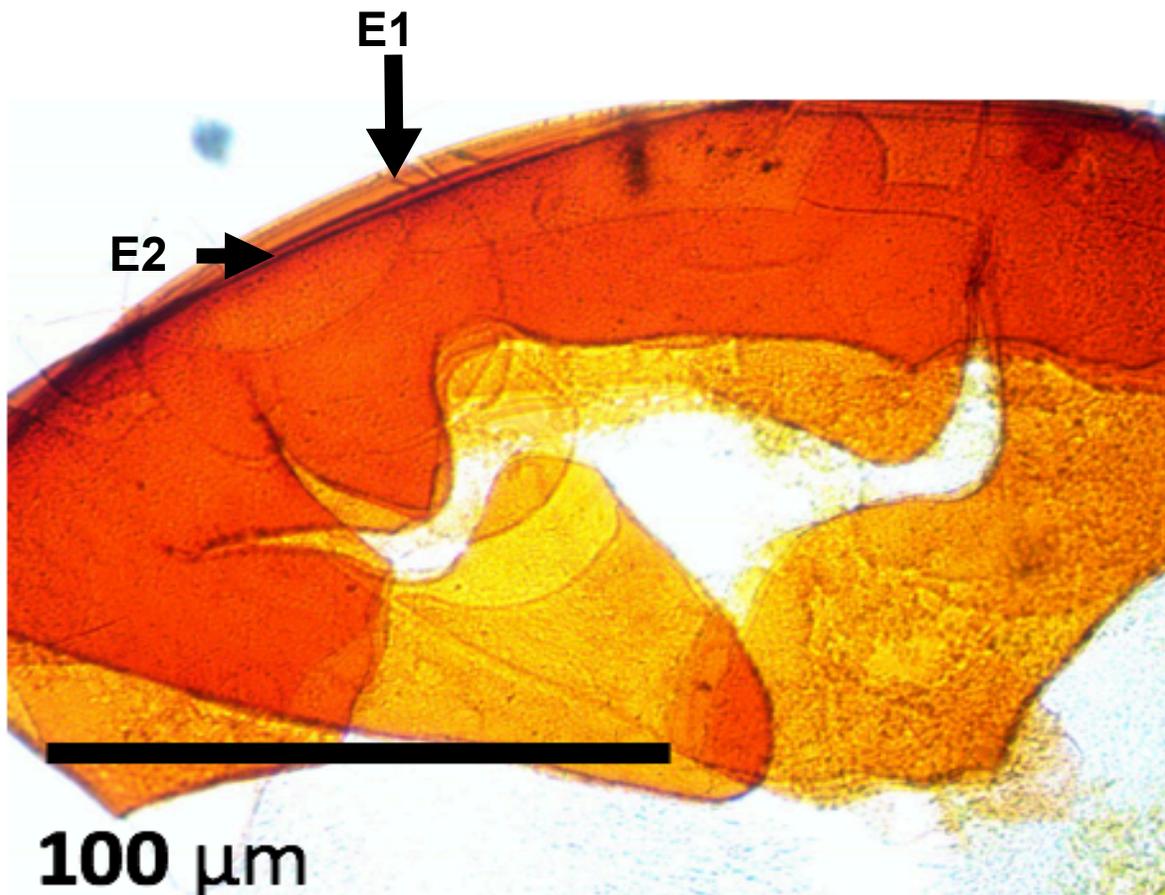


Figura 7. Espora de *Gigaspora* sp. Se observan dos estratos y con coloración amarilla. No presentan una reacción al reactivo de Melzer.

6.2. Metabolismo fotosintético de la piña durante el desarrollo del experimento

En las Figuras 8 a la 11 se muestran los cambios en los pesos secos (g), área foliar (cm²), densidad estomática (mm⁻²) y ganancia de carbono (No.equivalentes de ácido/g), registrados durante las 12 semanas del experimento en las plantas de piña.

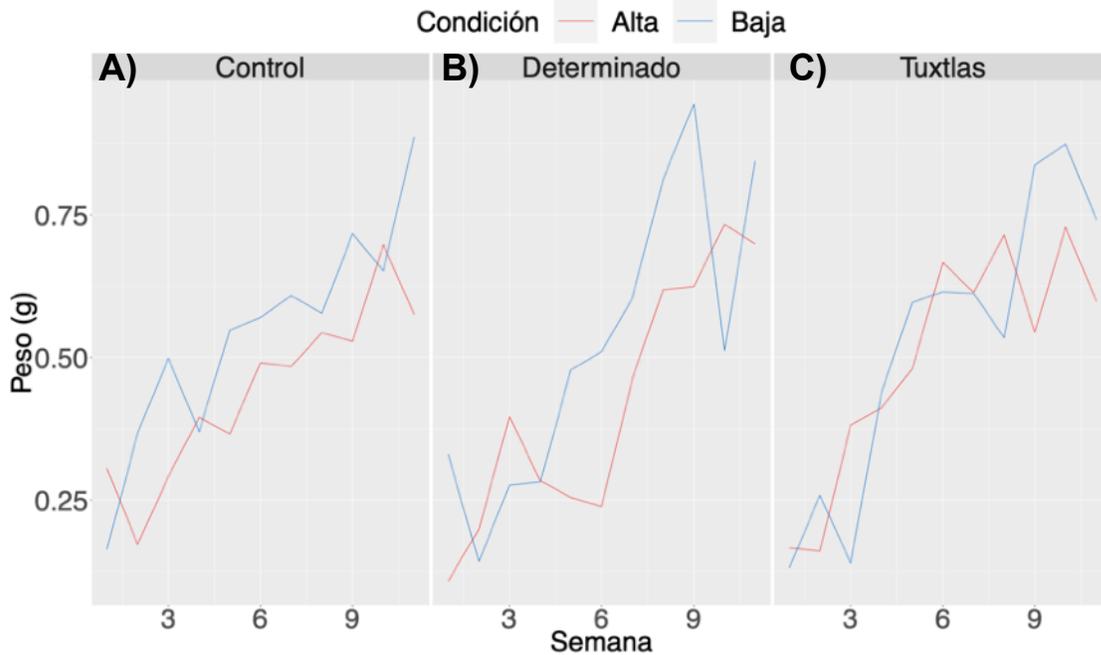


Figura 8. Efecto de la condición Alta (28°C, 50%HR, irrigación baja), condición Baja (25°C, 80%HR, irrigación alta) sobre el peso seco (g) de las piñas (n=2) durante las 12 semanas de tratamiento; A) grupo control B) con inóculo determinado (C) con inóculo del suelo de los Tuxtlas.

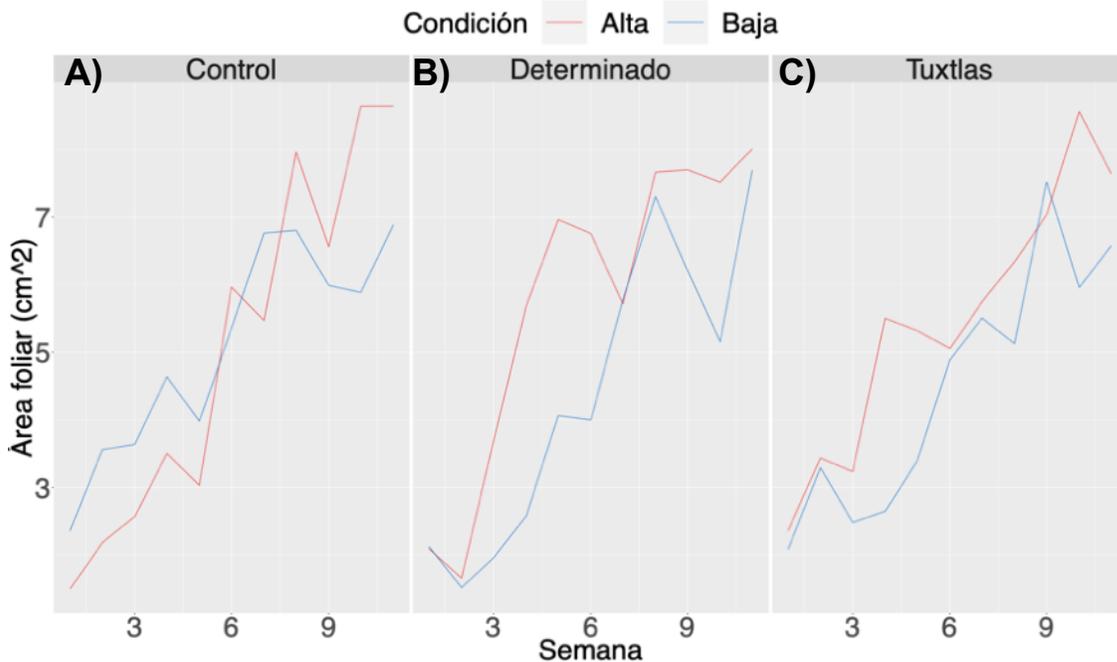


Figura 9. Efecto de la condición Alta (28°C, 50%HR, irrigación baja), condición Baja (25°C, 80%HR, irrigación alta) sobre el área foliar (cm²) de las piñas (n=2) durante las 12 semanas de tratamiento; A) grupo control B) con inóculo determinado (C) con inóculo del suelo de los Tuxtlas.

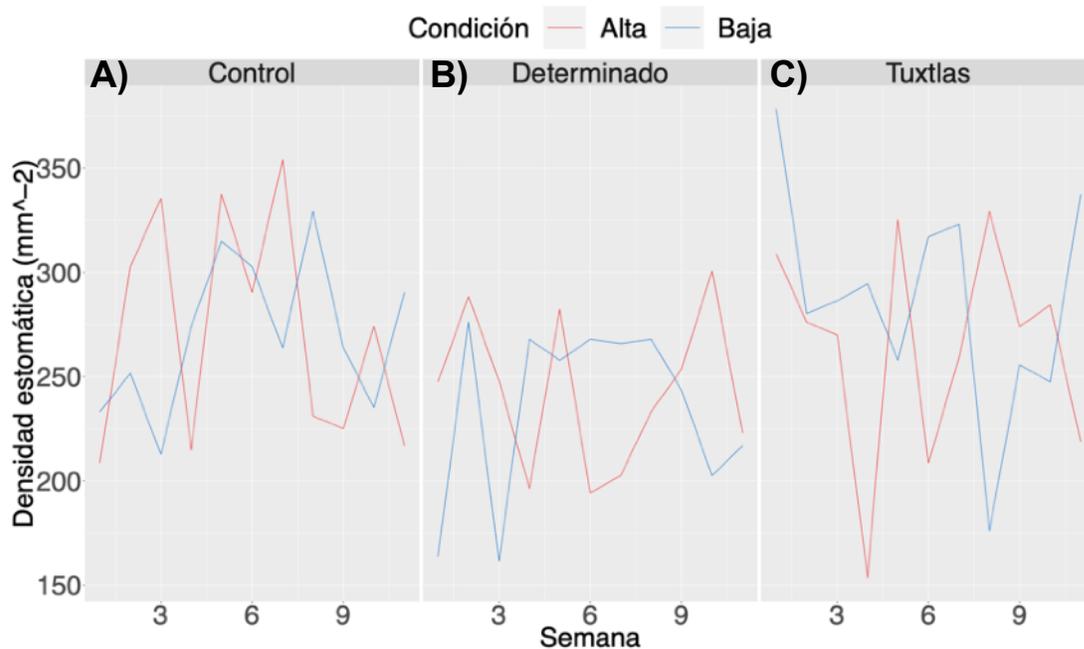


Figura 10. Efecto de la condición Alta (28°C, 50%HR, irrigación baja), condición Baja (25°C, 80%HR, irrigación alta) sobre la densidad estomática (mm⁻²) de las piñas (n=2) durante las 12 semanas de tratamiento; A) grupo control B) con inóculo determinado (C) con inóculo del suelo de los Tuxtlas.

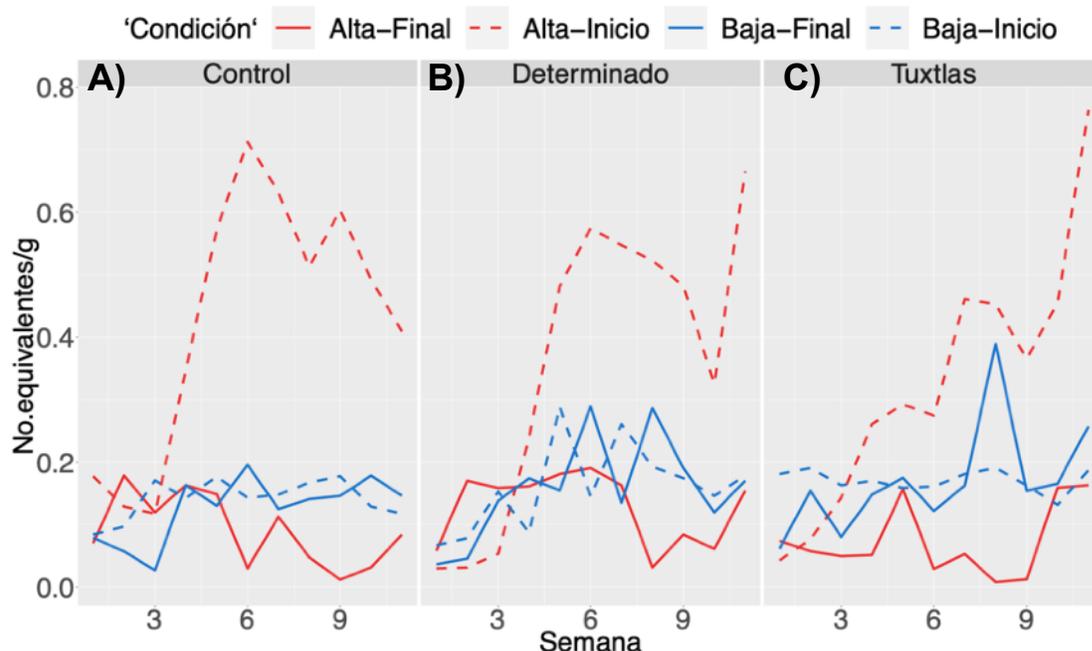


Figura 11. Efecto de la condición Alta (28°C, 50%HR, irrigación baja), condición Baja (25°C, 80%HR, irrigación alta) sobre la ganancia de carbono (No. equivalentes/g) de las piñas (n=2) durante las 12 semanas de tratamiento; A) grupo control B) con inóculo determinado (C) con inóculo del suelo de los Tuxtlas.

Los resultados de las medias de las variables presentadas a continuación, y de las pruebas de Tukey cuando fueron realizadas, se incluyen en la sección de Anexos.

6.3. Cambio de metabolismo fotosintético y crecimiento de *A. comosus* y *M. sativa*

6.3.1. Ganancia de carbono en *A. comosus*

Los resultados de la ganancia de carbono, medidos con el número de equivalentes de ácido málico por gramo de tejido, al inicio del fotoperíodo luminoso en la condición Alta y Baja se muestran en la Figura 12.

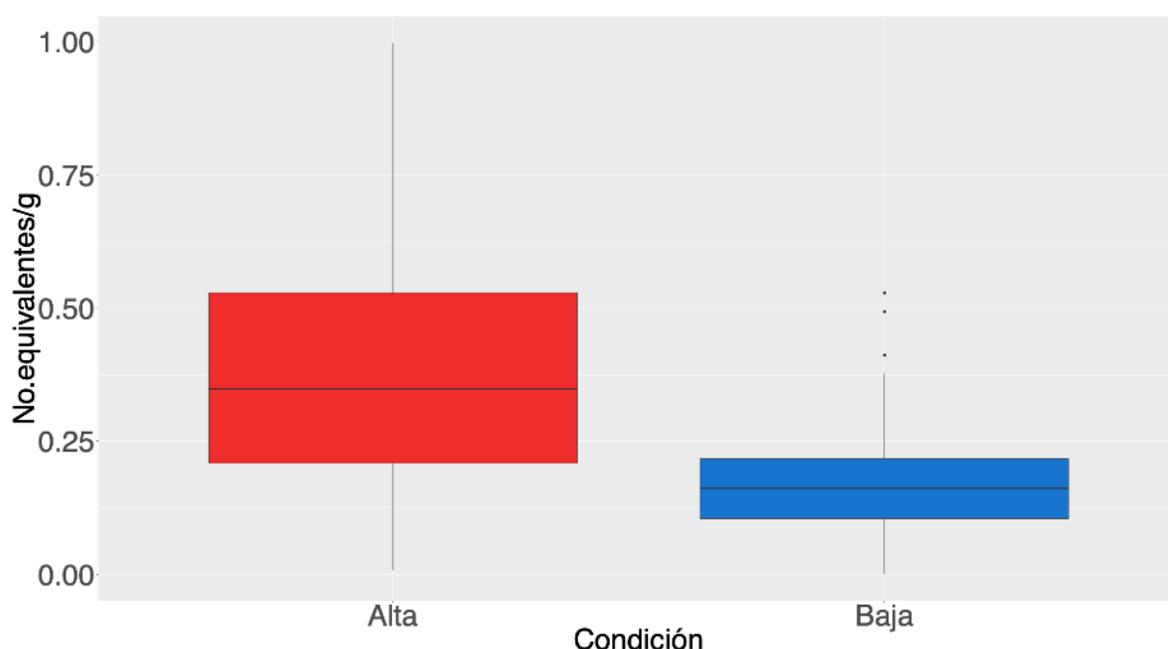


Figura 12. Ganancia de carbono (No.equivalentes de ácido/g de tejido) del periodo luminoso en la condición Alta (28°C, 50%HR, irrigación baja) y condición Baja (25°C, 80%HR, irrigación alta) al final del experimento (N=60 para cada condición).

La prueba *t* de Student de los datos transformados arrojó que hay diferencias significativas entre las medias, media A= 0.060, media B=0.355, de los dos tratamientos ($t=8.5321$, $p<0.05$).

La ganancia de carbono registrada en las plantas de piña al inicio y final del fotoperíodo luminoso, según el tipo de inóculo están representados en la Figura 13.

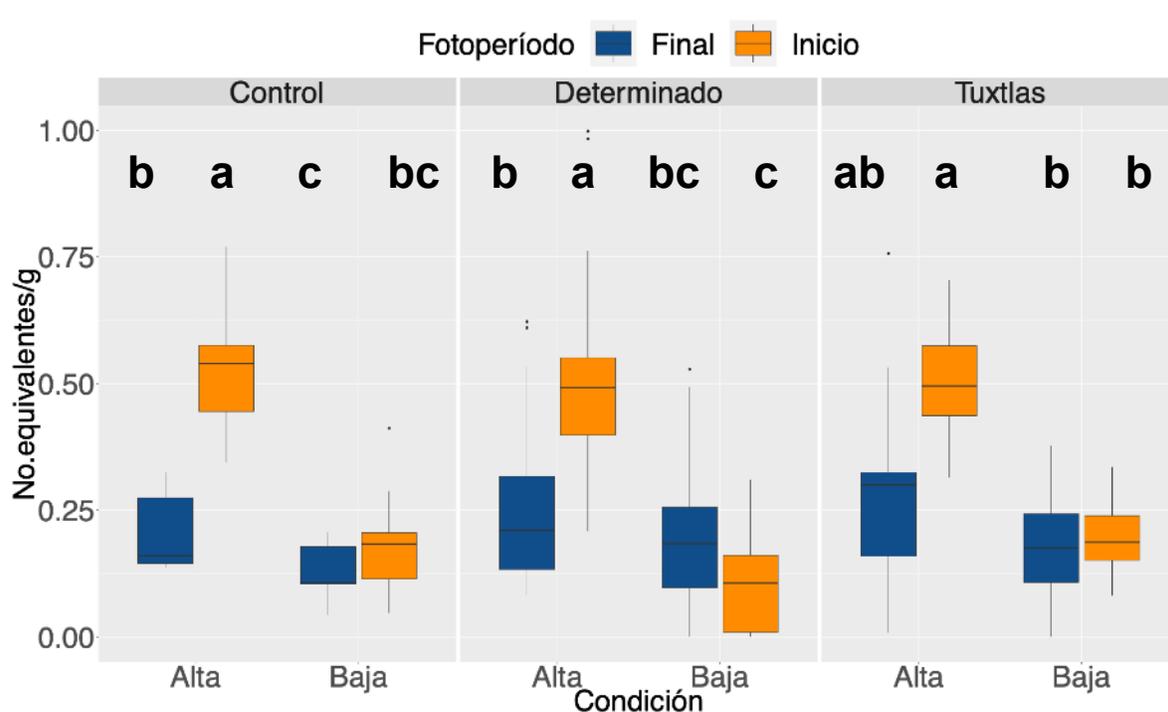


Figura 13. Ganancia de carbono (No.equivalentes de ácido /g de tejido) en las plantas de piña en la condición Alta (28°C, 50%HR, irrigación baja) y condición Baja (25°C, 80%HR, irrigación alta), al inicio y final del período luminoso. A) Grupo control B) con inóculo determinado (C) con inóculo del suelo de los Tuxtlas. (N= 20 en cada condición y tiempo). Las letras minúsculas diferentes indican diferencias entre los grupos de acuerdo a prueba de Tukey ($p<0.05$).

El ANOVA mostró diferencias significativas entre los niveles de cada tipo de inóculo: control ($F_{0.05, 19} = 45.133$, $p<0.05$), inóculo determinado ($F_{0.05, 19} = 20.558$,

$p < 0.05$) e inóculo de los Tuxtlas ($F_{0.05,19} = 13.714$, $p < 0.05$). Los resultados de la prueba de Turkey para cada inóculo se muestran en la Figura 13.

6.3.2. Área foliar en *A. comosus*

El área foliar de las plantas de piña en cada tratamiento fue analizada con un ANOVA factorial, mostrando valores no significativos en la interacción entre la condición ambiental y el tipo de inóculo ($F_{0.05, 19} = 0.567$, $p = 0.568$). Analizando cada factor, el inóculo y la condición ambiental mostraron ser factores de variación significativos ($F_{0.05, 19} = 6.657$, $p < 0.05$ y $F_{0.05, 19} = 39.296$, $p < 0.001$, respectivamente). Los resultados de la prueba de Tukey para estos factores se muestran en la Figura 14 y Figura 15.

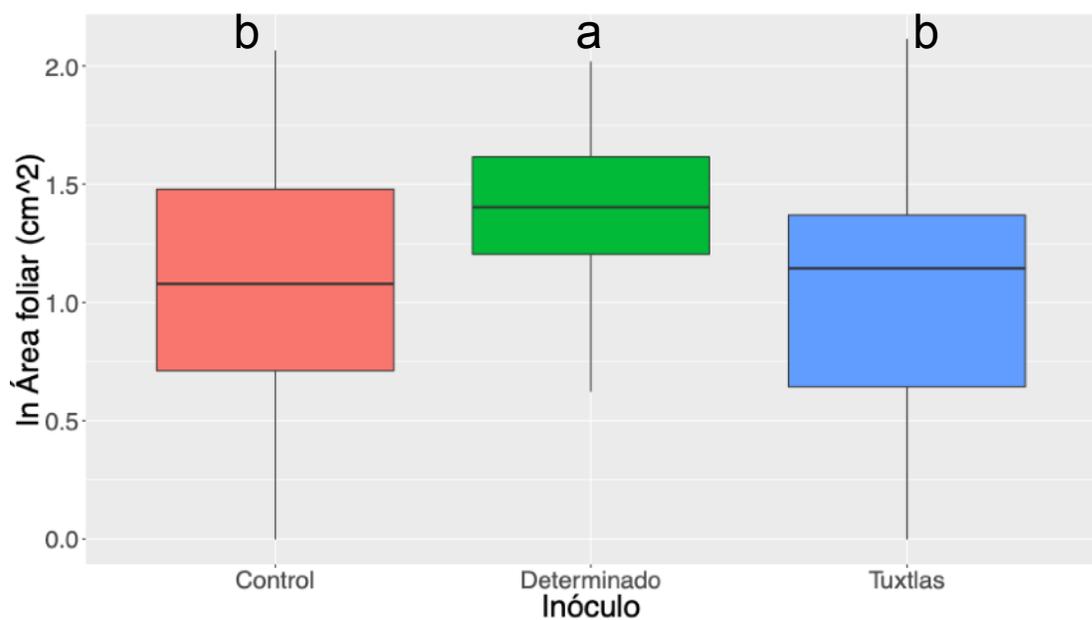


Figura 14. Logaritmo natural del área foliar de piñas con los tres tipos de inóculo. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias entre los grupos de acuerdo a prueba de Tukey ($p < 0.05$). (N= 20 en cada tratamiento)

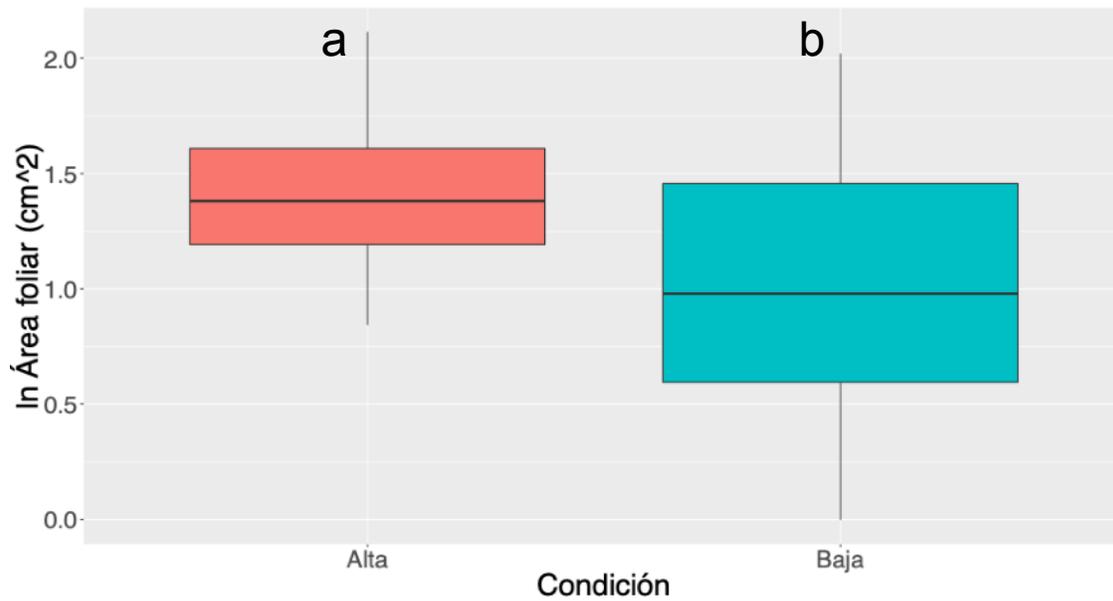


Figura 15. Logaritmo natural del área foliar de piñas en las dos condiciones. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias entre los grupos de acuerdo a prueba de Tukey ($p < 0.05$). (N=20)

6.3.3. Densidad estomática en *A. comosus*

El ANOVA para la densidad estomática no mostró una interacción significativa entre la condición y el tipo de inóculo ($F_{0.05, 19} = 2.228$, $p = 0.112$), ni para el factor condición ($F_{0.05, 19} = 0.799$, $p = 0.792$), pero resultó significativa para el factor inóculo ($F_{0.05, 19} = 5.442$, $p < 0.05$), mostrándose en la Figura 16.

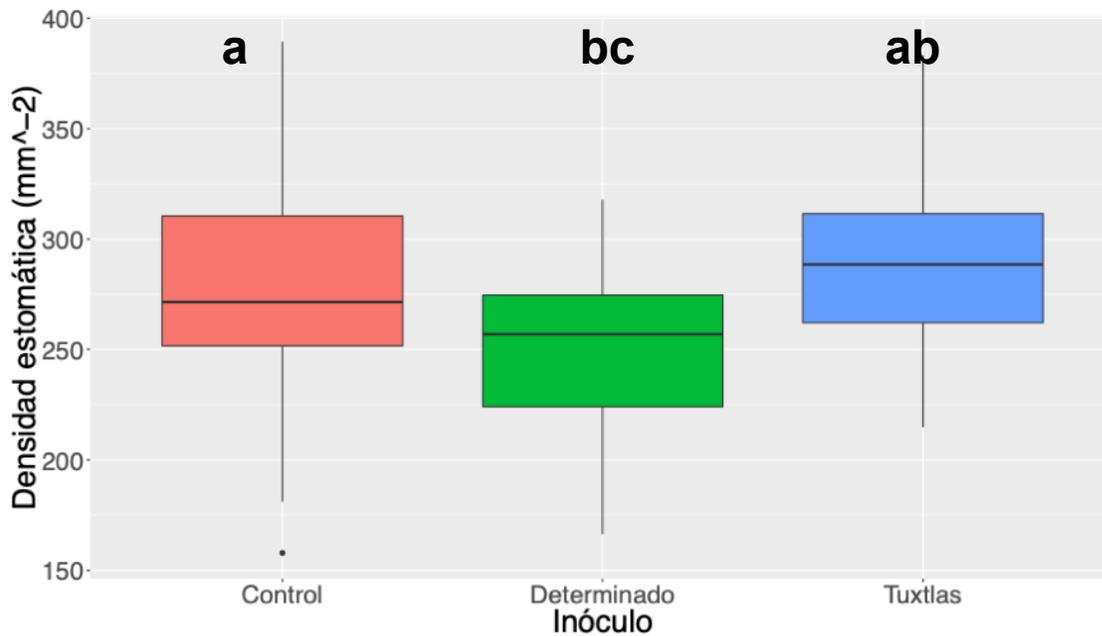


Figura 16. Densidad estomática de piñas con los tres tipos de inóculo. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias entre los grupos de acuerdo a prueba de Tukey. ($p < 0.05$). (N=20).

6.3.4. *Peso seco en A. comosus*

El ANOVA factorial para el peso seco mostró una diferencia significativa en la interacción entre la condición y el inóculo ($F_{0.05, 19} = 3.07$, $p < 0.05$), como se muestra en la Figura 17.

6.3.5. *Índice de succulencia en A. comosus*

El índice de succulencia calculado para cada tratamiento fue analizado con un ANOVA factorial, que solo mostró significativo el factor condición ($F_{0.05, 19} = 106.810$, $p < 0.001$). La interacción condición:inóculo ($F_{0.05, 19} = 1.21$, $p = 0.301$), y el factor inóculo ($F_{0.05, 19} = 1.64$, $p < 0.19$) no resultaron significativos. Los resultados para el factor Condición se muestran en la Figura 18.

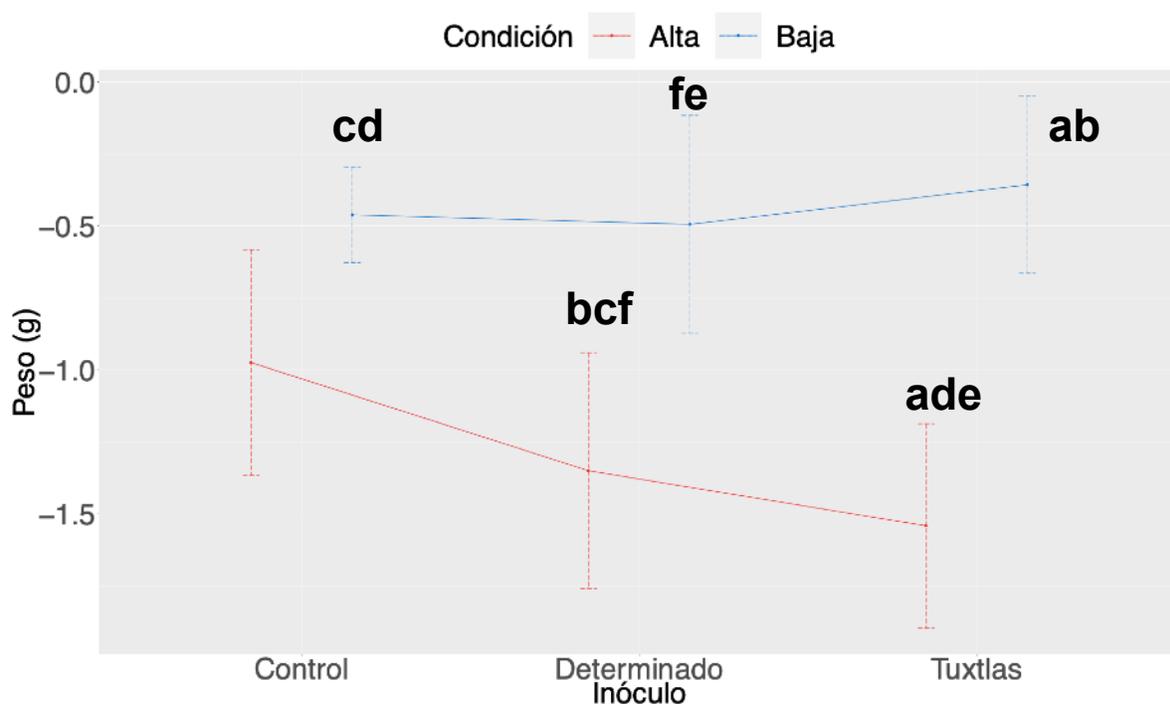


Figura 17. Peso (g) de piñas en la interacción condición:inóculo. Las letras minúsculas iguales indican diferencias entre los grupos de acuerdo a prueba de Tukey ($p < 0.05$), líneas representan intervalos de confianza al 95%.

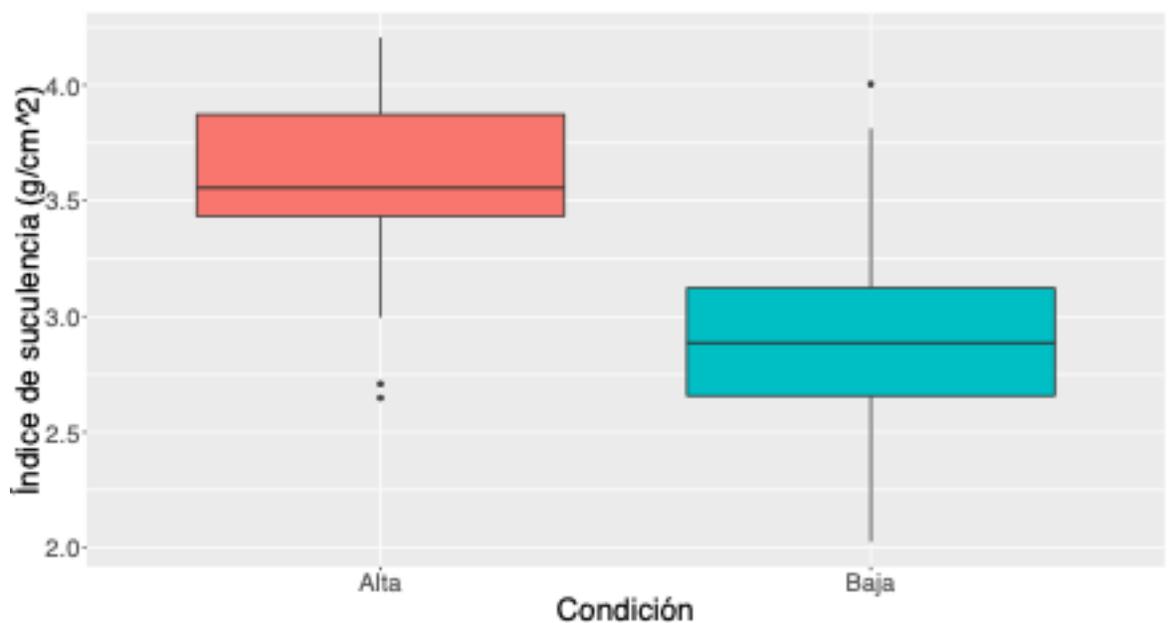


Figura 18. Índice de succulencia (g/cm^2) de las piñas en condición Alta (28°C , 50%HR, irrigación baja) y la condición Baja (25°C , 80%HR, irrigación alta). (N=20).

6.3.6. *Peso seco de M. sativa*

El peso seco para cada tratamiento en las plantas de alfalfa fue analizado con una prueba de Kruskal-Wallis, prueba no paramétrica, la cual no encontró diferencias entre los tratamientos ($\chi^2=5.394$, $p>0.05$). Los pesos se representan en la Figura 19.

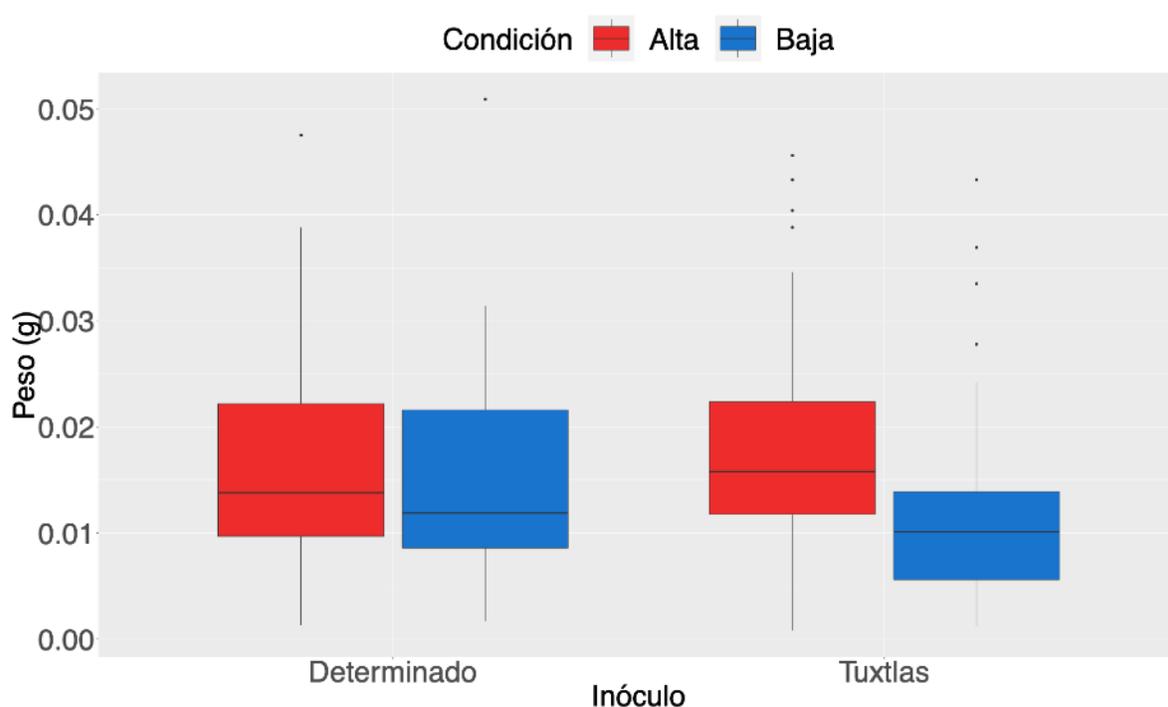


Figura 19. Peso seco de las plantas de alfalfa (g) en cada tratamiento. (N=25).

6.3.6. *Altura de M. sativa*

La prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas entre las alturas de las plantas de alfalfa en los diferentes tratamientos ($\chi^2=5.158$, $p>0.05$). La altura de las plantas se presentan en la Figura 20.

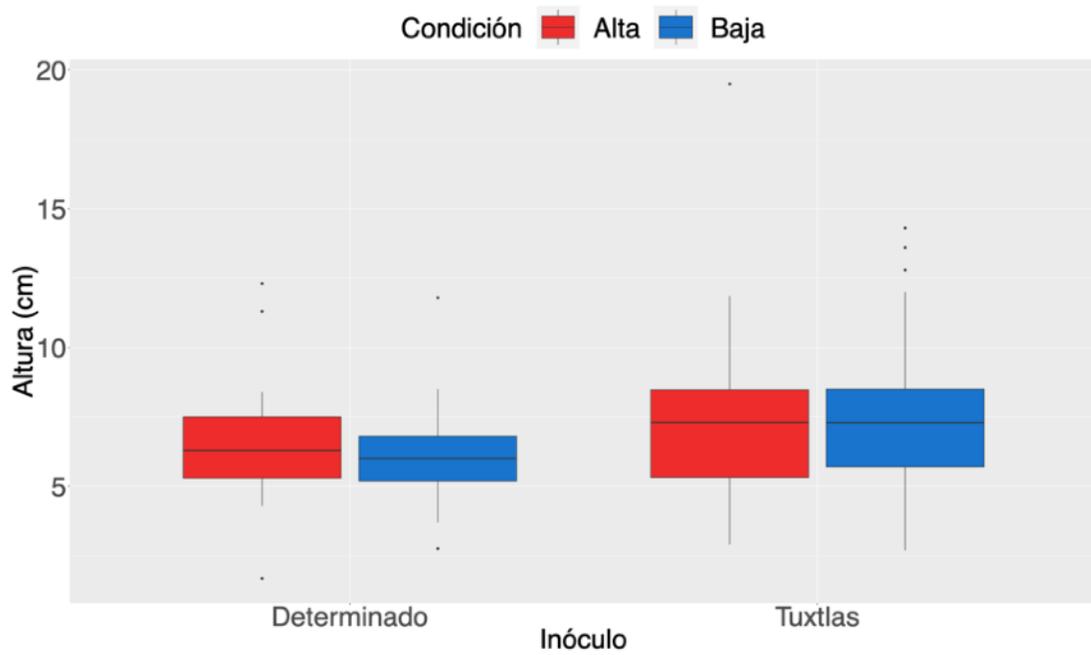


Figura 20. Altura de las plantas de alfalfa(cm) en cada tratamiento de alfalfa. (N=25).

6.3.7. Área foliar de *M. sativa* La prueba de Kruskal-Wallis no encontró diferencias significativas entre los tratamientos ($\chi^2=5.158$, $p>0.05$). Las áreas foliares se presentan en la Figura 21.

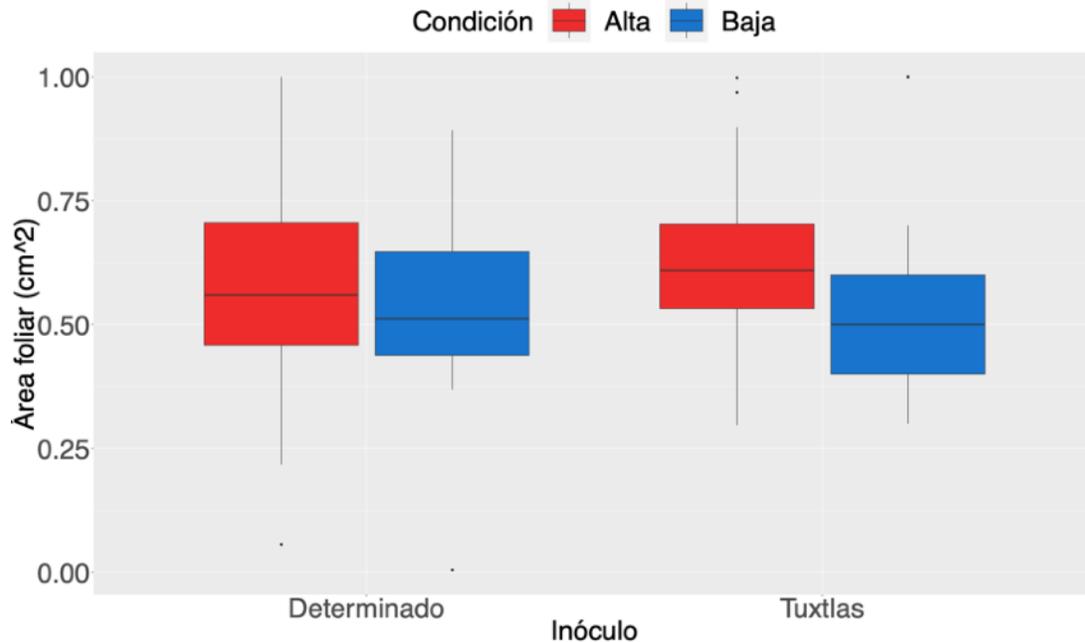


Figura 21. Área foliar de las plantas de alfalfa (cm²) en cada tratamiento.(N=25).

6.4. Colonización en plantas de piña y alfalfa

La revisión de las preparaciones de raíz en PVLG y azul de tripano en los controles negativos no mostraron micorrización. En las preparaciones con el inóculo de los Tuxtlas y en el inóculo determinado se encontró la presencia de vesículas, arbuscúlos y micelio extraradical en las raíces (Figura 22).

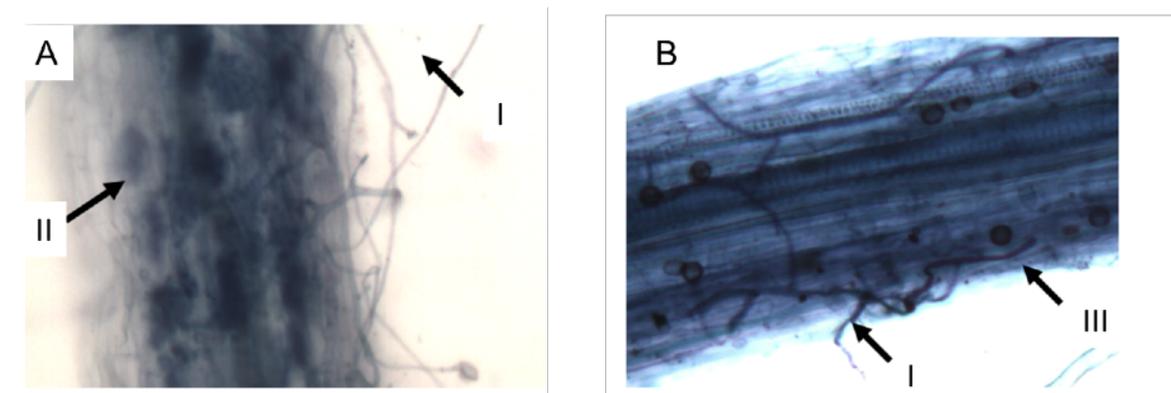


Figura 22. Muestra de raíz micorrizada. A) Se observa la presencia de micelio (I) y de arbuscúlos (II). B) Muestra de raíz micorrizada donde se observa presencia de micelio (I) y vesículas (III).

Los datos de colonización para cada tratamiento de alfalfa y piña fueron analizados con un ANOVA factorial. La interacción de los tres factores analizados (planta, inóculo y condición) no resultó significativa ($F_{0.05, 19}=3.141$, $p=0.078$). Las interacciones de segundo orden que fueron significativas fueron las de inóculo:planta ($F_{0.05, 19}=27.293$, $p<0.001$) y condición:planta ($F_{0.05, 19}=21.862$, $p<0.001$), mientras que la interacción condición:inóculo no resultó significativa ($F_{0.05, 19}=1.275$, $p=0.26$) (Figura 23). Los resultados de la prueba post hoc de Tukey para las interacciones significativas, inóculo:planta y condición:planta, se muestran en los Figuras 24 y 25.

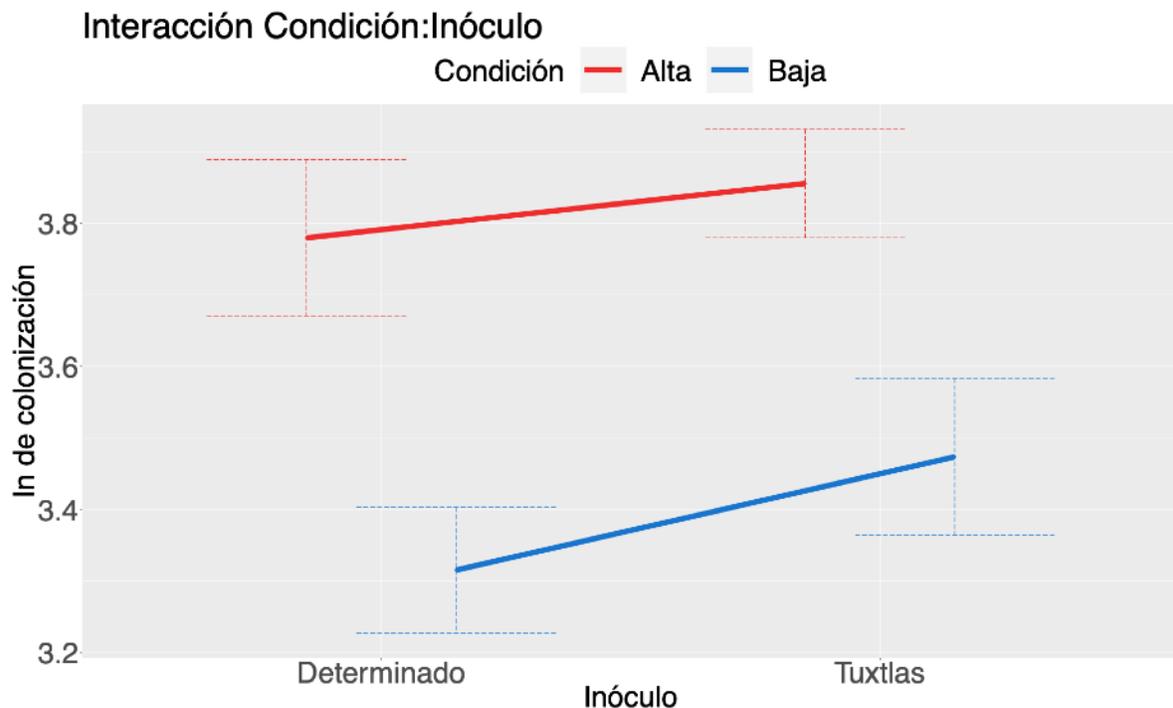


Figura 23. Respuesta de interacción condición:inóculo en colonización. Las barras representan los intervalos de confianza al 95%.

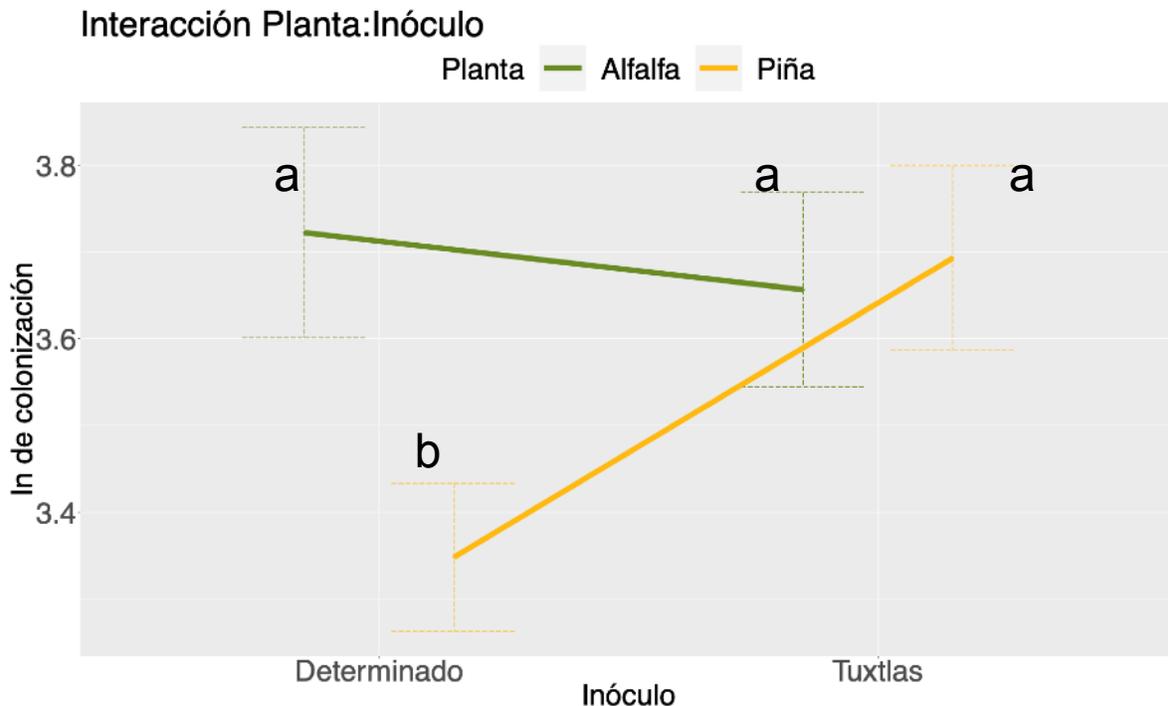


Figura 24. Respuesta de interacción inóculo:planta en colonización. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias entre los grupos de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$), las barras representan los intervalos de confianza al 95%.

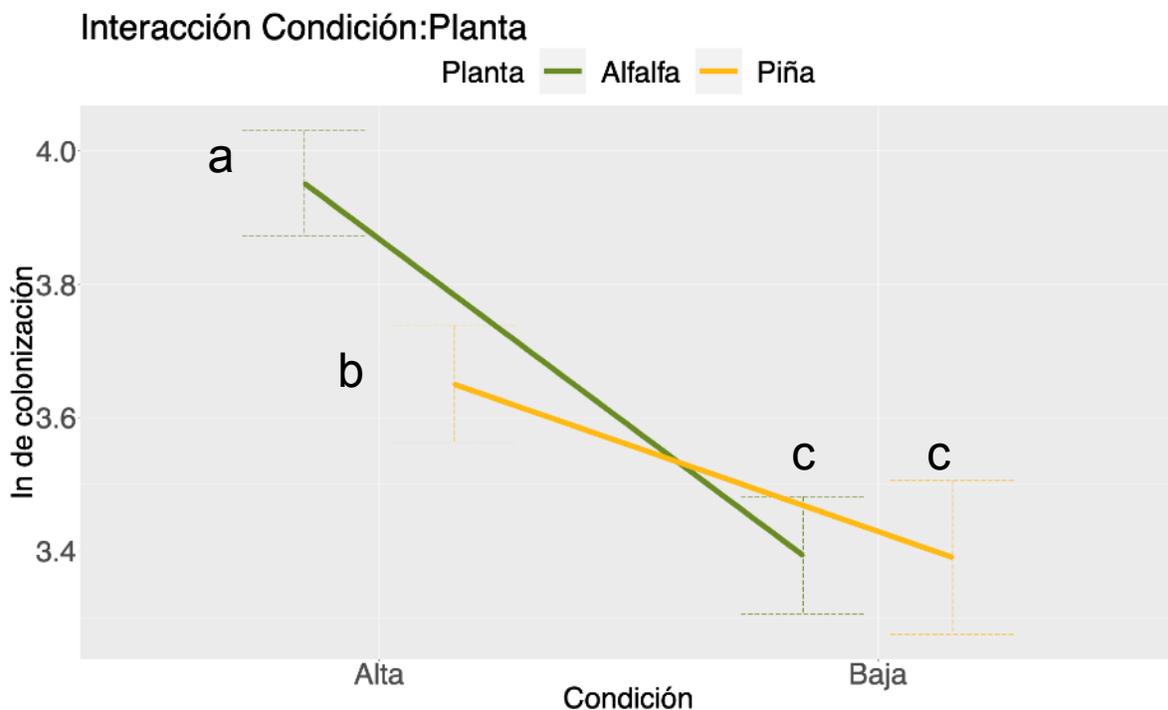


Figura 25. Respuesta de interacción planta:condición en la colonización. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias entre los grupos de acuerdo a prueba de Tukey ($p < 0.05$), las barras representan los intervalos de confianza al 95%.

VII. DISCUSIÓN

7.1 Comunidad potencial de HMA

La extracción e identificación de morfotipos de hongos micorrízicos arbusculares presentes en la muestra de suelo de los Tuxtlas solo logró la identificación de 9 esporas en buen estado, pertenecientes a los géneros *Gigaspora* y *Acaulospora* (Figuras 4-7). Varela-Fregoso (2008) reporta 60 especies de HMA para la región de la Reserva de la biósfera de los Tuxtlas; mientras que Guadarrama y Álvarez-Sánchez (1999) registraron un total de 16 morfoespecies de HMA para ésta región, tres de ellas del género *Acaulospora* y dos de *Gigaspora*. La presencia de estas esporas en el suelo variaba dependiendo de la estacionalidad, encontrando más de 200 esporas en 100 g de suelo durante la época de secas y menos de 50 esporas durante la época de lluvias. Los patrones de esporulación dados por la estacionalidad (temporada seca y humedad) han sido registrados en bosques de pino para hongos de la familia Acaulosporaceae y Gigasporaceae, donde una mayor producción de esporas de la familia Acaulosporaceae se da durante la temporada de lluvias (Violi *et al.*, 2008). Contrario a esto, se encontró una baja presencia de esporas de *Acaulospora* en la muestra tomada de suelo de la región de los Tuxtlas, por lo que este patrón fenológico puede no estar presente en las especies de esta región, o es afectado por otros factores como disturbios (Violi *et al.*, 2008), el estado de desarrollo o la fenología de sus hospederos (Schalamuk *et al.* 2006). La identificación de esporas presentes en el suelo encontró dos especies de HMA como posibles colonizadores para el experimento, pero no se debe descartar la presencia de otro tipo de propágulos como micelio o restos de

raíces de otras especies de HMA que puedan colonizar a las plantas durante el experimento.

7.2 Metabolismo fotosintético de las plantas de piña durante el desarrollo del experimento

Las variables medidas durante el transcurso del experimento mostraron diferencias entre tratamientos y durante el tiempo. El peso seco (Figura 8) y el área foliar (Figura 9) aumentaron conforme transcurrió el experimento. Los datos tomados de densidad estomática no mostraron la tendencia esperada de ser mayor en las plantas de la condición Baja (Figura 10). La ganancia de carbono, medida a través de los equivalentes de ácido en las hojas de piña, mostraron diferencias entre el tiempo en el que se tomó la muestra (inicio o fin del fotoperíodo luminoso) y en diferentes patrones a lo largo del experimento dependiendo de las condiciones ambientales (Figura 11). En las plantas de piña en la condición ambiental Alta (alta temperatura, baja humedad), la acidez en las muestras tomadas en el inicio del fotoperíodo luminoso aumentó conforme el transcurso de las 12 semanas, teniendo el cambio más evidente después de la semana tres. Los equivalentes medidos en esta misma condición pero al final del fotoperíodo luminoso son menores a los medidos al inicio del fotoperíodo luminoso después de la semana tres. En caso de las plantas de piña en la condición Baja (Baja temperatura, alta humedad, alta irrigación), no se observó un patrón de aumento en el número de equivalentes relacionado con el inicio o fin del fotoperíodo luminoso, ni con el transcurso del tiempo durante el experimento

(Figura 11). Aragón *et al.* (2012) y do Couto *et al.* (2016) demuestran el metabolismo CAM facultativo en dos variedades diferentes de *Ananas comosus* sometidas a condiciones ambientales con humedad relativa, temperatura media y radiación fotosintéticamente activa (PAR, por sus siglas en inglés) contrastantes.

7.3 Cambio de metabolismo fotosintético y crecimiento de *A. comosus* y *M. sativa*

Ananas comosus.

El análisis estadístico de los equivalentes en conjunto de cada tratamiento, al inicio del fotoperíodo luminoso encontró diferencias significativas entre las plantas que crecieron en la condición Alta y la condición Baja, siendo las plantas de la condición A las que tuvieron un mayor contenido de equivalentes, es decir mayor contenido de ácido málico por gramo (Figura 12). Dentro de cada tratamiento según el tipo de inóculo, los equivalentes medidos al inicio del fotoperíodo luminoso en la condición Alta siempre fueron mayores a los de la condición Baja, ya fueran del inicio o final del fotoperíodo luminoso (Figura 13). Los equivalentes de las plantas de la condición Baja de cada inóculo y de los grupos control, no mostraron diferencias significativas entre sí, al igual que las plantas de la condición Alta con el inóculo de los Tuxtlas. Contrario a esto, las piñas de la condición Alta del grupo control y con el inóculo determinado mostraron diferencias significativas en el número de equivalentes al inicio y final del fotoperíodo. Estos resultados sugieren un metabolismo diferencial entre las plantas de cada condición, siendo CAM en la condición Alta y C3 en la condición Baja; coincidiendo con los resultados reportados por do Couto *et al.* (2016) y Aragón *et al.* (2012),

donde encuentran diferencias fisiológicas entre plantas de piña con metabolismo CAM y C3.

En cuanto a las variables morfológicas, el área foliar fue influenciada significativamente por las condiciones ambientales y por el tipo de inóculo. Las plantas de la condición Alta presentaron una mayor área foliar en comparación con las de la condición Baja (Figura 15). El área foliar también fue dependiente del tipo de inóculo que presentaban las plantas, siendo diferente en las muestras con inóculo Determinado y de los Tuxtlas, así como las del inóculo Determinado y el Control (Figura 14). La densidad estomática solo fue significativamente afectada por el tipo de inóculo (Figura 15). Se conoce que la disponibilidad de agua influye en cambios anatómicos (diámetro de estomas) y cambios en conductancia estomática (Lawson y Vialet-Chabrand, 2018). La conductancia estomática es afectada por la presencia y/o ausencia de ciertas especies de HMA, resultando mayor en plantas micorrizadas cuya disponibilidad de agua es mayor debido a la capacidad de exploración del micelio en el sustrato (Augé *et.al.*, 2015). En el caso de este experimento, la densidad estomática no fue un factor afectado por las condiciones ambientales, y no fue un indicador para el tipo de metabolismo que expresan las plantas, pero su densidad en las hojas pudo estar afectada por la presencia o ausencia de un inóculo micorrízico, y las especies presentes en éste.

El peso seco de las plantas tuvo un efecto por la interacción del inóculo:condición. El resultado de la interacción analizada muestra que el tipo de inóculo y el ambiente, son factores que influyen en la fijación de biomasa aérea de las plantas con las que se asocian. En nuestro estudio observamos mayor biomasa en plantas inoculadas en la condición de baja temperatura y alta humedad e irrigación (Figura

18). Contrario a lo reportado por Aragón *et al.* (2012), donde el peso seco de las plantas que expresaron un metabolismo CAM (condición Alta) no fue mayor al de las plantas C3 (Condición Baja). Dentro de cada condición también se encontraron diferencias significativas en el peso seco según el tipo de inóculo que presentaban, mostrando que la eficiencia de la simbiosis depende de la afinidad de la comunidad de HMA al ambiente en el que crecen.

El índice de succulencia cambió únicamente con la condición ambiental en la que crecían las plantas, siendo mayor en la condición de alta temperatura y baja humedad e irrigación (Figura 18). Este resultado se esperaba para las piñas que debían presentar un metabolismo CAM en estas condiciones, almacenando una mayor cantidad de agua por área foliar que las plantas que expresan un metabolismo C3 (Ogburn y Edwards, 2012). Las variables medidas en las piñas de este experimento mostraron diferencias atribuibles a las condiciones ambientales, al tipo de inóculo micorrízico o a la interacción entre estos dos factores. Las variables de número de equivalentes de ácido en las hojas, área foliar, peso seco e índice de succulencia fueron diferentes entre las plantas de las dos condiciones ambientales utilizadas, sugiriendo la expresión de metabolismo CAM en la condición de alta temperatura, baja irrigación y humedad, y de un metabolismo C3 en la condición de baja temperatura, alta humedad e irrigación. La diferencia en estas variables concuerda con lo reportado en las plantas de piña con metabolismo C3 y CAM de los experimentos de Couto *et al.* (2016) y Aragón *et al.* (2012), quienes utilizaron condiciones ambientales similares a las reportadas en este estudio. Sin embargo, los autores reportan una mayor biomasa en plantas CAM, en comparación con las plantas C3. Esta diferencia puede deberse a que en

este experimento no se midió la biomasa de la raíz y que las diferencias en la biomasa de este órgano también debe ser tomada en cuenta, o bien a que la variedad de *A. comosus* utilizada se comporta de manera diferente a las variedades utilizadas por estos autores.

Los inóculos micorrízicos utilizados, o la ausencia de este, son factores que afectaron, en conjunto con las condiciones ambientales, o independientemente, el crecimiento de las piñas. Las comunidades de hongos micorrízico arbusculares presentes en los ecosistemas y en las raíces son afectadas por características del suelo, geografía, factores climáticos y, con un menor efecto, por sus plantas hospederas (Xu *et al.*, 2017). Las comunidades de HMA en los dos inóculos utilizados se sometieron a diferentes condiciones ambientales, que influyeron de manera diferencial en las especies de hongos presentes en los inóculos. Diferentes comunidades de HMA afectan el crecimiento de sus plantas simbiotes (van der Heijden *et al.*, 1998), al comportarse como mutualistas o parásitos, dependiendo de la afinidad entre los simbiotes (Klironomos, 2003), lo cual podría explicar las diferencias en el crecimiento de las plantas de piña según el inóculo utilizado.

Medicago sativa.

Las variables tomadas para la alfalfa bajo las dos condiciones ambientales y con los dos tipos de inóculo micorrízico no mostraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos (Figuras 19 a 21). El crecimiento de las plantas micorrizadas, en comparación con las no micorrizadas, puede ser afectado o no por la temperatura dependiendo de la especie de planta (Heinemeyer y Fitter, 2004). Bajo estos tratamientos y con las variables medidas, no fue posible

encontrar diferencias en el crecimiento de *M. sativa* por lo que estas diferencias en las condiciones ambientales específicas no son un factor que altere su crecimiento.

7.4 Colonización en plantas de piña y alfalfa

El porcentaje de colonización en las plantas no fue significativamente afectado por la interacción entre las condiciones ambientales, el tipo de inóculo y la especie de planta, ni por la interacción condición:inóculo, pero sí por la interacción entre la condición ambiental y la planta, el inóculo y el tipo de planta.

Aunque la interacción condición:inóculo no resultó significativa, se observó una mayor colonización en las plantas de piña y alfalfa en la condición Alta (Figura 23).

La temperatura del suelo es un factor que afecta la presencia de HMA. Hawkesy colaboradores (2008) reportaron una mayor presencia de micelio extraradical en suelos con temperatura elevada en comparación con suelos de menor temperatura. Además, los cambios en la temperatura dados por la estacionalidad también modifican la comunidad de HMA (Drumbrell *et al.*, 2011). Diferentes comunidades de HMA responden de manera diferencial a las variables ambientales (Xu *et al.*, 2017). En el caso de la comunidad de HMA de inóculo determinado, 7 de las 11 especies de HMA presentes han sido reportadas como tolerantes a estrés abiótico, especialmente a estrés hídrico: *Funneliformis geosporus*, *Funneliformis mosseae*, *Acaulospora scrobiculata*, *Claroideoglossum etunicatum*, *Glomus aggregatum*, *Glomus macrocarpum*, *Rizhophagus intraradices* (Leinor *et al.*, 2016). A pesar de encontrar especies del género *Acaulospora* en el inóculo de los Tuxtlas, la falta de una identificación con mayor resolución, y que

tome en cuenta otro tipo de propágulos que se encontraban en el suelo, no permite contrastar con otros estudios si las especies presentes en el inóculo son resistentes a estas variables ambientales (temperatura, humedad). La afinidad y tolerancia de las especies de HMA presentes en ambos inóculos se refleja en la mayor colonización encontrada en la condición Alta.

La interacción significativa entre el inóculo y planta (Figura 24) mostró que diferentes comunidades de HMA colonizan de manera diferencial a diferentes especies de plantas. Ambos tipos de inóculo tuvieron diferentes porcentajes de colonización entre sí y, en caso del inóculo determinado, la colonización difirió entre las plantas de piña y alfalfa (Figura 24). Estos resultados sustentan la idea de que la identidad de la planta y su afinidad con la comunidad de HMA influyen en el comportamiento de la simbiosis micorrízica (Klironomos, 2003), mostrando que los hospederos responden de manera diferencial a diferentes comunidades fúngicas (Xu *et al.*, 2017).

La interacción significativa entre condición y planta reveló que las condiciones ambientales en las que crecen las diferentes especies de plantas afectan el porcentaje de colonización. La colonización fue significativamente diferente entre piñas en la condición Alta y Baja, patrón que se repitió en las plantas de alfalfa (Figura 25), mostrando que la condición ambiental tiene un efecto en la colonización. La expresión de diferentes metabolismos en las plantas de piña al crecer en las dos condiciones ambientales se sugiere en la sección 7.3.

Las comunidades HMA presentes en las raíces de las plantas son influenciadas por variables ambientales, la identidad de la planta (Davison *et al.*, 2015) y por la capacidad fotosintética de esta última (Koorem *et al.*, 2017; Grman, 2012). En el

caso de la alfalfa, al ser una C3 obligada, se esperaba no encontrar diferencias en el porcentaje de colonización al crecer en dos condiciones ambientales distintas. Esto no fue así, al no encontrar diferencias significativas en el crecimiento de las alfalfas en ambas condiciones (Figura 25), las diferencias en la colonización se atribuyen a las variables ambientales. A pesar de encontrar diferencias significativas en la colonización de las piñas de la condición Alta (CAM) y piñas de la condición Baja (C3), éstas no pueden ser atribuidas directamente al tipo de metabolismo de fijación de carbono expresado, sin ignorar el efecto que tuvieron las condiciones ambientales en la colonización.

El papel del carbono en la colonización y en la estructuración de las comunidades de hongos micorrízico arbusculares se ha vuelto más evidente (Kiers *et al.*, 2011; Fellbaum *et al.*, 2014; Koorem *et al.*, 2017). En este trabajo se estudió la colonización por HMA en plantas clonales de una misma especie, cuando esta expresaba un metabolismo CAM y uno C3. Sin embargo, no fue posible separar el efecto ambiental del efecto del tipo de metabolismo que expresa una planta (C3 o CAM), midiendo el porcentaje de colonización. A pesar de esto, fue posible confirmar el efecto de las condiciones ambientales y de diferentes comunidades de HMA en el crecimiento de las plantas asociadas a estos. También se encontró el efecto en la micorrización, siendo favorecida por la alta temperatura, baja humedad e irrigación, y siendo afectada por la relación y afinidad entre las plantas hospedadoras y la comunidad de HMA, y por las condiciones ambientales en las que se desarrollan los hongos micorrízico arbusculares.

7.5 Metabolismo de la fijación de carbono en el contexto de los cambios ambientales mundiales

Los modelos de cambio climático predicen cambios en la precipitación y temperatura dados, en parte, por el aumento en la producción de gases de efecto invernadero, como el CO₂ (IPCC, 2014). Los efectos de estos cambios en las plantas han sido estudiados y se han encontrado respuestas fisiológicas que amortiguan el estrés inducido a las plantas. Estos incluyen: represión en la actividad fotosintética, cierre de estomas y menor conductancia estomática, aumento en la respiración celular, incremento en la temperatura de las hojas, almacenamiento de carbohidratos, entre otros (Zandalinas *et al.*, 2018). En este trabajo se mostró el efecto que tienen ciertas variables relacionadas al cambio climático (temperatura, disponibilidad de agua en el suelo y ambiente) con el metabolismo fotosintético de las plantas y su efecto en la colonización por HMA. La colonización fue mayor en condiciones de alta temperatura y baja disponibilidad de agua sin importar la comunidad de HMA presente en el inóculo (Figura 23), encontrándose un efecto significativo de la interacción entre la especie de planta con el tipo de inóculo (Figura 24), y las condiciones ambientales (Figura 25). Este último resultado, junto con las respuestas registradas de la piña a dos condiciones ambientales (Resultados 6.3), mostró que las respuestas fisiológicas ante el estrés hídrico y el calor influyeron en la colonización por HMA. Los HMA pueden recibir hasta un 20% de los fotosintatos producidos por sus plantas simbiotes (Pearson y Jakobsen, 1993) y tienen otros papeles en el ciclo del carbono, al utilizarlo para la construcción de su pared celular y al depositarlo en forma de glomalina en los suelos (Giri y Saxena, 2017). Las variables de disponibilidad de agua y

temperatura utilizadas en este trabajo mostraron tener un efecto en las plantas y en la colonización por HMA, por lo que cambios a escala global de estas variables pueden llevar a cambios en el ciclo de carbono de los ecosistemas, modificando la cantidad que es respirada y depositada en los suelos. Si bien el efecto puede estar dado por el tipo de metabolismo expresado por las plantas, por las condiciones ambientales, o por la combinación de ambas, queda por ser estudiado el alcance de estos efectos y la evaluación de la necesidad de inocular a las plantas para favorecer ecosistemas y cultivares más resilientes al cambio climático (Martínez-García *et al.*, 2017).

VIII. CONCLUSIONES

La comunidad de esporas de HMA encontradas en muestras del suelo de los Tuxtlas, Ver., utilizado como inóculo natural en este trabajo, contenía únicamente dos morfotipos acaulosporoides: un morfotipo del género *Acaulospora* y uno del género *Gigaspora*.

Las dos condiciones ambientales utilizadas en el experimento generaron diferencias morfológicas (área foliar) y fisiológicas (ganancia de carbono, biomasa, índice de succulencia) de *A. comosus* que sugieren la expresión diferencial del metabolismo de fijación de carbono durante y al finalizar las 12 semanas del tratamiento.

El porcentaje de colonización en plantas de piña con metabolismo C3 y CAM, así como en una planta C3 obligada (*M. sativa*), fue diferente en dos condiciones ambientales y con dos tipos de inóculos micorrízicos. No fue posible separar el efecto de las condiciones ambientales, utilizadas para inducir piñas C3 y CAM, en la colonización por HMA, por lo que no se puede atribuir que las diferencias en el porcentaje de colonización sean debidas al tipo de metabolismo de fijación de carbono.

IX. PERSPECTIVAS

Los hongos micorrízicos arbusculares, así como sus plantas simbiotes, pueden detectar y regular la cantidad de nutrientes que translocan a su simbiote. Este trabajo es una aportación al conocimiento de cómo es afectada la simbiosis micorrízica por el tipo de metabolismo de fijación de carbono de su hospedero, por

los factores ambientales y por el uso de diferentes especies de HMA y de plantas hospederas. Encontramos que es necesario tener modificaciones en el diseño experimental como: el uso de niveles que incluyan las diferentes combinaciones de factores ambientales, la evaluación de la micorrización en plantas que pasan de una condición ambiental a otra, el uso de la biotecnología para la propagación de una planta de piña que no cambie su metabolismo fotosintético al cambiar las condiciones ambientales, suprimiendo su metabolismo facultativo; así como la medición de variables de respuesta que aseguren el cambio de metabolismo de las plantas (e.g. conductancia estomática, cuantificación de ácido y clorofila en hojas) que ayudarían a responder de manera más exacta y precisa la hipótesis planteada. De igual forma, proponemos el uso de la metasecuenciación para conocer las comunidades de HMA en los inóculos, especialmente el de los Tuxtlas, y la evaluación del efecto de las variables utilizadas en la riqueza y composición de las comunidades de estos hongos. En un ambiente donde las temperaturas ambientales están en aumento, y donde la precipitación y humedad del suelo disminuyen, los estudios acerca de cómo es afectado el metabolismo de las plantas y este a la simbiosis micorrízica servirán para reconocer si las comunidades de estos hongos pudiese ser afectada en términos de funcionalidad, riqueza y diversidad. También podrían aportar información acerca de cómo se comporta la simbiosis micorrízica en términos de la cantidad de nutrientes que se translocan en diferentes condiciones ambientales, entre diferentes grupos funcionales, lo que permitirá conocer su efecto en los ciclos de C y P, y permitir el desarrollo de conocimiento y tecnologías que mantengan la producción estable de los cultivos agrícolas y la diversidad de especies de HMA en los ecosistemas.

X. REFERENCIAS

-Álvarez-Sánchez J. y A. Monroy-Ata. 2008. Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración. Facultad de Ciencias, UNAM, México.

-Aragón, C., L. Carvalho, J. Gónzales, M. Escalona y S. Amancio. 2012. The physiology of *ex vitro* pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by the environmental conditions. *Plant Cell Reproduction* **31**: 757-769.

-Augé R. M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* **11**: 3-42.

-Augé R.M., H.D. Toler, y A.M. Saxton. 2015. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. *Mycorrhiza* **25**: 13-24.

-Blackwell, M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *American Journal of Botany* **98**:426-438.

-Borland A. M., V. A. Barrera-Zambrano, J. Ceusters y K. Shorrocks. 2011. The photosynthetic plasticity of crassulacean acid metabolism: an evolutionary innovation for sustainable productivity in a changing world. *New Phytologist* **191**: 619-633.

-Bothe H., M. Regvar y K. Turnau. 2009. Arbuscular mycorrhiza, heavy metal and salt tolerance. En: Soil Heavy Metals. Sherameti I. y A. Varma. Springer-Verlag, Berlin. p. 87-111.

- Brundrett M., N. Bougher, B. Dell, T. Grove, y N. Malajczuk. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR Monograph 32, Canberra, Australia.
- Brundrett, M.C., y L. Tedersoo. 2018. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*. doi : 10.1111/nph.14976
- Cockburn W. 1985. Variation in the photosynthetic acid metabolism vascular plants: CAM and related phenomena. *New Phytologist*: **101**: 3-24.
- Davison, J., M. Moora, M. Öpik, A. Adholeya, L. Ainsaar, a Bâ, S. Burla, A.G. Diedhiou, I. Hiiesalu, T. Jairus, N.C. Johnson, A. Kane, K. Koorem, M. Kochar, C. Ndiaye, M. Pärtel, Ü. Reier, Ü. Saks, R. Singh, M. Vassar, M. Zobel. 2015. Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science* **127**: 970-973.
- do Couto T., J. da Silva, C. de Oliveira, M. Siqueira, A. Torres, V. Silva y E. Campostrini. 2016. Photosynthetic metabolism and grown of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) cultivated *ex vitro*. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* **28**:333-339.
- Drumbrell A. J., P. D. Ashton, N. Aziz, G. Feng, M. Nelson, C. Dytham, A. H. Fitter y T. Helgason. 2011. Distinct seasonal assemblages of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by massively parallel pyrosequencing. *New Phytologist* **190**: 794-804.
- Fellbaum, C. R., J. A. Mensah, A. J. Cloos, G.E Strahan, P.E. Pfeffer, E.T Kiers, y H. Bücking. 2014. Fungal nutrient allocation in common mycorrhizal networks is regulated by the carbon source strength of individual host plants. *New Phytologist* **203**: 646-656.

- Giri, B. y B. Saxena. 2017. Response of arbuscular mycorrhizal fungi to global climate change and their role in terrestrial ecosystem C and N cycling. En: Mycorrhiza function, diversity, state of the Art. A. Varma, R. Prasad, y N. Tuteja. 305-327. Springer International Publishing.
- Guadarrama P., F. J. Álvarez-Sánchez. 1999. Abundance of arbuscular mycorrhizal fungi spores in different environments in a tropical rain forest, Veracruz, México. *Mycorrhiza* **8**: 267-270.
- Grman E. 2012. Plant species differ in their ability to reduce carbon allocation to non-beneficial arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* **93** (4): 711-718.
- Hawkes, C., I. Hartley, P. Ineson y H. A. Fitter. 2008. Soil temperature affects carbon allocation within arbuscular mycorrhizal networks and carbon transport from plants to fungus. *Global Change Biology* **14**: 1181-1190.
- Heinemeyer A. y A. Fitter. 2004. Impact of temperature on the arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis: growth responses of the host plant and its fungal partner. *Journal of Experimental Botany* **55**: 525-534.
- Hoeksema J. D., V. B. Chaudhary, C. A. Gehring, N. C. Johnson, J. Karst, R. T. Koide, A. Pringle, C. Zabinski, J. D. Bever, J. C. Moore, G. W. T. Wilson, J. N. Klironomos y J. Umbanhowar. 2010. A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology Letters* **13**: 394-407.
- IPCC, 2014. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.

- Kiers, E.T., M. Duhamel, Y. Beesetty, J.A. Mensah, O. Franken, E. Verbruggen, G. A. Kowalchuk, M. M. Hart, A. Bago, T. M. Palmer, S. A. West, P. Vandenkoornhuysen, J. Jansa y C.R. Fellbaum. 2011. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* **333**: 880-882.
- Klironomos, J.N. 2003. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* **84**: 2292-2301.
- Koide R.T. y Kabir Z. 2000. Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate. *New Phytologist* **148**: 511–517
- Koorem K., I. Tulva, J. Davison, T. Jairus, M. Öpik, M. Vasar, M. Zobel y M. Moora. 2017. Arbuscular mycorrhizal fungal communities in forest plants roots are simultaneously shaped by host characteristics and canopy-mediated light availability. *Plant Soil* **410**: 259-271.
- Lawson, T., y S. Vialet-Chabrand. 2018. Speedy stomata, photosynthesis and plant water use efficiency. *New Phytologist*. doi : 10.1111/nph.15330
- Leinoir I., J. Fontaine y A. Lounés-Hadj Saharaoui. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: A review. *Phytochemistry* **123**: 4-15.
- Liu Y., L. Mao, J. Li, G. Shi, S. Jiang, X. Ma, L. An, G. Du y H. Feng. 2015. Resource availability differentially drives community assemblages of plants and their root-associated arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* **386**: 341-355.
- Lüttge U. 2004. Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). *Annals of Botany* **93**: 629–652.

- Males J., y H. Griffiths. 2017. Stomatal biology of CAM plants. *Plant Physiology* **174**: 550-560.
- Martínez-García L.B., G.B. De Deyn, F.I. Pugnaire, D. Kothamasi, y M.G.A. van der Heijden. 2017. Symbiotic soil fungi enhance ecosystem resilience to climate change. *Global Change Biology* **23**: 5228-5236.
- Mclaughlin D.J. y J. W. Spatafora. 2014. The Mycota VII: systematics and evolution, part A. A. Springer, Heidelberg.
- Melo A.S., A.O.A Netto, J.D. Neto, M.E.B, P.R.A. Viégas, L.T.S Magalhães, P.D. Fernandes. 2006. Desenvolvimento vegetativo, rendimento da fruta e otimização do abacaxizeiro cv. Pérola em diferentes níveis de irrigação. *Cienc. Rural* 36: 93–98.
- Moreira B.C, F.C. Mendes, I.R. Mendes, T.A. Paula, P. Prates Junior, L.C.C. Salomão, S.L. Stürmer, W.C. Otoni, A. Guarçoni M., M.C.M. Kasuya. 2015. The interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Piriformospora indica* improves the growth and nutrient uptake in micropropagation-derived pineapple plantlets. *Scientia Horticulturae* **197**: 183-192.
- Nobel P. S y T. L. Hartsock. 1983. Relationships between photosynthetically active radiation, nocturnal acid accumulation, and CO₂ uptake for a crassulacean acid metabolism plant, *Opuntia ficus-indica*. *Plant Physiology* **71**:71-75.
- Ogburn R.M. y J. E. Edwards. 2012. Quantifying succulence: a rapid, physiologically meaningful metric of plant water storage. Quantifying succulence: a rapid, physiologically meaningful metric of plant water storage. *Plant Cell & Environment* **35**:1533-42

- Opik M., M. Zobel, J. J. Cantero, J. Davison, J. M. Facelli, I. Hiiesalu, T. Jairus, J. M. Kalwij, K. Korrem y M. E. Leal. 2013. Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **23**: 411-430.
- Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 763–775.
- Pearson J. N. y I. Jakobsen. 1993. Symbiotic exchange of carbon and phosphorus cucumber and tree arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **124**: 481-488.
- Qiu S., S. Sultana, Z. D. Liu, L. Y. Yin y C. Y. Wang. 2015. Identification of obligate C3 photosynthesis in *Dendrobium*. *Photosynthetica* **53(2)**: 168-176.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Rasband W.S. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018.
- Schalamuk S., S. Velazquez, H. Chidichimo y M. Caballero. 2006. Fungal spore diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with spring wheat: effects of tillage. *Mycologia* **98**: 16-22.
- Sepp S-K., J. Davison, T. Jairus, M. Vasar, M. Moora, M. Zobel y M. Öpik. 2018. Non-random associations patterns in a plant-mycorrhizal fungal network reveal host-symbiont specificity. *Molecular Ecology* **00**: 1-14.
- Smith, S. y D. Read. 2008. Structure and development of ectomycorrhizal roots. In *The Mycorrhizal Symbiosis*, Smith, S., D Read. Academic Press, New York, New York. p. 191- 268.

- Sortibrán Martínez R. L. 1999. Efecto de la inclinación de los cladodios en la intervención de luz y fijación de carbono en *Opuntia puberula*. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Spatafora, J. W., Y. Chang, G. L. Benny, K. Lazarus, M. E. Smith y M. L. Berbee. 2016. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* **108**: 1028-1046.
- Taiz L., E. Zeiger, I. M. Moller y A. S. Murphy. 2014. Plant physiology and development. Sinauer Associates Inc., Sexta edición, 761 pag.
- Ting I. P. 1985. Crassulacean acid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* **39**: 595:622.
- van der Heijden, M.G.A., J.N. Klironomos, M. Ursic, P. Moutoglis, R. Streitwolf-Engel, T. Boller, A. Wiemken, y I.R. Sanders. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* **396**: 69-72.
- van der Heijden, M., M. Martin, M. Selosse, I.R. Sanders. 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present and the future. *New Phytologist* **205**: 1406-1423.
- Varela-Fregoso, L., A. Estrada-Torres, F.J Álvarez-Sánchez e I. Sánchez-Gallen. 2008. Catálogo ilustrado de hongos micorrizógenos arbusculares de la Reserva de la Biósfera de los Tuxtlas. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, Primer Edición digital.
- Violi H. A., A. F. Barrientos-Priego, S. F. Wright, E. Escamilla-Prado, J. B. Morton, J. A. Menge y C. J. Lovatt. 2008. Disturbance changes arbuscular mycorrhizal fungal phenology and soil glomalin concentration but not fungal spore composition

in montane rainforest in Veracruz and Chiapas, Mexico. *Forest Ecology and Management* **254**: 276- 290.

-Vogelmann T. C., J. F. Bornmann y S. Josserand. 1989. Photosynthetic light gradients and spectral régime within leaves of *Medicago sativa*. *Philosophical transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **323**: 411-421.

-Walder F., H. Niemann, M. Natarajan, M. F. Lehmann, T. Boller y A. Wiemken. 2012. Mycorrhizal networks: common goods of plants shared under unequal terms of trade. *Plant Physiology* **159**: 789-797.

-Werner G.D. y Kiers E.T. 2015. Order of arrival structures arbuscular mycorrhizal colonization of plants. *New Phytologist* **205**:1515– 1524.

-Wickham H. 2016. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4.

-Winter K. y J. A. M. Holtum. 2014. Facultative crassulacean acid metabolism (CAM) plants: power tools for unravelling the funcional elements of CAM photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **65**: 3425-3441.

-Wyatt G.A.K., E. T. Kiers, A. Gardner y S.A. West. 2014. A biological market analysis of the plant-mycorrhizal symbiosis. *Evolution* **68**: 2603-2618.

-Xu, X., C. Chen, Z. Zhang, Z. Sun, Y. Chen, J. Jiang, y Z. Shen. 2017. The influence of environmental factors on communities of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Chenopodium ambrosioides* revealed by MiSeq sequencing investigation. *Scientific Reports* **7**: 1-11

-Zandalinas S.I., R. Mittler, D. Balfagón, V. Arbona, y A. Gómez-Cadenas. 2018. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia Plantarum* **162**: 2-12.

-Zangaro W., L. V. Rostiola, P. Bochi de Souza, R. De Almeida Alves, L. E. Azevedo Marques Lescano, A. B. Lrio Rondina, M. A. Nogueira y R. Carrenho. 2013. Root colonization and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in distinct successional stages from an Atlantic rainforest biome in southern Brazil. *Mycorrhiza* **23**: 221-233.

-Zheng C., B. Ji, J. Zhang, F. Zhang y J.D Bever. 2015. Shading decreases plant carbon preferential allocation towards the most beneficial mycorrhizal mutualist. *New Phytologist* **205**: 361-368.

ANEXOS

Ganancia de carbono (No. equivalentes/g) al inicio y final del período luminoso en piña con los diferentes inóculos (N=20 de cada tratamiento).

Condición	Periodo luminoso	Inóculo Tuxtlas	Inóculo Determinado	Grupo control
		Media	Media	Media
Alta	Inicio	0.698	0.71	0.715
Alta	Final	0.520	0.48	0.443
Baja	Inicio	0.414	0.27	0.413
Baja	Final	0.404	0.39	0.338

Medias de variables medidas para piña al final del experimento (N=20 en cada tratamiento)

Tratamiento	Estomas (mm ⁻²)	Área foliar (cm ²)	Peso seco (g)	Índice de Suculencia (g/cm ²)
	Media	Media	Media	Media
Tuxtlas-Alta	27.4	3.89	0.314	6.14
Tuxtlas-Baja	27.1	2.62	1.41	4.32
Determinado-Alta	24.6	4.79	0.52	5.88
Determinado-Baja	23.1	3.91	1.35	3.75

Control-Alta	24.6	4.23	0.416	6.25
Control-Baja	27.2	2.62	0.839	8.88

Medias de variables medias en alfalfa al final del experimento (N=25 en cada tratamiento)

	Peso seco (g)	Área foliar (cm ²)	Altura (cm)
Tratamiento	Media	Media	Media
Tuxtlas-Alta	0.0192	0.624	7.5
Tuxtlas-Baja	0.0131	0.5	7.61
Determinado-Alta	0.0169	0.559	6.5
Determinado-Baja	0.0153	0.540	3.9

Resultados de la prueba de Tukey HSD para factor Inóculo en área foliar

Grupo	p	Grupos
Determinado-Control	0.017	b
Tuxtlas-Control	0.791	
Tuxtlas-Determinado	0.002	a

Resultados de la prueba de Tukey HSD para factor Inóculo y para densidad estomática.

Grupo	p	Grupos
Determinado-Control	0.010	a
Tuxtlas-Control	0.498	
Tuxtlas-Determinado	0.159	

Medias del porcentaje de colonización para cada tratamiento de piña (N=20) y alfalfa (N=25).

Tratamiento	Planta	Media (%)
Tuxtlas Alta	Piña	46.9
Tuxtlas Baja	Piña	30.3
Determinado Alta	Piña	35.5
Determinado Baja	Piña	25.3
Tuxtlas Alta	Alfalfa	50.1
Tuxtlas Baja	Alfalfa	30.6
Determinado Alta	Alfalfa	57.7
Determinado Baja	Alfalfa	31.3

Resultados de la prueba de Tukey HSD para la interacción Inóculo:Planta.

Grupo	p	Grupos
Tuxtlas:Alfalfa-Determinado:Alfalfa	0.280	
Determinado:Piña-Determinado:Alfalfa	0.000	a

Tuxtlas:Piña-Determinado:Alfalfa	0.706	
Determinado:Piña-Tuxtlas:Alfalfa	0.000	b
Tuxtlas:Piña-Tuxtlas:Alfalfa	0.915	
Tuxtlas:Piña-Determinado:Piña	0.000	c

Resultados de la prueba de Tukey HSD para interacción de Condición:Inóculo para el peso seco.

Grupo	p	Grupos
Baja:C-Alta:C	0.455	
Alta:D-Alta:C	0.157	
Baja:D-Alta:C	0.641	
Alta:T-Alta:C	0.070	
Baja:T-Alta:C	0.124	
Alta:D-Baja:C	0.000	a
Baja:D-Baja:C	0.999	
Alta:T-Baja:C	0.000	b
Baja:T-Baja:C	0.980	
Baja:D-Alta:D	0.001	f
Alta:T-Alta:D	0.999	
Baja:T-Alta:D	0.000	c
Alta:T-Baja:D	0.000	d
Baja:T-Baja-D	0.919	
Baja:T-Alta:T	0.000	e

C= planta sin inóculo, D= planta con inóculo determinado, T= planta con inóculo de los Tuxtlas.

Pruebas de supuesto de ANOVA factoriales.

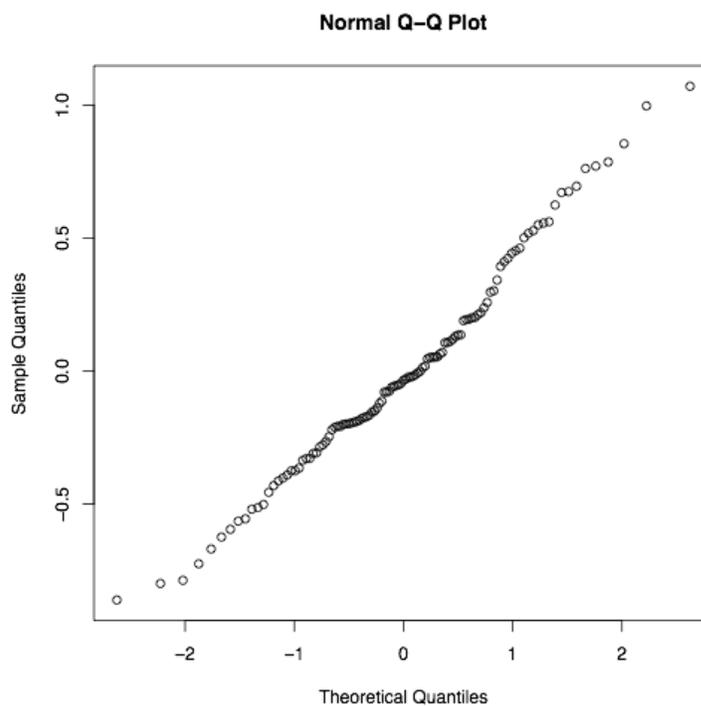
Área foliar de la piña.

Los datos fueron transformados con el logaritmo natural (ln)

Normalidad de residuos

Prueba Shapiro-Wilk

W= 0.983, p=0.174



Homegeniedad de la varianza

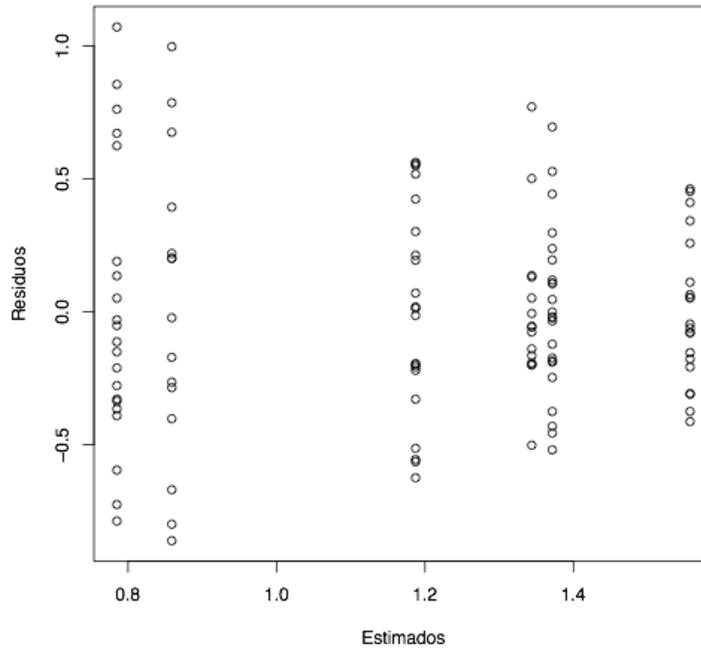
Prueba de Bartlett

$K^2=3.137$

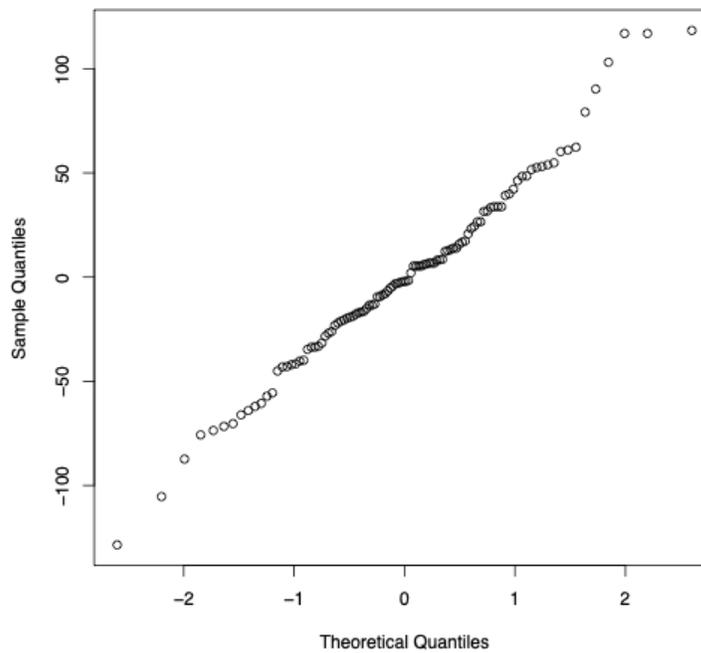
$p=0.208$

Homocedasticidad

Grafica de residuos contra estimados



Normal Q-Q Plot



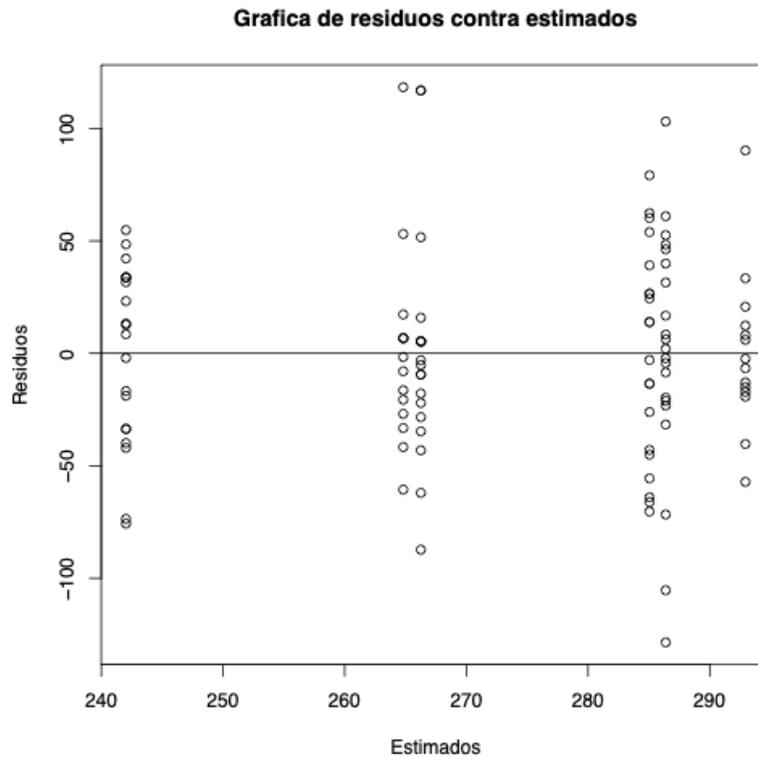
Densidad estomática

Normalidad de residuos

Prueba Shapiro-Wilk

W= 0.985, p=0.316

Homogeneidad de varianza



Prueba de Bartlett

$K^2=0.051$

$p=0.820$

Homocedasticidad

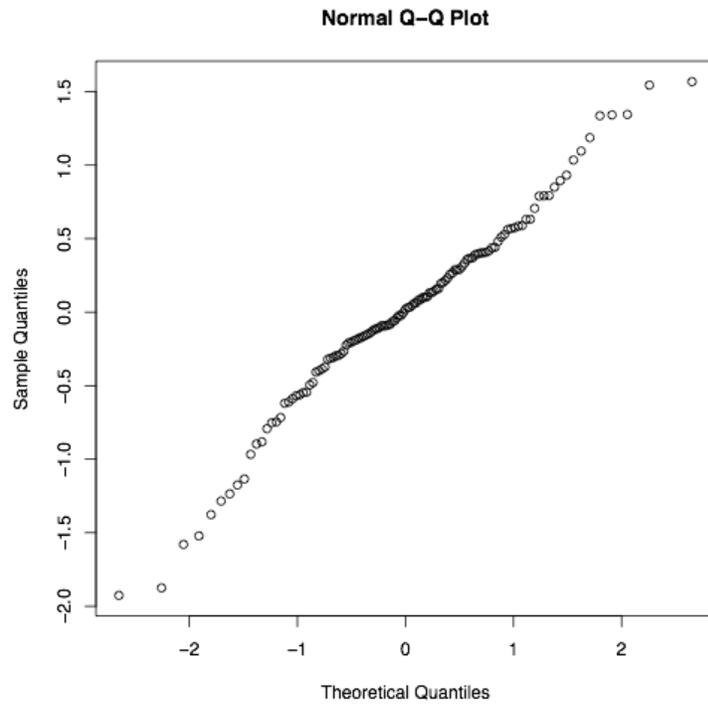
Peso seco

Valores fueron transformados con logaritmo natural (ln)

Normalidad de residuos

Prueba Shapiro-Wilk

W= 0.979, p=0.05018



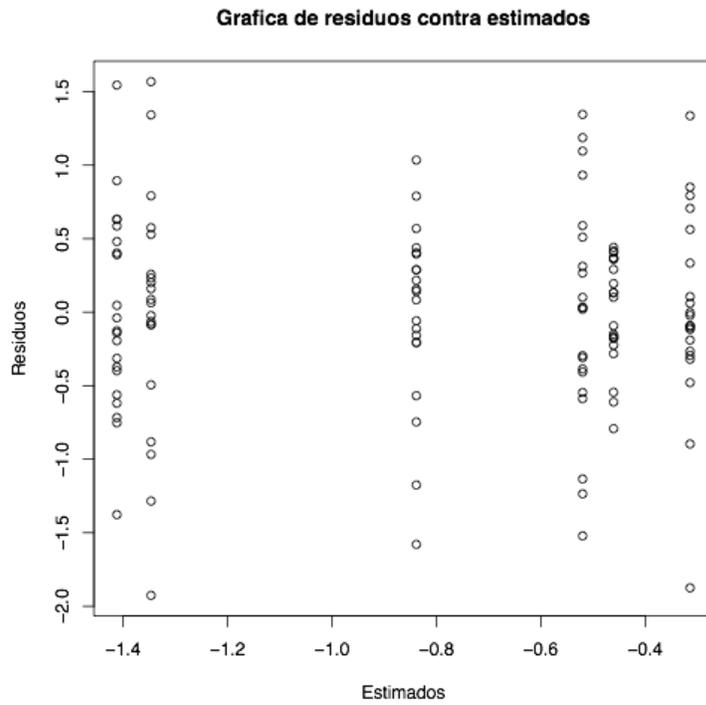
Homogeniedad de varianza

Prueba de Bartlett

$K^2=0.819$

$p=0.365$

Homocedasticidad



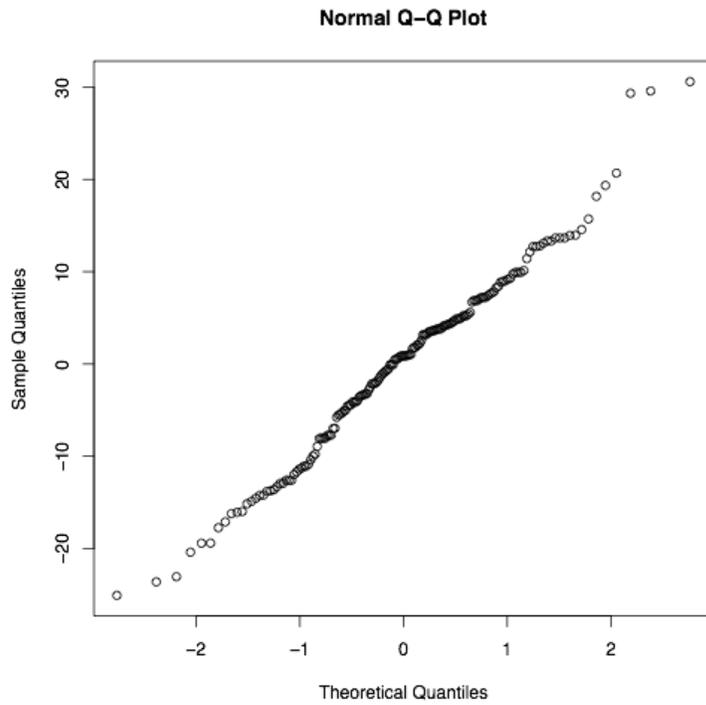
Índice de suculencia

Los valores fueron transformados con el logaritmo natural (ln)

Normalidad de residuos

Prueba Shapiro-Wilk

W= 0.981, p=0.142



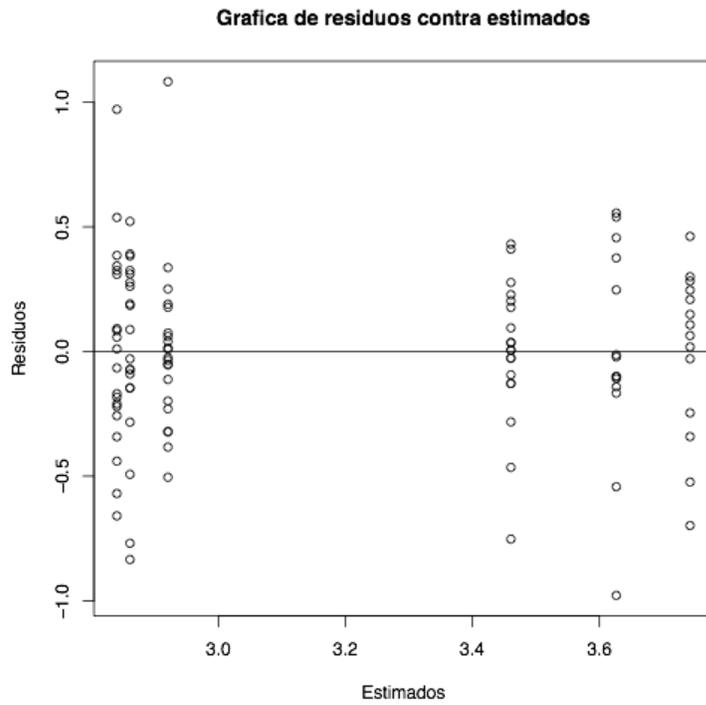
Homogeniedad de varianza

Prueba de Bartlett

$K^2=0.110$

$p=0.946$

Homocedasticidad



Colonización

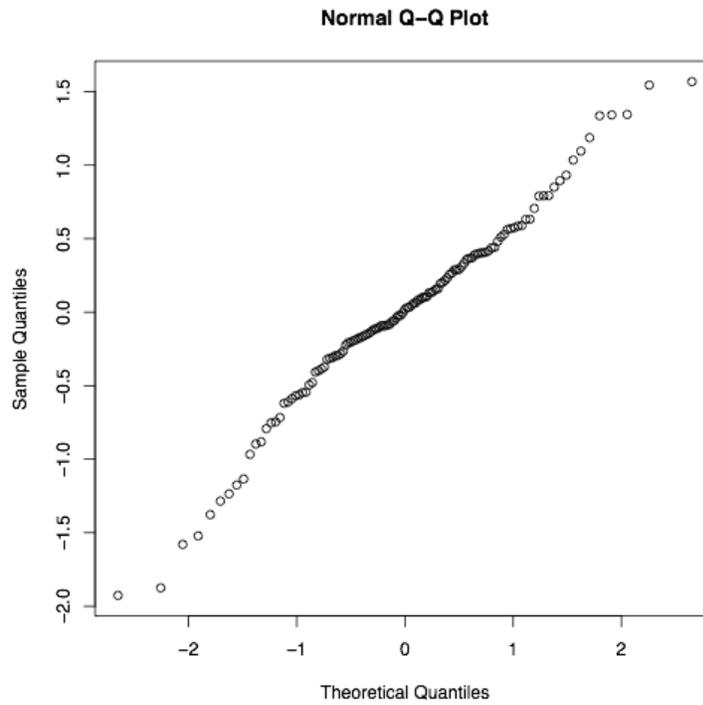
Los valores fueron transformados con el logaritmo natural (ln)

Normalidad de residuos

Prueba Shapiro-Wilk

W= 0.986

p=0.090



Homogeniedad de varianza

Prueba de Bartlett

$K^2=02.895$

$p=0.088$

Homocedasticidad

Grafica de residuos contra estimados

