



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**Facultad de Biología**



**Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas**

**“Influencia de la simbiosis micorrízica de tipo arbuscular sobre el flujo de carbono en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*)”**

**TESIS**

**Para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas**

**PRESENTA**

**MC. Isaac Alejandro Salmeron Santiago**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dra. Ana Tztzqui Chávez Bárcenas**

**COMITÉ TUTORAL:**

**Dr. Juan José Valdez Alarcón. CEMEB-UMSNH**

**Dra. Martha Elena Pedraza Santos. Facultad de Agrobiología-UMSN**

**Dr. Gustavo Santoyo Pizano. IIQB-UMSNH**

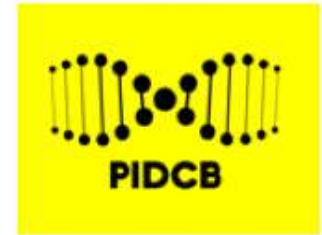
**Dra. María José Pozo Jiménez. EEZ-CSIC**

**Morelia Mich, Julio de 2024**



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

*Programa Institucional de  
Doctorado en Ciencias Biológicas*



DR. OMAR CHASSIN NORIA  
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
PRESENTE

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada:  
"Influencia de la simbiosis micorrízica de tipo arbuscular sobre el flujo de carbono en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*)" presentado por el **M. C Isaac Alejandro Salmeron Santiago (Núm. De Matrícula: 0453758E)**, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Doctor en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

Atentamente

Morelia, Michoacán, a 29 de junio 2023

COMITÉ SINODAL

Dra. Ana Tztzqui Chávez Bárcenas (07000499)

Directora de Tesis

Dra. Martha Elena Pedraza Santos (88001458)

Vocal 1

Dr. Juan José Valdez Alarcón (00038253)

Presidente

Dr. Gustavo Santoyo Pizano (08002711)

Vocal 2

POZO JIMENEZ MARIA JOSE - 74633755C  
Firmado digitalmente por POZO  
JIMENEZ MARIA JOSE - 74633755C  
Fecha: 2023.07.04 21:07:46 +02'00'

Dra. María José Pozo Jiménez (15010060)

Vocal 3

**El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Interacciones Planta Ambiente de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, dependiente de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Para su realización contó con apoyo del Concejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) y de la Coordinación de la Investigación Científica (CIC) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y a su dependencia la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”.

Al Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas.

Al Concejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) y a la Coordinación de la Investigación Científica (CIC) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por el apoyo económico para realizar la presente investigación (CONAHCYT: 732373; CIC: 7973805).

A la directora de este trabajo de investigación la Dra. Ana Tztzqui Chávez Bárcenas.

Al Dr. Miguel Martínez Trujillo por el apoyo brindado durante el tiempo de realización de este trabajo de investigación.

A los miembros del comité evaluador, los Doctores Martha Elena Pedraza Santos, Juan José Valdez Alarcón, Gustavo Santoyo, y María José Pozo Jiménez.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>RESUMEN GENERAL</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	5
<b>Anatomía de la simbiosis micorrízica de tipo arbuscular</b> .....	5
<b>Metabolismo de carbono y biosíntesis de sacarosa en plantas</b> .....	7
<b>Transporte de sacarosa de tejidos fuente a tejidos consumidores</b> .....	10
<b>Relevancia de la biosíntesis de sacarosa en interacciones con hongos formadores de micorriza arbuscular y otras interacciones mutualistas planta-microorganismo</b> --	11
<b>Papel de transportadores de carbohidratos en la distribución de carbono en plantas colonizadas por hongos formadores de micorriza arbuscular</b> .....	13
<b>Inducción del catabolismo de sacarosa en plantas colonizadas por hongos formadores de micorriza arbuscular</b> .....	16
<b>Las plantas otorgan lípidos como fuente de carbono a los HMA</b> .....	18
<b>Regulación del desarrollo de la simbiosis micorrízica por el fósforo</b> .....	22
<b>Literatura consultada</b> .....	23
<b>CAPITULO I. EFECTO DE LA COLONIZACIÓN MICORRÍZICA EN EL DESARROLLO DE PLANTAS DE TOMATE FERTILIZADAS CON DISTINTOS NIVELES DE FERTILIZACIÓN FOSFÓRICA</b> .....	36
<b>Resumen</b> .....	36
<b>Abstract</b> .....	37
<b>Introducción</b> .....	37
<b>Materiales y métodos</b> .....	39
<b>Resultados</b> .....	43
<b>Discusión</b> .....	48
<b>Conclusiones</b> .....	51
<b>Literatura consultada</b> .....	51
<b>CAPITULO II. LA RESPUESTA A LA ASOCIACIÓN MICORRÍZICA DE TIPO ARBUSCULAR DETERMINA LA RESPUESTA DE CRECIMIENTO DE LA PLANTA Y ALTERA LA DISTRIBUCIÓN DE CARBONO ENTRE LOS SIMBIONTES</b> .....	56
<b>Resumen</b> .....	56
<b>Abstract</b> .....	57
<b>Introducción</b> .....	57
<b>Materiales y métodos</b> .....	59
<b>Resultados</b> .....	63
<b>Discusión</b> .....	68
<b>Conclusiones</b> .....	72
<b>Literatura consultada</b> .....	74

### CAPITULO III. ANÁLISIS PRELIMINAR DE EXPRESIÓN DE GENES EN RAÍCES DE PLANTAS QUE PRESENTAN DIFERENTES RESPUESTAS DE CRECIMIENTO A LA ASOCIACIÓN MICORRÍZICA DE TIPO ARBUSCULAR

-----	79
<b>Resumen</b> -----	79
<b>Abstract</b> -----	80
<b>Introducción</b> -----	80
<b>Materiales y métodos</b> -----	82
<b>Resultados</b> -----	84
<b>Discusión</b> -----	86
<b>Conclusiones</b> -----	89
<b>Literatura consultada</b> -----	90
<b>CONCLUSIÓN GENERAL</b> -----	100

#### ANEXOS

##### **ANEXO I. Artículo de divulgación**

Salmeron-Santiago I. A., & Chávez Bárcenas A. T. (2022) Los fósiles de los hongos también cuentan una historia fascinante. *Saber más* 61(11): 22-25.

##### **ANEXO II. Artículo de revisión científica**

Salmeron-Santiago, I. A., Martínez-Trujillo, M., Valdez-Alarcón, J. J., Pedraza-Santos, M. E., Santoyo, G., Pozo, M. J., & Chávez-Bárcenas, A. T. (2022). An updated review on the modulation of carbon partitioning and allocation in arbuscular mycorrhizal plants. *Microorganisms*, 10(1), 1–20. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010075>

##### **ANEXO III. Artículo de investigación (Versión sometida a revisión)**

Salmeron-Santiago, I. A., Martínez-Trujillo, M., Valdez-Alarcón, J. J., Pedraza-Santos, M. E., Santoyo, G., López, P. A., Larsen, J., Pozo, M. J., & Chávez-Bárcenas, A. T. (2023). Carbohydrate and lipid balances in the positive plant phenotypic response to arbuscular mycorrhiza: Increase in sink strength.

La versión publicada esta disponible en: <https://doi.org/10.1111/ppl.13857>

## RESUMEN GENERAL

El mutualismo entre plantas y hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) está basado en el intercambio bidireccional de nutrientes. La alteración de este intercambio de nutrientes, resulta en respuestas de crecimiento contrastantes en el hospedero que se clasifican como positivas, negativas y neutras. En el presente trabajo se analizó la dinámica del flujo de carbono en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) inoculadas con *Rhizophagus irregularis* en las que se indujeron respuestas de crecimiento contrastantes a la asociación, por modificación de la fertilización con fósforo (P) que correspondieron a 1.3 mM (P Alto), 0.065 mM (P Bajo) y 0 mM (P Nulo) de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, respectivamente. La colonización de las raíces se redujo cuando las plantas se fertilizaron con P Alto; la reducción de la fertilización a concentraciones de P Bajo y Nulo incrementó la colonización del HMA. Se observó que cuando las plantas se fertilizaron con P Bajo, incrementó significativamente la acumulación del lípido 16:1 $\omega$ 5, biomarcador de la biomasa de HMA. Las plantas inoculadas y fertilizadas con la concentración de P Alto presentaron una respuesta neutra de crecimiento. Las plantas inoculadas con el HMA y fertilizadas con P Bajo, manifestaron una respuesta de crecimiento positiva, que se observó como incremento del área foliar de las hojas fuente. Cuando se aplicó solución nutritiva con P Nulo, la respuesta en crecimiento de las plantas inoculadas fue negativo, observando reducción en altura, área foliar de hojas fuente e índice de biovolumen. La acumulación de azúcares solubles totales en hojas fuente fue mayor en plantas inoculadas, en todas las condiciones de fertilización. En raíces, las plantas que presentaron respuesta positiva de crecimiento a la asociación micorrízica acumularon menos azúcares solubles totales. Se detectó acumulación de transcritos del gen de la invertasa LIN6 en plantas que presentaron represión del crecimiento por efecto de la asociación micorrízica. En cambio, se detectó incremento de transcritos del gen de la sacarosa sintasa 1 (*SISUS1*) y una mayor acumulación de transcritos del transportador de fosforo 4 (*SIPT4*) en plantas en donde la asociación micorrízica promovió el crecimiento. Los resultados obtenidos indican que las condiciones limitantes de P en donde se promueve la colonización del HMA en la raíz estimulan el crecimiento por incremento de la fuerza de los tejidos fuente y consumidor. Además, se sugiere que la canalización de carbono a diferentes rutas catabólicas en el hospedero es influenciada por el desempeño de la asociación micorrízica.

**Palabras clave:** Carbono, mutualismo, tejido consumidor, tejido fuente, micorriza.

## ABSTRACT

The mutualism of plants and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) is based on the bidirectional flux of nutrients between both symbionts. Alterations of such flux results in contrasting growth responses in the host plant that are classified as positive, negative, and neutral. Here we analysed the carbon dynamics in tomato plants (*Solanum lycopersicum*) inoculated with *Rhizophagus irregularis* that showed contrasting growth responses to mycorrhizal association by fertilizing plants with different phosphorus (P) that corresponded to 1.3 mM (High P), 0.065 mM (Low P) and 0 mM (Null P) of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, respectively. Root colonization by *R. irregularis* was significantly reduced in plants that were fertilized with High P; while P reduction to Low and Null P increased mycorrhizal colonization. At Low P, we detected the highest accumulation of the AMF biomass biomarker lipid 16:1 $\omega$ 5. Inoculated plants fertilized with High P showed a neutral growth response. Inoculated plants fertilized with Low P showed a positive growth response that was observed as an increment of source leaves area and biovolume index. Growth response of plants growing at Null P conditions was negative and was observed as lower height, source leaves area and biovolume index compared to non-inoculated plants. Soluble sugar accumulation was higher in mycorrhizal plants in all P fertilization levels. In plants that showed positive growth response, mycorrhizal roots accumulated significantly lower soluble sugars than non mycorrhizal roots. Transcriptional up-regulation of the gene of the apoplastic invertase LIN6 was observed in mycorrhizal root of plants that showed negative growth responses. In plants that showed positive growth response to mycorrhiza, we observed up-regulation of sucrose synthase 1 gene (*SISUS1*) and the highest accumulation of transcripts of the phosphate transporter 4 (*SIPT4*). Our results suggest that P limiting conditions that promotes mycorrhizal colonization stimulates growth by increasing the strength of source and sink tissues in the host. Additionally, it is suggested that carbon allocation to different metabolic pathways in the host is determined by the performance of the mycorrhizal symbiosis.

**Key words:** Carbon, mutualism, sink tissue, source tissue, mycorrhiza.

## INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) son simbioses mutualistas obligados que crecen en el interior de raíces de aproximadamente el 80 % de las plantas terrestres, dentro de las que se agrupan plantas inferiores como briofitas y plantas que pertenecen a los dos linajes de plantas superiores, monocotiledóneas y dicotiledóneas. Además, la asociación con HMA y raíces es una de las interacciones más ubicuas, encontrándose en casi todos los ecosistemas de la Tierra. En plantas de interés agronómico y en modelos biológicos se han reportado numerosos beneficios por el establecimiento de la asociación micorrízica. Dentro de estos beneficios se encuentran, por ejemplo, la mejora en el desarrollo y/o crecimiento, en el desempeño bajo condiciones de estrés causados por factores de origen biótico o abiótico, y la mejora en la adquisición de agua y nutrientes del suelo.

Durante el mutualismo entre plantas y HMA se establece un flujo bidireccional de nutrientes en donde el hongo recibe de la planta carbono en forma de lípidos y carbohidratos, para mantener su metabolismo heterotrófico. El HMA participa en la movilización de macronutrientes y micronutrientes del suelo hasta las zonas de intercambio de nutrientes que se desarrollan en el interior de las células corticales de las raíces, los arbusculos. Debido a que el hongo es un sumidero de carbono adicional para la planta, los patrones normales de distribución del carbono que se adquieren a través de la fotosíntesis se modifican para cumplir con las demandas de carbono de ambos organismos. Se estima que el carbono que invierte una planta para el mantenimiento de la simbiosis micorrízica oscila del 4 al 23 % del total del carbono fijado durante la fotosíntesis (Valentine et al., 2013). Los HMA adquieren carbono de la planta hospedera en forma de hexosas. Sin embargo, el estudio riguroso de su metabolismo también demostró que los HMA son incapaces de biosintetizar ácidos grasos *de novo*. Esta condición genera una dependencia de los HMA por la planta para obtener lípidos y explica el mutualismo obligado de los HMA.

Como se mencionó anteriormente, se tiene evidencia de que los HMA favorecen la movilización de numerosos macronutrientes y micronutrientes del suelo hasta la planta. Uno de los elementos a los que la simbiosis micorrízica de tipo arbuscular es particularmente sensible es el fósforo (P). En condiciones de carencia de P, se promueve la colonización micorrízica en las plantas, mientras que en condiciones de suficiencia de fósforo la colonización se reprime. Los mecanismos moleculares que regulan el comportamiento de la

asociación micorrízica ante el P han comenzado a elucidarse y ahora se conoce que este fenómeno está fuertemente regulado por la respuesta a la planta a la carencia de P mediada por los factores de transcripción PHOSPHATE STARVATION RESPONSE (PHR) (Das et al., 2022; Liao et al., 2022).

A pesar de que la asociación micorrízica de tipo arbuscular se reconoce como una asociación benéfica al mejorar el crecimiento y desarrollo de plantas, también puede no generar cambios significativos en las plantas hospederas o incluso reprimir el crecimiento. La manifestación de estos efectos contrastantes a la asociación micorrízica en las plantas pueden favorecerse por diversos factores, como las especies que están formando la interacción, las capacidades de colonización del HMA en el sistema radicular, y las condiciones nutrimentales en las que se desarrolla la asociación. Los diferentes efectos que puede manifestar una planta como resultado del establecimiento de la simbiosis micorrízica tienen el potencial de modular diferencialmente la inversión del carbono por parte de la planta, lo que impactaría en su desarrollo. Sin embargo, existe poco conocimiento de cómo el desempeño de la simbiosis regula la distribución del carbono y modifica los patrones de crecimiento en plantas que exhiben respuestas de crecimiento contrastantes a la asociación micorrízica de tipo arbuscular.

Para obtener información sobre el impacto de la simbiosis micorrízica de tipo arbuscular en la distribución de carbono en plantas con respuestas contrastantes a la asociación micorrízica, en este trabajo se analizaron aspectos fisiológicos, bioquímicos y genéticos en tomate (*Solanum lycopersicum* var. Río Grande) que manifestaron efectos positivos (promoción del crecimiento) negativos (represión del crecimiento) y neutros a la asociación con *Rhizophagus irregularis*.

## REVISIÓN DE LITERATURA

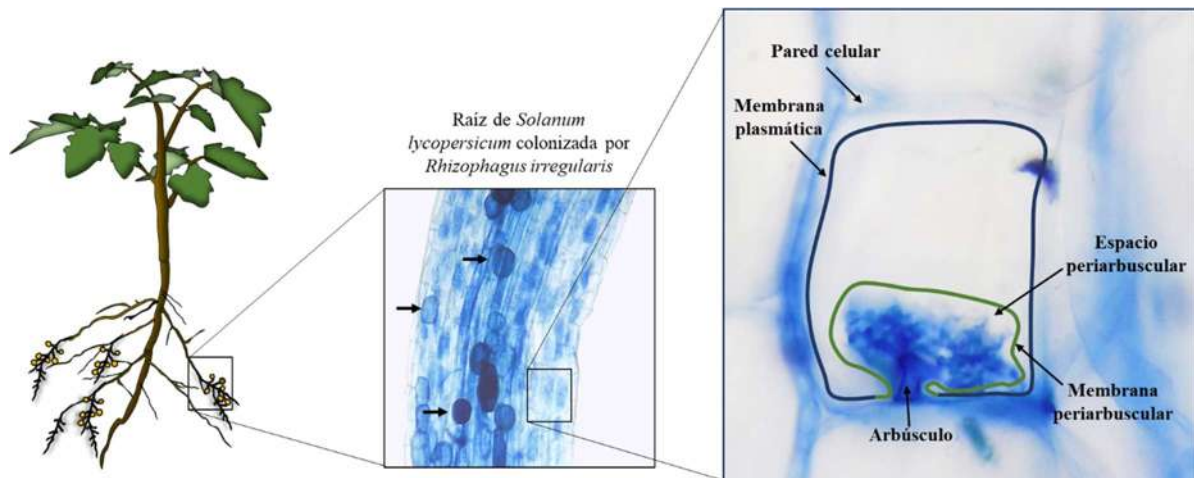
### **Anatomía de la simbiosis micorrízica de tipo arbuscular**

Los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) forman una asociación mutualista que se considera ubicua, ya que se establece con una importante proporción de especies de plantas. Los HMA pertenecen a un grupo monofilético de hongos denominado Glomeromycotina, grupo que está subordinado al phylum Mucoromycota (Spatafora et al., 2016). Se considera que las especies de HMA pueden establecer asociaciones micorrízicas con cualquier especie de planta que permita la colonización del hongo en su sistema radicular sin mostrar especificidad. Sin embargo, se ha demostrado que existen factores no identificados que determinan el desempeño de la simbiosis que involucran al número y especies de HMA y genotipo de plantas hospederas que determinan el desempeño de la simbiosis (Kaur et al., 2022).

De manera general, los HMA son capaces de colonizar en el interior de las raíces con sus hifas. A partir de estas se desarrolla una estructura altamente especializada que funcionan para establecer el principal sitio de interacción entre los dos simbioses (Gutjahr & Parniske, 2013; Parniske, 2008). Estas estructuras reciben el nombre de arbusculos, los cuales son ramificaciones dicotómicas de las hifas del hongo que se desarrollan en el interior de las células corticales de las raíces (Gutjahr & Parniske, 2013; Parniske, 2008). La presencia del arbusculo no compromete la viabilidad de la célula que coloniza, sino que es una estructura efímera (Gutjahr and Parniske 2013). Cuando el arbusculo está presente se considera que la célula alcanza un grado de desarrollo transitorio que consiste en la reprogramación para sustentar entre otras cosas un flujo bidireccional de nutrientes, entre otros cambios sustanciales a nivel fisiológico, bioquímico y genético (Montero et al., 2019).

El arbusculo está separado del contenido citoplásmico de la célula que coloniza por una membrana de origen plasmático de la célula que lo alberga, que recibe el nombre de membrana periarbuscular (Ivanov et al., 2019). Además, el arbusculo está rodeado por un espacio apoplástico que comprende al espacio periarbuscular, cuya composición es principalmente de derivados de la pared celular primaria de las plantas (Ivanov et al., 2019). El espacio periarbuscular, comprende la interfase de intercambio de nutrientes entre los dos

organismos durante la interacción micorrízica, ya que es aquí en dónde ambos organismos descargan los elementos que serán intercambiados (Rich et al., 2014). Las hifas del HMA, además crecen hacia el suelo formando una extensa red que permite la adquisición de nutrientes más allá de la zona de depleción que genera la propia absorción de nutrientes por las raíces (Smith et al., 2011). A su vez, el HMA transporta estos elementos del suelo que son transferidos directamente hacia el interior de las células corticales colonizadas por arbusculos, lo que representa una vía de adquisición de nutrientes a través de una vía dependiente de la asociación micorrízica (Smith et al., 2011; Smith & Read, 2008). Numerosos macronutrientes y micronutrientes son descargados por el HMA en el espacio periarbuscular y son adquiridos por las plantas por transportadores específicos localizados en la membrana periarbuscular, los cuales a su vez son asistidos por bombas de protones dependientes de ATP ( $H^+$ -ATP) (Guether et al., 2009; Harrison et al., 2002; Liu et al., 2020; Ruytinx et al., 2020; Wang et al., 2017). Además, se ha planteado que en la membrana periarbuscular se localizan transportadores de carbohidratos de diferentes clases que brindan una fuente de carbono al HMA y además controlan la cantidad de carbono que se descarga al espacio periarbuscular (Harrison, 1996; Manck-Götzenberger & Requena, 2016; Salmeron - Santiago et al., 2022; Wipf et al., 2019). Una representación esquemática de la interfase que se forma entre hongos y plantas se presenta en la Figura 1.



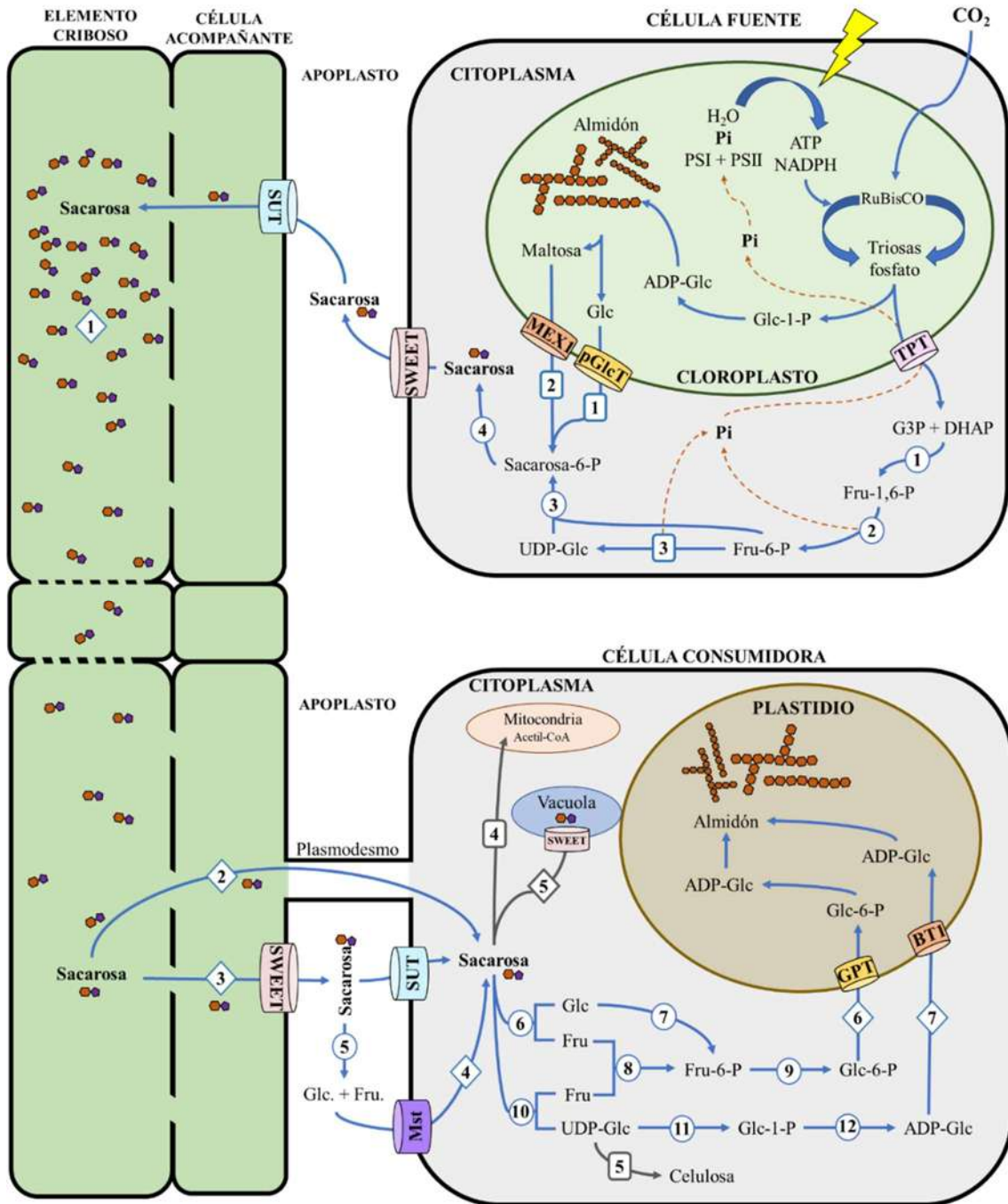
**Figura 1.** Representación esquemática de la simbiosis micorrízica con observaciones realizadas en raíces de tomate (*Solanum lycopersicum*) colonizadas por *Rhizophagus irregularis*. En la imagen del centro las flechas señalan la presencia de vesículas en el interior de las raíces. En la imagen de la derecha, se esquematizan y señalan los componentes estructurales principales de las zonas de intercambio de nutrientes en células corticales colonizadas por arbusculos.

Uno de los transportadores de carbohidratos es el transportador de sacarosa 2 (SUT2) de tomate del que se tiene conocimiento tiene localización subcelular en la membrana periarbuscular (Bitterlich et al., 2014). También, los transportadores SRT1 y STR2 (Stunted Arbuscule 1 and Stunted Arbuscule 2) de *M. truncatula* interactúan con la membrana periarbuscular y se han descrito como transportadores putativos de 2-monoacilglicerol (Gutjahr et al., 2012). Numerosos transportadores se han descrito en el HMA que descargan nutrientes y agua en el espacio periarbuscular, y también transportadores de carbohidratos para adquirir hexosas (Wipf et al., 2019). Sin embargo, aún no se ha caracterizado un transportador de lípidos que regule la adquisición de esta fuente de carbono por parte del hongo del espacio periarbuscular (Wipf et al., 2019).

### **Metabolismo de carbono y biosíntesis de sacarosa en plantas**

Las plantas adquieren una fuente de carbono inorgánica de la atmósfera, el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) para sustentar su metabolismo. Durante la fotosíntesis, el dióxido de carbono es reducido e incorporado a moléculas orgánicas que sirven como precursores de carbohidratos. La asimilación de carbono sucede en los órganos fotosintéticos de las plantas, principalmente las hojas, también denominados tejidos fuente. El carbono asimilado durante la fotosíntesis es canalizado a diferentes rutas metabólicas para la biosíntesis de carbohidratos de reserva, principalmente almidón, polímeros estructurales como la celulosa, o de transporte como la sacarosa. La sacarosa es el principal carbohidrato que por sus características fisicoquímicas se utiliza por la mayoría de las especies de plantas para distribuir el carbono fijado en los tejidos fuente a los tejidos de metabolismo heterotrófico, también denominados tejidos consumidores. La biosíntesis de sacarosa depende de las reacciones de la fotosíntesis al ser sus precursores las triosas fosfato generadas durante el ciclo de Calvin. Sin embargo, la biosíntesis de sacarosa también es independiente de las reacciones de la fotosíntesis y sus precursores provienen del catabolismo de carbohidratos de reserva como el almidón. El flujo de carbono en plantas esta esquematizado en la Figura 2.

Las triosas-fosfato generadas durante el ciclo de Calvin dentro de cloroplasto, son exportadas al citoplasma principalmente por el translocador de triosas fosfato (Triose Phosphate Translocator; TPT). El TPT es un transportador de tipo antiporte que exporta triosas-fosfato



**Figura 2.** Representación esquemática del flujo de carbono en plantas. Adaptado de Salmeron-Santiago et al., 2022. Las flechas color azul indican el flujo de carbono, las líneas discontinuas indican color naranja muestran el flujo de P y los cilindros de diferentes colores indican diferentes clases de transportadores de carbohidratos. Las enzimas implicadas en el flujo de carbono están indicadas como: (1) Fructosa 1,6-bisphosphate aldolasa (EC 4.1.2.13); (2) FBPasa (EC 3.1.3.11); (3) SPS (EC 2.4.1.14); (4) SPP (EC 3.1.3.24); (5) Invertasa apoplástica (EC 3.2.1.26); (6) Invertasa neutra (citoplásmica); (7) Hexokinasa (EC 2.7.1.1); (8) Fructokinasa (EC 2.7.1.4); (9) Fosfoglucoisomerasa (EC 5.3.1.9); (10) SUS (EC 2.4.1.13); (11) UDPasa (EC 2.7.7.9); (12) ADP-glucosa pirofosforilasa (EC 2.7.7.27). Los números en círculos indican rutas metabólicas específicas que corresponden a: (1) y (2) transporte de productos del catabolismo de almidón transportados al citoplasma por la proteína Maltose Excess Protein (MEX1) o Plastidic Glucose Translocator (pGlcT) que funcionan como precursores de

la biosíntesis de sacarosa: (3) síntesis de UDP-Glucosa de Fructosa-6-P; (4) catabolismo de sacarosa para la fosforilación oxidativa; (5) biosíntesis de celulosa. Los números en diamantes indican flujos de carbono que corresponden a: (1) Flujo de masas de tejidos fuente a tejidos consumidores; (2) transporte de sacarosa del floema a tejidos consumidores por el simplasto; (3) transporte de sacarosa del floema a tejidos consumidores por el apoplasto; (4) transporte de monosacáridos del apoplasto a células consumidoras por transportadores de monosacáridos (Monosaccharide transporters; Mst); (5) Acumulación de sacarosa en vacuola para almacenamiento transitorio de carbono; 6 y (7) representa el importe de Glc-6-P and ADP-Glc por transportadores específicos (GPT, translocador de Glc-6-P/Pi; BT1, transportador adenin-nucleótido Brittle1), respectivamente, y su canalización para la biosíntesis de almidón.

del cloroplasto a cambio de fosfato inorgánico (Pi) del citoplasma (Flügge et al., 1989). El flujo de Pi hacia el interior del cloroplasto mediado por TPT mantiene la biosíntesis de trifosfato de adenosina (ATP) en el cloroplasto durante las reacciones dependientes de luz de la fotosíntesis, mientras que en la ruta de biosíntesis de sacarosa en el citoplasma, las triosas fosfato son condensadas para sintetizar Fructosa-1,6-bisfosfato por acción de la fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa (FBP; EC 4.1.2.13) (Lu et al., 2012). Posteriormente se remueve un grupo fosfato Fructosa-1,6-bisfosfato por la Fructosa bisfosfatasa (FBPasa; EC 3.1.3.11), generando Fructosa-6-fosfato que es subsecuentemente isomerizada a Glucosa-6-fosfato por la enzima fosfoglucoisomerasa (PGI; EC 5.3.1.9). La Glucosa-6-fosfato es nuevamente usada como sustrato por la fosfoglucomutasa (PGM; EC 5.4.2.2) para generar como producto Glucosa-1-fosfato. La Glucosa-1-fosfato se usa como sustrato junto con UTP por la enzima UDP-glucosa pirofosforilasa (UDPasa; EC 2.7.7.9) para generar UDP-Glucosa. Los sustratos UDP-Glucosa y Fructosa-6-fosfato son los sustratos de la sacarosa-fosfato sintasa (SPS; EC 2.4.1.14) que genera como producto Sacarosa-6-fosfato, la cual es subsecuentemente defosforilada por la sacarosa-fosfato fosfatasa (SPP; EC 3.1.3.24), para generar como producto final sacarosa (Daie, 1993; Koch, 2004; Salerno & Curatti, 2003). En la ruta de biosíntesis de sacarosa en tejidos fotosintéticos, los determinantes principales de la canalización del carbono hacia la biosíntesis de sacarosa son las reacciones catalizadas por la FBPasa y la SPS (Kerr & Huber, 1987).

La FBPasa cataliza la primera reacción irreversible de la ruta de biosíntesis de sacarosa, además de que está sujeta a diferentes mecanismos de regulación. Por ejemplo, se ha descrito el incremento de su actividad por el incremento de triosas-fosfato en el citoplasma (Stitt & Quick, 1989), mientras que la producción de su regulador alostérico fructosa-2,6-bisfosfato disminuye su actividad y se debe a la acumulación de hexosas-fosfato en el citosol (Winter & Huber, 2000). Sin embargo, la inactivación (knockout) del gen de la FBPasa citosólica en

*Arabidopsis thaliana* no compromete la viabilidad ni genera modificaciones en el fenotipo de la planta, a pesar de que se acumula más almidón, sin modificación del contenido de sacarosa en hojas (Rojas-González et al., 2015). También, en mutantes antisentido de la FBPasa citosólica en plantas de papa (*Solanum tuberosum*) se observó un incremento de la cantidad de almidón en hojas, mientras que el desarrollo de otros órganos como tubérculos y el contenido de azúcares solubles no fue significativamente alterado (Zrenner et al. 1996).

Los resultados de los trabajos antes descritos sugieren la presencia de un mecanismo compensatorio por la disrupción de la función de la FBPasa citosólica que implica la movilización de almidón del cloroplasto para generar hexosas que son exportadas al citoplasma para la biosíntesis de sacarosa (Serrato et al., 2009; Zrenner et al., 1996). Esto también denota la plasticidad que tiene la biosíntesis de sacarosa para evitar la translocación de triosas-fosfato del cloroplasto y por consecuencia la reacción catalizada por la FBPasa.

Por su parte, la reacción catalizada por la SPS, si bien es irreversible en condiciones in vitro, los valores calculados de energía libre estándar de la reacción calculados in vivo indican que en los tejidos fotosintéticos es una reacción irreversible que desplaza el equilibrio de la reacción hacia la biosíntesis de sacarosa (Lunn y Ap Rees 1990; Chen et al. 2005; Maloney et al. 2015). La actividad enzimática de la SPS es regulada por estados de desarrollo y tejido-específica, además de que presenta regulación alostérica por Glucosa-6-fosfato y Pi, al igual que por modificaciones covalentes por fosforilación (Chávez-Bárceñas et al., 2000; Huber & Huber, 1996).

### **Transporte de sacarosa de tejidos fuente a tejidos consumidores**

Una vez sintetizada la sacarosa en tejidos fotosintéticos es transportada por rutas simplásticas y apoplásticas hasta alcanzar las células del mesófilo adyacentes al floema de dónde es descargada al apoplasto por proteínas transportadoras del tipo SWEET (Sugar Will Eventually be Exported Transporters) (Braun, 2012). El flujo de sacarosa se mantiene por la importación de sacarosa del apoplasto al floema mediada por transportadores de sacarosa (Sucrose transporters; SUT). En el floema, la sacarosa se distribuye por flujo de masas hasta los tejidos consumidores y entra a las células de estos tejidos por el simplasto a través de plasmodesmos, o por rutas apoplásticas en las que participan transportadores del tipo SWEET y SUT (Kühn

& Grof, 2010; Milne et al., 2018). Adicionalmente, cuando la sacarosa es liberada al apoplasto, puede ser hidrolizada por invertasas apoplásticas para producir Glucosa y Fructosa que son subsecuentemente incorporadas a los tejidos consumidores por transportadores de hexosas (Milne et al., 2018; Sauer, 2007).

En los tejidos consumidores, la sacarosa es sustrato de diferentes rutas metabólicas en dónde se utiliza para generar energía o como molécula precursora para la biosíntesis de moléculas estructurales, polímeros de reserva, u otros metabolitos. Sin embargo, también ha sido detectada la expresión de genes y la actividad enzimática de SPS en tejidos consumidores como semillas en germinación, raíces, nódulos de bacterias fijadoras de nitrógeno y granos de polen en inflorescencias inmaduras, en dónde la biosíntesis de sacarosa es importante para la formación de polímeros de azúcares, el intercambio de azúcares durante las interacciones simbióticas mutualistas con bacterias fijadoras de nitrógeno y en respuesta a estrés ambiental como sequía y altas temperaturas (Aleman et al., 2010; Bilska-Kos et al., 2020; Chávez-Bárceñas et al., 2000; Hirose et al., 2014; Okamura et al., 2011; Xue et al., 2021).

### **Relevancia de la biosíntesis de sacarosa en interacciones con hongos formadores de micorriza arbuscular y otras interacciones mutualistas planta-microorganismo**

La presencia de HMA en las raíces de plantas genera una demanda extra de carbono que es movilizado a la raíz en forma de sacarosa, ya que durante la asociación el hongo es un consumidor adicional de carbono. Se han reportado incrementos de la tasa fotosintética en plantas colonizadas por HMA (Wright et al., 1998). Experimentos realizados en *Cucumis sativus* con HMA reportaron un descenso de entre el 10 y el 40 % en la actividad fotosintética posterior a la remoción del micelio extrarradicular, demostrando que la presencia del hongo incrementa las capacidades de movilización de carbono en raíces colonizadas (Gavito et al., 2019). También, se ha propuesto que el incremento de la actividad fotosintética de plantas colonizadas no solo es el resultado de la presencia del HMA en las raíces, sino que se explica por el incremento en la absorción de nutrientes, particularmente del P por el HMA (Black et al., 2000). Sin embargo, se ha determinado que la adquisición de nutrientes no explica completamente la estimulación de la tasa fotosintética, sino que existen otras características que promueve la simbiosis como la estimulación de tejidos consumidores que resulta, por

ejemplo, en el incremento del índice de cosecha (la proporción de producción de semillas respecto a la materia seca) (Kaschuk et al., 2009).

La SPS es codificada por una familia multigénica que consiste de tres a cinco copias de genes encontrados en los genomas de plantas superiores (Castleden et al., 2004; Jiang et al., 2015; Langenkämper et al., 2002). Algunos de los genes de SPS presentan redundancia en su expresión (Chen et al., 2005; Solís-Guzmán et al., 2017; Volkert et al., 2014). Sin embargo, algunos genes de SPS con papeles importantes se expresan en tejidos específicos en momentos precisos como en las oscilaciones de luz y oscuridad o en estados de desarrollo concretos (Chávez-Bárceñas et al., 2000; Lin et al., 2014; Okamura et al., 2011; Solís-Guzmán et al., 2017; Volkert et al., 2014).

La influencia que ejerce la simbiosis micorrízica sobre la actividad fotosintética en plantas podría estar relacionada con la modulación de la SPS en términos de su expresión y de su actividad enzimática. Sin embargo, la evidencia experimental sobre la distribución del carbono en plantas en relación con el papel de la SPS en plantas colonizadas por HMA ha sido controvertido. En plantas de *C. sativus* inoculadas y no inoculadas con HMA no se encontraron diferencias en la actividad enzimática de SPS (Black et al., 2000). Sin embargo, se reportó que en las mismas condiciones de crecimiento, en las hojas de *Poncirus trifoliata* inoculadas con HMA hay mayor actividad de SPS que en plantas no colonizadas creciendo en condiciones óptimas y en déficit hídrico (Wu et al., 2017). Éste último estudio sugirió que la simbiosis micorrízica modula la actividad de SPS para incrementar la producción de sacarosa y suplir las demandas de carbono del hongo, pero también se estimula la producción de ésta en plantas colonizadas como osmoprotector bajo condiciones de déficit hídrico (Wu et al., 2017).

El papel de la SPS en la distribución de carbono en plantas colonizadas por endófitos mutualistas ha sido abordado más ampliamente en la interacción de plantas con otros endófitos que colonizan raíces. Por ejemplo, en la interacción con *Medicago sativa* y *Sinorhizobium meliloti*. Tres genes codifican diferentes isoformas de SPS en *M. sativa*, *MsSPSa*, *MsSPSB* y *MsSPSB3*, de los cuales *MsSPSB* y *MsSPSB3* incrementaron su expresión de manera exclusiva en hojas, mientras que *MsSPSa* incrementó su expresión exclusivamente en raíces colonizadas por *S. meliloti* y de manera particular en nódulos (Aleman et al., 2010). Además, se definió posteriormente en esta misma interacción que

SPSB controla la biosíntesis de sacaros en hojas, mientras que la SPSA está involucrada en ciclos regulatorios de biosíntesis y catabolismo de sacarosa y de los productos del catabolismo de almodón para regular el carbono que se otorga al simbiote (Padhi et al., 2019).

Más recientemente se describió en la interacción de tomate con *Serendipita indica*, que la presencia del endófito en las raíces estimula el incremento de la actividad enzimática de SPS y esto está acompañado del incremento de la expresión del gen *SISPSA1*, uno de los cuatro genes que codifican las diferentes SPS en tomate (De Rocchis et al., 2022). Por lo que se sugirió que la síntesis de sacarosa en raíces colonizadas por este hongo endófito juega un papel importante durante la interacción y produce efectos fisiológicos en la planta como acumulación de biomasa en la raíz (De Rocchis et al., 2022).

Durante la simbiosis micorrízica de tipo arbuscular, el incremento en la cantidad de P en la planta podría modular de manera indirecta la actividad de la SPS, dado que el P es esencial para la movilización del carbono del cloroplasto al citoplasma, y también regula la actividad por fosforilación y regulación alostérica (Häusler et al., 2000; Winter & Huber, 2000).

Los estudios que existen hasta ahora indican que los elementos genéticos y los mecanismos moleculares que regulan la expresión y actividad de la SPS responden a las interacciones mutualistas. Sin embargo, se requiere más información para elucidar los mecanismos que modulan el contenido de sacarosa en las interfases de intercambio de nutrientes entre los simbiontes durante las interacciones mutualistas planta-microorganismo.

### **Papel de transportadores de carbohidratos en la distribución de carbono en plantas colonizadas por hongos formadores de micorriza arbuscular**

La sacarosa, como la principal forma de distribución de carbono de las plantas, ingresa al floema con la asistencia de transportadores de sacarosa del tipo SUT. Los transportadores tipo SUT son proteínas que pertenecen a una pequeña familia multigénica que se divide en tres grupos filogenéticos designados como del tipo I, II y III; los transportadores SUT del tipo I y II se encuentran en el floema, mientras que los del tipo III se localizan en la membrana del tonoplasto, éstos últimos funcionan en el almacenamiento transitorio de sacarosa en el tonoplasto (Reinders, 2012).

Con el análisis semicuantitativo de la expresión de genes SUT en tomate se determinó que el gen *SISUT1* disminuye su expresión cuando las raíces están colonizadas por *Glomus caledonium* o *G. intraradices*, al igual que, se determinó que la disponibilidad de P en ausencia de la simbiosis no tenía influencia sobre la expresión de este gen (Ge et al., 2008). Sugiriendo que los cambios en la expresión de *SISUT1* en presencia de las especies de HMA evaluadas se debían a la colonización micorrízica y no a la mejora en la adquisición de P promovida por el hongo (Ge et al., 2008). Posteriores análisis con técnicas más sensibles, determinaron que en tomate los tres genes codifican transportadores de sacarosa que corresponden a *SISUT1*, *SISUT2* y *SISUT4*, que incrementan su expresión en hojas de tomate de plantas colonizadas por *Funneliformis mosseae* (Boldt et al., 2011). En estas mismas condiciones pero en raíces, solo *SISUT1* y *SISUT4*, incrementaron su expresión en presencia de la simbiosis micorrízica, sin alteraciones de la expresión de *SISUT2* (Boldt et al., 2011). En *M. truncatula*, los genes *MtSUT1-1*, *MtSUT2* y *MtSUT4-1* (los genes ortólogos de *SISUT1*, *SISUT2* y *SISUT4*, respectivamente), incrementan su expresión en tejidos foliares, en condiciones de carencia de fósforo, en tales condiciones, su expresión es aún mayor cuando las raíces son colonizadas por *Rhizophagus irregularis* (Doidy et al., 2012), sugiriendo que las plantas que crecen en condiciones de escasas de P y en presencia de la simbiosis micorrízica promueven la carga de azúcares al floema para transportarlo a las raíces (Doidy et al., 2012). Sin embargo, en raíces solo se detectó incremento de la expresión de *MtSUT1-1* en raíces colonizadas por el HMA, mientras que la expresión de los genes del resto de los transportadores SUT evaluados fueron significativamente iguales entre plantas colonizadas y no colonizadas por el HMA (Doidy et al., 2012).

Estudios con injertos que combinaban plantas de genotipo silvestre y plantas con el gen *SISUT2* silenciado, revelaron que el silenciamiento del gen *SISUT2* en raíces de tomate incrementa la colonización micorrízica, y que este efecto de la simbiosis era específico del silenciamiento de *SISUT2* en la raíz (Bitterlich et al., 2014). El transportador SUT2 se localizó en la membrana periarbuscular y se determinó que su función es la de reincorporar una proporción de la sacarosa que se exporta al espacio periarbuscular, para limitar la disponibilidad de carbono para el hongo (Bitterlich et al., 2014).

Los transportadores tipos SWEET son otra clase de transportadores de carbohidratos codificados por una familia multigénica dividida en transportadores Clase I, que tiene

afinidad por hexosas (glucosa y fructosa) y los transportadores de Clase II que son afines a glucosa y sacarosa (Feng et al., 2015). Una de las funciones de estos transportadores es la de exportar sacarosa al apoplasto, un paso esencial para la carga del floema (Chen et al., 2012). En los últimos años se ha generado evidencia de que estos transportadores juegan papeles importantes en la distribución de carbono en plantas durante interacciones bióticas con microorganismos patógenos y mutualistas. En *Lotus japonicus*, que contiene 13 genes que codifican transportadores del tipo SWEET, solamente el gen *LjSWEET3* incrementa su expresión en nódulos formados por *Mesorhizobium loti* y en raíces colonizadas por *R. irregularis* (Sugiyama et al., 2016). En *Solanum tuberosum*, 22 de los 35 genes SWEET que contiene su genoma modifican su expresión en diferentes estados de desarrollo de la simbiosis micorrízica de tipo arbuscular (Manck-Götzenberger & Requena, 2016). De este resultado se identificaron tres genes cuyo patrón de expresión se analizó con la fusión de su promotor con un gen reportero y se determinó que la expresión de estos genes está presente en células colonizadas por arbusculos (Manck-Götzenberger & Requena, 2016). Adicionalmente se determinó que los genes *StSWEET1a*, *StSWEET1b* y *StSWEET7a* son genes que incrementan su expresión en raíces colonizadas por un HMA (Manck-Götzenberger & Requena, 2016). Además, la expresión ectópica de *StSWEET7a*, indujo un mayor nivel de colonización del sistema radicular de plantas de papa por *R. irregularis* y por el patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *tuberosi* (Tamayo et al., 2022). Lo que indica que el incremento de la expresión de genes de transportadores del tipo SWEET en interacciones simbióticas, involucra el incremento de la capacidad consumidora de raíces colonizadas por hongos benéficos y patógenos (Tamayo et al., 2022). Los genes *MtSWEET1b* y *MtSWEET6*, ortólogos a los reportados en papa, también incrementan su expresión en plantas de *M. truncatula* en raíces colonizadas por un HMA (Kafle et al., 2019) y *MtSWEET1b* tiene localización subcelular en la membrana periarbuscular (An et al., 2019). También, la comparación de interacciones cooperativas y no cooperativas de diferentes especies de HMA con diferentes genotipos de *Glycine max*, se determinó que el incremento de la expresión de genes que codifican transportadores del tipo SWEET está relacionada con efectos positivos de la simbiosis sobre el desarrollo de las plantas (Zhao et al., 2019). Además de estas clases de transportadores de azúcares, otras clases de transportadores de monosacáridos se han asociado a la regulación de la distribución del carbono en plantas

colonizadas por hongos formadores de micorriza arbuscular. La primera evidencia experimental que se tuvo del papel de transportadores de monosacáridos en la distribución del carbono en plantas colonizadas por HMA fue la detección por hibridación in situ de la expresión del gen *Mtst1* en raíces de *Medicago* spp en células que albergaban arbusculos de *G. versiforme* (Harrison, 1996). En tomate, el gen *SISFP7* (antes llamado *LeST3*), un transportador de hexosas perteneciente a la principal superfamilia de facilitadores, incrementa su expresión en tejidos foliares cuando las raíces son colonizadas por HMA o por *Phytophthora parasítica* y se determinó que este fenómeno es resultado de la estimulación del transporte de carbohidratos desde los tejidos fotosintéticos hacia las raíces colonizadas por hongo u otros organismos que colonizan raíces (García-Rodríguez et al., 2005). El incremento de la expresión del transportador de monosacáridos *ZmMST1* en raíces de maíz colonizadas por *G. intraradices*, correlacionó con el incremento de azúcares en condiciones de carencia de P (Wright et al., 2005).

La expresión de genes ortólogos que codifican transportadores de azúcares en diferentes especies de plantas en respuesta a la asociación micorrízica de tipo arbuscular, indica la existencia de un mecanismo molecular en plantas que controla la cantidad de carbono que se brinda al hongo en forma de hexosas en dónde los transportadores SUT, SWEET y transportadores de monosacáridos tienen un papel común (Salmeron-Santiago et al., 2022).

### **Inducción del catabolismo de sacarosa en plantas colonizadas por hongos formadores de micorriza arbuscular**

En las plantas, las enzimas sacarosa sintasa (SUS; EC 2.4.1.13) y las invertasas (EC 3.2.1.26) son capaces de catabolizar sacarosa, para subsecuentemente canalizar el carbono a diferentes rutas metabólicas. Los genes que codifican estas dos enzimas en las plantas superiores integran familias multigénicas (Tauzin & Giardina, 2014; Xu et al., 2019).

Las invertasas se localizan subcelularmente en el citoplasma, mitocondrias, cloroplastos, vacuola y en el apoplasto e hidrolizan sacarosa para generar glucosa y fructosa (Tauzin & Giardina, 2014). Las invertasas apoplásticas, también conocidas como invertasas de pared celular, juegan un papel importante durante la interacción de plantas con HMA, estas enzimas

hidrolizan sacarosa en el espacio periarbuscular para generar hexosas que son susceptibles de ser adquiridas por el HMA.

La expresión de la invertasa apoplástica LIN6 en tomate incrementa en respuesta a estrés ambiental, estímulos mecánicos y por la infección de patógenos (Proels & Roitsch, 2009). El patrón de expresión del promotor y la identificación de transcritos por hibridación in situ de LIN6 en plantas de tomate en interacción con HMA, se han localizado en células colonizadas por arbusculos (Schaarschmidt et al., 2006). En los más recientes modelos de transferencia de carbono de las plantas hacia el HMA, se considera que las invertasas apoplásticas generan hexosas que son transferidas al HMA (García-Rodríguez et al., 2007; Manck-Götzenberger & Requena, 2016; Schaarschmidt et al., 2006). También, se reportó que la expresión de un gen de invertasas vacuolares se sobreexpresa en raíces de *Phaseolus vulgaris* colonizadas por *G. intraradices* (Blee & Anderson, 2002). En *G. max*, se describió el incremento de la actividad de invertasas citoplásmicas en raíces colonizadas por *G. mosseae* (Schubert et al., 2003). Sugiriendo que los ciclos de resíntesis de sacarosa en los tejidos radiculares juegan un papel importante en la regulación de la distribución de carbono en plantas colonizadas por HMA. De manera particular, la expresión de un gen de una invertasa de levadura fusionado al promotor 35S en tabaco generó que las plantas acumularan una mayor proporción de azúcares solubles en hojas, pero el contenido de éstos se redujo en raíces, mientras que la colonización micorrízica también fue menor que en plantas de genotipo silvestre (Schaarschmidt, Kopka, et al., 2007). Por su parte, la expresión localizada de un gen de invertasa de levadura en distintos espacios subcelulares en raíces de tabaco y *M. truncatula* incrementó la acumulación de hexosas, sin ningún impacto significativo sobre la simbiosis micorrízica (Schaarschmidt, Gonzalez, et al., 2007). Debido a esto se propuso que el incremento de la actividad de invertasas no impacta significativamente en la fisiología de la simbiosis micorrízica y que el suplemento de carbono hacia el HMA, mediado por invertasas, no es un factor limitante para el desarrollo de la simbiosis micorrízica (Schaarschmidt, Gonzalez, et al., 2007).

Al igual que invertasas, las enzimas SUS son codificadas por una familia multigénica. En *M. truncatula*, se conocen cinco genes que codifican SUS, pero solo *MySucSI*, se induce en raíces colonizadas por *G. mosseae* y además la actividad del promotor de este gen se localizó en células colonizadas por arbusculos y en las células adyacentes a éstas (Hohnjec et al.,

2003). Un patrón de expresión similar se reportó en raíces de *P. vulgaris* colonizadas por *G. irregularis* por detección de la expresión de transcritos de SUS con hibridación in situ (Blee & Anderson, 2002). En *M. truncatula*, el silenciamiento de la expresión de SUS por una secuencia antisentido de *MtSuc1*, generó arbusculos aberrantes efímeros cuando las raíces se colonizaron por *G. intraradices* (Baier et al., 2010). Se concluyó que este gen es esencial para el mantenimiento de la simbiosis, además, se demostró que la sola actividad de invertasas no es suficiente para mantener el flujo de carbono hacia el HMA (Baier et al., 2010). Se ha propuesto que SUS es importante para mantener el gradiente de movilización de sacarosa hacia las células colonizadas por el HMA para generar productos que pueden ser usados para mantener las necesidades metabólicas de las células colonizadas por arbusculos o para generar hexosas para el HMA durante la interacción (Blee & Anderson, 2002; García-Rodríguez et al., 2007; Hohnjec et al., 2003).

Actualmente, se considera que durante la simbiosis micorrízica de tipo arbuscular, las invertasas apoplásticas generan hexosas a partir de sacarosa para brindar carbono en forma de hexosas al HMA (Manck-Götzenberger & Requena, 2016; Salmeron - Santiago et al., 2022). La función de las invertasas apoplásticas es reducir el contenido de sacarosa en el espacio periarbuscular para mantener un flujo constante de sacarosa a este espacio subcelular; mientras que el flujo de sacarosa hacia las células colonizadas es coordinado también por la actividad de SUS e invertasas localizadas en otros espacios subcelulares como la vacuola o el citoplasma.

### **Las plantas otorgan lípidos como fuente de carbono a los HMA**

Estudios del metabolismo realizados en esporas en estado de germinación revelaron la existencia de rutas metabólicas que controlaban el metabolismo del carbono en estas etapas del desarrollo, como las rutas de la gluconeogénesis a partir de los lípidos almacenados en las esporas y la ruta del glioxilato (Bago et al., 1999). Sin embargo, no se encontró evidencia de la existiera la ruta de biosíntesis de ácidos grasos, para la generación de biomasa, particularmente asociada a la biosíntesis de membranas (Bago et al., 1999). Se especuló que esta condición metabólica de los HMA impide la formación de nuevos propágulos de esporas

germinadas, y es un indicio de que la simbiosis obligada de estos organismos está relacionada con el metabolismo de los ácidos grasos (Bago & Bécard, 2002).

Con los avances en los estudios de genómica de estos organismos, se detectó que *R. irregularis* posee los elementos genéticos necesarios para realizar la oxidación y la elongación y desaturación de ácidos grasos, pero no se encontró evidencia de la presencia del complejo multienzimático de la ácido graso sintasa I (FAS I), responsable de la biosíntesis de ácidos grasos de novo (Wewer et al., 2014). Posteriormente, se describió que las plantas biosintetizan ácidos grasos *de novo* que posteriormente son transferidos al hongo como fuente de carbono y además se confirmó que esta fuente de carbono es esencial para generar una colonización normal del sistema radicular (Jiang et al., 2017; Luginbuehl et al., 2017). Posteriormente, los genomas de otras especies de HMA, revelarían que estos tampoco poseen el complejo FAS I, por lo que se considera que la incapacidad de sintetizar ácidos grasos de novo es una característica común dentro de Glomeromycotina (Kobayashi et al., 2018; Rich et al., 2017), explicando de esta manera, su mutualismo obligado con un simbionte que sí posee esta capacidad metabólica.

Una vez que se describió que las plantas brindan lípidos como fuente de carbono a los HMA, se comenzó a estudiar la regulación de la biosíntesis de ácidos grasos en plantas colonizadas por HMA. Los factores de transcripción WRINKLED de la familia AP2-EREBP (APETALA2-ethylen-responsive element binding protein) controlan la biosíntesis de sacarosa en *Arabidopsis* (To et al., 2013). En *L. japonicus* un factor de transcripción homólogo a WRINKLED, se describió que activa genes inducibles por la presencia de la simbiosis micorrízica como el transportador de fosfatos 4 (*LjPY4*), una bomba de hidrógeno dependiente de ATP (*LjHAI*) y al gen *RAM2* (*REQUIRED FOR ARBUSCULAR MYCORRHIZATION 2*), este último codifica una gliceraldehido-3-fosfato acil transferasa (EC: 2.3.1.15). De manera similar, en *M. truncatula* los factores de transcripción WRI5, WRI5/Erf1, y WRI5/c regulan la expresión de STR (Stunted Arbuscule) que codifican un transportador dependiente de ATP que se localiza en la membrana periarbuscular y se sugiere funciona en el transporte de ácidos grasos hacia el espacio periarbuscular (Gutjahr et al., 2012; E. Wang et al., 2012; Zhang et al., 2010).

Recientemente, se describió la activación de la expresión de los genes asociados a la biosíntesis y transporte de ácidos grasos como *RAM2*, *STR1* y *STR2* es controlada por

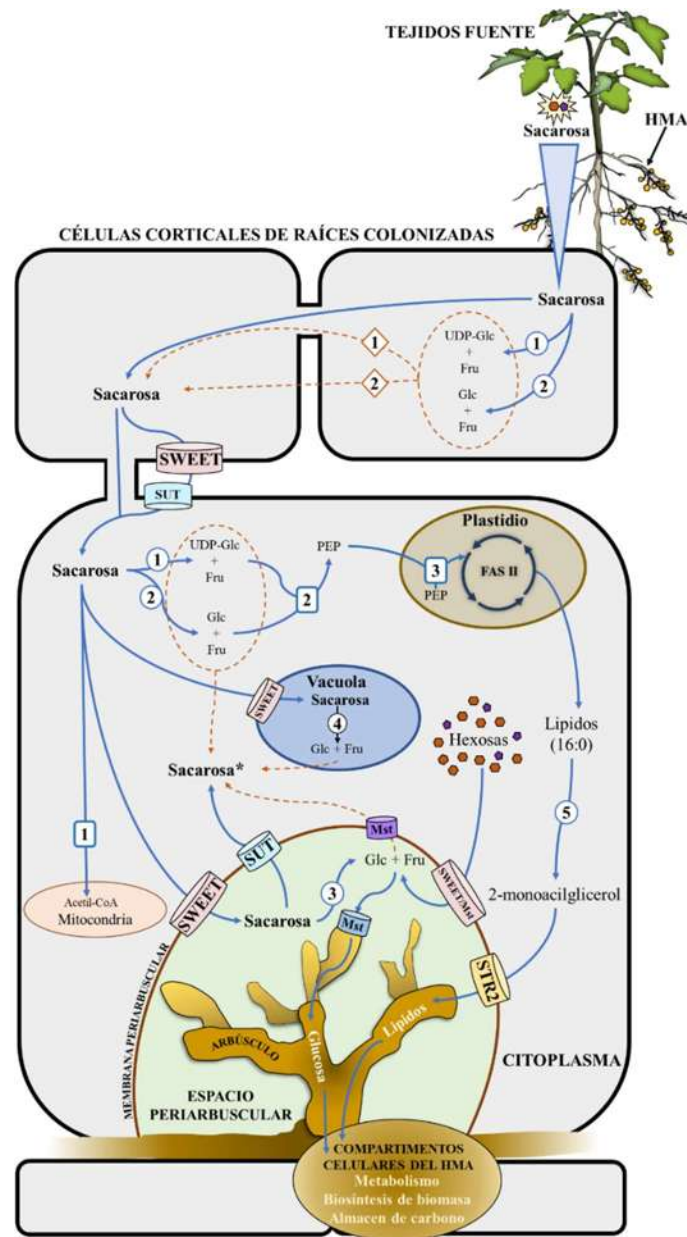
factores de transcripción del tipo WRINKLED en plantas superiores y en briofitas (Rich et al., 2021). Esto sugiere que existe un programa molecular común que controla la biosíntesis y transporte de ácidos grasos desde la planta hacia el hongo que está conservado a lo largo de los diversos linajes de plantas capaces de establecer asociaciones micorrízicas. Esto sustenta la hipótesis de que el establecimiento de la asociación micorrízica de tipo arbuscular fue un factor clave durante la transición de las plantas de hábitats totalmente acuáticos al terrestre y durante la colonización de las plantas sobre la corteza terrestre (Pirozynski, 1981; Remy et al., 1994; Rich et al., 2021).

A pesar de los avances en el entendimiento del flujo del carbono de las plantas hacia el HMA, la importancia de la transferencia de carbohidratos y lípidos durante la asociación aún no se ha abordado ampliamente. A través de análisis de transcriptómica se ha descrito que los HMA que promueven el crecimiento generan estimulación del transporte y catabolismo de sacarosa (Zhao et al., 2019). En este mismo estudio se determinó que la activación de la ruta de biosíntesis y transporte de ácidos grasos medidas por RAM2 y STR1/STR2, respectivamente, se activa independientemente de la respuesta sobre el crecimiento de las plantas (Zhao et al., 2019). Por lo que se concluyó que los efectos positivos en el crecimiento de las plantas están relacionados con la estimulación del transporte y catabolismo de sacarosa en la planta hospedera (Zhao et al., 2019).

El incremento del contenido de sacarosa en células colonizadas por arbuscúlos con el uso de técnicas de microdissección láser y en tejidos radiculares colonizados se ha descrito en diversos modelos biológicos (Boldt et al., 2011; Doidy et al., 2012; Gaude et al., 2015; Zhao et al., 2019).

Estudios realizados en *Arabidopsis*, un modelo biológico que no forma asociaciones micorrízicas, se describió que la acumulación de sacarosa promueve la actividad de WRINKLED1 (WRI1) por la inactivación de KIN10, su regulador negativo, promoviendo la acumulación de ácidos grasos, por lo que se sugirió que la homeostasis de sacarosa juega un papel esencial durante la biosíntesis de ácidos grasos (Zhai, Liu, & Shanklin, 2017; Zhai et al., 2017). Esto sugiere que la asociación micorrízica de tipo arbuscular promueve la acumulación de sacarosa como una señal que impacta sobre la biosíntesis de ácidos grasos. Sin embargo, la acumulación de sacarosa parece ser modificada dinámicamente, en donde factores como la edad de la planta y la progresión de la colonización en el sistema radicular

son importantes, como lo sugieren algunos estudios (Sonia García-Rodríguez et al., 2007). En la Figura 3, se esquematiza el flujo de carbono en células colonizadas por arbusculos durante la simbiosis micorrízica de tipo arbuscular.



**Figura 3.** Representación esquemática del flujo de carbono en células colonizadas por arbusculos. Adaptado de Salmeron-Santiago et al., 2022. Los carbohidratos solubles generados durante las reacciones de la fotosíntesis son transportados hasta las células corticales que contienen arbusculos. El catabolismo de sacarosa en las células colonizadas por arbusculos promueve el flujo de hexosas y lípidos al espacio peri-arbuscular, resultado de la fuerza consumidora del HMA. Las flechas color azul, indican el flujo de carbono; las líneas discontinuas color naranja indican los ciclos “fútiles” de catabolismo y biosíntesis de sacarosa; los cilindros de diferentes colores indican transportadores de carbohidratos y lípidos. Las enzimas están indicadas como a continuación se describe: (1) SUS; (2) invertasa neutra (citoplásica); (3) invertasa apoplástica; (4) invertasa vacuolar; (5) Glicerol-3-phosphato acil transferasa. Los números en rectángulos denotan rutas metabólicas

específicas correspondientes a: (1) Catabolismo de sacarosa para fosforilación oxidativa; (2) Síntesis de fosfoenolpiruvato a partir de la glucólisis; (3) biosíntesis de lípidos mediada por el complejo macromolecular ácido graso sintasa (FAS I). Los diamantes indican flujos potenciales de carbono como: (1) Rutas simplásticas y (2) apoplásticas de hexosas a las células consumidoras. Sacarosa\* indica la sacarosa sintetizada en las células colonizadas por arbusculos.

## **Regulación del desarrollo de la simbiosis micorrízica por el fósforo**

La simbiosis micorrízica de tipo arbuscular es particularmente sensible a las cantidades de P que se tienen a disposición en los suelos o sustratos en lo que se desarrolla la asociación. Se ha reportado ampliamente que la asociación micorrízica se impide en condiciones en las que el P se encuentra en suficiencia, mientras que se promueve en condiciones en las que se convierte en un factor limitante para el desarrollo de la planta (Balzergue et al., 2013; Nouri et al., 2014; Smith & Smith, 2011; Smith & Read, 2008).

Numerosos efectos del fósforo fueron descritos como inhibidores de la simbiosis micorrízica de tipo arbuscular, como la limitación de la germinación de las esporas y crecimiento de tubos de germinación (Miranda & Harris, 1994). También se propuso que la inhibición de la rizodeposición de estrigolactonas, que funcionan en la señalización temprana entre raíces y HMA, tenía un papel importante en condiciones de suficiencia de P (Czarnecki et al., 2013). Sin embargo estos efectos de la suficiencia de P no explicaban completamente la inhibición de la colonización micorrízica (Balzergue et al., 2013; Czarnecki et al., 2013).

Recientemente, se describió el mecanismo molecular que resulta en la inhibición de la colonización micorrízica. Las plantas, responden a la deficiencia de fósforo por la activación de diversos mecanismos controlados por la expresión de factores de transcripción denominados PHR (PHOSPHATE STARVATION RESPONSE) (Satheesh et al., 2022). En arroz, el silenciamiento del factor de transcripción PHR2 (*phr2*) reduce la colonización y por lo menos 70 % de los genes relevantes para el desarrollo y función de la asociación micorrízica mitigan su expresión (Das et al., 2022). Incluso la expresión ectópica de PHR2 dirigida por el promotor 35S generó incrementó la proporción de colonización de *R. irregularis* en comparación con plantas de genotipo silvestre o en plantas *phr2* en condiciones de suficiencia de P (Das et al., 2022). En tomate, se demostró que uno de los principales represores de la simbiosis micorrízica en condiciones de suficiencia de P es SIPX1 (SYG1 (suppressor of yeast GPA1)/Pho81(phosphate 81)/XPR1 (xenotropic and polytropic

retrovirus receptor 1) el represor de la actividad de diversos factores de transcripción pertenecientes al grupo de PHR (Liao et al., 2022). La interacción entre SIPX1 con los factores de transcripción PHR impide la activación de los genes responsables del desarrollo de la simbiosis (Liao et al., 2022). Mientras que el silenciamiento de *SIPX1* promueve la colonización del sistema radicular en condiciones de suficiencia de P (Liao et al., 2022). Esos nuevos descubrimientos brindan nuevas perspectivas para el estudio de la regulación por el P en el estudio de esta interacción micorrízica, que es agronómica y ecológicamente muy importante (Das et al., 2022; Liao et al., 2022).

### Literatura consultada

- Aleman, L., Ortega, J. L., Martínez-Grimes, M., Seger, M., Holguin, F. O., Uribe, D. J., García-Ibilcieta, D., & Sengupta-Gopalan, C. (2010). Nodule-enhanced expression of a sucrose phosphate synthase gene member (*MsSPSA*) has a role in carbon and nitrogen metabolism in the nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Planta*, *231*(2), 233–244. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-1043-y>
- An, J., Zeng, T., Ji, C., de Graaf, S., Zheng, Z., Xiao, T. T., Deng, X., Xiao, S., Bisseling, T., Limpens, E., & Pan, Z. (2019). A *Medicago truncatula* SWEET transporter implicated in arbuscule maintenance during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, *224*(1), 396–408. <https://doi.org/10.1111/nph.15975>
- Bago, B., & Bécard, G. (2002). Bases of the obligate biotrophy of arbuscular mycorrhizal fungi. In *Mycorrhizal Technology in Agriculture* (Vol. 53, Issue 9, pp. 33–48). Birkhäuser Basel. [https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8117-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8117-3_3)
- Bago, Berta, Pfeffer, P. E., Douds, D. D., Brouillette, J., Bécard, G., & Shachar-Hill, Y. (1999). Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiology*, *121*(1), 263–271. <https://doi.org/10.1104/pp.121.1.263>
- Baier, M. C., Keck, M., Gödde, V., Niehaus, K., Küster, H., & Hohnjec, N. (2010). Knockdown of the symbiotic sucrose synthase *MtSucS1* affects arbuscule maturation and maintenance in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, *152*(2), 1000–1014. <https://doi.org/10.1104/pp.109.149898>

- Balzerque, C., Chabaud, M., Barker, D. G., Bécard, G., & Rochange, S. F. (2013). High phosphate reduces host ability to develop arbuscular mycorrhizal symbiosis without affecting root calcium spiking responses to the fungus. *Frontiers in Plant Science*, 4(October), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00426>
- Bilska-Kos, A., Mytych, J., Suski, S., Magoń, J., Ochodzki, P., & Zebrowski, J. (2020). Sucrose phosphate synthase (SPS), sucrose synthase (SUS) and their products in the leaves of *Miscanthus × giganteus* and *Zea mays* at low temperature. *Planta*, 252(2), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03421-2>
- Bitterlich, M., Krügel, U., Boldt-Burisch, K., Franken, P., & Kühn, C. (2014). The sucrose transporter SISUT2 from tomato interacts with brassinosteroid functioning and affects arbuscular mycorrhiza formation. *Plant Journal*, 78(5), 877–889. <https://doi.org/10.1111/tpj.12515>
- Black, K. G., Mitchell, D. T., & Osborne, B. A. (2000). Effect of mycorrhizal-enhanced leaf phosphate status on carbon partitioning, translocation and photosynthesis in cucumber. *Plant, Cell and Environment*, 23(8), 797–809. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00598.x>
- Blee, K. A., & Anderson, A. J. (2002). Transcripts for genes encoding soluble acid invertase and sucrose synthase accumulate in root tip and cortical cells containing mycorrhizal arbuscules. *Plant Molecular Biology*, 50(2), 197–211. <https://doi.org/10.1023/A:1016038010393>
- Boldt, K., Pörs, Y., Haupt, B., Bitterlich, M., Kühn, C., Grimm, B., & Franken, P. (2011). Photochemical processes, carbon assimilation and RNA accumulation of sucrose transporter genes in tomato arbuscular mycorrhiza. *Journal of Plant Physiology*, 168(11), 1256–1263. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.01.026>
- Braun, D. M. (2012). SWEET! The pathway is complete. *Science*, 335(6065), 173–174. <https://doi.org/10.1126/science.1216828>
- Castleden, C. K., Aoki, N., Gillespie, V. J., MacRae, E. A., Quick, W. P., Buchner, P., Foyer, C. H., Furbank, R. T., & Lunn, J. E. (2004). Evolution and function of the sucrose-phosphate synthase gene families in wheat and other grasses. *Plant Physiology*, 135(3), 1753–1764. <https://doi.org/10.1104/pp.104.042457>
- Chávez-Bárcenas, A. T., Valdez-Alarcón, J. J., Martínez-Trujillo, M., Chen, L., Xoconostle-

- Cázares, B., Lucas, W. J., & Herrera-Estrella, L. (2000). Tissue-specific and developmental pattern of expression of the rice *sps1* gene. *Plant Physiology*, *124*(2), 641–654. <https://doi.org/10.1104/pp.124.2.641>
- Chen, L.-Q., Qu, X.-Q., Hou, B. H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A. R., & Frommer, W. B. (2012). Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science*, *335*(6065), 207–211. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9780-8>
- Chen, S., Hajirezaei, M., & Börnke, F. (2005). Differential expression of sucrose-phosphate synthase isoenzymes in tobacco reflects their functional specialization during dark-governed starch mobilization in source leaves. *Plant Physiology*, *139*(3), 1163–1174. <https://doi.org/10.1104/pp.105.069468>
- Czarnecki, O., Yang, J., Weston, D., Tuskan, G., & Chen, J.-G. (2013). A dual role of strigolactones in phosphate acquisition and utilization in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(4), 7681–7701. <https://doi.org/10.3390/ijms14047681>
- Daie, J. (1993). Cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase: A key enzyme in the sucrose biosynthetic pathway. *Photosynthesis Research*, *38*(1), 5–14. <https://doi.org/10.1007/BF00015056>
- Das, D., Paries, M., Hobecker, K., Gigl, M., Dawid, C., Lam, H. M., Zhang, J., Chen, M., & Gutjahr, C. (2022). PHOSPHATE STARVATION RESPONSE transcription factors enable arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Nature Communications*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-27976-8>
- De Rocchis, V., Jammer, A., Camehl, I., Franken, P., & Roitsch, T. (2022). Tomato growth promotion by the fungal endophytes *Serendipita indica* and *Serendipita herbamans* is associated with sucrose de-novo synthesis in roots and differential local and systemic effects on carbohydrate metabolisms and gene expression. *Journal of Plant Physiology*, *276*, 153755. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153755>
- Doidy, J., Van Tuinen, D., Lamotte, O., Corneillat, M., Alcaraz, G., & Wipf, D. (2012). The *Medicago truncatula* sucrose transporter family: Characterization and implication of key members in carbon partitioning towards arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Plant*, *5*(6), 1346–1358. <https://doi.org/10.1093/mp/sss079>
- Feng, C. Y., Han, J. X., Han, X. X., & Jiang, J. (2015). Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of the SWEET gene family in tomato. *Gene*, *573*(2),

261–272. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.07.055>

- Flügge, U. I., Fischer, K., Gross, A., Sebald, W., Lottspeich, F., & Eckerskorn, C. (1989). The triose phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and import of the in vitro synthesized precursor protein into chloroplasts. *The EMBO Journal*, *8*(1), 39–46. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03346.x>
- García-Rodríguez, S., Pozo, M. J., Azcón-Aguilar, C., & Ferrol, N. (2005). Expression of a tomato sugar transporter is increased in leaves of mycorrhizal or *Phytophthora parasitica*-infected plants. *Mycorrhiza*, *15*(7), 489–496. <https://doi.org/10.1007/s00572-005-0354-5>
- García-Rodríguez, Sonia, Azcón-Aguilar, C., & Ferrol, N. (2007). Transcriptional regulation of host enzymes involved in the cleavage of sucrose during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Physiologia Plantarum*, *129*(4), 737–746. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00873.x>
- Gaude, N., Bortfeld, S., Erban, A., Kopka, J., & Krajinski, F. (2015). Symbiosis dependent accumulation of primary metabolites in arbuscule-containing cells. *BMC Plant Biology*, *15*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0601-7>
- Gavito, M. E., Jakobsen, I., Mikkelsen, T. N., & Mora, F. (2019). Direct evidence for modulation of photosynthesis by an arbuscular mycorrhiza-induced carbon sink strength. *New Phytologist*, *223*(2), 896–907. <https://doi.org/10.1111/nph.15806>
- Ge, L., Sun, S., Chen, A., Kapulnik, Y., & Xu, G. (2008). Tomato sugar transporter genes associated with mycorrhiza and phosphate. *Plant Growth Regulation*, *55*(2), 115–123. <https://doi.org/10.1007/s10725-008-9266-7>
- Genre, A., Lanfranco, L., Perotto, S., & Bonfante, P. (2020). Unique and common traits in mycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(11), 649–660. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0402-3>
- Guether, M., Neuhäuser, B., Balestrini, R., Dynowski, M., Ludewig, U., & Bonfante, P. (2009). A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology*, *150*(1), 73–83. <https://doi.org/10.1104/pp.109.136390>
- Gutjahr, C., & Parniske, M. (2013). Cell and developmental biology of arbuscular

- mycorrhiza symbiosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 29, 593–617. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122413>
- Gutjahr, C., Radovanovic, D., Geoffroy, J., Zhang, Q., Siegler, H., Chiapello, M., Casieri, L., An, K., An, G., Guiderdoni, E., Kumar, C. S., Sundaresan, V., Harrison, M. J., & Paszkowski, U. (2012). The half-size ABC transporters STR1 and STR2 are indispensable for mycorrhizal arbuscule formation in rice. *Plant Journal*, 69(5), 906–920. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04842.x>
- Harrison, M. J. (1996). A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *The Plant Journal*, 9(4), 491–503. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.09040491.x>
- Harrison, M. J., Dewbre, G. R., & Liu, J. (2002). A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell*, 14(10), 2413–2429. <https://doi.org/10.1105/tpc.004861>
- Häusler, R. E., Schlieben, N. H., Nicolay, P., Fischer, K., Fischer, K. L., & Flügge, U.-I. (2000). Control of carbon partitioning and photosynthesis by the triose phosphate/phosphate translocator in transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). I. Comparative physiological analysis of tobacco plants with antisense repression and overexpression of the triose phosphate/phosphate translocator. *Planta*, 210(3), 371–382. <https://doi.org/10.1007/PL00008145>
- Hirose, T., Hashida, Y., Aoki, N., Okamura, M., Yonekura, M., Ohto, C., Terao, T., & Ohsugi, R. (2014). Analysis of gene-disruption mutants of a sucrose phosphate synthase gene in rice, *OsSPS1*, shows the importance of sucrose synthesis in pollen germination. *Plant Science*, 225, 102–106. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.05.018>
- Hohnjec, N., Perlick, A. M., Pühler, A., & Küster, H. (2003). The *Medicago truncatula* sucrose synthase gene *MtSucSI* is activated both in the infected region of root nodules and in the cortex of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(10), 903–915. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2003.16.10.903>
- Huber, S. C., & Huber, J. L. (1996). Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1), 431–444. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.431>
- Ivanov, S., Austin, J., Berg, R. H., & Harrison, M. J. (2019). Extensive membrane systems

- at the host–arbuscular mycorrhizal fungus interface. *Nature Plants*, 5(2), 194–203. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0364-5>
- Jiang, S. Y., Chi, Y. H., Wang, J. Z., Zhou, J. X., Cheng, Y. S., Zhang, B. L., Ma, A., Vanitha, J., & Ramachandran, S. (2015). Sucrose metabolism gene families and their biological functions. *Scientific Reports*, 5, 1–24. <https://doi.org/10.1038/srep17583>
- Jiang, Y., Wang, W., Xie, Q., Liu, N., Liu, L., Wang, D., Zhang, X., Yang, C., Chen, X., Tang, D., & Wang, E. (2017). Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi. *Science*, 356(6343), 1172–1175. <https://doi.org/10.1126/science.aam9970>
- Kafle, A., Garcia, K., Wang, X., Pfeffer, P. E., Strahan, G. D., & Bücking, H. (2019). Nutrient demand and fungal access to resources control the carbon allocation to the symbiotic partners in tripartite interactions of *Medicago truncatula*. *Plant Cell and Environment*, 42(1), 270–284. <https://doi.org/10.1111/pce.13359>
- Kaschuk, G., Kuyper, T. W., Leffelaar, P. A., Hungria, M., & Giller, K. E. (2009). Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? *Soil Biology and Biochemistry*, 41(6), 1233–1244. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.03.005>
- Kaur, S., Campbell, B. J., & Suseela, V. (2022). Root metabolome of plant–arbuscular mycorrhizal symbiosis mirrors the mutualistic or parasitic mycorrhizal phenotype. *New Phytologist*, 234(2), 672–687. <https://doi.org/10.1111/nph.17994>
- Kerr, P. S., & Huber, S. C. (1987). Coordinate control of sucrose formation in soybean leaves by sucrose-phosphate synthase and fructose-2,6-bisphosphate. *Planta*, 170(2), 197–204. <https://doi.org/10.1007/BF00397888>
- Kobayashi, Y., Maeda, T., Yamaguchi, K., Kameoka, H., Tanaka, S., Ezawa, T., Shigenobu, S., & Kawaguchi, M. (2018). The genome of *Rhizophagus clarus* HR1 reveals a common genetic basis for auxotrophy among arbuscular mycorrhizal fungi. *BMC Genomics*, 19(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4853-0>
- Koch, K. (2004). Sucrose metabolism: Regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(3), 235–246. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.03.014>
- Kühn, C., & Grof, C. P. L. (2010). Sucrose transporters of higher plants. *Current Opinion in*

- Plant Biology*, 13(3), 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.02.001>
- Langenkämper, G., Fung, R. W. M., Newcomb, R. D., Atkinson, R. G., Gardner, R. C., & MacRae, E. A. (2002). Sucrose phosphate synthase genes in plants belong to three different families. *Journal of Molecular Evolution*, 54(3), 322–332. <https://doi.org/10.1007/s00239-001-0047-4>
- Liao, D., Sun, C., Liang, H., Wang, Y., Bian, X., Dong, C., Niu, X., Yang, M., Xu, G., Chen, A., & Wu, S. (2022). SISPX1-SIPHR complexes mediate the suppression of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate repletion in tomato. *The Plant Cell*, 4045–4065. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac212>
- Lin, I. W., Sosso, D., Chen, L. Q., Gase, K., Kim, S. G., Kessler, D., Klinkenberg, P. M., Gorder, M. K., Hou, B. H., Qu, X. Q., Carter, C. J., Baldwin, I. T., & Frommer, W. B. (2014). Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter SWEET9. *Nature*, 508(7497), 546–549. <https://doi.org/10.1038/nature13082>
- Liu, J. J., Chen, J., Xie, K., Tian, Y., Yan, A., Liu, J. J., Huang, Y., Wang, S., Zhu, Y., Chen, A., & Xu, G. (2020). A mycorrhiza-specific H<sup>+</sup>-ATPase is essential for arbuscule development and symbiotic phosphate and nitrogen uptake. *Plant Cell and Environment*, 43(4), 1069–1083. <https://doi.org/10.1111/pce.13714>
- Lu, W., Tang, X., Huo, Y., Xu, R., Qi, S., Huang, J., Zheng, C., & Wu, C. (2012). Identification and characterization of fructose 1,6-bisphosphate aldolase genes in *Arabidopsis* reveal a gene family with diverse responses to abiotic stresses. *Gene*, 503(1), 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.04.042>
- Luginbuehl, L. H., Menard, G. N., Kurup, S., Van Erp, H., Radhakrishnan, G. V., Breakspear, A., Oldroyd, G. E. D., & Eastmond, P. J. (2017). Fatty acids in arbuscular mycorrhizal fungi are synthesized by the host plant. *Science*, 356(6343), 1175–1178. <https://doi.org/10.1126/science.aan0081>
- Lunn, J. E., & ap Rees, T. (1990). Apparent equilibrium constant and mass-action ratio for sucrose-phosphate synthase in seeds of *Pisum sativum*. *Biochemical Journal*, 267(3), 739–743. <https://doi.org/10.1042/bj2670739>
- Maloney, V. J., Park, J. Y., Unda, F., & Mansfield, S. D. (2015). Sucrose phosphate synthase and sucrose phosphate phosphatase interact in planta and promote plant growth and biomass accumulation. *Journal of Experimental Botany*, 66(14), 4383–4394.

<https://doi.org/10.1093/jxb/erv101>

- Manck-Götzenberger, J., & Requena, N. (2016). Arbuscular mycorrhiza symbiosis induces a major transcriptional reprogramming of the potato *SWEET* sugar transporter family. *Frontiers in Plant Science*, 7(April), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00487>
- Milne, R. J., Grof, C. P., & Patrick, J. W. (2018). Mechanisms of phloem unloading: shaped by cellular pathways, their conductances and sink function. *Current Opinion in Plant Biology*, 43, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.11.003>
- Miranda, J. C. C., & Harris, P. J. (1994). Effects of soil phosphorus on spore germination and hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 128(1), 103–108. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb03992.x>
- Montero, H., Choi, J., & Paszkowski, U. (2019). Arbuscular mycorrhizal phenotyping: the dos and don'ts. *New Phytologist*, 221(3), 1182–1186. <https://doi.org/10.1111/nph.15489>
- Nouri, E., Breuillin-Sessoms, F., Feller, U., & Reinhardt, D. (2014). Phosphorus and nitrogen regulate arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Petunia hybrida*. *PLoS ONE*, 9(3), e90841. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090841>
- Okamura, M., Aoki, N., Hirose, T., Yonekura, M., Ohto, C., & Ohsugi, R. (2011). Tissue specificity and diurnal change in gene expression of the sucrose phosphate synthase gene family in rice. *Plant Science*, 181(2), 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.04.019>
- Padhi, S., Grimes, M. M., Muro-Villanueva, F., Ortega, J. L., & Sengupta-Gopalan, C. (2019). Distinct nodule and leaf functions of two different sucrose phosphate synthases in alfalfa. *Planta*, 250(5), 1743–1755. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03261-9>
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 763–775. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1987>
- Pirozynski, K. A. (1981). Interactions between fungi and plants through the ages. *Canadian Journal of Botany*, 59(10), 1824–1827. <https://doi.org/10.1139/b81-243>
- Proels, R. K., & Roitsch, T. (2009). Extracellular invertase LIN6 of tomato: A pivotal enzyme for integration of metabolic, hormonal, and stress signals is regulated by a diurnal rhythm. *Journal of Experimental Botany* 60(6), 1555–1567. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp027>

- Reinders, A. (2012). Evolution of plant sucrose uptake transporters. *Frontiers in Plant Science*, 3(February), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00022>
- Remy, W., Taylor, T. N., Hass, H., & Kerp, H. (1994). Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA*, 91(December), 11841–11843.
- Rich, M. K., Nouri, E., Courty, P. E., & Reinhardt, D. (2017). Diet of arbuscular mycorrhizal fungi: Bread and butter? *Trends in Plant Science*, 22(8), 652–660. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.05.008>
- Rich, M. K., Schorderet, M., & Reinhardt, D. (2014). The role of the cell wall compartment in mutualistic symbioses of plants. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00238>
- Rich, M. K., Vigneron, N., Libourel, C., Keller, J., Xue, L., Hajheidari, M., Radhakrishnan, G. V., Le Ru, A., Diop, S. I., Potente, G., Conti, E., Duijsings, D., Batut, A., Le Faouder, P., Kodama, K., Kyojima, J., Sallet, E., Bécard, G., Rodriguez-Franco, M., ... Delaux, P. M. (2021). Lipid exchanges drove the evolution of mutualism during plant terrestrialization. *Science*, 372(6544), 864–868. <https://doi.org/10.1126/science.abg0929>
- Rojas-González, J. A., Soto-Suárez, M., García-Díaz, Á., Romero-Puertas, M. C., Sandalio, L. M., Mérida, Á., Thormählen, I., Geigenberger, P., Serrato, A. J., & Sahrawy, M. (2015). Disruption of both chloroplastic and cytosolic FBPase genes results in a dwarf phenotype and important starch and metabolite changes in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 66(9), 2673–2689. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv062>
- Ruytinx, J., Kafle, A., Usman, M., Coninx, L., Zimmermann, S. D., & Garcia, K. (2020). Micronutrient transport in mycorrhizal symbiosis; zinc steals the show. *Fungal Biology Reviews*, 34(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2019.09.001>
- Salerno, G. L., & Curatti, L. (2003). Origin of sucrose metabolism in higher plants: When, how and why? *Trends in Plant Science*, 8(2), 63–69. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)00029-8](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)00029-8)
- Salmeron-Santiago, I. A., Martínez-Trujillo, M., Valdez-Alarcón, J. J., Pedraza-Santos, M. E., Santoyo, G., Pozo, M. J., & Chávez-Bárceñas, A. T. (2022). An updated review on the modulation of carbon partitioning and allocation in arbuscular mycorrhizal plants.

- Microorganisms*, 10(1), 1–20. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010075>
- Satheesh, V., Tahir, A., Li, J., & Lei, M. (2022). Plant phosphate nutrition: sensing the stress. *Stress Biology*, 2(1), 16. <https://doi.org/10.1007/s44154-022-00039-0>
- Sauer, N. (2007). Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters*, 581(12), 2309–2317. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.048>
- Schaarschmidt, S., Gonzalez, M.-C., Roitsch, T., Strack, D., Sonnewald, U., & Hause, B. (2007). Regulation of arbuscular mycorrhization by carbon. The symbiotic interaction cannot be improved by increased carbon availability accomplished by root-specifically enhanced invertase activity. *Plant Physiology*, 143(4), 1827–1840. <https://doi.org/10.1104/pp.106.096446>
- Schaarschmidt, S., Kopka, J., Ludwig-Müller, J., & Hause, B. (2007). Regulation of arbuscular mycorrhization by apoplastic invertases : enhanced invertase activity in the leaf apoplast affects the symbiotic interaction. *The Plant Journal*. 51, 390–405. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03150.x>
- Schaarschmidt, S., Roitsch, T., & Hause, B. (2006). Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Journal of Experimental Botany*, 57(15), 4015–4023. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl172>
- Schubert, A., Allara, P., & Morte, A. (2003). Cleavage of sucrose in roots of soybean (*Glycine max*) colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist*, 161(2), 495–501. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00965.x>
- Serrato, A. J., de Dios Barajas-López, J., Chueca, A., & Sahrawy, M. (2009). Changing sugar partitioning in FBPase-manipulated plants. *Journal of Experimental Botany*, 60(10), 2923–2931. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp066>
- Smith, S. E., Jakobsen, I., Grønlund, M., & Smith, F. A. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: Interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiology*, 156(3), 1050–1057. <https://doi.org/10.1104/pp.111.174581>
- Smith, S. E., & Smith, F. A. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: New paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology*, 62(1), 227–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103846>

- Smith, S., & Read, D. (2008). Mycorrhizal symbiosis. In *Mycorrhizal Symbiosis*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-6>
- Solís-Guzmán, M. G., Argüello-Astorga, G., López-Bucio, J., Ruiz-Herrera, L. F., López-Meza, J. E., Sánchez-Calderón, L., Carreón-Abud, Y., & Martínez-Trujillo, M. (2017). *Arabidopsis thaliana* sucrose phosphate synthase (*sps*) genes are expressed differentially in organs and tissues, and their transcription is regulated by osmotic stress. *Gene Expression Patterns*, 25–26, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2017.06.001>
- Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A., James, T. Y., O'Donnell, K., Roberson, R. W., Taylor, T. N., Uehling, J., Vilgalys, R., White, M. M., & Stajich, J. E. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108(5), 1028–1046. <https://doi.org/10.3852/16-042>
- Stitt, M., & Quick, W. P. (1989). Photosynthetic carbon partitioning: its regulation and possibilities for manipulation. *Physiologia Plantarum*, 77(4), 633–641. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1989.tb05402.x>
- Sugiyama, A., Saida, Y., Yoshimizu, M., Takanashi, K., Sosso, D., Frommer, W. B., & Yazaki, K. (2017). Molecular characterization of LjSWEET3, a sugar transporter in nodules of *Lotus japonicus*. *Plant and Cell Physiology*, 58(2), 298–306. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw190>
- Tamayo, E., Figueira-Galán, D., Manck-Götzenberger, J., & Requena, N. (2022). Overexpression of the potato monosaccharide transporter *StSWEET7a* promotes root colonization by symbiotic and pathogenic fungi by increasing root sink strength. *Frontiers in Plant Science*, 13:837231. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.837231>
- Tauzin, A. S., & Giardina, T. (2014). Sucrose and invertases, a part of the plant defense response to the biotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 5:293. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00293>
- To, A., Joubès, J., Barthole, G., Lécureuil, A., Scagnelli, A., Jasinski, S., Lepiniec, L., & Baud, S. (2013). WRINKLED transcription factors orchestrate tissue-specific regulation of fatty acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24(12), 5007–5023. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.106120>
- Valentine, A. J., Mortimer, P. E., Kleinert, A., Kang, Y., & Benedito, V. A. (2013). Carbon

- metabolism and costs of arbuscular mycorrhizal associations to host roots. In R. Aroca (Ed.), *Symbiotic Endophytes* (Vol. 37, pp. 233–252). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-39317-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-39317-4_12)
- Volkert, K., Debast, S., Voll, L. M., Voll, H., Schiebl, I., Hofmann, J., Schneider, S., & Börnke, F. (2014). Loss of the two major leaf isoforms of sucrose-phosphate synthase in *Arabidopsis thaliana* limits sucrose synthesis and nocturnal starch degradation but does not alter carbon partitioning during photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, *65*(18), 5217–5229. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru282>
- Wang, E., Schornack, S., Marsh, J. F., Gobbato, E., Schwessinger, B., Eastmond, P., Schultze, M., Kamoun, S., & Oldroyd, G. E. D. (2012). A common signaling process that promotes mycorrhizal and oomycete colonization of plants. *Current Biology*, *22*(23), 2242–2246. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.09.043>
- Wang, W., Shi, J., Xie, Q., Jiang, Y., Yu, N., & Wang, E. (2017). Nutrient exchange and regulation in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Molecular Plant*, *10*(9), 1147–1158. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.07.012>
- Wewer, V., Brands, M., & Dörmann, P. (2014). Fatty acid synthesis and lipid metabolism in the obligate biotrophic fungus *Rhizophagus irregularis* during mycorrhization of *Lotus japonicus*. *The Plant Journal*, *79*(3), 398–412. <https://doi.org/10.1111/tpj.12566>
- Winter, H., & Huber, S. C. (2000). Regulation of sucrose metabolism in higher plants: Localization and regulation of activity of key enzymes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *19*(1), 31–67. <https://doi.org/10.1080/07352680091139178>
- Wipf, D., Krajinski, F., van Tuinen, D., Recorbet, G., & Courty, P. E. (2019). Trading on the arbuscular mycorrhiza market: from arbuscules to common mycorrhizal networks. *New Phytologist*, *223*(3), 1127–1142. <https://doi.org/10.1111/nph.15775>
- Wright, D. P., Read, D. J., & Scholes, J. D. (1998). Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment*, *21*(9), 881–891. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00351.x>
- Wright, Derek P., Scholes, J. D., Read, D. J., & Rolfe, S. A. (2005). European and African maize cultivars differ in their physiological and molecular responses to mycorrhizal infection. *New Phytologist*, *167*(3), 881–896. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01472.x>

- Wu, H.-H., Zou, Y.-N., Rahman, M. M., Ni, Q.-D., & Wu, Q.-S. (2017). Mycorrhizas alter sucrose and proline metabolism in trifoliolate orange exposed to drought stress. *Scientific Reports*, 7(1), 42389. <https://doi.org/10.1038/srep42389>
- Xu, X., Yang, Y., Liu, C., Sun, Y., Zhang, T., Hou, M., Huang, S., & Yuan, H. (2019). The evolutionary history of the sucrose synthase gene family in higher plants. *BMC Plant Biology*, 19(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2181-4>
- Xue, X., Yu, Y., Wu, Y., Xue, H., & Chen, L. (2021). Locally restricted glucose availability in the embryonic hypocotyl determines seed germination under abscisic acid treatment. *New Phytologist*, 231(5), 1832–1844. <https://doi.org/10.1111/nph.17513>
- Zhai, Z., Liu, H., & Shanklin, J. (2017). Phosphorylation of WRINKLED1 by KIN10 results in its proteasomal degradation, providing a link between energy homeostasis and lipid biosynthesis. *Plant Cell*, 29(4), 871–889. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00019>
- Zhai, Z., Liu, H., Xu, C., & Shanklin, J. (2017). Sugar potentiation of fatty acid and triacylglycerol accumulation. *Plant Physiology*, 175(2), 696–707. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00828>
- Zhang, Q., Blaylock, L. A., & Harrison, M. J. (2010). Two *Medicago truncatula* half-ABC transporters are essential for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Cell*, 22(5), 1483–1497. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.074955>
- Zhao, S., Chen, A., Chen, C., Li, C., Xia, R., & Wang, X. (2019). Transcriptomic analysis reveals the possible roles of sugar metabolism and export for positive mycorrhizal growth responses in soybean. *Physiologia Plantarum*, 166(3), 712–728. <https://doi.org/10.1111/ppl.12847>
- Zrenner, R., Krause, K. P., Apel, P., & Sonnewald, U. (1996). Reduction of the cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase in transgenic potato plants limits photosynthetic sucrose biosynthesis with no impact on plant growth and tuber yield. *Plant Journal*, 9(5), 671–681. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.9050671.x>

# CAPITULO I

## EFECTO DE LA COLONIZACIÓN MICORRÍZICA EN EL DESARROLLO DE PLANTAS DE TOMATE FERTILIZADAS CON DISTINTOS NIVELES DE FERTILIZACIÓN FOSFÓRICA

### Resumen

La colonización de un hongo micorrizógeno arbuscular (HMA) induce respuestas de crecimiento contrastantes en el hospedero que dependen de numerosos factores como las especies que están en interacción y condiciones ambientales como la disponibilidad de nutrientes en los suelos. Las respuestas de crecimiento del hospedero a la asociación micorrízica se han clasificado como positivas, negativas o neutras. En este trabajo, se establecieron diferentes niveles de fertilización con fósforo (P) que permitieron la manifestación de respuestas de crecimiento positivas, negativas y neutras en la interacción establecida entre tomate (*Solanum lycopersicum*) y el HMA *Rhizophagus irregularis*. Se evaluaron diferentes variables morfológicas y fisiológicas en plantas inoculadas y no inoculadas con *R. irregularis* que se fertilizaron con distintas concentraciones de P, aplicando en solución nutritiva que correspondieron a 1.3 mM (P Alto), 0.065 mM (P Bajo) y 0 mM (P Nulo) de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente. En las variables morfológicas evaluadas, no se observaron diferencias entre plantas inoculadas y no inoculadas cuando las plantas se fertilizaron con la dosis de P Alto. Cuando las plantas se fertilizaron con P Bajo, las plantas colonizadas incrementaron el área foliar de las hojas fuente. En cambio, cuando las plantas se fertilizaron con solución nutritiva con P Nulo, se redujo la altura, el área foliar de hojas fuente y el índice de biovolumen. En plantas inoculadas con el HMA que se fertilizaron con P Alto y P Nulo, se observó incremento de las unidades SPAD en las hojas fuente, lo que sugiere que la simbiosis incrementa las capacidades fotosintéticas de las hojas fuente. Los resultados indican que diferentes niveles de fertilización fosfórica promueven respuestas de crecimiento contrastantes en las plantas colonizadas por un HMA, lo que podría estar relacionado con el desempeño de la asociación y su influencia sobre el metabolismo primario del hospedero.

## **Abstract**

Arbuscular mycorrhizal colonization (AMF) induces contrasting growth responses in the host that depends on different factors such as the species establishing the interaction and the environmental conditions as nutrient availability. Mycorrhizal growth responses in the host have been classified as positive, negative, and neutral. Here we established different levels of phosphorous (P) fertilization that enabled the manifestation of positive, negative and neutral growth response in tomato plants (*Solanum lycopersicum*) inoculated with the HMA *Rhizophagus irregularis*. We evaluated different morphometric and physiological variables in tomato plants inoculated and non-inoculated with *R. irregularis* and fertilized with nutrient solutions containing 1.3 mM (High P), 0.065 mM (Low P) and 0 mM (Null P), respectively. There were not significant differences in the morphometric variables measured in inoculated plants fertilized with High P when compared to non-inoculated plants. When plants were inoculated and fertilized with Low P positive growth response was observed as increase in the source leaves area. While plants that were inoculated and fertilized with Null P, showed reduction in plant height, source leaves area and biovolume index. Mycorrhizal plants that were fertilized with High and Null P showed significant increments in SPAD units measured in source leaves, which suggest that mycorrhizal symbiosis increases the photosynthetic potential of source leaves. The results suggest that different P fertilization levels promotes contrasting growth responses in the plants colonized by an HMA, which could be related with mycorrhizal performance and its influence on primary metabolism.

## **Introducción**

El mutualismo entre las raíces de plantas y hongos formadores de micorriza (HMA) implica un flujo de nutrientes entre ambos organismos. Cuando una asociación micorrízica se establece, la planta cede parte de los productos de la fijación de carbono (fotoasimilados) al hongo. Los HMA son organismos heterótrofos, que hasta donde se sabe, son incapaces de obtener una fuente de carbono alterna en ausencia de un hospedero. Por lo que dependen por completo del suministro de carbono que le otorga la planta hospedera. La planta recibe numerosos beneficios por la presencia del hongo, entre los cuales destaca la mejora en la

adquisición de nutrientes, particularmente fósforo (P). También, en plantas colonizadas por HMA, se ha reportado el incremento de la fotosíntesis (Allen et al., 1981; Drüge & Schonbeck, 1992; Wright et al., 1998; Q.-S. Wu & Xia, 2006) y se ha estimado que se destina de un 4 a un 23 % del total del carbono fotoasimilado para el mantenimiento de la simbiosis (S. Smith & Read, 2008; Valentine et al., 2013). Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales se realiza este proceso aún no están completamente elucidados.

Algunos autores han concluido que la mejora en la capacidad de asimilación de carbono es consecuencia del aporte nutrimental que suministra el hongo en plantas colonizadas (Black et al., 2000). Otros trabajos han sugerido que el aumento en la asimilación de carbono es la respuesta al incremento en la demanda de carbono impuesta por el hongo durante la asociación (Wright et al., 1998). Actualmente, se considera que la influencia que tienen los HMA sobre el incremento de las capacidades fotosintéticas de las plantas son multifactoriales. Entre otras cosas, se propone que el estado de desarrollo de la planta, las especies involucradas en la asociación y los elementos de origen biótico o abiótico que influyen sobre los mecanismos de asimilación de carbono en plantas regulan la distribución de este elemento entre los dos simbioses (Valentine et al., 2013).

Durante la interacción el hongo es capaz de formar estructuras especializadas en el interior de las células de la raíz conocidas como arbusculos, los cuales se consideran los principales sitios de intercambio entre los simbioses. A pesar de que la formación del arbusculo sucede en el interior de las células corticales de las raíces, éste no compromete la integridad de la célula, sino que se encuentra rodeado por la membrana plasmática de la célula que lo alberga que recibe el nombre de membrana periarbuscular. En la membrana periarbuscular se ha reportado la localización de transportadores de nutrientes como P y nitrógeno dependientes de la actividad de  $H^+$ -ATPasa, los cuales realizan la importación de los nutrientes liberados en el espacio periarbuscular por el hongo hacia el interior de la célula cortical (Harrison et al., 2002; Liu et al., 2019). La influencia del P disponible sobre el desarrollo de la micorriza arbuscular ha sido un tema que ha tomado interés desde el inicio del estudio de la simbiosis micorrízica. Con la finalidad de explorar la capacidad de la micorriza arbuscular ante la carencia de P se ha logrado conocer que las plantas modulan las vías de adquisición de nutrientes para acceder con mayor eficiencia a este nutriente. Se ha caracterizado una ruta de

adquisición de fósforo en plantas que dependen del establecimiento de una asociación micorrízica (Smith & Smith, 2011; Smith & Read, 2008).

Debido a la influencia del P sobre la asociación micorrízica de tipo arbuscular, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de HMA en el desarrollo vegetativo de tomate y describir las respuestas de crecimiento del hospedero, además de caracterizar el desarrollo de la simbiosis micorrízica en diferentes niveles de fertilización fosfórica.

## **Materiales y métodos**

El hongo *Rhizophagus irregularis* (DAOM 197198) fue propagado en bolsas de invernadero con en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) como hospedero, en dónde se inocularon esporas obtenidas de cultivos monoxénicos con raíces transformadas de zanahoria (Maldonado-Mendoza & Harrison, 2018). Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero durante once semanas y la arena que se usó como sustrato se recuperó y se utilizó como inoculante micorrízico. El inoculante contenía una spora de *R. irregularis* por gramo y además contenía fragmentos de raíces colonizadas y micelio. El contenido de macronutrientes en el inoculante en miligramos por kilogramo de inoculante fue de 35.8, P (extraído por el método de Bray); 5.72, N-NO<sub>3</sub>; 21.3, K; 345, Ca; 12.3, Mg; 105, Na; y 9.26, S.

Para establecer el experimento, plantas de tomate de la variedad Río Grande se desinfectaron superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 5 % durante 10 min y posteriormente se enjuagaron cinco veces con agua destilada esterilizada. Para germinar las semillas, éstas se colocaron en turba esterilizada (por tindalización durante una hora tres días continuos a 120 °C) y se mantuvieron las condiciones de humedad durante 15 días con agua destilada. Después de 15 días del inicio de la germinación, las plántulas de tomate que presentaban las hojas cotiledonales completamente expandidas se trasplantaron a bolsas de invernadero que contenían 1 L de arena sílica esterilizada. Para realizar la inoculación del HMA, durante el trasplante se agregaron 150 g del inoculante del hongo *R. irregularis* previamente descrito a cada planta. A las plantas control no inoculadas, se les adicionó 150 g del inoculante micorrízico previamente esterilizado (por tindalización durante una hora tres días continuos a 120 °C) para eliminar los propágulos del hongo. Finalizado el trasplante, las

plantas no inoculadas recibieron 50 mL de una suspensión del inoculante micorrízico (10 g de inoculante suspendido en 90 mL de agua destilada estéril) filtrada por un tamiz de 37  $\mu\text{m}$  y fibra de algodón.

Las plantas inoculadas y no inoculadas se fertilizaron dos veces por semana con 25 mL de solución nutritiva Long-Ashton con diferentes concentraciones de fosfato monobásico de sodio que correspondieron a 1.3 mM, 0.0065 mM y 0 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , la última concentración de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  aplicada corresponde a la originalmente reportada como fuente de fosfato inorgánico (Pi) para la solución nutritiva Long Ashton (Smith et al., 1983) (Cuadro 1). Las dosis de fertilización aplicadas serán referenciadas a partir de aquí como P Alto (1.3 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), P Bajo (0.065 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) y P Nulo (0 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) respectivamente. Los riegos se realizaron aplicando de 25 a 50 mL de agua destilada para mantener la humedad en el sustrato.

Las plantas de tomate se mantuvieron en esta condición durante ocho semanas después del trasplante, en un diseño experimental completamente al azar que consistió en seis tratamientos, cada uno con cinco replicas biológicas.

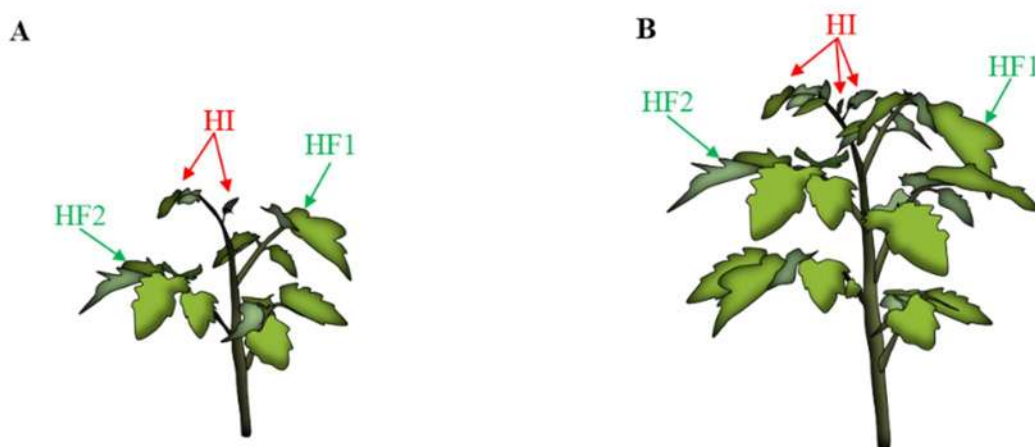
**Cuadro 1.** Fuentes elementales de la solución nutritiva Long-Ashton. Para la fuente elemental de fósforo ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) se indican las tres concentraciones que se aplicaron durante la fertilización del experimento que correspondieron a P Alto (1.3 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) P Bajo (0.065 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) y P Nulo (0 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )

<b>Fuente elemental</b>	<b>Concentración milimolar</b>	<b>Miligramos por litro de solución</b>
$\text{KNO}_3$	4.0	404
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5	368
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4.0	944
	1.3	160
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	0.065	8
	0	0
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.010	1.69
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.002	0.25
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.001	0.29
$\text{H}_3\text{Bo}_3$	0.050	3.1
$\text{NaCl}$	0.101	5.9
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$7.1 \text{E-}05$	0.088
$\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$	0.095	0.025

## Determinación de variables morfométricas y fisiológicas y cosecha de material vegetal

Las variables morfométricas y fisiológicas fueron cuantificadas en plantas control no inoculadas y en plantas inoculadas. Se midieron las variables de altura (cm) el diámetro del tallo (mm), la longitud de raíz (cm).

Se calculó el índice de biovolumen de acuerdo con la fórmula propuesta por Hatchel et al. (1985). El volumen radicular ( $\text{cm}^3$ ) fue calculado por desplazamiento de agua en una probeta graduada. El peso fresco (PF) total, de la parte aérea y de la raíz fueron registrados (g). El área foliar y las unidades SPAD fueron calculadas en las dos hojas más jóvenes completamente expandidas más cercanas al ápice de la parte aérea. Estas dos hojas, en lo sucesivo serán referidas como hoja fuente 1 (HF1) y hoja fuente 2 (HF2) para hacer referencia a la primera hoja más joven y a la segunda hoja más joven completamente expandidas, respectivamente (Figura 1). El área de la hoja fue estimada a partir de fotografías digitales y el software ImageJ (Schneider et al., 2012), y las unidades SPAD se calcularon con un medidor de unidades SPAD-502.



**Figura 1.** Representación esquemática de las posiciones de las hojas fuente en plantas de tomate. Posición de las hojas fuente en plantas que se fertilizaron con P Bajo y P Nulo (A); posición de las hojas fuente en plantas que se fertilizaron con P Alto. HF1, hoja fuente 1; HF2, hoja fuente 2; HI, hojas inmaduras.

Después de medir las variables morfométricas y fisiológicas antes descritas, se procedió a realizar la cosecha de los tejidos durante el periodo comprendido entre 9 am y 11 am. Para ello, los folíolos de HF1 y HF2 y una alícuota de tejido radicular fueron removidos de cada una de replicas biológicas de los seis tratamientos y se congelaron rápidamente con nitrógeno

líquido. Los tejidos congelados se mantuvieron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para realizar análisis bioquímicos y moleculares posteriores. El resto de los tejidos de las plantas fueron pesados y después se deshidrataron a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 h para determinar la biomasa fresca y seca.

### **Determinación de la colonización micorrízica y conteo de esporas**

Para visualizar y cuantificar a la colonización micorrízica, se tomaron raíces secas de tomate y se clarearon y tiñeron con el método de Phillips y Hayman (1970) con modificaciones. Para lo cual, las raíces se hidrolizaron con KOH al 10 % por 10 min en autoclave ( $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Después de decantar la solución de KOH, las raíces se enjuagaron tres veces con agua destilada y posteriormente clareadas con una solución de HCl durante 1 minuto. Después del clareo se agregó el colorante azul de tripano en acetoglicerol (27 mL de ácido acético; 33 mL de glicerol; 40 mL de agua destilada). El color se fijó en autoclave ( $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante 10 minutos. Para realizar la cuantificación, se montaron treinta y seis fragmentos de raíz de tres replicas biológicas por tratamiento en portaobjetos y se observaron en microscopio óptico. La cuantificación se determinó de acuerdo con el método de Trouvelot et al. (1896).

Las esporas fueron extraídas del sustrato en donde se desarrollaron las plantas de los seis tratamientos. Se realizó la extracción de esporas con el método de tamizado húmedo y decantación (Gerdemann & Nicolson, 1963) seguido de una centrifugación con sacarosa al 46 % (3000 rpm, 1 min). El número de esporas se representa como la media de tres replicas independientes de 50 g de sustrato.

### **Análisis estadísticos**

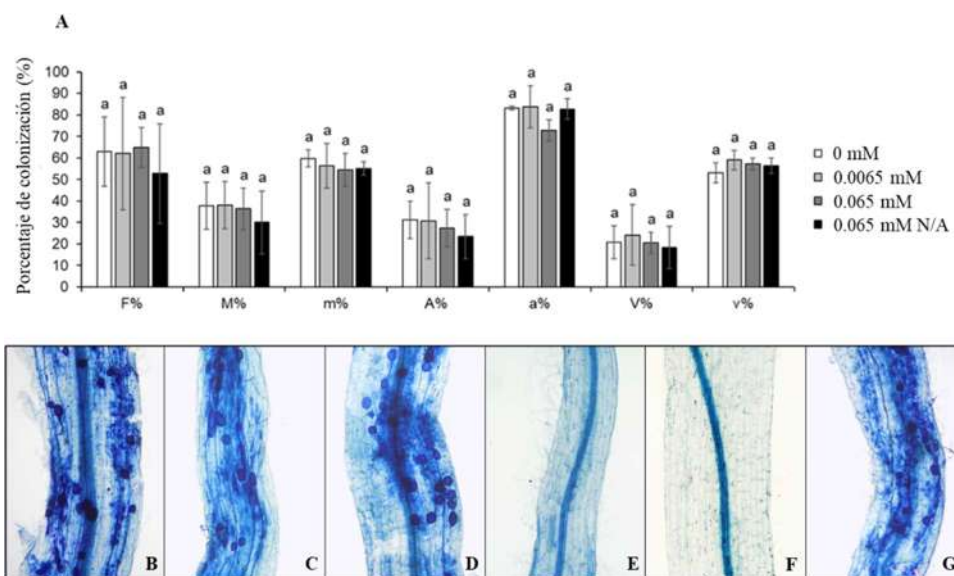
Los análisis estadísticos se realizaron con el programa disponible en línea SAS OnDemand for Academics (SAS Institute, Inc.). Para las comparaciones entre tratamientos se utilizaron por lo menos tres replicas biológicas. La normalidad de los datos fue evaluada por la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianza por la prueba de Levine. Los datos cuantitativos que fueron normales y homocedásticos se compararon por la prueba de t de Student o por análisis de varianza (ANOVA) por los procedimientos ANOVA o GLM cuando los datos estaban balanceados o no balanceados, respectivamente, seguidos por la

comparación de medias de Fischer o Tukey ( $p=0.05$ ). El coeficiente de correlación de Pearson se calculó con el procedimiento PROC CORR. La comparación entre los factores de inoculación con *R. irregularis*, representado como M- en plantas control no inoculadas y como M+ en plantas inoculadas y de las tres concentraciones de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  aplicadas y la se realizó por un ANOVA factorial 2 X 3 usando los procedimientos ANOVA o GLM cuando los datos estaban balanceados o no balanceados, respectivamente, seguidos por la comparación de medias de Tukey ( $p=0.05$ ).

## Resultados

### Cuantificación de la colonización micorrízica y número de esporas

Las tres dosis de P aplicadas que generaran niveles de colonización contrastantes fueron determinadas con un experimento preliminar en la que se inoculó tomate con *R. irregularis* con seis concentraciones de 0 a 1.3 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . También se evaluó el efecto de la modificación del potencial osmótico de la solución nutritiva en concentraciones menores a la de la solución basal en la colonización micorrízica. Se observó que concentraciones de 0, 0.065 y 1.3 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  presentaron niveles de colonización contrastantes (Figura 2).

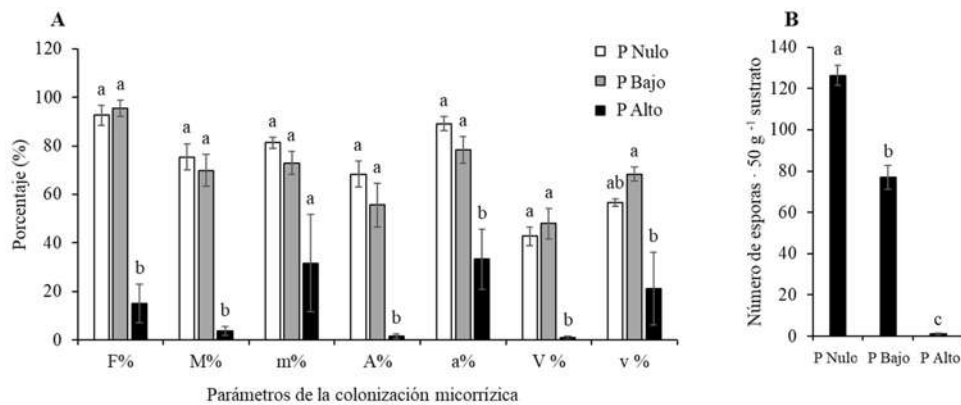


**Figura 2.** Colonización radicular de *R. irregularis* en tomate fertilizado con diferentes concentraciones de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . La cuantificación de la colonización micorrízica se cuantificó con el método de Trouvelot et al. (1986) (A). El potencial osmótico de las soluciones nutritivas fue ajustado en todas las concentraciones de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a  $-0.621$  MPa, excepto la designada como N/A, cuyo potencial se modificó por la reducción de la

concentración de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  que correspondió a  $-0.0606$  MPa. Visualización de la colonización micorrízica en raíces de plantas de tomate fertilizadas con 0 mM (B), 0.0065 mM (C), 0.065 mM (D), 0.65 mM (E), 1.3 mM (F) y 0.065 mM N/A (G). La colonización micorrízica en este ensayo preliminar no fue visualmente detectada en plantas fertilizadas con 0.65 mM (E) y 1.3 mM (F). F%, frecuencia de colonización micorrízica en el sistema radicular; M%, abundancia de colonización micorrízica en el sistema radicular; m% abundancia de colonización en los fragmentos de raíz observados; A%, abundancia de arbuscúlos en el sistema radicular; a% abundancia de arbuscúlos en los fragmentos observados; V%, abundancia de vesículas en el sistema radicular; v% abundancia de vesículas en los fragmentos observados.

También observamos que las alteraciones del potencial osmótico de la solución nutritiva por la reducción de la concentración o la eliminación de la fuente de P no modifica significativamente los niveles de colonización micorrízica (Figura 2). Con base en estos resultados, se determinó evaluar el efecto de las concentraciones de P Alto (1.3 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) P Bajo (0.065 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) y P Nulo (0 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ).

Cuando se cuantificó la colonización micorrízica en las plantas mantenidas con P Bajo y P Nulo, se observó un mayor porcentaje de intensidad de colonización (M%) que fue superior al 60 % y más del 50 % en la abundancia de arbuscúlos en el sistema radicular (A%) en ambas condiciones. El resto de las variables cuantificadas no mostraron diferencias estadísticas significativas (Figura 3 A). En las plantas inoculadas que se mantuvieron con P Alto, todos los parámetros calculados de la colonización micorrízica se redujeron significativamente, excepto el que corresponde a la colonización de los fragmentos observados (m%) cuyo porcentaje se redujo, pero sin diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) comparada con P Bajo y P Nulo (Figura 3 A).



**Figura 3.** Cuantificación de colonización micorrízica y número de esporas. Parámetros de la colonización micorrízica medidos con el método de Trouvelot et al. (1986) (A). Cuento de esporas en 50 gramos de sustrato donde se desarrollaron plantas con los tres niveles de fertilización fosfórica aplicados (B). F%, frecuencia de colonización micorrízica en el sistema radicular; M%, abundancia de colonización micorrízica en el sistema radicular; m% abundancia de colonización en los fragmentos de raíz observados; A%, abundancia de arbuscúlos en el sistema radicular; a% abundancia de arbuscúlos en los fragmentos observados; V%, abundancia de vesículas en el sistema radicular; v% abundancia de vesículas en los fragmentos observados. Los datos

representan la comparación de tres replicas por tratamiento, las comparaciones se realizaron por ANOVA, las barras de error representan el error estándar de la media, diferentes letras indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de comparación de medias de Tukey's test ( $\alpha=0.05$ ).

La cuantificación de esporas presentó un coeficiente de correlación de Pearson negativo P ( $r^2 = -0.93031$ ;  $p>0.05$ ). El mayor número de esporas se cuantificó a partir de sustratos en las que se mantuvieron plantas inoculadas con fertilización con solución nutritiva sin una fuente de P (P Nulo), y se redujo significativamente ( $p>0.05$ ) cuando se aplicaron soluciones nutritivas con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Figura 3 B). El menor número de esporas cuantificado se obtuvo de sustratos en donde se aplicó la solución nutritiva con P Alto (Figura 3 B).

### **Respuesta de crecimiento de las plantas inoculadas con *R. irregularis* en diferentes condiciones de disponibilidad de fósforo**

La respuesta del crecimiento de tomate se caracterizó en las tres condiciones de P aplicadas en plantas inoculadas y no inoculadas con *R. irregularis*. Las variables morfométricas evaluadas fueron diferentes en cada una de las condiciones de fertilización fosfórica. Las plantas a las que se aplicó la concentración de P más alta mostraron el mayor desarrollo, las variables morfométricas se redujeron significativamente ( $p>0.05$ ) en las plantas que se fertilizaron con concentraciones de P Bajo y P Nulo (Figura 3). En cuanto a las variables fisiológicas, la reducción de P en la solución nutritiva también redujo significativamente ( $p>0.05$ ) los valores correspondientes a biomasa (Cuadro 2).

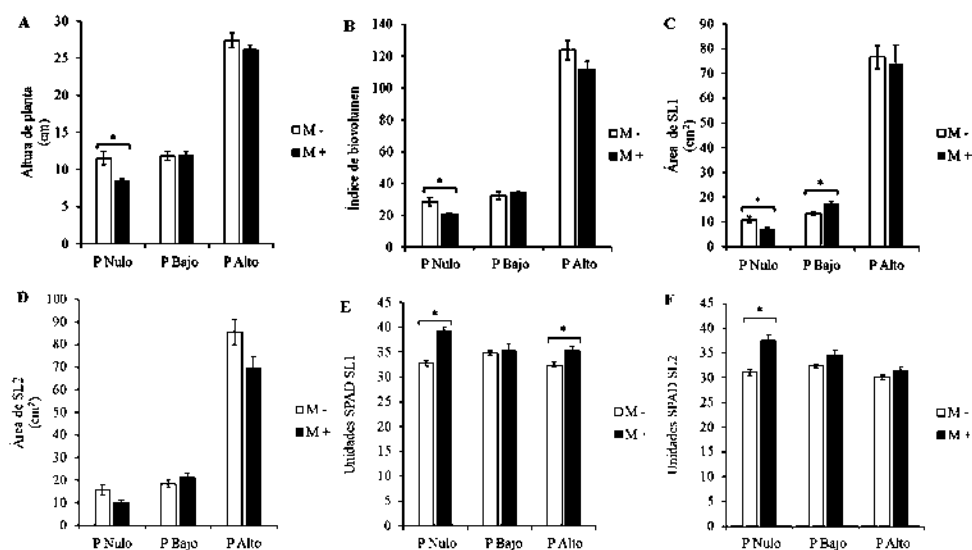
**Cuadro 2.** Acumulación de biomasa en gramos en plantas control no inoculadas (M-) y plantas inoculadas con *R. irregularis* (M+) en los tres niveles de fertilización fosfórica. Los datos representan la comparación de cinco replicas por tratamiento, la comparación se realizó por ANOVA; ( $\pm$ ) representa el error estándar de la media; letras diferentes indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	<i>R. irregularis</i>	Parte aérea	Raíz	Total
P Nulo	M -	0.173 ( $\pm 0.025$ ) b	0.119 ( $\pm 0.017$ ) b	0.292 ( $\pm 0.041$ ) b
	M+	0.126 ( $\pm 0.014$ ) b	0.098 ( $\pm 0.018$ ) b	0.224 ( $\pm 0.03$ ) b
P Bajo	M -	0.205 ( $\pm 0.02$ ) b	0.136 ( $\pm 0.047$ ) b	0.342 ( $\pm 0.066$ ) b
	M+	0.213 ( $\pm 0.019$ ) b	0.219 ( $\pm 0.041$ ) b	0.432 ( $\pm 0.052$ ) b
P Alto	M -	1.322 ( $\pm 0.057$ ) a	3.543 ( $\pm 0.518$ ) a	4.865 ( $\pm 0.575$ ) a
	M+	1.279 ( $\pm 0.068$ ) a	2.384 ( $\pm 0.485$ ) a	3.66 ( $\pm 0.522$ ) a

El desarrollo de las plantas inoculadas con *R. irregularis* que se mantuvieron con P Nulo se redujo significativamente comparado con las plantas no inoculadas que crecieron en las mismas condiciones. De manera particular, en esta condición se redujo significativamente ( $p>0.05$ ) la altura, el índice de biovolumen y el área foliar de la HF1 (Figura 3 A-C). Sin embargo, la inoculación con *R. irregularis* promovió el incremento de manera significativa de las unidades SPAD en al menos seis unidades en la HF1 y HF2 comparadas con las plantas no inoculadas (Figura 4 E y F).

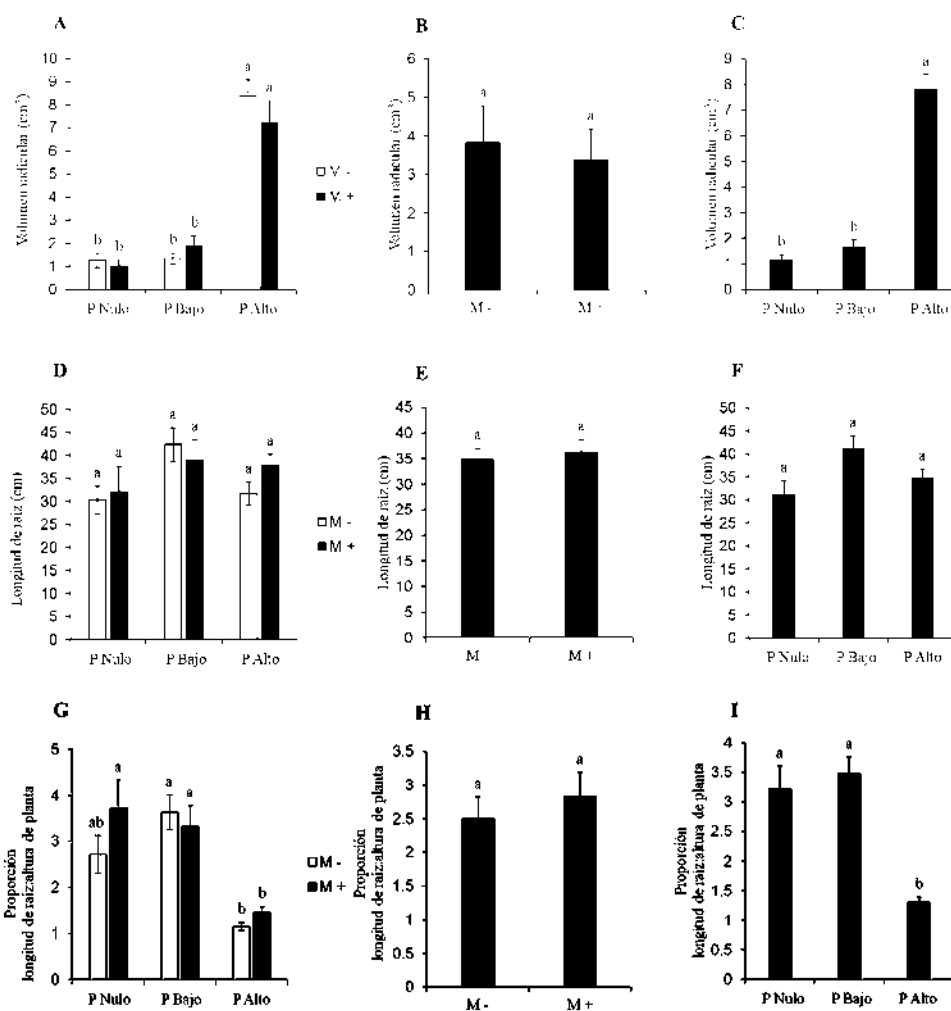
En cambio, en plantas inoculadas con *R. irregularis*, la aplicación de solución nutritiva con una P Bajo, revertió la represión del crecimiento que se observó cuando se aplicó solución nutritiva sin una fuente de P. En estas condiciones las plantas presentaron un incremento significativo ( $p>0.05$ ) en el área foliar de la HF1 comparado con las plantas que no tenían la asociación micorrízica presente. También, el valor de las unidades SPAD en HF1 y HF2, no se alteró por la presencia de la simbiosis micorrízica (Figura 4 C, E y F).

Las plantas inoculadas y no inoculadas no presentaron diferencias significativas en las variables morfométricas evaluadas ( $p>0.05$ ) cuando se desarrollaron con la concentración de P Alto. Sin embargo, en esta condición, se detectó un incremento significativo ( $p>0.05$ ) de las unidades SPAD en la HF1 cuando la simbiosis micorrízica estuvo presente (Figura 4 E).



**Figura 4.** Variables morfométricas de plantas de tomate fertilizadas con tres dosis de P en presencia de la simbiosis micorrízica de tipo arbuscular. Altura de planta (A); índice de biovolumen (B); área de HF1 (C); área de HF2 (D); unidades SPAD HF1 (E); unidades SPAD HF2 (F). Los datos representan la media de cinco replicas, las barras de error representan el error estándar de la media, el asterisco indica diferencias significativas entre plantas control no inoculadas (M-) y plantas inoculadas con *R. irregularis* (M+) de cada una de las concentraciones de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  aplicadas en la solución nutritiva (prueba de comparación de medias de Student;  $\alpha=0.05$ ).

En cuanto al desarrollo radicular, se observó que la disponibilidad de P alteró el desarrollo radicular, mientras que la presencia o ausencia de la simbiosis en plantas inoculadas y no inoculadas, respectivamente no generó cambios significativos. También, la reducción del volumen radicular fue significativo en las plantas que se desarrollaron en condiciones de escasez de P (Figura 5).



**Figura 5.** Variables morfológicas de raíces de plantas de tomate fertilizadas con diferentes dosis de P en presencia de la simbiosis micorrízica de tipo arbuscular. Volumen radicular (A-C); Longitud de raíz (D-F); proporción longitud de raíz:altura de planta (G-I). Los datos representan el promedio de al menos cuatro replicas biológicas, la barra de error representa el error estándar de la media, la contribución de cada factor por variable se evaluó por los procedimientos ANOVA (A-C) o GLM (D-I) en un diseño factorial (2x3), letras diferentes indican diferencia estadística significativa de acuerdo con la prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). M- plantas control no inoculadas; M+ plantas inoculadas con *R. irregularis*.

La longitud radicular fue estadísticamente similar en todos los tratamientos, pero la proporción de la longitud respecto a la altura de la planta incrementó en las plantas que se

desarrollaron con P Nulo y P Bajo (Figura 5 G-I), denotando los cambios drásticos en la arquitectura radicular por la limitación de P en estas condiciones.

## **Discusión**

La presencia de la simbiosis micorrízica requiere de una inversión de carbono por parte de la planta hospedera. El intercambio de nutrientes que sucede durante la asociación determina la cantidad de carbono invertida por la planta (Kiers et al., 2011). El balance de P por parte del hongo y de carbono de la planta hacia el hongo induce diferentes respuestas de crecimiento en la planta hospedera que se pueden manifestar como promoción o represión del crecimiento.

En este trabajo, se observó que en plantas que se fertilizaron con solución nutritiva con P Nulo y P Bajo la colonización micorrízica aumentó hasta alcanzar más de un 60 % de colonización en el sistema radicular. Niveles similares de colonización micorriza se han reportado en otros modelos vegetales en condiciones de disponibilidad de P similares a las que se evaluaron en este trabajo (Balzergue et al., 2013; Nouri et al., 2014). En este trabajo, también se observó que la producción de esporas se incrementó en condiciones de deficiencia de P. Se ha reportado que en condiciones in vitro y en invernadero, la reducción u omisión de la cantidad de P aplicada resulta en un incremento de la cantidad de esporas (Maitra et al., 2021). Lo que sugiere que en condiciones de deficiencia de P el carbono que percibe el hongo de la planta es preferencialmente canalizado para la formación de reservas que se acumulan en los propágulos del hongo.

Se ha hipotetizado que el potencial consumidor de los HMA en plantas sometidas a deficiencia de P genera que el carbono fijado durante la fotosíntesis también se convierta en un factor limitante para el desarrollo de los dos simbioses (Janos, 2007). El potencial consumidor del HMA puede incrementar por su capacidad de colonización en el sistema radicular, por lo que se ha propuesto que especies de HMA que tienen mayor potencial de colonización, son más propensas a reprimir el crecimiento de la planta hospedera (Graham y Abbott, 2000). Cuando se evaluó la colonización de *R. irregularis* en las plantas de tomate, se observó que la intensidad de la colonización de las plantas que se sometieron a carencia de P fue similar, pero mostraron diferentes respuestas de crecimiento a la simbiosis

micorrízica. Cuando las plantas se mantuvieron con concentraciones de P Nulo, la presencia del HMA en las raíces reprimió el crecimiento de las plantas de tomate; mientras que cuando las plantas se fertilizaron con P Bajo incrementó el área foliar del tejido fuente. Lo que indica que otros factores distintos a la intensidad de la colonización en el sistema radicular, como la disponibilidad de P, son responsables de la manifestación de respuestas de crecimiento positivas o negativas en plantas colonizadas por un HMA.

Se ha reportado que la simbiosis micorrízica puede reprimir el crecimiento de las plantas en condiciones en las que el P es un factor limitante; en esta condición, se ha hipotetizado que el desarrollo de los órganos fotosintéticos de la planta hospedera es determinante (Janos, 2007). Es decir, en plantas jóvenes que tienen órganos fotosintéticos en desarrollo, se exagera la represión del crecimiento por la presencia de la simbiosis micorrízica, dado que el carbono se convierte en un factor limitante para el desarrollo de ambos organismos (Janos, 2007). La represión del crecimiento sería entonces transitoria hasta la generación de órganos fotosintéticos bien diferenciados y activos por parte de la planta hospedera (Janos, 2007). Sin embargo, recientemente se reportó que plántulas de tomate que germinaron en presencia del hongo *Funneliformis mosseae* tienen un mejor desarrollo y menores signos de estrés que plántulas que se desarrollaron en ausencia de la simbiosis micorrízica (Cesaro et al., 2020). Por lo que se consideró que la respuesta de las plantas a la asociación micorrízica es positiva desde estados tempranos de desarrollo (Cesaro et al., 2020) En este trabajo se observó que la represión del crecimiento en las plantas mantenidas con concentraciones de P Nulo, se extendió durante 8 semanas en plantas que formaron órganos fotosintéticos diferenciados. En cambio, la fertilización con P Bajo en la solución nutritiva promovió el incremento del área foliar de las plantas inoculadas con *R. irregularis* en comparación con las plantas control no inoculadas. Recientemente, se reportó que la fertilización con una fuente de P soluble ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) promovió el incremento del área foliar y de la tasa fotosintética en plantas de tomate colonizadas por *R. irregularis*, en comparación con las plantas control no colonizadas, y plantas colonizadas por la misma especie de HMA, pero fertilizadas con una fuente orgánica de P (ácido fítico) o con una fuente de P poco soluble (apatita) (Andrino et al., 2021). Lo que indica que cuando la fuente de P es ortofosfato, se adquiere de manera más eficiente por la planta mediante la micorriza, generando en el hospedero respuestas que se manifiestan como incremento en el área fotosintética y de la tasa de fijación de carbono para

cumplir con las demandas de carbono del HMA (Andrino et al., 2021). Nuestros resultados están de acuerdo con esta idea, y además sugieren que, en las condiciones de P Bajo, el P es preferentemente transportado a la planta por el HMA.

La inoculación con *R. irregularis* en las plantas de tomate evaluadas en este trabajo aumentó el valor de las unidades SPAD en tejidos foliares de tomate en plantas que se fertilizaron con P Bajo y P Alto. El incremento del valor de las unidades SPAD se han reportado comúnmente en plantas colonizadas por HMA (Campanelli et al., 2013; Lopez de Andrade et al., 2015; Saia et al., 2020). En cuanto a las unidades SPAD, se ha reportado que éstas tienen correlación positiva con la tasa fotosintética, por lo tanto, las unidades SPAD pueden ser indicadores de la capacidad fotosintética de los órganos foliares (Reis et al., 2009). Sin embargo, el incremento de las unidades SPAD también se ha asociado con estrés por el daño en el fotosistema II en hojas bandera de arroz (Kumagai et al., 2009), y con el incremento en la acumulación de antocianinas en plantas de tomate causado por la deficiencia de P (Hlavinka et al., 2013). En este trabajo, la promoción del incremento del área foliar en plantas inoculadas con el HMA y mantenidas con P Bajo no estuvo acompañada de un incremento significativo de las unidades SPAD en las hojas fuente, mientras que en plantas mantenidas con solución nutritiva con P Nulo o P Alto,, se incrementó el valor de las unidades SPAD en al menos una de las dos hojas fuente evaluadas. Lo que sugiere que cuando la asociación micorrízica de tipo arbuscular promueve el desarrollo de la planta, se atenúa la respuesta al estrés en los tejidos fotosintéticos. Estos resultados sugieren que, cuando la simbiosis micorrízica promueve el crecimiento de las plantas en condiciones de deficiencia de P, la planta incrementa la superficie fotosintética para generar fotoasimilados para compensar las demandas de carbono de los dos organismos, junto con la atenuación de la respuesta de estrés. Mientras que cuando la planta manifiesta respuestas de crecimiento negativas o neutras, se incrementa la cantidad de clorofila y la actividad fotosintética.

El potencial consumidor de carbono de un HMA esta tradicionalmente expresado en su capacidad para modular la expresión de genes de las plantas relacionados con el catabolismo de sacarosa como invertasas y sacarosa sintasa (T. Kiers & van der Heijden, 2006). Por lo que explorar la distribución de carbohidratos y los niveles de expresión de genes clave que regulan la biosíntesis y catabolismo de sacarosa son clave para comprender más ampliamente

el efecto de la simbiosis micorrízica en plantas que manifiestan diferentes respuestas de crecimiento.

## **Conclusiones**

La fertilización de plantas de tomate con diferentes concentraciones de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  generó que las plantas manifestaran diferentes respuestas de crecimiento en presencia de la simbiosis micorrízica de tipo arbuscular. La respuesta de crecimiento negativa se observó cuando las plantas inoculadas con *R. irregularis* fueron mantenidas con solución nutritiva con P Nulo. Respuestas de crecimiento positiva y neutra se observaron cuando las plantas inoculadas se fertilizaron con solución nutritiva con P Bajo y P Alto, respectivamente. La respuesta de crecimiento observada en la planta también influyó en la distribución de carbono en el HMA, observándose una mayor canalización de carbono a la formación de esporas cuando las plantas presentaban una respuesta al crecimiento negativa a la simbiosis. Estudios posteriores para conocer la distribución de carbono entre órganos fotosintéticos y raíces proporcionarán información para proponer modelos de partición de carbono entre diferentes órganos de las plantas y entre los simbiosiontes en condiciones que promueven la manifestación de respuestas de crecimiento a la asociación micorrízica positivas, negativas y neutras en plantas.

## **Literatura consultada**

- Allen, M. F., Smith, W. K., Moore, T. S., & Christensen, M. (1981). Comparative water relations and photosynthesis of mycorrhizal and non-mycorrhizal *Bouteloua gracilis* H.B.K. Lag Ex Steud. *New Phytologist*, 88(4), 683–693. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1981.tb01745.x>
- Andrino, A., Guggenberger, G., Sauheitl, L., Burkart, S., & Boy, J. (2021). Carbon investment into mobilization of mineral and organic phosphorus by arbuscular mycorrhiza. *Biology and Fertility of Soils*, 57(1), 47–64. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01505-5>
- Balergue, C., Chabaud, M., Barker, D. G., Bécard, G., & Rochange, S. F. (2013). High phosphate reduces host ability to develop arbuscular mycorrhizal symbiosis without

- affecting root calcium spiking responses to the fungus. *Frontiers in Plant Science*, 4(October), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00426>
- Black, K. G., Mitchell, D. T., & Osborne, B. A. (2000). Effect of mycorrhizal-enhanced leaf phosphate status on carbon partitioning, translocation and photosynthesis in cucumber. *Plant, Cell and Environment*, 23(8), 797–809. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00598.x>
- Campanelli, A., Ruta, C., Mastro, G. De, & Morone-Fortunato, I. (2013). The role of arbuscular mycorrhizal fungi in alleviating salt stress in *Medicago sativa* L. var. icon. *Symbiosis*, 59(2), 65–76. <https://doi.org/10.1007/s13199-012-0191-1>
- Cesaro, P., Massa, N., Cantamessa, S., Todeschini, V., Bona, E., Berta, G., Barbato, R., & Lingua, G. (2020). Tomato responses to *Funneliformis mosseae* during the early stages of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*, 30(5), 601–610. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00973-9>
- Drüge, U., & Schonbeck, F. (1992). Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on transpiration, photosynthesis and growth of flax (*Linum usitatissimum* L.) in relation to cytokinin levels. *Journal of Plant Physiology*, 141(1), 40–48. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80849-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80849-7)
- Gerdemann, J. W., & Nicolson, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46(2), 235–244. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(63)80079-0)
- Harrison, M. J., Dewbre, G. R., & Liu, J. (2002). A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell*, 14(10), 2413–2429. <https://doi.org/10.1105/tpc.004861>
- Hatchel, G. E., Berry, C. R., & Muse, H. D. (1985). Nondestructive indices related to aboveground biomass of young loblolly and sand pines on ectomycorrhizal and fertilizer plots. *Forest Science*, 31(2), 419–427. <https://doi.org/doi.org/10.1093/forestscience/31.2.419>
- Hlavinka, J., Nauš, J., & Špundová, M. (2013). Anthocyanin contribution to chlorophyll meter readings and its correction. *Photosynthesis Research*, 118(3), 277–295. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9934-y>
- Janos, D. P. (2007). Plant responsiveness to mycorrhizas differs from dependence upon

- mycorrhizas. *Mycorrhiza*, 17(2), 75–91. <https://doi.org/10.1007/s00572-006-0094-1>
- Kiers, E. T., Duhamel, M., Beesetty, Y., Mensah, J. A., Franken, O., Verbruggen, E., Fellbaum, C. R., Kowalchuk, G. A., Hart, M. M., Bago, A., Palmer, T. M., West, S. A., Vandenkoornhuyse, P., Jansa, J., & Bücking, H. (2011). Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science*, 333(6044), 880–882. <https://doi.org/10.1126/science.1208473>
- Kiers, T., & van der Heijden, M. (2006). Mutualistic stability in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Ecology*, 87(7), 1627–1636.
- Kumagai, E., Araki, T., & Kubota, F. (2009). Correlation of chlorophyll meter readings with gas exchange and chlorophyll fluorescence in flag leaves of rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Plant Production Science*, 12(1), 50–53. <https://doi.org/10.1626/pp.s.12.50>
- Liu, J., Liu, J., Liu, J., Cui, M., Huang, Y., Tian, Y., Chen, A., & Xu, G. (2019). The potassium transporter SIHAK10 is involved in mycorrhizal potassium uptake. *Plant Physiology*, 180(1), 465–479. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01533>
- Lopez de Andrade, S. A., Domingues, A. P., & Mazzafera, P. (2015). Photosynthesis is induced in rice plants that associate with arbuscular mycorrhizal fungi and are grown under arsenate and arsenite stress. *Chemosphere*, 134, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.023>
- Maitra, P., Al-Rashid, J., Barman, N. C., Khan, M. N. M., Mandal, D., Rasul, N. M., Chowdhury, A., El-Sappah, A. H., & Li, J. (2021). Sand particle size and phosphorus amount affect rhizophagus irregularis spore production using in vitro propagated spore as a starter inoculum in rhizosphere of maize (*Zea mays*) plantlets. *Journal of Fungi*, 7(10). <https://doi.org/10.3390/jof7100846>
- Maldonado-Mendoza, I. E., & Harrison, M. J. (2018). *RiArsB* and *RiMT-11*: Two novel genes induced by arsenate in arbuscular mycorrhiza. *Fungal Biology*, 122(2–3), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.11.003>
- Nouri, E., Breuillin-Sessoms, F., Feller, U., & Reinhardt, D. (2014). Phosphorus and nitrogen regulate arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Petunia hybrida*. *PLoS ONE*, 9(3), e90841. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090841>
- Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection.

- Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158-IN18.  
[https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(70)80110-3)
- Reis, A. R., Favarin, J. L., Malavolta, E., Júnior, J. L., & Moraes, M. F. (2009). Photosynthesis, chlorophylls, and SPAD readings in coffee leaves in relation to nitrogen supply. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 40(9–10), 1512–1528.  
<https://doi.org/10.1080/00103620902820373>
- Saia, S., Aissa, E., Luziatelli, F., Ruzzi, M., Colla, G., Ficca, A. G., Cardarelli, M., & Roupshael, Y. (2020). Growth-promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi differentially benefit tomato and corn depending upon the supplied form of phosphorus. *Mycorrhiza*, 30(1), 133–147. <https://doi.org/10.1007/s00572-019-00927-w>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Smith, G. S., Johnston, C. M., & Cornforth, I. S. (1983). Comparison of nutrient solutions for growth of plants in sand culture. *New Phytologist*, 94(4), 537–548.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1983.tb04863.x>
- Smith, S. E., & Smith, F. A. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: New paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology*, 62(1), 227–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103846>
- Smith, S., & Read, D. (2008). Mycorrhizal symbiosis. In *Mycorrhizal Symbiosis*.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-6>
- Trouvelot, A., Kough, J. L., & Gianinazzi-Pearson, V. (1896). Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In V. Gianinazzi-Pearson & S. Gianinazzi (Eds.), *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae* (pp. 217–221). INRA Press.
- Valentine, A. J., Mortimer, P. E., Kleinert, A., Kang, Y., & Benedito, V. A. (2013). Carbon metabolism and costs of arbuscular mycorrhizal associations to host roots. In R. Aroca (Ed.), *Symbiotic Endophytes* (Vol. 37, pp. 233–252). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-39317-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-39317-4_12)
- Wright, D. P., Read, D. J., & Scholes, J. D. (1998). Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment*, 21(9), 881–891. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00351.x>

Wu, Q.-S., & Xia, R.-X. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. *Journal of Plant Physiology*, 163(4), 417–425.  
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.04.024>

## CAPITULO II

### LA RESPUESTA A LA ASOCIACIÓN MICORRÍZICA DE TIPO ARBUSCULAR DETERMINA LA RESPUESTA DE CRECIMIENTO DE LA PLANTA Y ALTERA LA DISTRIBUCIÓN DE CARBON ENTRE LOS SIMBIONTES

#### Resumen

Cuando las plantas establecen asociaciones simbióticas con hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) invierten una parte importante del carbono fotoasimilado para mantener el metabolismo heterotrófico del HMA. Esto repercute en la distribución de carbono fijado durante la fotosíntesis y a su vez, puede impactar sobre la respuesta de crecimiento en el hospedero. Para analizar la distribución de carbono entre los simbioses durante la interacción entre plantas y HMA, se cuantificaron azúcares solubles, almidón y la acumulación del lípido biomarcador de biomasa del HMA 16:1 $\omega$ 5 en diferentes tejidos de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) inoculadas con *Rhizophagus irregularis*. Las plantas se fertilizaron con distintas dosis de fósforo (P) aplicando NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> lo que permitió generar respuestas de crecimiento contrastantes entre plantas inoculadas y no inoculadas. La respuesta de crecimiento fue neutra cuando se aplicó 1.3 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (P Alto), positiva cuando se aplicó 0.065 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (P Bajo) y negativas cuando no se agregó NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a la solución nutritiva (P Nulo). Se observó que la inoculación con el HMA promovió la acumulación de azúcares solubles en hojas fuente, en todas las condiciones de fertilización. En raíces, la acumulación de azúcares solubles fue menor en las plantas inoculadas que se fertilizaron con P Bajo en comparación con plantas no inoculadas. La acumulación de almidón en hojas fuente y raíces no se alteró significativamente entre plantas inoculadas y no inoculadas en las condiciones de fertilización con P evaluadas. Las plantas inoculadas que se mantuvieron con P Bajo, acumularon una mayor cantidad del lípido 16:1 $\omega$ 5 en raíces. Los resultados obtenidos indican que, durante la asociación, el HMA recibe una mayor cantidad de carbono de la planta cuando promueve respuestas de crecimiento positivas en el hospedero.

## Abstract

When plants establish symbiotic interactions with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) invest an important amount of the assimilated carbon to sustain the heterotrophic metabolism of the fungal partner. This impacts in carbon allocation and partitioning in the host and in can also have a significant role in the growth response of the host. To analyse carbon partitioning between the symbionts during arbuscular mycorrhiza, we quantified soluble sugars, starch and the accumulation of the AMF biomass biomarker lipid 16:1 $\omega$ 5 in different tissues of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) inoculated with the AMF *Rhizophagus irregularis*. The tomato plants were fertilized with different phosphorous (P) levels by adding different concentrations of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in nutrient that led to the manifestation contrasting growth responses of the host to the mycorrhizal colonization. A neutral growth response in the host to arbuscular mycorrhiza was observed when they were fertilized with 1.3 mM (High P), positive when plants were fertilized with 0.065 mM (Low P), and negative when fertilized with 0 mM (Null P) of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, respectively. We observed that the inoculation with the HMA promoted the accumulation of total soluble sugars in source leaves in all P fertilization levels. In roots, mycorrhizal plants that were fertilized with Low P showed significantly lower content of total soluble sugars in roots were observed when compared non-inoculated plants. Starch accumulation was not significantly modified between inoculated and non-inoculated plants at any P fertilization level. Inoculated plants that were fertilized with Low P, accumulated a higher amount of the lipid 16:1 $\omega$ 5. The results suggest that during the mycorrhizal association, the HMA perceives a higher amount of carbon when it promotes positive growth responses in the host.

## Introducción

Los órganos fotosintéticos, o tejidos fuente, de las plantas fijan dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) durante la fotosíntesis para generar como productos finales almidón y sacarosa. El almidón es el principal almacén de energía en los órganos de las plantas, mientras que la sacarosa se usa principalmente para la movilización del carbono fijado durante la fotosíntesis hasta los tejidos no fotosintéticos, o tejidos consumidores. La distribución de carbono en las plantas

se realiza por una maquinaria molecular compleja que involucra procesos intrínsecos relacionados con la diferenciación celular y el desarrollo de órganos durante el ciclo ontogenético de la planta (Poorter & Nagel, 2000; Poorter & Pothmann, 1992).

Las plantas establecen interacciones complejas con microorganismos del suelo que tiene el potencial de modificar la distribución de carbono en las plantas y como consecuencia modificar su desarrollo (Hartmann et al., 2020; Hennion et al., 2019). Dentro de estas interacciones destaca la que establecen las raíces de las plantas con hongos micorrizógenos arbusculares (HMA). Los HMA son simbioses obligados de metabolismo heterotrófico que se desarrollan en el interior de las raíces en donde forman estructuras de intercambio dentro de las células corticales denominadas arbusculos (Genre et al., 2020). Cuando la micorriza se establece, el HMA demanda carbono en forma de carbohidratos y lípidos (Jiang et al., 2017; Luginbuehl et al., 2017; Salmeron-Santiago et al., 2022; Wipf et al., 2019). A cambio, el hongo mejora la adquisición de nutrientes minerales y agua del suelo, además de beneficios para la planta hospedera que incluyen incremento al estrés biótico y abiótico (Begum et al., 2019; Jung et al., 2012). Por lo que el carácter mutualista de la simbiosis está basado en el intercambio de nutrientes.

La interacción entre HMA y plantas se considera como una asociación benéfica para las plantas, sin embargo, se han caracterizado diferentes respuestas de crecimiento de las plantas cuando la asociación micorrízica está presente. Cuando el desarrollo de las plantas mejora por efecto de la colonización micorrízica, se considera una respuesta positiva. Pero, cuando la respuesta a esta simbiosis no genera cambios significativos en el desarrollo de la planta, se considera neutra. Una respuesta de crecimiento negativa se observa cuando la colonización micorrízica reprime el crecimiento de la planta hospedera (Lü et al., 2018; Smith et al., 2011). Estudios realizados en plantas de soya, indican que la manifestación de efectos positivos, negativos y neutros están determinados por las capacidades catabólicas de azúcares en los tejidos fotosintéticos en sinergia, con la distribución de carbono determinado por la actividad de transportadores de carbohidratos (Zhao et al., 2019). Sin embargo, la dinámica de la distribución de carbono ha sido poco estudiada en relación con el desempeño de la simbiosis y la respuesta de crecimiento del hospedero en diferentes condiciones nutrimentales.

En este trabajo se exploró la influencia que tienen los HMA sobre la distribución de carbohidratos en plantas de tomate que manifiestan respuestas de crecimiento positivas,

negativas y neutras a la asociación, que además presentan diferentes niveles de colonización micorrízica y acumulación de biomasa intrarradical en diferentes condiciones de disponibilidad de P. Se observó que las plantas que expresan respuestas positivas a la simbiosis reducen la cantidad de carbohidratos solubles en raíces, mientras que las plantas que presentan respuestas negativas o neutras a la simbiosis no modifican la acumulación de azúcares solubles si se comparan con plantas no inoculadas, que se desarrollaron bajo el mismo régimen de fertilización fosfórica.

## **Materiales y métodos**

### **Material vegetal**

Para el analizar la distribución de carbohidratos solubles y almidón en plantas de tomate, se utilizaron folíolos de las hojas fuente y una alícuota de raíces de las plantas inoculadas y no inoculadas con *R. irregularis*. Las plantas analizadas también fueron sometidas a distintos regímenes de fertilización con P que se aplicó en solución nutritiva en forma de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  en concentraciones de 1.3 mM (P Alto), 0.065 mM (P Bajo) y 0 mM (P Nulo). En estas condiciones, las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero durante 8 semanas después de la inoculación con *R. irregularis*. Con la caracterización de la respuesta en crecimiento de las plantas de tomate a la asociación micorrízica se determinó que, en condiciones de P Alto, las plantas presentan una respuesta neutra a la asociación; positiva en P Bajo y negativa en P Nulo. Las condiciones de inoculación, mantenimiento en invernadero, régimen de fertilización y la forma en la que se cosecharon los tejidos para realizar la cuantificación de metabolitos se detallan en el Capítulo I.

### **Cuantificación de biomasa de *R. irregularis* en raíces de plantas colonizadas**

Para comparar el porcentaje de colonización micorrízica, con la acumulación de biomasa las observaciones realizadas en fragmentos de raíces de los tratamientos inoculados con *R. irregularis* se compararon con la cuantificación del lípido biomarcador de la biomasa de HMA 16:1 $\omega$ 5. La cuantificación del biomarcador 16:1 $\omega$ 5 se realizó en al menos tres replicas

biológicas de los tratamientos de plantas control no inoculadas y plantas inoculadas con *R. irregularis* por cromatografía de gases con el Microbial Identification System (MIDI, Inc., Newark, DE, USA). Los resultados se expresaron en nanomoles del biomarcador 16:1 $\omega$ 5 por gramo de tejido fresco. Los ácidos grasos celulares se extrajeron de las muestras de raíz por cuatro pasos del procedimiento reportado por Sasser (1990): (i) saponificación, (ii) metilación, (iii) extracción, y (iv) lavado base. Para la cuantificar los metil-ésteres de los ácidos grasos extraídos, se usó como estándar interno nanodecanoato de metilo, que se agregó a cada una de las muestras. Se usaron 25 mg de tejido que se saponificaron con 2 mL de NaOH 50 % en metanol en un vial de vidrio, y se incubó a 100 °C en baño maría (5 min). El contenido del vial se agitó con vortex y se regresó al baño maría (25 min). Posteriormente se dejaron enfriar para metilar las muestras, para ello se agregó 4 mL de solución con 325 mL de 6N HCl y 275 mL de metanol. Las muestras se incubaron a 80 °C (10 min). La extracción de metil-ésteres de ácidos grasos se realizó agregando 2.5 mL de una solución 50 % hexano-50% metil-terbutil éter, a cada muestra, se agitó durante 5 minutos y posteriormente se removió la fase acuosa. El extracto se lavó con 6 mL de una solución 0.3 M de NaOH para remover los ácidos grasos no metilados y otros residuos.

El análisis de los metil-ésteres de ácidos grasos se realizó usando el software Sherlock (Ver. 6.0M MIDI Inc, Newark, DE) y un cromatógrafo de gases HP68090 con una columna de sílica de 25 m (HP no. 19091B-102) e hidrógeno como gas acarreador. La temperatura del inyector fue de 250 °C y la del detector 300 °C. La temperatura se programó con una temperatura inicial de 170 °C con incrementos de 5 °C cada minuto hasta alcanzar 270 °C. Para todas las muestras, se inyectaron 2  $\mu$ L. El software MIDI controló de manera automática todas las operaciones de la cromatografía de gases, que incluyen calibración y la secuenciación de la muestra, la integración de picos en cromatogramas y la identificación. Los estándares de calibración contenían una mezcla de ácidos grasos hidroximetilados con cadenas de carbonos de 10 a 20 (MIDI mo. 1200A).

### **Extracción de azúcares solubles**

Los folíolos que se cosecharon de las HF1 y HF2 y una alícuota de raíces se congelaron con nitrógeno líquido. Los tejidos congelados se molieron en mortero y una alícuota de cada

muestra de hoja y raíz (25-50 mg) se mezcló con 500  $\mu\text{L}$  etanol al 80 % y se incubó a 80 °C (30 min). Después, se centrifugó a 12000 rpm (15 min) y el sobrenadante se colectó en un tubo de 2 mL. Este proceso de extracción con etanol al 80 % se repitió cuatro veces por cada muestra. Los sobrenadantes recuperados se colectaron en un solo tubo. Después, se evaporó el solvente incubando las muestras a 60 °C durante 12-15 h. El contenido del tubo se resuspendió en 1 mL agua destilada esterilizada y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se recuperó y se utilizó para la cuantificación de azúcares solubles. El pellet de cada muestra se lavó con etanol al 80 % dos veces más y posteriormente se dejó secar a 60 °C para utilizar en la cuantificación de almidón.

### **Cuantificación de azúcares solubles totales**

Los azúcares solubles totales se cuantificaron con el método de fenol-ácido sulfúrico (DuBois et al., 1956). La mezcla de reacción consistió en una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  del extracto de azúcares solubles, 80  $\mu\text{L}$  de una solución de fenol al 5 %, y de 500  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico al 98 %. Se agregó agua destilada para alcanzar un volumen final de 780  $\mu\text{L}$ . Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min y posteriormente se registró la absorbancia a 490 nm. La cantidad de azúcares solubles totales se estimó con una curva de calibración de glucosa como estándar y se reporta como  $\mu\text{g}$  de glucosa por mg de tejido ( $\mu\text{g Glu mg TF}^{-1}$ ).

### **Cuantificación de azúcares reductores totales**

Los azúcares reductores totales se cuantificaron con los reactivos de Somogy-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1952). Primero se mezcló 50  $\mu\text{L}$  del extracto de azúcares solubles con 400  $\mu\text{L}$  de reactivo de cobre de Somogy y agua destilada para alcanzar un volumen final de 600  $\mu\text{L}$ . Ésta mezcla se incubó a 100 °C (45 min) y después se dejó enfriar en oscuridad a temperatura ambiente (30 min). Posteriormente se adicionó 400  $\mu\text{L}$  del reactivo de Nelson para alcanzar un volumen final de 1 mL, y las reacciones se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente (30 min). Finalmente, la absorbancia se midió a 550 nm y la concentración de azúcares reductores totales se estimó con base en una curva de calibración

de glucosa. La cantidad de azúcares reductores se reporta como  $\mu\text{g}$  de glucosa por  $\text{mg}$  de tejido ( $\mu\text{g Glu mg TF}^{-1}$ ).

### **Cuantificación de cetosas totales, cetosas no reductoras y reductoras**

Las cetosas totales se cuantificaron con base en el método de resorcinol (Roe, 1934). Las reacciones consistieron en mezclar  $50 \mu\text{L}$  del extracto de azúcares solubles con reactivo de resorcinol (0.1 % de resorcinol, diluido en etanol al 96 %) con  $700 \mu\text{L}$  de HCl concentrado. Se agregó agua destilada para alcanzar un volumen final de  $1 \text{ mL}$ . Las reacciones se incubaron a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  (15 min) y se enfriaron a temperatura ambiente (15 min). La absorbancia de cada muestra se midió a  $520 \text{ nm}$  y el contenido de cetosas totales se estimó con una curva de calibración de fructosa. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  de fructosa por  $\text{mg}$  de tejido fresco ( $\mu\text{g Fru mg TF}^{-1}$ ).

Las cetosas no reductoras también se cuantificaron con el reactivo de resorcinol. Para ello, primero una alícuota de  $50 \mu\text{L}$  del extracto de azúcares solubles se llevó a un volumen final de  $400 \mu\text{L}$  y a una concentración final de  $0.2 \text{ N}$  de NaOH y se incubó a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  (15 min). Después, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionó  $100 \mu\text{L}$  de reactivo de resorcinol y  $500 \mu\text{L}$  de HCL concentrado. Las reacciones se incubaron a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  (15 min). La absorbancia se midió a  $520 \text{ nm}$  y el contenido de cetosas no reductoras totales se estimó con una curva de calibración en la que se usó sacarosa como estándar y los resultados se reportan como  $\mu\text{g}$  de sacarosa por  $\text{mg}$  de tejido fresco ( $\mu\text{g Suc mg TF}^{-1}$ ).

Para el cálculo de cetosas reductoras se restó el equivalente molar de fructosa en la fracción cuantificada de cetosas no reductoras del cuantificado para cetosas totales. El resultado se expresó en unidades de masa como  $\mu\text{g}$  de fructosa por  $\text{mg}$  de tejido fresco ( $\mu\text{g Fru mg TF}^{-1}$ ).

### **Cuantificación de almidón**

La cuantificación de almidón se realizó con base en el protocolo de Smith & Zeeman, 2006 con modificaciones. El pellet de las muestras de donde se obtuvo el extracto de azúcares solubles se resuspendió en  $200 \text{ mL}$  de agua destilada y se calentó a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  (45 min) para después mantenerse a temperatura ambiente (15 min). Después, se adicionó  $300 \mu\text{L}$  de una

mezcla de reacción con 1.7  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -amilasa (Sigma A3403) y 1.1  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -amiloglucosidasa (Sigma A1602) en amortiguador de acetato de sodio al 0.2 M (pH 5.4). Las reacciones se incubaron a 37 °C (24 h). Los azúcares reductores, producto de la digestión enzimática del almidón, se cuantificaron con los reactivos de Somogy-Nelson como se describió anteriormente. El contenido de almidón se estimó con base en una curva de calibración de glucosa como estándar y se expresó como  $\mu\text{g}$  de glucosa por  $\text{mg}$  de tejido fresco ( $\mu\text{g Glu mg TF}^{-1}$ ). Finalmente se calcularon las proporciones de azúcares solubles totales respecto a almidón en tejidos fuente y raíces en muestras individuales.

### **Análisis estadísticos**

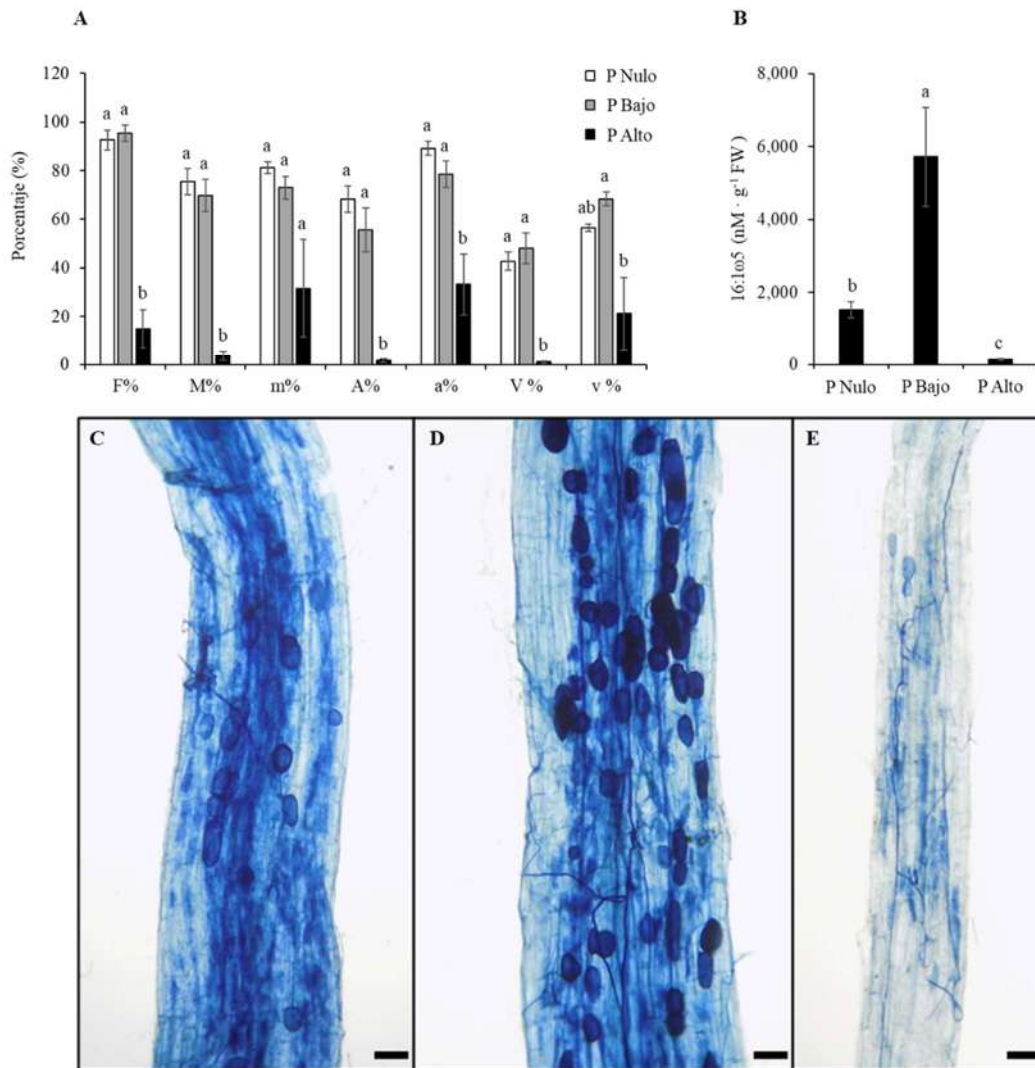
Los análisis estadísticos se realizaron con el programa disponible en línea SAS OnDemand for Academics (SAS Institute, Inc.). Para las comparaciones entre tratamientos se utilizaron por lo menos tres replicas biológicas. La normalidad de los datos fue evaluada por la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas por la prueba de Levine. Los datos cuantitativos que fueron normales y homocedásticos se compararon por la prueba de t de Student o por análisis de varianzas (ANOVA) por los procedimientos ANOVA o GLM cuando los datos estaban balanceados o no balanceados, respectivamente, seguidos por la comparación de medias de Fischer o Tukey ( $p=0.05$ ), respectivamente. La comparación entre los factores de inoculación con *R. irregularis*, representado como M- para plantas control no inoculadas y como M+ para plantas inoculadas, así como la concentración de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0 mM, 0.065 mM y 1.3 mM) se realizó por un ANOVA factorial 2 X 3 usando los procedimientos ANOVA o GLM cuando los datos estaban balanceados o no balanceados, respectivamente, seguidos por la comparación de medias de Tukey ( $p=0.05$ ).

### **Resultados**

#### **El incremento de biomasa del HMA en raíces promueve respuestas de crecimiento positivas en la planta hospedera**

Como se presentó en el Capítulo I, las plantas a las que se fertilizaron con solución nutritiva con P Nulo presentaron los niveles de colonización más altos, mientras que las plantas que

se mantuvieron con P Alto, mantuvieron niveles de colonización significativamente más bajos para los parámetros medidos excepto para la abundancia de colonización en los fragmentos de raíz observados (m%) (Figura 1 A).

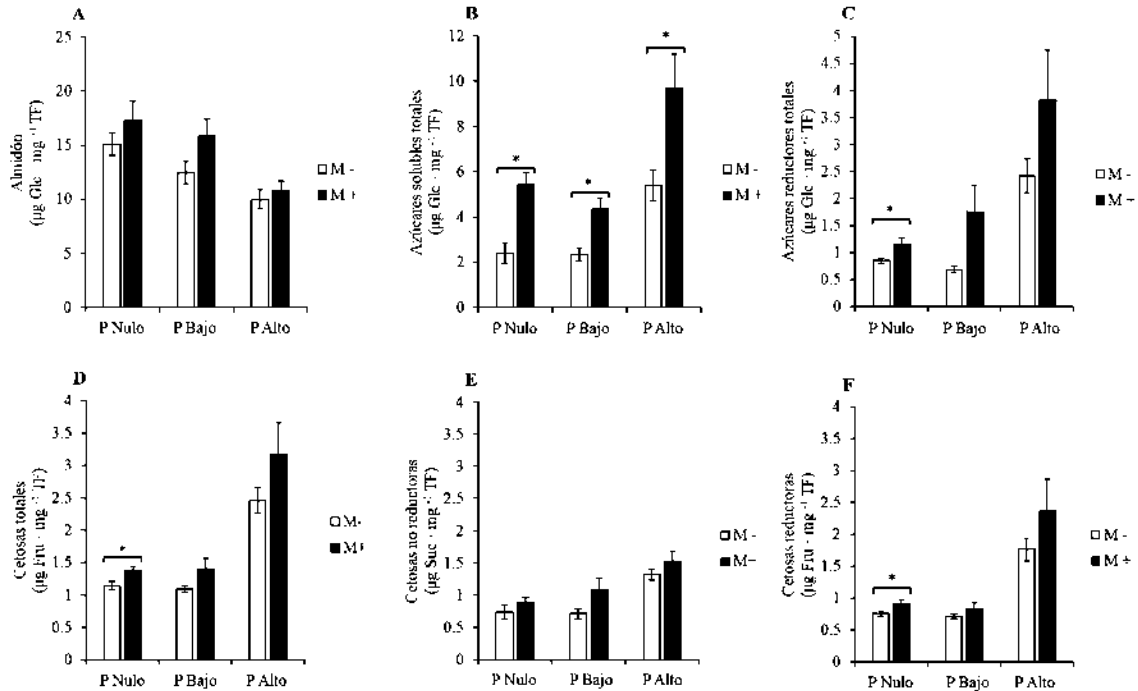


**Figura 1:** Comparación de los porcentajes de colonización micorrízica cuantificados visualmente y la acumulación del biomarcador de hongos formadores de micorriza arbuscular 16:1ω5. Cuantificación de hongos formadores de micorriza por el método de Trouvelot et al (1896) (A). Cuantificación del lípido 16:1ω5 en raíces de plantas colonizadas por *R. irregularis* (B). Colonización de *R. irregularis* en fragmentos de raíces de tomate fertilizadas con soluciones nutritivas con P Nulo (C), P Bajo (D) y P Alto (E). F%, frecuencia de colonización micorrízica en el sistema radicular; M%, abundancia de colonización micorrízica en el sistema radicular; m% abundancia de colonización en los fragmentos de raíz observados; A%, abundancia de arbuscúlos en el sistema radicular; a% abundancia de arbuscúlos en los fragmentos observados; V%, abundancia de vesículas en el sistema radicular; v% abundancia de vesículas en los fragmentos observados. Los datos representan la comparación de al menos tres replicas por tratamiento, las comparaciones se realizaron por ANOVA (A) o por el procedimiento GLM (B), las barras de error representan el error estándar de la media, diferentes letras indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de comparación de medias de Tukey's test ( $p=0.05$ ).

Sin embargo, la biomasa del HMA determinada por la cuantificación del lípido 16:1 $\omega$ 5 fue significativamente mayor cuando las plantas presentaron promoción de crecimiento en los tejidos fuente mientras se mantuvieron con P Bajo, en comparación con la acumulación de biomasa en los otros dos niveles de P aplicados (Figura 1 B). También, el mayor porcentaje de vesículas en los fragmentos observados (v%) se visualizó en fragmentos de raíces de plantas que se mantuvieron con P Bajo, y las observaciones en microscopio fueron consistentes con esto (Figuras 1 C-E). Sin embargo, no hubo diferencia estadística significativa cuando se comparó el valor de v% entre plantas mantenidas con P Nulo y P Bajo (Figura 1 A).

### **La distribución de carbono en la planta está modificada en tejidos fuente y tejidos consumidores por la disponibilidad de P y la respuesta a la simbiosis micorrízica**

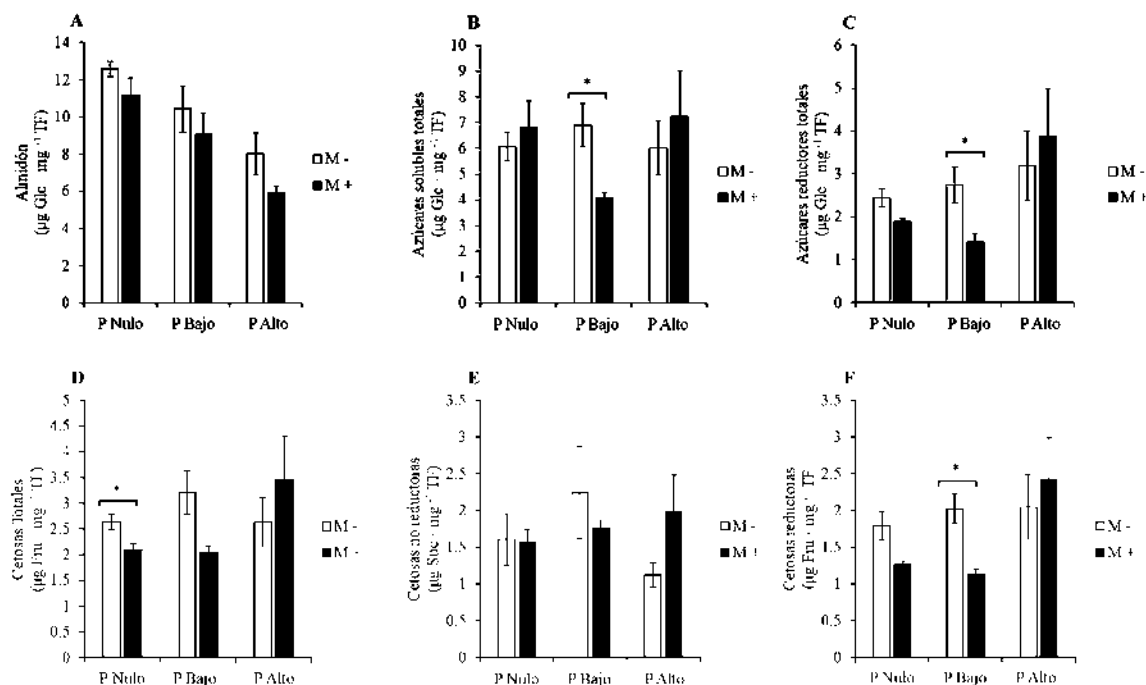
Para evaluar las diferencias en la distribución de carbono en plantas inoculadas con *R. irregularis* fertilizadas con los diferentes niveles de P, se cuantificaron diferentes fracciones de azúcares solubles y de almidón en hojas fuente y raíces que se compararon con plantas control no inoculadas. En hojas fuente, la cantidad de almidón no se modificó significativamente por la presencia de la simbiosis micorrízica, en ninguna de las condiciones de fertilización fosfórica (Figura 2 A). Sin embargo, se observó que la presencia de la asociación micorrízica incrementó la acumulación de azúcares solubles totales en todas las condiciones de fertilización fosfórica (Figura 2 B). De manera particular, cuando las plantas se mantuvieron con solución nutritiva con P Nulo, la simbiosis promovió el incremento significativo ( $p=0.05$ ) de azúcares reductores totales, cetosas totales y cetosas reductoras (Figuras 2 C, D y F); sin diferencias significativas en el contenido de cetosas no reductoras (Figura 2 E). En cuanto a las plantas mantenidas con P Bajo y P Alto, todas las fracciones de azúcares solubles fueron estadísticamente similares entre plantas inoculadas y no inoculadas (Figura 2 C-F).



**Figura 2.** Concentración de almidón y azúcares solubles en hojas fuente de plantas de tomate. Almidón (A), azúcares solubles totales (B), azúcares reductores totales (C), cetosas totales (D), cetosas no reductoras (E), cetosas reductoras (F). Los datos representan el promedio de cinco replicas biológicas y se expresan en microgramos por miligramo de tejido fresco (TF), las barras de error representan el error estándar de la media. El asterisco indica diferencia estadística significativa entre plantas control no inoculadas (M-) y plantas inoculadas con *R. irregularis* (M+) de acuerdo con la prueba de comparación de medias de Student ( $p=0.05$ ). Las concentraciones de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  están indicadas como P Nulo (0 mM), P Bajo (0.065 mM) y P Alto (1.3 mM), respectivamente.

Similar a lo que se observó en hojas fuente, en raíces la simbiosis micorrízica no alteró significativamente los contenidos de almidón entre plantas inoculadas y no inoculadas con el HMA (Figura 3 A). Sin embargo, se observó que los niveles de azúcares solubles totales fueron estadísticamente ( $p=0.05$ ) iguales en plantas inoculadas y no inoculadas cuando las plantas se mantuvieron con P Nulo y P Bajo. Las plantas que se fertilizaron con P Bajo y que mostraron respuestas positivas de crecimiento a la asociación micorrízica presentaron reducción del contenido de azúcares solubles totales, en comparación con las plantas no inoculadas que se fertilizaron con la misma solución nutritiva (Figura 3 B). En esta condición, también se observó reducción significativa ( $p=0.05$ ) de los azúcares reductores totales y de las cetosas reductoras (Figura 3 C y F). De manera particular, en las plantas inoculadas y mantenidas con solución nutritiva con P Nulo, se observó una reducción significativa ( $p=0.05$ ) de la acumulación de cetosas totales, en comparación con las plantas control no inoculadas mantenidas con la misma concentración de P (Figura 3 D); sin embargo, la

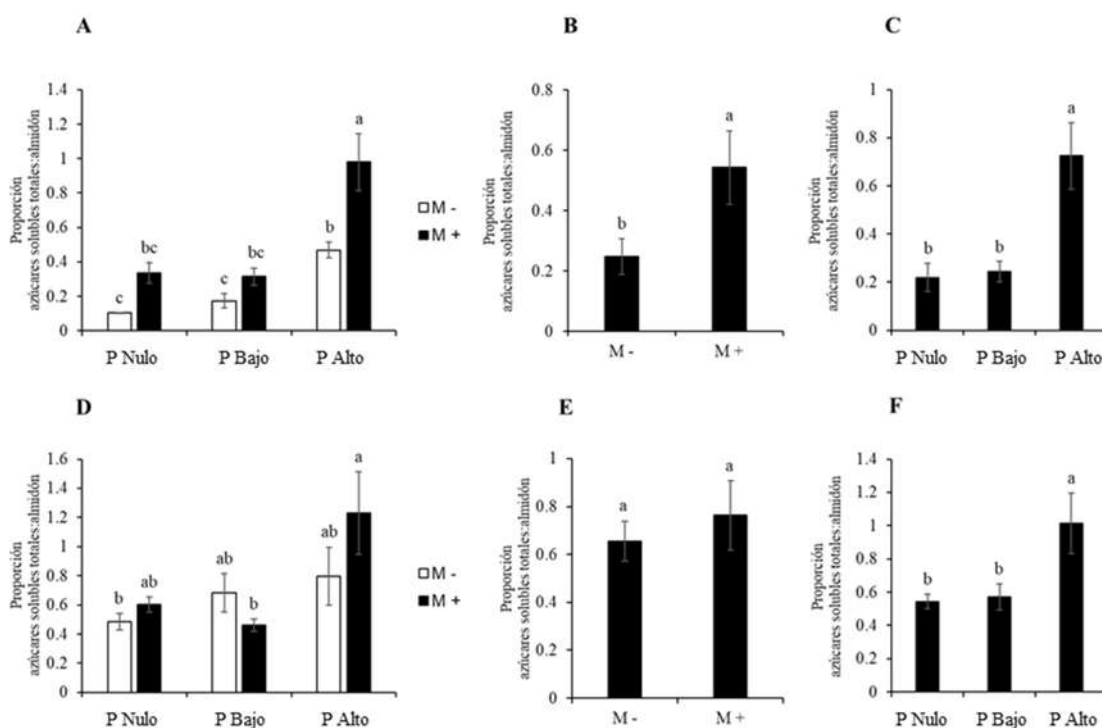
reducción de esta fracción no impactó significativo en la acumulación de azúcares solubles totales en comparación con las plantas no inoculadas (Figura 3 B).



**Figura 3.** Concentración de almidón y azúcares solubles en raíces de plantas de tomate. Almidón (A), azúcares solubles totales (B), azúcares reductores totales (C), cetosas totales (D), cetosas no reductoras (E), cetosas reductoras (F). Los datos representan el promedio de tres replicas biológicas y se expresan en microgramos por miligramo de tejido fresco (TF), las barras de error representan el error estándar de la media. El asterisco indica diferencia estadística significativa entre plantas control no inoculadas (M-) y plantas inoculadas con *R. irregularis* (M+) de acuerdo con la prueba de comparación de medias de Student ( $p=0.05$ ). Las concentraciones de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  están indicadas como P Nulo (0 mM), P Bajo (0.065 mM) y P Alto (1.3 mM), respectivamente.

Para evaluar los efectos de la fertilización fosfórica y la colonización micorrízica en la distribución de carbono en plantas, se calculó la proporción de la concentración de azúcares solubles respecto a la de almidón. En hojas fuente, esta proporción fue mayor en plantas que se desarrollaron en presencia de bajas cantidades de P en la solución nutritiva en comparación con las que se desarrollaron con la concentración de P Alto (Figura 4 A). El efecto general de la inoculación con el HMA se observó como un incremento de la proporción de los azúcares solubles respecto a almidón en las hojas fuente (Figura 4 B); mientras que la reducción del P en la solución nutritiva generó que la proporción se redujera significativamente en las plantas que se mantuvieron con P Nulo y P Bajo en comparación con las plantas que se fertilizaron con P Alto (Figura 4 C). En raíces, la asociación micorrízica no modificó el valor calculado de la proporción azúcares solubles:almidón en ninguna

condición de P disponible (Figura 4 D), lo que fue consistente con la comparación que se realizó entre plantas inoculadas y no inoculadas de todo el experimento (Figura 4 E). Sin embargo, de manera similar a lo que se observó en hojas fuente, la reducción del contenido de P en la solución nutritiva redujo el valor de la proporción de azúcares solubles respecto a almidón significativamente ( $p=0.05$ ), en comparación con las plantas que recibieron la concentración de P más alta (Figura 4 F).



**Figura 4:** Proporción del contenido de azúcares solubles respecto al contenido de almidón en hojas fuente y raíces. Proporción del contenido de azúcares solubles respecto al contenido de almidón en hojas fuente (A-C) y raíces (D-F). Los datos representan el promedio de al menos tres replicas biológicas las barras de error representan el error estándar de la media. Los datos representan el promedio de al menos cuatro replicas biológicas, la barra de error representa el error estándar de la media, la contribución de cada factor por variable se evaluó por ANOVA en un diseño factorial (2x3), letras diferentes indican diferencia estadística significativa de acuerdo con la prueba de comparación de medias de Tukey ( $p=0.05$ ). M- plantas control no inoculadas; M+ plantas inoculadas con *R. irregularis*. Las concentraciones de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  están indicadas como P Nulo (0 mM), P Bajo (0.065 mM) y P Alto (1.3 mM), respectivamente.

## Discusión

Las asociaciones micorrízicas que se establecen entre plantas y HMA tienen el potencial de promover respuestas contrastantes que se clasifican como positivas, neutras o negativas, que

se manifiestan como promoción, represión, o sin cambios significativos en el desarrollo y crecimiento de la planta hospedera (Salmeron-Santiago et al., 2023; Smith et al., 2011).

En este trabajo se reportó que las plantas que se desarrollaron en una condición limitante de P expresaron un fenotipo negativo a la simbiosis, lo que sugiere que en esta condición la competencia por este elemento ocasionaría la reducción del crecimiento. Las respuestas de crecimiento negativas a la asociación micorrízica se han relacionado con estados de desarrollo tempranos de la planta hospedera en los que no existen órganos fotosintéticos desarrollados (Janos, 2007). Considerando esto, la respuesta negativa de la planta hospedera podría revertirse una vez que se desarrollan hojas fotosintéticamente activas (Janos, 2007). Esta observación contrasta con nuestros resultados, ya que el efecto negativo de la asociación estuvo presente en plantas que desarrollaron órganos fotosintéticos.

Además, se ha reportado también que la limitación de la fijación del carbono en la planta por la exposición a bajas cantidades de radiación puede generar la expresión de fenotipos negativos en plantas colonizadas por un HMA (Konvalinková et al., 2017). En esta condición, el carbono se convertiría en el factor limitante para el desarrollo de la planta por el importe de carbono que genera el hongo para sustentar su metabolismo heterotrófico. En relación con esto, en este trabajo se detectaron indicadores que sugieren el incremento de la fuerza del tejido fuente en las plantas inoculadas con *R. irregularis*, como el incremento de las unidades SPAD en hojas fuente, como se describió en el Capítulo I, y el incremento del contenido de azúcares solubles en hojas. Por lo que se sugiere que la simbiosis con HMA promueve la actividad fotosintética para compensar las demandas de carbono del HMA.

En cuanto al efecto de la deficiencia de P sobre la distribución de carbono en las plantas. Se sabe que la deficiencia de este elemento incrementa el contenido de almidón en las hojas por el incremento de la actividad de la AGPasa para liberar P de intermediarios del ciclo de Calvin y mantener la biosíntesis de ATP. En las condiciones de deficiencia de P promovidas en este trabajo, se observó que los tejidos foliares acumularon una mayor cantidad de almidón, lo que concuerda con la caracterización de la deficiencia de P en plantas. A pesar de ello, la simbiosis micorrízica promovió la acumulación de azúcares solubles en hojas en todas las condiciones de P evaluadas. Se sugiere que el incremento del contenido de azúcares solubles en hojas fuente esta ejercido por la presencia de la simbiosis micorrízica, posiblemente como un efecto independiente a la deficiencia de P en plantas colonizadas. Esto

sugiere que, a pesar de los efectos generados por la deficiencia de P, la presencia de la simbiosis micorrízica promueve el incremento de la fuerza del tejido fuente, al canalizar productos de la fotosíntesis para la biosíntesis de azúcares solubles que tienen el potencial de ser exportados a las raíces colonizadas por el HMA.

Se ha reportado que los HMA son capaces de incrementar la cantidad de azúcares solubles en órganos fotosintéticos por la modulación de la actividad de la SPS (Wu et al., 2017). La reacción catalizada por la SPS es un paso clave durante la biosíntesis de sacarosa que desplaza los productos de la fijación de carbono de manera irreversible a sacarosa (Lunn & ap Rees, 1990), por lo que determina la cantidad de carbono que puede ser distribuido a otros órganos de la planta. También, se ha reportado que la presencia de HMA en raíces reduce la concentración de azúcares solubles en tejidos fotosintéticos, como una respuesta del incremento de la exportación de carbono de estos órganos a tejido consumidores (Doidy et al., 2012; Goddard et al., 2021). Estas diferencias pueden deberse a factores que controlan el suministro de nutrientes al HMA como la regulación circadiana de los elementos clave que controlan la fuerza del tejido fuente, la intensidad y calidad de la luz, la edad de la planta y el estado de desarrollo de la simbiosis (Salmeron-Santiago et al., 2022).

En raíces, la deficiencia de P también favorece la acumulación de almidón en las raíces por el incremento de la fuerza del tejido consumidor y de canalización de carbono a la biosíntesis de almidón (Hammond & White, 2008). La reducción de la proporción de azúcares solubles respecto a almidón en las plantas que se fertilizaron con las dos dosis de P más bajas sugiere que existe acumulación de almidón en estas dos condiciones. Con la evaluación de mutantes de *Lotus japonicus* con las rutas de biosíntesis y degradación de almidón alteradas, se concluyó que el metabolismo del almidón en raíces no altera la colonización micorrízica, y se sugirió que el hongo toma la mayor parte del carbono de los azúcares solubles que son importados desde los tejidos fuente (Gutjahr et al., 2011). Nuestros resultados apoyan esta idea, además sugieren que el metabolismo del almidón es independiente del desempeño de la simbiosis en términos de eficiencia de la colonización, ya que una mayor biomasa del hongo en el sistema radicular no modifica los efectos de acumulación del almidón ejercidos por la deficiencia de P entre plantas inoculadas y no inoculadas con *R. irregularis*.

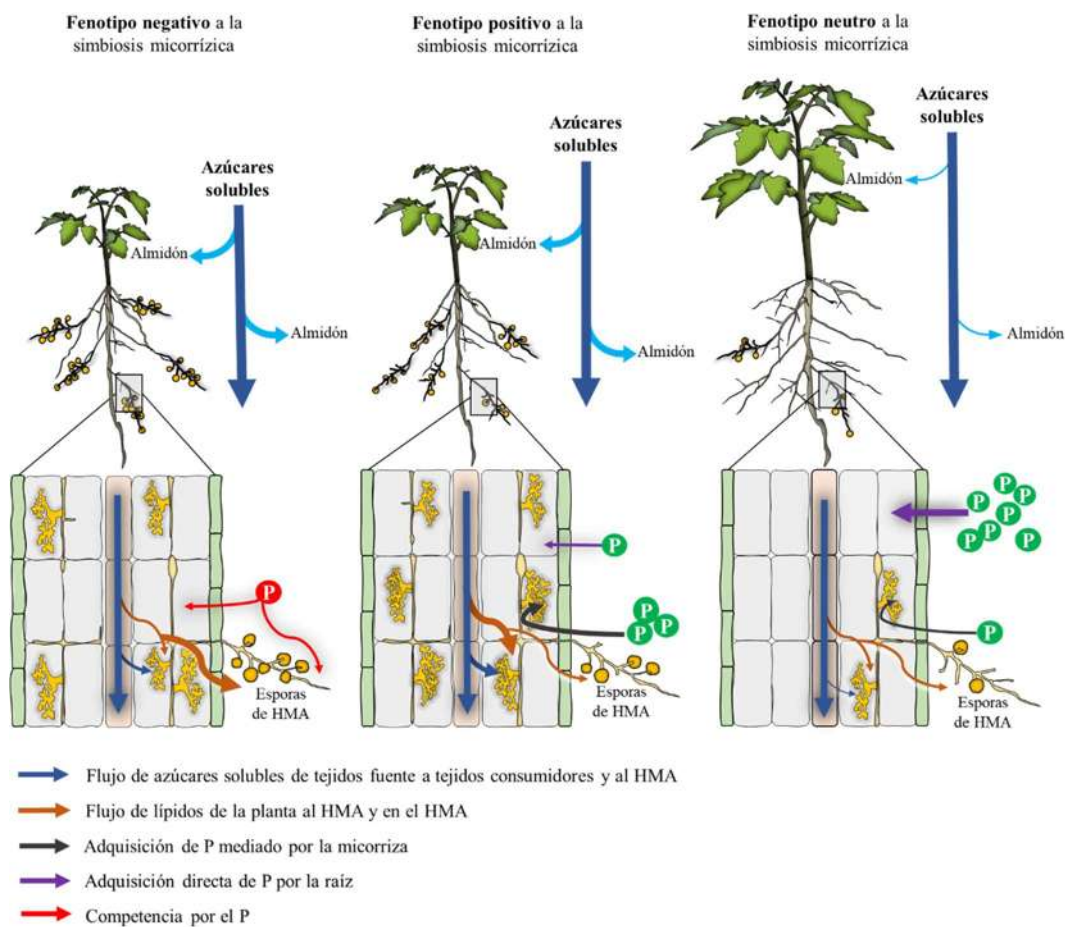
En raíces de tomate colonizadas por *Funneliformis mosseae* se promovió la acumulación de sacarosa y fructosa y se redujo el contenido de glucosa, lo que sugirió el incremento de la

capacidad consumidora de las raíces colonizadas por un HMA (Boldt et al., 2011). La reducción de glucosa se consideró como la manifestación de la adquisición de carbono en forma de hexosas por parte del HMA (Boldt et al., 2011). Estos efectos en los azúcares solubles son consistentes con la actividad de transportadores de sacarosa del tipo SUT y con invertasas apoplásticas como LIN6, lo que promueven la translocación de sacarosa desde los tejidos fuente hasta las raíces colonizadas por un HMA y al espacio periarbuscular, en donde es hidrolizada a glucosa y fructosa (Bitterlich et al., 2014; Boldt et al., 2011; Sonia García-Rodríguez et al., 2007; Schaarschmidt et al., 2006). En nuestros resultados solo las raíces de las plantas que presentaron una respuesta positiva a la asociación micorrízica mostraron menor contenido de azúcares solubles que las plantas no inoculadas con el HMA que se desarrollaron en la misma condición, de manera particular en la que correspondió a la fracción de azúcares reductores totales que incluye a glucosa y fructosa. Lo que sugiere que en esta condición las raíces colonizadas por HMA incrementan su capacidad catabólica para proveer hexosas que pueden ser tomadas directamente por el hongo, o que se canalizan a rutas para la biosíntesis de otros compuestos que también sustentan la simbiosis como lípidos. Otra característica de los hongos formadores de micorriza arbuscular, que ha sido propuesta como la que desencadena la expresión de fenotipos negativos en la planta hospedera, es la agresividad de la colonización (Graham & Abbott, 2000). La especie *R. irregularis* se caracteriza por una alta capacidad de colonización en periodos cortos de tiempo comparado con otras especies de HMA (Hart & Reader, 2002; Werner & Kiers, 2015). En nuestros resultados, observamos que el contenido de las estructuras intrarradicales en las dos condiciones de P más bajas fue alto y similar en ambas, pero la biomasa fúngica determinada por la cuantificación del lípido biomarcador 16:1 $\omega$ 5 en las raíces indica que existe una mayor biomasa en las plantas que manifestaron un fenotipo positivo a la simbiosis. Por lo que la agresividad de colonización, como responsable de la generación de fenotipos negativos, no correlaciona con nuestras observaciones. El incremento de la biomasa del hongo cuando las plantas presentan respuestas positivas a la asociación micorrízica sugieren que en esta condición la planta provee una mayor cantidad de carbono en forma de lípidos, comparado con respuestas negativas o neutras. El incremento de la biomasa del HMA cuando la planta expresa respuestas de crecimiento positivas, sugiere que existe una mayor extensión de hifas en las raíces, que promovería una mayor adquisición de nutrientes, particularmente P a través

de la vía micorrízica. Esto está de acuerdo con la hipótesis que plantea que las plantas invierten una mayor cantidad de carbono cuando perciben un mayor beneficio en términos de la adquisición de P por el HMA (Kiers & Van der Heijden, 2006). El estudio de la distribución de carbono a diferentes rutas metabólicas ayudará a elucidar los mecanismos por los cuales las plantas manifiestan respuestas de crecimiento positivas, negativas o neutras en condiciones nutrimentales en las que el hospedero presenta respuestas de crecimiento contrastantes a la asociación micorrízica.

## Conclusiones

En el esquema de la Figura 5 se resumen las conclusiones del presente trabajo, integrando las del Capítulo I.



**Figura 5:** Efecto de la disponibilidad de P y de la colonización por un HMA en el flujo de carbono y el desarrollo de la micorriza. La expresión de un fenotipo negativo, positivo o neutro a la asociación micorrízica en las tres condiciones de disponibilidad de P está relacionada con el desempeño de la asociación generada por

las diferentes condiciones de adquisición de P y por la modificación de los patrones de distribución de carbono en la planta y entre los simbiontes. La acumulación de almidón y azúcares solubles que se aprecian en la concentración de P más alta son modificados y conducen a la acumulación de almidón en las hojas en las condiciones en las que el P es más escaso. La asociación micorrízica promueve la canalización de carbono a la biosíntesis de azúcares solubles independientemente del fenotipo que exprese la planta colonizada a la asociación, mientras que la cantidad de lípidos transferidos de la planta al hongo se incrementa en las plantas que expresan un fenotipo positivo a la asociación. La colonización micorrízica también depende de la disponibilidad de P, y presenta mejor desarrollo en condiciones en las que el P es escaso. Las flechas azul oscuro indican la movilización de azúcares solubles entre tejidos fuente y raíces colonizadas por el HMA; las flechas azul claro indican la biosíntesis de almidón en hojas y en raíces. La distribución de carbono entre la planta y el HMA se indican con flechas como está descrito en la parte inferior del esquema. Las diferencias en el grosor de las flechas están de acuerdo con la intensidad del flujo de nutrientes entre los órganos de las plantas y las estructuras del HMA.

Con base en los resultados obtenidos, se describió que la colonización micorrízica incrementa la fuerza del tejido consumidor incluso a bajos niveles de colonización. Además, el incremento de la cantidad de carbono canalizado a la biosíntesis de almidón en los tejidos fuente no limita la estimulación de la fuerza del tejido fuente ejercida por la simbiosis micorrízica. El incremento de la fuerza del tejido fuente provee mayor cantidad de azúcares solubles para distribuirse en las raíces colonizadas por el HMA. De manera simultánea se incrementa la fuerza consumidora de las raíces colonizadas por el HMA.

La acumulación de azúcares solubles en las raíces de las plantas colonizadas en plantas que se desarrollaron con solución nutritiva sin una fuente de P es una consecuencia del incremento de la fuerza consumidora de las raíces colonizadas, lo que ocasiona la represión del crecimiento de la planta. Pero en esta misma condición, la planta restringiría el carbono que otorga al hongo, como resultado de la baja eficiencia en la adquisición de P promovida por el hongo, limitando así la formación de biomasa fúngica intrarradical y promoviendo la esporulación del hongo.

Cuando la planta expresa un fenotipo positivo a la asociación micorrízica, ésta invierte una mayor cantidad de carbono como carbohidratos, pero también como lípidos. En estas condiciones la planta canaliza una mayor cantidad de carbono como carbohidratos al HMA para el sustento de su metabolismo energético. Al mismo tiempo, la planta estaría canalizando azúcares para la biosíntesis de 2-monoacilglicerol, que es biosintetizado por la planta y es el precursor del lípido 16:1 $\omega$ 5 que se biosintetiza en el HMA para la formación de biomasa y lípidos de almacenamiento. Como consecuencia, se reduce la concentración de azúcares solubles en raíces de plantas en donde se promueve el crecimiento por la asociación con el HMA. El incremento de la biomasa del HMA en las raíces en esta condición,

promovería una mayor actividad de la simbiosis en términos de movilización de nutrientes y particularmente de P, que se encuentra en niveles limitantes para el desarrollo de la planta. La respuesta del HMA por el incremento de su biomasa y su actividad para mantener el flujo bidireccional de nutrientes, reduce la canalización de carbono para la compartimentación en esporas, reduciendo la esporulación.

Esto sugiere que la manifestación de respuestas de crecimiento negativas o positivas a la simbiosis micorrízica de tipo arbuscular son la consecuencia de la distribución y canalización del carbono entre los tejidos de la planta y a diferentes rutas metabólicas respectivamente.

### **Literatura consultada**

- Begum, N., Qin, C., Ahanger, M. A., Raza, S., Khan, M. I., Ashraf, M., Ahmed, N., & Zhang, L. (2019). Role of Arbuscular mycorrhizal fungi in plant growth regulation: Implications in abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, *10*:1068. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01068>
- Bitterlich, M., Krügel, U., Boldt-Burisch, K., Franken, P., & Kühn, C. (2014). The sucrose transporter SISUT2 from tomato interacts with brassinosteroid functioning and affects arbuscular mycorrhiza formation. *Plant Journal*, *78*(5), 877–889. <https://doi.org/10.1111/tpj.12515>
- Boldt, K., Pörs, Y., Haupt, B., Bitterlich, M., Kühn, C., Grimm, B., & Franken, P. (2011). Photochemical processes, carbon assimilation and RNA accumulation of sucrose transporter genes in tomato arbuscular mycorrhiza. *Journal of Plant Physiology*, *168*(11), 1256–1263. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.01.026>
- Doidy, J., Van Tuinen, D., Lamotte, O., Corneillat, M., Alcaraz, G., & Wipf, D. (2012). The *Medicago truncatula* sucrose transporter family: Characterization and implication of key members in carbon partitioning towards arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Plant*, *5*(6), 1346–1358. <https://doi.org/10.1093/mp/sss079>
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, *28*(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- García-Rodríguez, S., Azcón-Aguilar, C., & Ferrol, N. (2007). Transcriptional regulation of

- host enzymes involved in the cleavage of sucrose during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Physiologia Plantarum*, 129(4), 737–746. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00873.x>
- Genre, A., Lanfranco, L., Perotto, S., & Bonfante, P. (2020). Unique and common traits in mycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 18(11), 649–660. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0402-3>
- Goddard, M. L., Belval, L., Martin, I. R., Roth, L., Laloue, H., Deglène-Benbrahim, L., Valat, L., Bertsch, C., & Chong, J. (2021). Arbuscular mycorrhizal symbiosis triggers major changes in primary metabolism together with modification of defense responses and signaling in both roots and leaves of *Vitis vinifera*. *Frontiers in Plant Science*, 12:721614. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.721614>
- Graham, J. H., & Abbott, L. K. (2000). Wheat responses to aggressive and non-aggressive arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 220(1–2), 207–218. <https://doi.org/10.1023/a:1004709209009>
- Gutjahr, C., Novero, M., Welham, T., Wang, T., & Bonfante, P. (2011). Root starch accumulation in response to arbuscular mycorrhizal colonization differs among *Lotus japonicus* starch mutants. *Planta*, 234(3), 639–646. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1472-2>
- Hammond, J. P., & White, P. J. (2008). Sucrose transport in the phloem: Integrating root responses to phosphorus starvation. *Journal of Experimental Botany*, 59(1), 93–109. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm221>
- Hart, M. M., & Reader, R. J. (2002). Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 153(2), 335–344. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646X.2001.00312.x>
- Hartmann, H., Bahn, M., Carbone, M., & Richardson, A. D. (2020). Plant carbon allocation in a changing world – challenges and progress: introduction to a Virtual Issue on carbon allocation. *New Phytologist*, 227(4), 981–988. <https://doi.org/10.1111/nph.16757>
- Hennion, N., Durand, M., Vriet, C., Doidy, J., Maurousset, L., Lemoine, R., & Pourtau, N. (2019). Sugars en route to the roots. Transport, metabolism and storage within plant roots and towards microorganisms of the rhizosphere. *Physiologia Plantarum*, 165(1), 44–57. <https://doi.org/10.1111/ppl.12751>

- Janos, D. P. (2007). Plant responsiveness to mycorrhizas differs from dependence upon mycorrhizas. *Mycorrhiza*, 17(2), 75–91. <https://doi.org/10.1007/s00572-006-0094-1>
- Jiang, Y., Wang, W., Xie, Q., Liu, N., Liu, L., Wang, D., Zhang, X., Yang, C., Chen, X., Tang, D., & Wang, E. (2017). Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi. *Science*, 356(6343), 1172–1175. <https://doi.org/10.1126/science.aam9970>
- Jung, S. C., Martinez-Medina, A., Lopez-Raez, J. A., & Pozo, M. J. (2012). Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of Chemical Ecology*, 38(6), 651–664. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0134-6>
- Kiers, T., & van der Heijden, M. (2006). Mutualistic stability in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Ecology*, 87(7), 1627–1636.
- Konvalinková, T., Püschel, D., Řezáčová, V., Gryndlerová, H., & Jansa, J. (2017). Carbon flow from plant to arbuscular mycorrhizal fungi is reduced under phosphorus fertilization. *Plant and Soil*, 419(1–2), 319–333. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3350-6>
- Lü, L.-H., Zou, Y.-N., & Wu, Q.-S. (2018). Relationship between arbuscular mycorrhizas and plant growth: Improvement or depression? In B. Giri, R. Prasad, & A. Varma (Eds.), *Root biology* (Issue May, pp. 451–464). Elsevier. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75910-4\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75910-4_18)
- Luginbuehl, L. H., Menard, G. N., Kurup, S., Van Erp, H., Radhakrishnan, G. V., Breakspear, A., Oldroyd, G. E. D., & Eastmond, P. J. (2017). Fatty acids in arbuscular mycorrhizal fungi are synthesized by the host plant. *Science*, 356(6343), 1175–1178. <https://doi.org/10.1126/science.aan0081>
- Lunn, J. E., & ap Rees, T. (1990). Apparent equilibrium constant and mass-action ratio for sucrose-phosphate synthase in seeds of *Pisum sativum*. *Biochemical Journal*, 267(3), 739–743. <https://doi.org/10.1042/bj2670739>
- Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 153(2), 375–380. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)71980-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)71980-7)
- Poorter, H., & Nagel, O. (2000). The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO<sub>2</sub>, nutrients and water: A quantitative review.

- Australiand Journal of Plant Physiology*, 27(12), 595–607.  
[https://doi.org/10.1071/PP99173\\_CO](https://doi.org/10.1071/PP99173_CO)
- Poorter, H., & Pothmann, P. (1992). Growth and carbon economy of a fast-growing and a slow-growing grass species as dependent on ontogeny. *New Phytologist*, 120(1), 159–166. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1992.tb01069.x>
- Roe, J. H. (1934). A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine. *Journal of Biological Chemistry*, 107(1), 15–22. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)75382-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)75382-9)
- Salmeron-Santiago, I. A., Martínez-Trujillo, M., Valdez-Alarcón, J. J., Pedraza-Santos, M. E., Santoyo, G., López, P. A., Larsen, J., Pozo, M. J., & Chávez-Bárceñas, A. T. (2023). Carbohydrate and lipid balances in the positive plant phenotypic response to arbuscular mycorrhiza: Increase in sink strength. *Physiologia Plantarum*, 175(1). <https://doi.org/10.1111/ppl.13857>
- Salmeron-Santiago, I. A., Martínez-Trujillo, M., Valdez-Alarcón, J. J., Pedraza-Santos, M. E., Santoyo, G., Pozo, M. J., & Chávez-Bárceñas, A. T. (2022). An updated review on the modulation of carbon partitioning and allocation in arbuscular mycorrhizal plants. *Microorganisms*, 10(1), 1–20. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010075>
- Schaarschmidt, S., Roitsch, T., & Hause, B. (2006). Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. 57(15), 4015–4023. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl172>
- Smith, A. M., & Zeeman, S. C. (2006). Quantification of starch in plant tissues. *Nature Protocols*, 1(3), 1342–1345. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.232>
- Smith, S. E., Jakobsen, I., Grønlund, M., & Smith, F. A. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: Interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiology*, 156(3), 1050–1057. <https://doi.org/10.1104/pp.111.174581>
- Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, 195(1), 19–23. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50870-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50870-5)
- Trouvelot, A., Kough, J. L., & Gianinazzi-Pearson, V. (1896). Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant

- une signification fonctionnelle. In V. Gianinazzi-Pearson & S. Gianinazzi (Eds.), *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae* (pp. 217–221). INRA Press.
- Werner, G. D. A., & Kiers, E. T. (2015). Order of arrival structures arbuscular mycorrhizal colonization of plants. *New Phytologist*, 205(4), 1515–1524. <https://doi.org/10.1111/nph.13092>
- Wipf, D., Krajinski, F., van Tuinen, D., Recorbet, G., & Courty, P. E. (2019). Trading on the arbuscular mycorrhiza market: From arbuscules to common mycorrhizal networks. *New Phytologist*, 223(3), 1127–1142. <https://doi.org/10.1111/nph.15775>
- Wu, H.-H., Zou, Y.-N., Rahman, M. M., Ni, Q.-D., & Wu, Q.-S. (2017). Mycorrhizas alter sucrose and proline metabolism in trifoliolate orange exposed to drought stress. *Scientific Reports*, 7(1), 42389. <https://doi.org/10.1038/srep42389>
- Zhao, S., Chen, A., Chen, C., Li, C., Xia, R., & Wang, X. (2019). Transcriptomic analysis reveals the possible roles of sugar metabolism and export for positive mycorrhizal growth responses in soybean. *Physiologia Plantarum*, 166(3), 712–728. <https://doi.org/10.1111/ppl.12847>

### CAPITULO III

## ANÁLISIS PRELIMINAR DE EXPRESIÓN DE GENES EN RAÍCES DE PLANTAS QUE PRESENTAN DIFERENTES RESPUESTAS DE CRECIMIENTO A LA ASOCIACIÓN MICORRÍZICA DE TIPO ARBUSCULAR

### Resumen

Durante la interacción con hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) las plantas ceden parte de los productos que generan durante la fotosíntesis al hongo para mantener su metabolismo heterotrófico. A cambio, el hongo favorece la adquisición de nutrientes, entre ellos el fósforo (P). La presencia del HMA en raíces tiene influencia sobre la distribución del carbono y su canalización hacia distintas rutas metabólicas en el hospedero, lo que podría estar asociado con el desempeño de la simbiosis y la respuesta de crecimiento que manifiesta el hospedero. En el presente trabajo se analizó la expresión de genes responsables de catabolismo de sacarosa en raíces de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) colonizadas por *Rhizophagus irregularis*. Las plantas se fertilizaron con distintas dosis de fósforo (P) aplicando diferentes concentraciones de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  con lo que se generó diferentes respuestas de crecimiento que se clasificaron como neutra cuando se aplicó 1.3 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (P Alto); positiva, cuando se aplicó 0.065 mM (P Bajo); y negativa, cuando se aplicó 0 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (P Nulo) en la solución nutritiva respectivamente. La eficiencia de la asociación en las diferentes condiciones de fertilización fosfórica se determinó con el análisis de la expresión del gen transportador de fosfato 4 de tomate (*SIPT4*). Se observó que cuando las plantas presentaron una respuesta en crecimiento negativa, incrementó significativamente la expresión del gen de la invertasa apoplástica LIN6. En cambio, cuando las plantas presentaron una respuesta de crecimiento positiva, se detectó incremento significativo de los transcritos para el gen de la sacarosa sintasa 1 (*SISUS1*). También, la mayor acumulación de transcritos del gen *SIPT4* se observó en las plantas que presentaron respuesta positiva a la asociación. Los resultados sugieren que el carbono se canaliza en el hospedero hacia diferentes rutas metabólicas en respuesta al desempeño de la asociación.

## **Abstract**

When plants interact with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) they provide part of the products they generate during photosynthesis to the AMF to sustain its heterotrophic metabolism. In exchange, the AMF improve nutrient acquisition, particularly phosphorus (P). Thus, the arbuscular mycorrhizal symbiosis has an important influence in the distribution of carbon partitioning and allocation in the host plant, which can be related to the performance of the symbiosis and the growth response of the host plant. We analysed the expression of genes involved in sucrose catabolism in root of tomato (*Solanum lycopersicum*) plant inoculated with *Rhizophagus irregularis*. Tomato plants were fertilized with different phosphorous (P) levels by applying NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> to generate contrasting growth responses in the host that were classified as neutral when fertilized with 1.3 mM (High P), positive when fertilized with 0.065 mM (Low P), and negative when fertilized with 0 mM (Null P), respectively. The performance of the symbiosis was analysed by measuring the level of expression of the phosphate transporter 4 gene (*SIPT4*). In roots of tomato plants that showed a negative growth response to arbuscular mycorrhiza, we observed that the expression of the gene of the apoplastic invertase LIN6 was up-regulated. While in roots of plants that showed a positive growth response, we observed an increase in the expression level of the sucrose synthase 1 gene (*SISUS1*). Also, plants showing a positive growth response to mycorrhiza accumulated the highest level of transcripts of the *SIPT4* gene. The results suggest that carbon is allocated to different metabolic pathways in the host in response to the performance of the mycorrhizal association.

## **Introducción**

La sacarosa es el carbohidrato que preferentemente se transporta desde los tejidos fotosintéticos, denominados tejidos fuente, hasta los tejidos de metabolismo heterotrófico, o tejidos consumidores (Stitt & Quick, 1989). En el contexto de las asociaciones micorrízicas, se considera que la sacarosa es la principal fuente de energía que se otorga a los hongos formadores de micorriza arbuscular (HMA) (Manck-Götzenberger & Requena, 2016).

Cuando los HMA colonizan el interior de las raíces forman estructuras complejas denominadas arbusculos en el interior de las células corticales; éstos a su vez están rodeados por una membrana que deriva de la membrana plasmática de la célula que alberga al arbusculo que se denomina membrana periarbuscular (Genre et al., 2020; Gutjahr & Parniske, 2013; Ivanov et al., 2019). El espacio apoplástico que separa al arbusculo de la membrana periarbuscular se denomina espacio periarbuscular (Ivanov et al., 2019).

Cuando la sacarosa importada desde los tejidos fuente ingresa a las células colonizadas por HMA, se descarga en el espacio periarbuscular, en donde es hidrolizada por invertasas localizadas en el apoplasto para generar hexosas. Las hexosas generadas pueden ser adquiridas por el hongo y a su vez, la hidrólisis de sacarosa en este espacio subcelular establece y mantiene un gradiente de movilización de sacarosa que se descarga al espacio periarbuscular, incrementando de esta manera la fuerza del tejido consumidor (Durrett et al., 2008; Manck-Götzenberger & Requena, 2016; Schaarschmidt et al., 2006; Wipf et al., 2019). Se conoce que la acción de transportadores de sacarosa (SUT) intervienen en el control de la cantidad de sacarosa que se descarga en espacio apoplástico al importar sacarosa del espacio periarbuscular nuevamente a la citoplasma de la célula cortical colonizada (Bitterlich et al., 2014). Este mecanismo de control de la disponibilidad de carbono para el HMA, impuesto por la planta, parece estar presente en diferentes linajes de plantas superiores (Salmeron-Santiago et al., 2022).

Evidencia directa de la participación de sacarosa sintasa (SUS) en la interacción entre plantas y HMA también la han asociado con el incremento de fuerza consumidora de raíces colonizadas por HMA. De hecho, en algunos modelos vegetales se ha reportado incremento de la expresión de solo uno de los genes que comprende a la familia multigénica de la SUS en tejidos radiculares colonizados por un HMA. Además, el silenciamiento del gen que codifica SUS, que responde incrementando su expresión en tejidos radiculares, conduce a la manifestación de fenotipos aberrantes de la asociación micorrízica de tipo arbuscular, que se caracterizan por la formación de arbusculos aberrantes y efímeros. Por lo que se considera que SUS es un elemento importante para el mantenimiento de la simbiosis.

Los hongos formadores de micorriza arbuscular también demandan carbono en forma de lípidos (Jiang et al., 2017; Luginbuehl et al., 2017). A diferencia de otros eucariotas, la biosíntesis de lípidos en plantas ocurre en plastidios. Las moléculas precursoras para la

biosíntesis de lípidos se producen durante la glucólisis y a partir de productos del catabolismo de sacarosa como Glucosa-6-fosfato. De este modo, el catabolismo de sacarosa es esencial para proveer una fuente de carbono para sustentar el metabolismo de lípidos (Dorion et al., 2012; Ma et al., 2017).

De acuerdo con esto, y como se concluyó en el Capítulo II, la manifestación de respuestas de crecimiento contrastantes a la simbiosis micorrízica de tipo arbuscular clasificadas como positivas, negativas o neutras podrían estar asociadas a la canalización del carbono a diferentes rutas metabólicas para proveer al HMA de las fuentes de carbono necesarias para el mantenimiento de su metabolismo energético, pero también para permitir la producción de biomasa fúngica y por consecuencia su desarrollo durante la asociación con la planta.

## **Materiales y métodos**

### **Material vegetal**

Para el analizar la expresión de genes en plantas de tomate, se utilizaron muestras de raíces de las plantas control no inoculadas y en plantas inoculadas con *R. irregularis* que se fertilizaron con solución nutritiva con diferentes niveles de fósforo (P) que correspondieron a 1.3 mM (P Alto), 0.065 mM (P Bajo) y 0 mM (P Nulo) de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente. Los detalles del régimen de fertilización, las condiciones y tiempo de mantenimiento de las plantas en invernadero al igual que el proceso de cosecha de los tejidos se detallan en el Capítulo I.

### **Análisis de expresión de genes en raíces**

La expresión de genes de plantas se evaluó por RT-PCR en tiempo real con el equipo StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). El RNA se extrajo de una alícuota de tejido pulverizado con nitrógeno líquido con el kit de extracción PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La síntesis de cDNA se realizó a partir de 400 ng de RNA total de cada una de las muestras con el kit de síntesis de cDNA

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) en reacciones con un volumen final de 20  $\mu$ L, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para la cuantificación de la expresión de genes se realizó una mezcla de reacción por cada una de las réplicas biológicas evaluadas que contenía 1  $\mu$ L de una dilución 1:20 del cDNA, 0.4  $\mu$ M de cada uno de los primers, 5  $\mu$ L de TB Green Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) y agua hasta un volumen final de 10  $\mu$ L. El programa que se usó para la amplificación fue de un ciclo de incubación de 30 s a 95 °C; seguido de 40 ciclos de 5 s a 95 °C, 30 s a 58 °C, en esta última condición se determinó la fluorescencia. La cuantificación se realizó con el método comparativo  $2^{-\Delta(\Delta C_t)}$ . La expresión de los genes se normalizó con el gen del factor de elongación-1 $\alpha$  de tomate (*SIEF-1  $\alpha$* ) que se amplificó con los primers EF-1 Fw y EF1-Rev. Cada una de las reacciones de las muestras evaluadas contó con una réplica técnica.

Se logró detectar la expresión de los genes que corresponden al transportador de fosfato 4 (*SIPT4*), uno de los cuatro genes que codifican una isoforma de sacarosa fosfato sintasa (*spsA2*); la invertasa apoplástica de tomate LIN6 (*SILIN6*) y dos genes que codifican isoformas del sacarosa sintasa (*SISUS1* y *SISUS3*). La secuencia de los primers empleados para la detección de la expresión de cada uno de los genes antes mencionados se presenta en el Cuadro 1.

**Cuadro 1:** Secuencias de primers usados para la cuantificación de genes en raíces de plantas de tomate.

Nombre del gen y accesoión de la SoKGenomics Network	Nombre del primer	Secuencia 5'-3'	Cita
Factor de Elongación 1- $\alpha$ (Solyc06g009970.2)	EF-1 Fw	GATTGGTGGTATTGGAAGCTGTC	López-Ráez et al., 2010.
	EF-1 Rev	AGCTTCGTGGTGCATCTC	
Transportador de fosfato 4 (Solyc06g051850.1)	PT4 Fw	GAAGGGGAGCCATTAAATGTGG	Balestrini et al., 2007.
	PT4 Rev	ATCGCGGCTTGTTAGCATTTC	
Sacarosa-fosfato sintasa A2 (Solyc08g042000.2)	spsA2-Fw	TGTIAITGCGGCAGATTGTG	Este trabajo
	spsA2-Rev	TCTACTAATGGTCAAGGCTGTTG	
Invertasa apoplástica (Solyc10g083290.1)	Lin6-Fw	AGCACATTIATTCGCCTTCAACAA	García-Rodríguez et al., 2007.
	Lin6-Rev	TTTGTGACGTGGCATAATAAGAT	
Sacarosa Sintasa 1 (Solyc12g009300.1)	SUS1/TOMSS-Fw	GGATTGAAAGCCACGAAAAAGG	García-Rodríguez et al., 2007
	SUS1/TOMSS-Rev	ACCAGGCCTCAAACGAATAGCA	
Sacarosa Sintasa 3 (Solyc07g042550.2)	SUS3-Fw	GGTTTCGTCTGATTGTTATCC	Goren et al., 2011
	SUS3-Rev	ACAGAAGGGAAAAATGGCAA	

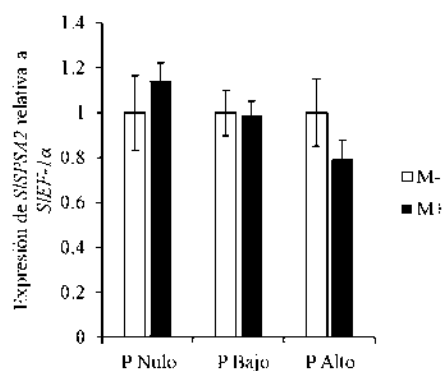
## Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa disponible en línea SAS OnDemand for Academics (SAS Institute, Inc.). Para las comparaciones entre tratamientos se utilizaron por lo menos tres réplicas biológicas. Para las comparaciones entre plantas control no

inoculadas (M-) y plantas inoculadas con *R. irregularis* (M+), la normalidad de los datos se evaluó por la prueba de Shapiro-Wilk y la igualdad de varianza por la prueba de Fisher. La significancia se evaluó por la prueba de t de Student ( $p=0.05$ ). La significancia de la expresión de genes en plantas colonizadas por *R. irregularis* se evaluó por el procedimiento GLM seguido de una prueba de comparación de medias de Tukey ( $p=0.05$ ).

## Resultados

Para conocer los posibles mecanismos asociados a distribución de carbono en raíces de plantas de tomate colonizadas por *R. irregularis* se analizó la expresión de genes relacionados con la biosíntesis y el catabolismo de sacarosa. En estudios previos al presente trabajo, se evaluó la expresión de dos genes que codifican SPS en raíces y se observó que *spsA2* presentaba expresión inducible por interacciones bióticas dentro de las que se encuentra la simbiosis micorrízica de tipo arbuscular (datos no mostrados). Sin embargo, la cuantificación de la expresión de este gen realizada bajo las condiciones descritas en este trabajo no presentó cambios significativos entre plantas control no inoculadas y plantas inoculadas con *R. irregularis* en ninguna de las concentraciones de P aplicadas en la solución nutritiva (Figura 1).

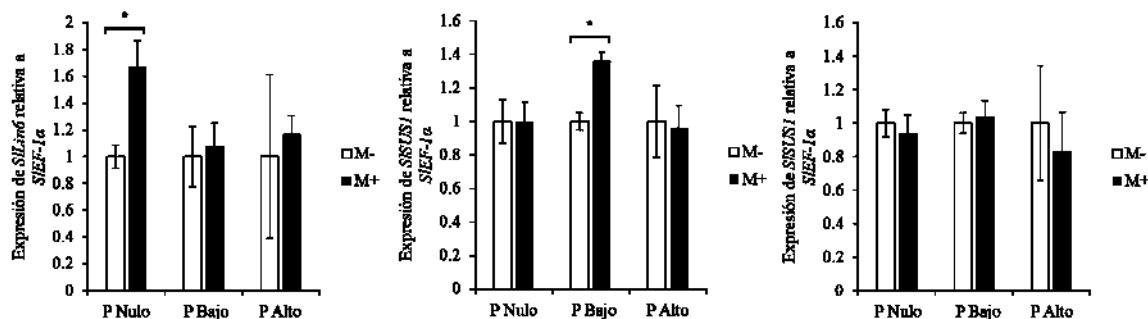


**Figura 1:** Expresión de un gen de la sacarosa fosfato sintasa, *spsA2* en raíces. Los datos representan la comparación de al menos tres replicas biológicas, las barras de error representan el error relativo calculado para cada uno de los tratamientos comparados. El asterisco indica diferencia estadística significativa entre plantas control no colonizadas (M-) y plantas colonizadas por *R. irregularis* (M+) de acuerdo con la prueba de t de Student ( $p=0.05$ ). Las concentraciones de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  están indicadas como P Nulo (0 mM), P Bajo (0.065 mM) y P Alto (1.3 mM), respectivamente.

Para analizar la diferencia en el catabolismo de sacarosa entre raíces no inoculadas e inoculadas con *R. irregularis*, se analizó la expresión de una invertasa asociada a la hidrólisis

de sacarosa en el espacio periarbuscular y de dos genes de sacarosa sintasa. Se detectó incremento de la expresión del gen de la invertasa LIN6 en raíces de plantas que se mantuvieron con solución nutritiva sin con P Bajo en plantas inoculadas con *R. irregularis* que fue 1.6 veces mayor que en las plantas no colonizadas. En las otras dos condiciones de P no se observaron cambios significativos en la expresión del gen de la invertasa LIN6 (Figura 2 A).

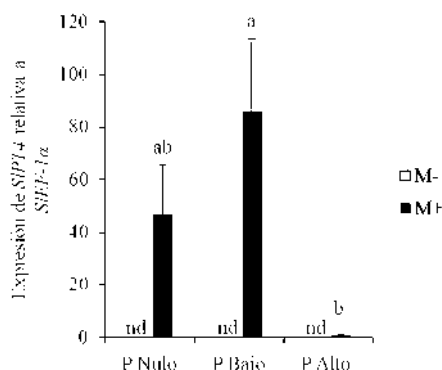
En las plantas que presentaron una respuesta de crecimiento positiva a la asociación micorrízica, que se mantuvieron con P Bajo, se observó un incremento significativo de 1.3 veces del gen *SISUS1* en comparación con las plantas que se desarrollaron en la misma condición, pero que no establecieron la asociación micorrízica. Mientras que las plantas que presentaron respuestas de crecimiento negativas o neutras (P Nulo y P Alto, respectivamente) a la asociación no presentaron cambios en la expresión de este gen en comparación con las plantas no inoculadas (Figura 2 B). Adicionalmente, no se detectaron cambios significativos en la expresión del gen *SISUS3* entre plantas colonizadas y no colonizadas de las tres condiciones de fertilización fosfórica (Figura 2 C).



**Figura 2:** Expresión de genes que codifican enzimas relacionadas con el catabolismo de sacarosa en raíces. Expresión de los genes que codifican la invertasa apoplástica Lin6 (A); y las glicosiltransferasas SUS1 (B) y SUS3 (C). Los datos representan la comparación de al menos tres replicas biológicas, las barras de error representan el error relativo calculado para cada uno de los tratamientos comparados. El asterisco indica diferencia estadística significativa entre plantas control no colonizadas (M-) y plantas colonizadas por *R. irregularis* (M+) de acuerdo con la prueba de t de Student ( $p=0.05$ ). Las concentraciones de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  están indicadas como P Nulo (0 mM), P Bajo (0.065 mM) y P Alto (1.3 mM), respectivamente.

La eficiencia de la simbiosis fue evaluada midiendo la expresión del gen *SIPT4* que codifica un transportador de P, el cual controla la adquisición de este elemento a través de la vía micorrízica. La mayor acumulación de transcritos de *SIPT4* se presentó en las plantas que se fertilizaron con P Bajo (Figura 3). Esto sugiere que la actividad de este transportador es

mayor en las plantas en las que el hongo acumula una mayor biomasa radicular y promueve respuestas positivas de crecimiento en la planta.



**Figura 3:** Expresión del gen del transportador PT4 de tomate (*SIPT4*) en raíces de plantas colonizadas por *R. irregularis*. Los datos representan la comparación de tres réplicas, cada réplica correspondió a una planta inoculada con *R. irregularis*. En raíces no inoculadas con *R. irregularis* no se detectó la expresión de *SIPT4* en ninguna concentración de fertilización fosfórica aplicada en la solución nutritiva (nd). Las barras de error representan el error relativo calculado para cada uno de los tratamientos comparados. La significancia se evaluó por el procedimiento GLM, letras diferentes indican diferencia estadística significativa de acuerdo con la prueba de comparación de medias de Tukey ( $p=0.05$ ). Las concentraciones de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  están indicadas como P Nulo (0 mM), P Bajo (0.065 mM) y P Alto (1.3 mM), respectivamente.

Las plantas colonizadas por *R. irregularis* y que se fertilizaron con solución nutritiva con P Nulo, presentaron una menor acumulación de transcritos de *SIPT4*, sin embargo, no fue estadísticamente distinta a la que se cuantificó en las plantas mantenidas con 0.065 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Figura 3). El menor nivel de expresión de *SIPT4* se detectó en las plantas que se fertilizaron con solución nutritiva con P Alto, lo que coincidió con los reducidos niveles de colonización de *R. irregularis* observados en esta condición (Figura 3).

## Discusión

La modulación de la biosíntesis de sacarosa en tejidos fotosintéticos se ha observado en plantas colonizadas por HMA al detectar incremento en la actividad de SPS en hojas de *Poncirus trifoliata* cuando se encontraban colonizadas por diferentes especies de HMA en las condiciones de crecimiento normal y en presencia de estrés por falta de agua (H.-H. Wu et al., 2017). En otros sistemas simbióticos, la influencia sobre la expresión de genes que codifican diferentes isoformas de SPS se ha estudiado más extensivamente, por ejemplo, en la interacción con bacterias formadoras de nódulos y *Medicago sativa*. En esta interacción, se ha propuesto que la SPS está involucrada en el control del carbono que provee la planta

por la biosíntesis de sacarosa en nódulos y además se ha probado que existe una activación nódulo específica de genes *sps* de isoformas específicas en respuesta a esta interacción mutualista (Aleman et al., 2010; Padhi et al., 2019). En el presente trabajo, se seleccionó analizar la expresión del gen designado como *spsA2* (Solyc08g042000.2), sin embargo, no se observaron cambios significativos en la expresión de este gen en tomate por influencia de la simbiosis micorrízica establecida con *R. irregularis*. Se reportó que la deficiencia de P incrementa la fuerza consumidora de las raíces e incrementa la acumulación de carbono como almidón (Hammond & White, 2008). Nuestros resultados sugieren que durante la deficiencia de P son suficientes para limitar la biosíntesis de sacarosa en raíces, mientras que los azúcares solubles provenientes de los tejidos fuente son catabolizados para generar moléculas precursoras para sustentar otras rutas metabólicas como la biosíntesis de almidón. Sin embargo, será necesario analizar la expresión de otros genes miembros de la familia multigénica de SPS. También, los resultados descritos en este trabajo sugieren que cuando la simbiosis micorrízica está presente, se promueve el catabolismo de azúcares solubles para enviar carbono en forma de hexosas al hongo o precursores derivados del catabolismo de sacarosa para la biosíntesis de lípidos que son transferidos al HMA.

El incremento de la expresión de enzimas que están relacionadas con el catabolismo de sacarosa se ha reportado en plantas con simbiosis micorrízica establecida (Schaarschmidt et al., 2006, 2007; Schaarschmidt & Hause, 2008; Zhao et al., 2019). Alterar la actividad de enzimas que catabolizan sacarosa como SUS e invertasas, conducen a la alteración del fenotipo de la asociación micorrízica, generando senescencia temprana de arbusculos y niveles de colonización reducidos en el sistema radicular (Baier et al., 2010; Roth & Paszkowski, 2017; Schaarschmidt et al., 2006). De manera particular la invertasa apoplástica de tomate LIN6 se considera como un elemento clave para la obtención de hexosas por el HMA (Schaarschmidt et al., 2006). Genes ortólogos a *SILIN6* en otras solanáceas responden también incrementando su expresión en raíces colonizadas por un HMA (Manck-Götzenberger & Requena, 2016). De manera contrastante a lo que se ha reportado comúnmente, en este trabajo se observó que la expresión del gen *SILIN6* solo se incrementó en las plantas que presentaron una respuesta negativa a la asociación micorrízica y que fueron fertilizadas con solución nutritiva con P Nulo. En las otras dos condiciones de fertilización fosfórica y de respuesta de crecimiento a la asociación micorrízica de tomate, no se

observaron cambios en la expresión de este gen. La invertasa *SILIN6* está considerada como un elemento central en el que converge la señalización hormonal, la de metabolitos como azúcares y la respuesta por efectos de estrés en tomate (Proels & Roitsch, 2009). Es plausible entonces que la presencia del estrés por la carencia de P desencadene el incremento de la expresión de este gen para incrementar la fuerza consumidora de las raíces. En relación con ello, se ha reportado que los genes de invertasas se expresan diferencialmente en plantas que sufren carencia de P (Hammond & White, 2008). Sin embargo, el incremento específico en plantas colonizadas por el HMA y que presentaron una respuesta negativa a la asociación, sugiere también que en esta condición la presencia del HMA promueve la movilización de carbono con mayor intensidad desde los tejidos fuente hacia el espacio periarbuscular, como un sumidero de carbono adicional. Esto causaría que el HMA tenga el potencial de consumir una mayor cantidad de carbono en forma de hexosas, y en consecuencia reprimir el crecimiento de la planta.

Otro mecanismo molecular que contribuye al mantenimiento del suministro de carbono al HMA durante la simbiosis micorrízica es el catabolismo de sacarosa mediado por SUS, una glucosiltransferasa, que tiene localización citoplásmica y también se encuentra asociada a la membrana plasmática (Baier et al., 2010; Roth & Paszkowski, 2017; Stein & Granot, 2019). Se ha reportado que el gen *SISUS1* también responde con incremento de su expresión en raíces colonizadas por un HMA (Sonia García-Rodríguez et al., 2007) y la acumulación de transcritos de genes de SUS se han observado en células corticales que contienen arbusculos (Blee & Anderson, 2002). En este trabajo, se observó incremento de la expresión del gen *SISUS1* solamente en plantas que presentaron una respuesta de crecimiento positiva a la asociación micorrízica.

La actividad de SUS se localiza en el citoplasma y es clave para diferentes procesos celulares como la biosíntesis de almidón y celulosa y participa en la fuerza consumidora de frutos y semillas (X. Xu et al., 2019). Además, se ha reportado que la actividad de SUS tienen un rol importante en la canalización de carbono a los plastidios para la biosíntesis de lípidos (Núñez et al., 2008; Stein & Granot, 2019). Las plantas colonizadas por el HMA que presentaron incremento de la actividad de *SISUS1*, fueron las que presentaron un mayor contenido de biomasa fúngica intraradical y una menor concentración de azúcares solubles totales comparadas con plantas no colonizadas que se desarrollaron en la misma condición de

fertilización fosfórica. Nuestros resultados sugieren que cuando la planta hospedera manifiesta respuestas positivas a la asociación con un HMA, la planta canaliza una mayor cantidad de carbono hacia la biosíntesis de lípidos para incrementar la biomasa del HMA en las raíces. El incremento de la biomasa del HMA haría más eficiente la adquisición del P a través de la vía micorrízica cuando este elemento se encuentre escaso. Esta observación concuerda con los resultados del análisis de la expresión de *SIPT4*, que fue mayor en la condición de fertilización fosfórica en la que se observó una respuesta positiva a la simbiosis. En cuanto a la expresión del gen *SISUS3*, que tiene una alta expresión en raíces en comparación con otros órganos de la planta (Goren et al., 2011), no se observaron cambios por influencia de la simbiosis micorrízica bajo ningún nivel de fertilización fosfórica. Lo que sugiere que la contribución de *SUS3* para el incremento de la fuerza consumidora en raíces colonizadas por HMA no es relevante como la de otras isoformas de *SUS* como *SUS1*.

## **Conclusiones**

Los resultados presentados aquí apoyan nuestra hipótesis de que respuestas en crecimiento positivas o negativas a la simbiosis micorrízica de tipo arbuscular, son la consecuencia de la distribución y canalización del carbono entre los tejidos de la planta y a diferentes rutas metabólicas. Cuando la planta manifiesta respuestas de crecimiento negativas, la fuerza consumidora de las raíces está principalmente controlada por la actividad de invertasas apoplásticas, que movilizarían una mayor cantidad de azúcares al espacio periarbuscular. Limitando la fuente de carbono para otros procesos como la síntesis de almidón, y en consecuencia, reduciendo la biosíntesis de precursores de lípidos que se transfieren al HMA, disminuyendo así la biomasa del hongo que se acumula en las raíces. Mientras que cuando la planta presenta respuestas de crecimiento positivas a la asociación micorrízica, la fuerza consumidora está determinada mayormente por *SUS*, cuyos productos del catabolismo de sacarosa se utilizan como sustrato para la biosíntesis de lípidos, que potencialmente pueden ser transferidos al HMA. El incremento de la transferencia de lípidos por la planta hospedera favorecería el incremento de la biomasa del HMA en las raíces como una respuesta para hacer más eficiente el flujo bidireccional de nutrientes y la adquisición de P por la vía micorrízica.

## Literatura consultada

- Aleman, L., Ortega, J. L., Martinez-Grimes, M., Seger, M., Holguin, F. O., Uribe, D. J., Garcia-Ibilcieta, D., & Sengupta-Gopalan, C. (2010). Nodule-enhanced expression of a sucrose phosphate synthase gene member (*MsSPSA*) has a role in carbon and nitrogen metabolism in the nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Planta*, *231*(2), 233–244. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-1043-y>
- Allen, M. F., Smith, W. K., Moore, T. S., & Christensen, M. (1981). Comparative water relations and photosynthesis of mycorrhizal and non-mycorrhizal *Bouteloua gracilis* H.B.K. Lag Ex Steud. *New Phytologist*, *88*(4), 683–693. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1981.tb01745.x>
- Andrino, A., Guggenberger, G., Sauheitl, L., Burkart, S., & Boy, J. (2021). Carbon investment into mobilization of mineral and organic phosphorus by arbuscular mycorrhiza. *Biology and Fertility of Soils*, *57*(1), 47–64. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01505-5>
- Baier, M. C., Keck, M., Gödde, V., Niehaus, K., Küster, H., & Hohnjec, N. (2010). Knockdown of the Symbiotic Sucrose Synthase MtSucS1 Affects Arbuscule Maturation and Maintenance in Mycorrhizal Roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, *152*(2), 1000–1014. <https://doi.org/10.1104/pp.109.149898>
- Balestrini, R., Gómez-Ariza, J., Lanfranco, L., & Bonfante, P. (2007). Laser microdissection reveals that transcripts for five plant and one fungal phosphate transporter genes are contemporaneously present in arbusculated cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *20*(9), 1055–1062. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-9-1055>
- Balergue, C., Chabaud, M., Barker, D. G., Bécard, G., & Rochange, S. F. (2013). High phosphate reduces host ability to develop arbuscular mycorrhizal symbiosis without affecting root calcium spiking responses to the fungus. *Frontiers in Plant Science*, *4*(October), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00426>
- Begum, N., Qin, C., Ahanger, M. A., Raza, S., Khan, M. I., Ashraf, M., Ahmed, N., & Zhang, L. (2019). Role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant growth regulation: Implications in abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, *10*:1068.

- <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01068>
- Bitterlich, M., Krügel, U., Boldt-Burisch, K., Franken, P., & Kühn, C. (2014). The sucrose transporter SISUT2 from tomato interacts with brassinosteroid functioning and affects arbuscular mycorrhiza formation. *Plant Journal*, 78(5), 877–889. <https://doi.org/10.1111/tpj.12515>
- Black, K. G., Mitchell, D. T., & Osborne, B. A. (2000). Effect of mycorrhizal-enhanced leaf phosphate status on carbon partitioning, translocation and photosynthesis in cucumber. *Plant, Cell and Environment*, 23(8), 797–809. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00598.x>
- Blee, K. A., & Anderson, A. J. (2002). Transcripts for genes encoding soluble acid invertase and sucrose synthase accumulate in root tip and cortical cells containing mycorrhizal arbuscules. *Plant Molecular Biology*, 50(2), 197–211. <https://doi.org/10.1023/A:1016038010393>
- Boldt, K., Pörs, Y., Haupt, B., Bitterlich, M., Kühn, C., Grimm, B., & Franken, P. (2011). Photochemical processes, carbon assimilation and RNA accumulation of sucrose transporter genes in tomato arbuscular mycorrhiza. *Journal of Plant Physiology*, 168(11), 1256–1263. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.01.026>
- Campanelli, A., Ruta, C., Mastro, G. De, & Morone-Fortunato, I. (2013). The role of arbuscular mycorrhizal fungi in alleviating salt stress in *Medicago sativa* L. var. icon. *Symbiosis*, 59(2), 65–76. <https://doi.org/10.1007/s13199-012-0191-1>
- Cesaro, P., Massa, N., Cantamessa, S., Todeschini, V., Bona, E., Berta, G., Barbato, R., & Lingua, G. (2020). Tomato responses to *Funneliformis mosseae* during the early stages of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*, 30(5), 601–610. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00973-9>
- Chiu, C. H., & Paszkowski, U. (2019). Mechanisms and impact of symbiotic phosphate acquisition. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034603>
- Doidy, J., Van Tuinen, D., Lamotte, O., Corneillat, M., Alcaraz, G., & Wipf, D. (2012). The *Medicago truncatula* sucrose transporter family: Characterization and implication of key members in carbon partitioning towards arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Plant*, 5(6), 1346–1358. <https://doi.org/10.1093/mp/sss079>

- Dorion, S., Clendenning, A., Jeukens, J., Salas, J. J., Parveen, N., Haner, A. A., Law, R. D., Force, E. M., & Rivoal, J. (2012). A large decrease of cytosolic triosephosphate isomerase in transgenic potato roots affects the distribution of carbon in primary metabolism. *Planta*, 236(4), 1177–1190. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1675-1>
- Drüge, U., & Schonbeck, F. (1992). Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on transpiration, photosynthesis and growth of flax (*Linum usitatissimum* L.) in relation to cytokinin levels. *Journal of Plant Physiology*, 141(1), 40–48. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80849-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80849-7)
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Durrett, T. P., Benning, C., & Ohlrogge, J. (2008). Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. *Plant Journal*, 54(4), 593–607. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03442.x>
- Ferrol, N., Azcón-Aguilar, C., & Pérez-Tienda, J. (2019). Review: Arbuscular mycorrhizas as key players in sustainable plant phosphorus acquisition: An overview on the mechanisms involved. *Plant Science*, 280, 441–447. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.11.011>
- García-Rodríguez, S., Pozo, M. J., Azcón-Aguilar, C., & Ferrol, N. (2005). Expression of a tomato sugar transporter is increased in leaves of mycorrhizal or *Phytophthora parasitica*-infected plants. *Mycorrhiza*, 15(7), 489–496. <https://doi.org/10.1007/s00572-005-0354-5>
- García-Rodríguez, Sonia, Azcón-Aguilar, C., & Ferrol, N. (2007). Transcriptional regulation of host enzymes involved in the cleavage of sucrose during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Physiologia Plantarum*, 129(4), 737–746. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00873.x>
- Genre, A., Lanfranco, L., Perotto, S., & Bonfante, P. (2020). Unique and common traits in mycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 18(11), 649–660. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0402-3>
- Gerdemann, J. W., & Nicolson, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British*

- Mycological Society*, 46(2), 235–244. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(63)80079-0)
- Goddard, M. L., Belval, L., Martin, I. R., Roth, L., Laloue, H., Deglène-Benbrahim, L., Valat, L., Bertsch, C., & Chong, J. (2021). Arbuscular mycorrhizal symbiosis triggers major changes in primary metabolism together with modification of defense responses and signaling in both roots and leaves of *Vitis vinifera*. *Frontiers in Plant Science*, 12: 721614. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.721614>
- Goren, S., Huber, S. C., & Granot, D. (2011). Comparison of a novel tomato sucrose synthase, SISUS4, with previously described SISUS isoforms reveals distinct sequence features and differential expression patterns in association with stem maturation. *Planta*, 233(5), 1011–1023. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1356-5>
- Graham, J. H., & Abbott, L. K. (2000). Wheat responses to aggressive and non-aggressive arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 220(1–2), 207–218. <https://doi.org/10.1023/a:1004709209009>
- Gutjahr, C., Novero, M., Welham, T., Wang, T., & Bonfante, P. (2011). Root starch accumulation in response to arbuscular mycorrhizal colonization differs among *Lotus japonicus* starch mutants. *Planta*, 234(3), 639–646. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1472-2>
- Gutjahr, C., & Parniske, M. (2013). Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 29, 593–617. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122413>
- Hammond, J. P., & White, P. J. (2008). Sucrose transport in the phloem: Integrating root responses to phosphorus starvation. *Journal of Experimental Botany*, 59(1), 93–109. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm221>
- Harrison, M. J., Dewbre, G. R., & Liu, J. (2002). A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell*, 14(10), 2413–2429. <https://doi.org/10.1105/tpc.004861>
- Hart, M. M., & Reader, R. J. (2002). Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 153(2), 335–344. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646X.2001.00312.x>
- Hartmann, H., Bahn, M., Carbone, M., & Richardson, A. D. (2020). Plant carbon allocation in a changing world – challenges and progress: introduction to a Virtual Issue on carbon

- allocation. *New Phytologist*, 227(4), 981–988. <https://doi.org/10.1111/nph.16757>
- Hatchel, G. E., Berry, C. R., & Muse, H. D. (1985). Nondestructive indices related to aboveground biomass of young loblolly and sand pines on ectomycorrhizal and fertilizer plots. *Forest Science*, 31(2), 419–427. <https://doi.org/doi.org/10.1093/forestscience/31.2.419>
- Hennion, N., Durand, M., Vriet, C., Doidy, J., Maurousset, L., Lemoine, R., & Pourtau, N. (2019). Sugars en route to the roots. Transport, metabolism and storage within plant roots and towards microorganisms of the rhizosphere. *Physiologia Plantarum*, 165(1), 44–57. <https://doi.org/10.1111/ppl.12751>
- Hlavinka, J., Nauš, J., & Špundová, M. (2013). Anthocyanin contribution to chlorophyll meter readings and its correction. *Photosynthesis Research*, 118(3), 277–295. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9934-y>
- Ivanov, S., Austin, J., Berg, R. H., & Harrison, M. J. (2019). Extensive membrane systems at the host–arbuscular mycorrhizal fungus interface. *Nature Plants*, 5(2), 194–203. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0364-5>
- Janos, D. P. (2007). Plant responsiveness to mycorrhizas differs from dependence upon mycorrhizas. *Mycorrhiza*, 17(2), 75–91. <https://doi.org/10.1007/s00572-006-0094-1>
- Jiang, Y., Wang, W., Xie, Q., Liu, N., Liu, L., Wang, D., Zhang, X., Yang, C., Chen, X., Tang, D., & Wang, E. (2017). Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi. *Science*, 356(6343), 1172–1175. <https://doi.org/10.1126/science.aam9970>
- Jung, S. C., Martinez-Medina, A., Lopez-Raez, J. A., & Pozo, M. J. (2012). Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of Chemical Ecology*, 38(6), 651–664. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0134-6>
- Kiers, E. T., Duhamel, M., Beesetty, Y., Mensah, J. A., Franken, O., Verbruggen, E., Fellbaum, C. R., Kowalchuk, G. A., Hart, M. M., Bago, A., Palmer, T. M., West, S. A., Vandenkoornhuyse, P., Jansa, J., & Bücking, H. (2011). Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science*, 333(6044), 880–882. <https://doi.org/10.1126/science.1208473>
- Kiers, T., & van der Heijden, M. (2006). Mutualistic stability in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Ecology*, 87(7), 1627–1636.

- Konvalinková, T., Püschel, D., Řezáčová, V., Gryndlerová, H., & Jansa, J. (2017). Carbon flow from plant to arbuscular mycorrhizal fungi is reduced under phosphorus fertilization. *Plant and Soil*, *419*(1–2), 319–333. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3350-6>
- Kumagai, E., Araki, T., & Kubota, F. (2009). Correlation of chlorophyll meter readings with gas exchange and chlorophyll fluorescence in flag leaves of rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Plant Production Science*, *12*(1), 50–53. <https://doi.org/10.1626/pp.s.12.50>
- Liu, J., Liu, J., Liu, J., Cui, M., Huang, Y., Tian, Y., Chen, A., & Xu, G. (2019). The potassium transporter SIHALK10 is involved in mycorrhizal potassium uptake. *Plant Physiology*, *180*(1), 465–479. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01533>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, *25*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- López-Ráez, J. A., Verhage, A., Fernández, I., García, J. M., Azcón-Aguilar, C., Flors, V., & Pozo, M. J. (2010). Hormonal and transcriptional profiles highlight common and differential host responses to arbuscular mycorrhizal fungi and the regulation of the oxylipin pathway. *Journal of Experimental Botany*, *61*(10), 2589–2601. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq089>
- Lopez de Andrade, S. A., Domingues, A. P., & Mazzafera, P. (2015). Photosynthesis is induced in rice plants that associate with arbuscular mycorrhizal fungi and are grown under arsenate and arsenite stress. *Chemosphere*, *134*, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.023>
- Luginbuehl, L. H., Menard, G. N., Kurup, S., Van Erp, H., Radhakrishnan, G. V., Breakspear, A., Oldroyd, G. E. D., & Eastmond, P. J. (2017). Fatty acids in arbuscular mycorrhizal fungi are synthesized by the host plant. *Science*, *356*(6343), 1175–1178. <https://doi.org/10.1126/science.aan0081>
- Lunn, J. E., & ap Rees, T. (1990). Apparent equilibrium constant and mass-action ratio for sucrose-phosphate synthase in seeds of *Pisum sativum*. *Biochemical Journal*, *267*(3), 739–743. <https://doi.org/10.1042/bj2670739>
- Ma, Y., Yin, Z., & Ye, J. (2017). *Lipid Biosynthesis and Regulation in Jatropha, an Emerging Model for Woody Energy Plants*. 113–127. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-49653->

- Maldonado-Mendoza, I. E., & Harrison, M. J. (2018). RiArsB and RiMT-11: Two novel genes induced by arsenate in arbuscular mycorrhiza. *Fungal Biology*, *122*(2–3), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.11.003>
- Manck-Götzenberger, J., & Requena, N. (2016). Arbuscular mycorrhiza symbiosis induces a major transcriptional reprogramming of the potato SWEET sugar transporter family. *Frontiers in Plant Science*, *7*:487. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00487>
- Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, *153*(2), 375–380. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)71980-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)71980-7)
- Nouri, E., Breuillin-Sessoms, F., Feller, U., & Reinhardt, D. (2014). Phosphorus and nitrogen regulate arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Petunia hybrida*. *PLoS ONE*, *9*(3), e90841. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090841>
- Núñez, J. G. A., Kronenberger, J., Wuillème, S., Lepiniec, L., & Rochat, C. (2008). Study of AtSUS2 localization in seeds reveals a strong association with plastids. *Plant and Cell Physiology*, *49*(10), 1621–1626. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn117>
- Padhi, S., Grimes, M. M., Muro-Villanueva, F., Ortega, J. L., & Sengupta-Gopalan, C. (2019). Distinct nodule and leaf functions of two different sucrose phosphate synthases in alfalfa. *Planta*, *250*(5), 1743–1755. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03261-9>
- Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, *55*(1), 158–IN18. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(70)80110-3)
- Poorter, H., & Nagel, O. (2000). The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO<sub>2</sub>, nutrients and water: a quantitative review. *Australian Journal of Plant Physiology*, *27*(12), 595–607. [https://doi.org/10.1071/PP99173\\_CO](https://doi.org/10.1071/PP99173_CO)
- Poorter, H., & Pothmann, P. (1992). Growth and carbon economy of a fast-growing and a slow-growing grass species as dependent on ontogeny. *New Phytologist*, *120*(1), 159–166. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1992.tb01069.x>
- Proels, R. K., & Roitsch, T. (2009). Extracellular invertase LIN6 of tomato : a pivotal enzyme

- for integration of metabolic , hormonal , and stress signals is regulated by a diurnal rhythm. *60*(6), 1555–1567. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp027>
- Roe, J. H. (1934). A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine. *Journal of Biological Chemistry*, *107*(1), 15–22. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)75382-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)75382-9)
- Roth, R., & Paszkowski, U. (2017). Plant carbon nourishment of arbuscular mycorrhizal fungi. *Current Opinion in Plant Biology*, *39*, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.05.008>
- Saia, S., Aissa, E., Luziatelli, F., Ruzzi, M., Colla, G., Ficca, A. G., Cardarelli, M., & Roupshael, Y. (2020). Growth-promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi differentially benefit tomato and corn depending upon the supplied form of phosphorus. *Mycorrhiza*, *30*(1), 133–147. <https://doi.org/10.1007/s00572-019-00927-w>
- Salmeron-Santiago, I. A., Martínez-Trujillo, M., Valdez-Alarcón, J. J., Pedraza-Santos, M. E., Santoyo, G., Pozo, M. J., & Chávez-Bárceñas, A. T. (2022). An updated review on the modulation of carbon partitioning and allocation in arbuscular mycorrhizal plants. *Microorganisms*, *10*:75. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010075>
- Schaarschmidt, S., & Hause, B. (2008). Apoplastic invertases. Multi-faced players in the arbuscular mycorrhization. *Plant Signaling and Behavior*, *3*(5), 317–319. <https://doi.org/10.4161/psb.3.5.5307>
- Schaarschmidt, S., Kopka, J., Ludwig-mu, J., & Hause, B. (2007). Regulation of arbuscular mycorrhization by apoplastic invertases : enhanced invertase activity in the leaf apoplast affects the symbiotic interaction. *The Plant Journal* *51*: 390–405. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03150.x>
- Schaarschmidt, S., Roitsch, T., & Hause, B. (2006). Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Journal of Experimental Botany* *57*(15), 4015–4023. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl172>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Smith, A. M., & Zeeman, S. C. (2006). Quantification of starch in plant tissues. *Nature Protocols*, *1*(3), 1342–1345. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.232>
- Smith, G. S., Johnston, C. M., & Cornforth, I. S. (1983). Comparison of nutrient solutions

- for growth of plants in sand culture. *New Phytologist*, 94(4), 537–548. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1983.tb04863.x>
- Smith, S. E., & Smith, F. A. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: New paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology*, 62(1), 227–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103846>
- Smith, S., & Read, D. (2008). Mycorrhizal Symbiosis. In *Mycorrhizal Symbiosis*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-6>
- Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, 195(1), 19–23. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50870-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50870-5)
- Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A., James, T. Y., O'Donnell, K., Roberson, R. W., Taylor, T. N., Uehling, J., Vilgalys, R., White, M. M., & Stajich, J. E. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108(5), 1028–1046. <https://doi.org/10.3852/16-042>
- Stein, O., & Granot, D. (2019). An overview of sucrose synthases in plants. *Frontiers in Plant Science*, 10:95. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00095>
- Stitt, M., & Quick, W. P. (1989). Photosynthetic carbon partitioning: Its regulation and possibilities for manipulation. *Physiologia Plantarum*, 77(4), 633–641. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1989.tb05402.x>
- Trouvelot, A., Kough, J. L., & Gianinazzi-Pearson, V. (1896). Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In V. Gianinazzi-Pearson & S. Gianinazzi (Eds.), *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae* (pp. 217–221). INRA Press.
- Valentine, A. J., Mortimer, P. E., Kleinert, A., Kang, Y., & Benedito, V. A. (2013). Carbon metabolism and costs of arbuscular mycorrhizal associations to host roots. In R. Aroca (Ed.), *Symbiotic Endophytes* (Vol. 37, pp. 233–252). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-39317-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-39317-4_12)
- Werner, G. D. A., & Kiers, E. T. (2015). Order of arrival structures arbuscular mycorrhizal colonization of plants. *New Phytologist*, 205(4), 1515–1524. <https://doi.org/10.1111/nph.13092>
- Wipf, D., Krajinski, F., van Tuinen, D., Recorbet, G., & Courty, P. E. (2019). Trading on the

- arbuscular mycorrhiza market: from arbuscules to common mycorrhizal networks. *New Phytologist*, 223(3), 1127–1142. <https://doi.org/10.1111/nph.15775>
- Wright, D. P., Read, D. J., & Scholes, J. D. (1998). Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment*, 21(9), 881–891. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00351.x>
- Wu, H.-H., Zou, Y.-N., Rahman, M. M., Ni, Q.-D., & Wu, Q.-S. (2017). Mycorrhizas alter sucrose and proline metabolism in trifoliolate orange exposed to drought stress. *Scientific Reports*, 7(1), 42389. <https://doi.org/10.1038/srep42389>
- Wu, Q.-S., & Xia, R.-X. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. *Journal of Plant Physiology*, 163(4), 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.04.024>
- Xu, G. H., Chague, V., Melamed-Bessudo, C., Kapulnik, Y., Jain, A., Raghothama, K. G., Levy, A. A., & Silber, A. (2007). Functional characterization of LePT4: A phosphate transporter in tomato with mycorrhiza-enhanced expression. *Journal of Experimental Botany*, 58(10), 2491–2501. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm096>
- Xu, X., Yang, Y., Liu, C., Sun, Y., Zhang, T., Hou, M., Huang, S., & Yuan, H. (2019). The evolutionary history of the sucrose synthase gene family in higher plants. *BMC Plant Biology*, 19(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2181-4>
- Zhao, S., Chen, A., Chen, C., Li, C., Xia, R., & Wang, X. (2019). Transcriptomic analysis reveals the possible roles of sugar metabolism and export for positive mycorrhizal growth responses in soybean. *Physiologia Plantarum*, 166(3), 712–728. <https://doi.org/10.1111/ppl.12847>

## CONCLUSIÓN GENERAL

Los parámetros evaluados en tejidos fuente en este trabajo son consistentes con el incremento de su capacidad fotosintética en presencia de la simbiosis micorrízica de tipo arbuscular. Por ejemplo, se observó que las plantas colonizadas por el HMA acumularon mayor cantidad de azúcares solubles en hojas fuente, en cualquiera de las condiciones de fertilización fosfórica. Sin embargo, también se observó incremento de pigmentos fotosintéticos en plantas que presentaron respuestas de crecimiento negativas con reducción de la expansión foliar de las hojas fuente. En plantas que se presentaron respuestas positivas a la asociación, el incremento en el contenido de azúcares solubles totales estuvo acompañado del incremento en área foliar de las hojas fuente. Lo que indica que la influencia de la asociación sobre las capacidades fotosintéticas de la planta depende de la eficiencia de la simbiosis y repercute de manera importante sobre la respuesta de crecimiento observada en la planta hospedera.

Como se mencionó, las plantas colonizadas por el HMA acumularon una mayor cantidad de azúcares solubles independientemente del nivel de colonización o de la cantidad de P aplicada. Por lo que se sugiere que la acumulación de almidón en hojas fuente y raíces, promovido por la deficiencia de P, no es una limitante para la estimulación del tejido fotosintético de las plantas colonizadas. Adicionalmente, la promoción de la acumulación de azúcares solubles en plantas colonizadas por HMA fue detectada incluso en niveles de colonización bajos. Esto indica que la principal fuente de carbono para sustentar el metabolismo heterotrófico del HMA proviene de los azúcares solubles transportados desde los tejidos fuente hacia las raíces colonizadas.

La estimulación de la capacidad consumidora de las raíces por el HMA determinó el efecto en la respuesta de crecimiento en las plantas. El incremento en la expresión de la invertasa apoplástica Lin6 en raíces de plantas que manifestaron respuestas de crecimiento negativas, sugiere que la canalización de carbono hacia el espacio periarbuscular predomina incrementando la fuerza consumidora en esta condición. Mientras que el incremento de la expresión de SUS1 sugiere que el catabolismo de sacarosa en el citoplasma de la célula genera una mayor influencia para el incremento de la fuerza consumidora en raíces colonizadas de plantas que presentan respuestas de crecimiento positivas a la simbiosis. Las diferencias en la acumulación de transcritos del gen *SIPT4* y los diferentes niveles de acumulación de azúcares solubles en raíces, indican que cuando la simbiosis es más activa

en términos de adquisición de P, las plantas otorgan una mayor cantidad de carbono para sustentar la simbiosis, y como consecuencia, la biomasa intrarradical del HMA incrementa. Con esto, se concluye que la compartimentalización del catabolismo de sacarosa tiene un rol importante en la determinación de la respuesta a la asociación micorrízica. Además, se sugiere que la manifestación de efectos positivos o negativos a la asociación micorrízica, son la consecuencia de la canalización de carbono a diferentes rutas metabólicas en la planta hospedera, por influencia de la actividad del HMA.

# ARTÍCULO

## Los fósiles de hongos también cuentan una historia fascinante

Isaac Alejandro Salmeron Santiago y Ana Tztzqui Chávez Bárcenas



**Isaac Alejandro Salmeron Santiago.** Estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. [0453758e@umich.mx](mailto:0453758e@umich.mx)

**Ana Tztzqui Chávez Bárcenas.** Profesora-Investigadora de la Facultad de Agrobiología «Presidente Juárez», Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. [tztzqui.chavez@umich.mx](mailto:tztzqui.chavez@umich.mx)

Es muy probable que, al leer fósiles, pienses inmediatamente en grandes dinosaurios que poblaron la Tierra, cuyos restos atrapados en distintos materiales terrestres permiten conocer cómo eran. Este conocimiento ha fascinado a muchísimos investigadores, y desde pequeños, a muchos investigadores en potencia. Gracias a los fósiles podemos reconstruir con gran precisión la estructura y comportamiento de organismos complejos y de gran tamaño como los dinosaurios, pero también la de otros tan pequeños como los microorganismos.

Dentro de los microorganismos que se tiene registro fósil, están los **hongos microscópicos**,

lo que ha servido para determinar que estos organismos poblaron la Tierra desde hace más de 700 millones de años. Además, se considera que estos hongos fueron componentes esenciales de los **ecosistemas primigenios**, que modificaron las **condiciones de la Tierra primitiva**, hasta permitir el **desarrollo de formas de vida complejas** como las que conocemos hoy.

La palabra «hongo» normalmente se asocia con setas en platillos deliciosos o con procesos de descomposición, malos olores o incluso enfermedades de humanos, animales y plantas. Sin embargo, **los hongos cumplen funciones clave en el reciclaje de los nutrientes**, indispensable en todos los ecosistemas de la Tierra. En este artículo te platicaremos de los fósiles de algunos hongos y cómo su descubrimiento puede cambiar drásticamente nuestro conocimiento sobre el origen y evolución de todos los organismos de nuestro planeta.

### Pero, ¿qué es un fósil?

Los fósiles son **restos de fragmentos de organismos o huellas de estructuras de vida orgánica impresos en otros materiales como resinas o arcillas**, que por procesos químicos o geológicos absorben minerales, quedan petrificados y de esta manera son protegidos de la degradación por la intemperie. Por ello, los fósiles pueden «contar» la historia de formas de vida que poblaron la Tierra hace muchos años y dar pistas sobre los orígenes de las formas de vida actuales.

La **paleontología** es el área de la Biología que **estudia los fósiles**. Los científicos dedicados a esta área, o paleontólogos, usan diferentes técnicas para estimar la edad de los fósiles. Algunos de estos estudios consisten en el análisis atómico de los materiales propios del fósil y de la capa de la corteza terrestre que lo alberga, lo que ha permitido definir la edad de la Tierra en diferentes eras geológicas y cuya duración se ha estimado en tiempo; cada era geológica comprende millones de años.

### Descubrimiento de un hongo fósil

En una zona del ártico de Canadá, en 2019, un grupo de científicos descubrió el fósil de un hongo que provenía de la era Proterozoica y que fue identificado como *Ourasphaira giraldae*, con una edad estimada entre 1010 y 890 millones de años. La era Proterozoica es un eón geológico perteneciente al Precámbrico que abarca desde hace 2500 millones de años hasta 542 millones de años. Posteriormente, en África, se descubrieron estructuras fósiles filamentosas de un hongo cuya edad se valoró entre 715 y 810 millones de años, que también coincide con la era Proterozoica. **Estos descubrimientos cambiaron drásticamente nuestro entendimiento respecto al origen de los hongos y otros organismos.**

Todos los seres vivos se clasifican por sus características morfológicas, bioquímicas y genéticas en grupos con valor jerárquico. Uno de estos grupos de clasificación se conoce como Opisthokonta (opis-



Fotografía: Isaac Alejandro Salmeron Santiago.

tocontos) y en él se agrupa a los hongos, algunos protozoarios (organismos unicelulares) y a todos los animales, incluyendo al ser humano.

Los hongos son el grupo más ancestral que comparte características morfológicas, bioquímicas y genéticas con otros opistocontos. Los registros fósiles previos al de *Ourasphaira giraldae* de 2019, se habían asociado a etapas posteriores a la era Proterozoica, por lo que el descubrimiento de fósiles de hongos con más de 700 millones de años no solamente redefine el origen de los hongos actuales en etapas tempranas de la edad de la Tierra, sino que también hace reconsiderar que el grupo de Opisthokonta tuvo un origen geológico más antiguo de lo que se creía.

Un momento importante en la historia de la Tierra, y que ayudó a moldear las condiciones que permitieron el desarrollo de la vida como la conocemos, fue la transición de hábitat de los organismos fotosintéticos, de ser enteramente acuáticos a desarrollarse sobre la corteza terrestre. Nuevamente, los restos fósiles de plantas ayudan a estimar que este proceso debió ocurrir hace 470 millones de años durante el periodo conocido como Ordovícico.

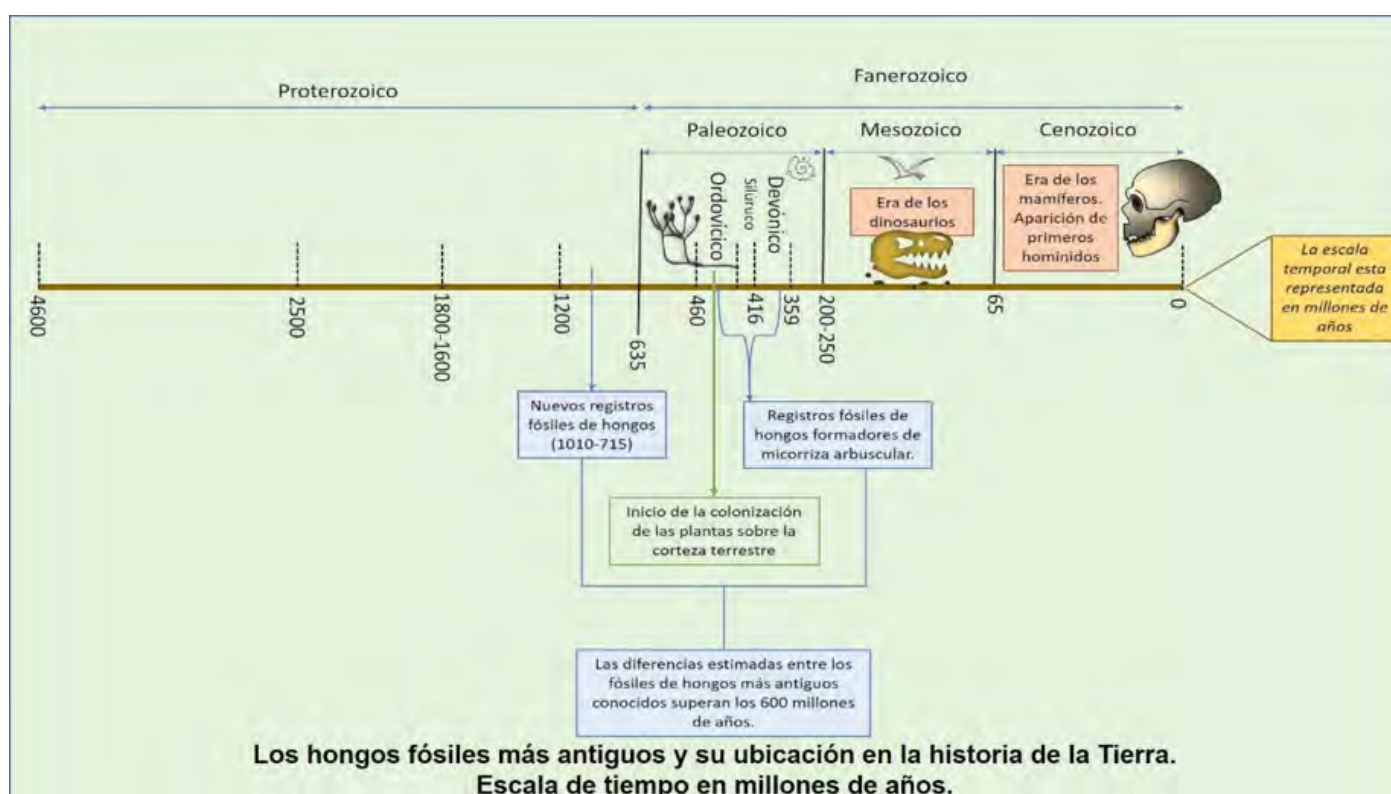
**¡El reto de este cambio de hábitat fue enorme!**

Pero, no solo por la baja disposición de agua en un ambiente terrestre, sino por la obtención de

nutrientes a partir del suelo. Los científicos consideran que la intervención de los hongos en este escenario tuvo una gran relevancia, esto es debido a que actualmente casi todas las plantas mantienen relaciones con hongos en sus raíces, formando una asociación que se llama micorriza y que proporciona beneficios a ambos organismos para adaptarse a distintos medios. Por ejemplo, las micorrizas permiten que las plantas puedan aprovechar mejor los nutrientes disponibles en el suelo, mientras que el hongo se beneficia porque la planta le brinda productos derivados de la fotosíntesis.

Algunos de los fósiles de las plantas más antiguas que se conocen fueron descubiertos en un yacimiento de la ciudad de Rhynie, en Escocia. Se estimó que estas plantas son de hace más de 400 millones de años, de la era geológica denominada Devónico. En las raíces de fósiles de estas plantas se encontraron estructuras de hongos formadores de micorrizas arbusculares, un grupo de los hongos micorrícicos más abundantes en la actualidad y que colonizan hasta en un 70 % a las plantas.

Fósiles semejantes a las esporas de hongos actuales formadores de micorriza arbuscular, también se han descubierto en Wisconsin, Estados Unidos, y su edad se ha estimado en 460 millones de años, que coincide con la era geológica del Ordovícico. Además, la descripción de fósiles de hongos



idénticos a los hongos formadores de micorriza arbuscular, indican que **esta asociación mutualista entre plantas y hongos ha permanecido en la Tierra por más de 400 millones de años.**

### La relevancia de los registros fósiles de hongos

Gracias a los estudios realizados en la actualidad, se sabe que las plantas que forman una micorriza arbuscular, pueden adaptarse a condiciones ambientales adversas con mayor facilidad que las plantas que no establecen este tipo de interacción. Es por ello que muchos científicos hipotetizan que la formación de micorriza arbuscular, permitió a las plantas primitivas adaptarse a las condiciones atmosféricas que imperaban en la Tierra durante el Ordovícico y les ayudó a acceder de manera más eficiente a los recursos minerales disponibles en la corteza terrestre.

La colonización de las plantas sobre la corteza contribuyó, entre otras cosas, a la reducción de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) de la atmósfera —un gas de efecto invernadero— y al aumento de la cantidad de oxígeno (O<sub>2</sub>) debido al proceso de fotosíntesis. **Las modificaciones de la química de la atmósfera terrestre trajeron consigo cambios a escala glo-**



Fotografía: Isaac Alejandro Salmeron Santiago.

**bal** que permitieron el establecimiento, desarrollo y diversificación de otras formas de vida.

Como puedes ver, los registros fósiles indican que, además de otorgar pistas sobre el origen de los seres vivos actuales, los hongos también fueron participantes activos en los ecosistemas primitivos que moldearon las condiciones que permiten sustentar la vida en la Tierra, tal como la conocemos hoy.



Camargo-Ricalde S., Montañón N., Rosa C de la. y Montañón S. (2012). «Micorrizas: Una gran unión debajo del suelo». *Revista Digital Universitaria*, 13(7), 3-19. <http://www.revista.unam.mx/vol.13/num7/art72/>

Gómez-Aguilera L.I., Olalde-Portugal V., Rubí-Arriaga M. y Contreras-Alonso R. (2007). «Micorrizas arbusculares». *Ciencia Ergo Sum.*, 14(3), 300-306. <https://www.redalyc.org/pdf/104/10414307.pdf>

Marco-Brown L. (2004). «Los hongos fósiles o la paleomicrobiología». *Interciencia*, 29(2), 94-98. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33908907.pdf>

Loron C., François C., Rainbird R., Turner E., Borensztajn S. y Javaux E. (2019). «Early fungi from the Proterozoic era in Arctic Canada». *Nature*, 570, 232-235. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1217-0>



Review

# An Updated Review on the Modulation of Carbon Partitioning and Allocation in Arbuscular Mycorrhizal Plants

Isaac A. Salmeron-Santiago <sup>1</sup>, Miguel Martínez-Trujillo <sup>1,\*</sup>, Juan J. Valdez-Alarcón <sup>2</sup>,  
Martha E. Pedraza-Santos <sup>3</sup>, Gustavo Santoyo <sup>4</sup>, María J. Pozo <sup>5,\*</sup> and Ana T. Chávez-Bárcenas <sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia 58030, Mexico; isaac.salmeron@umich.mx

<sup>2</sup> Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia 58880, Mexico; jose.alarcon@umich.mx

<sup>3</sup> Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Uruapan 60170, Mexico; martha.elena.pedraza@umich.mx

<sup>4</sup> Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia 58030, Mexico; gustavo.santoyo@umich.mx

<sup>5</sup> Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18008 Granada, Spain

\* Correspondence: miguel.martinez@umich.mx (M.M.-T.); mariajose.pozo@eez.csic.es (M.J.P.); tztzqui.chavez@umich.mx (A.T.C.-B.); Tel.: +52-4431319933 (M.M.-T.); +52-4525250971 (A.T.C.-B.)

**Abstract:** Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are obligate biotrophs that supply mineral nutrients to the host plant in exchange for carbon derived from photosynthesis. Sucrose is the end-product of photosynthesis and the main compound used by plants to translocate photosynthates to non-photosynthetic tissues. AMF alter carbon distribution in plants by modifying the expression and activity of key enzymes of sucrose biosynthesis, transport, and/or catabolism. Since sucrose is essential for the maintenance of all metabolic and physiological processes, the modifications addressed by AMF can significantly affect plant development and stress responses. AMF also modulate plant lipid biosynthesis to acquire storage reserves, generate biomass, and fulfill its life cycle. In this review we address the most relevant aspects of the influence of AMF on sucrose and lipid metabolism in plants, including its effects on sucrose biosynthesis both in photosynthetic and heterotrophic tissues, and the influence of sucrose on lipid biosynthesis in the context of the symbiosis. We present a hypothetical model of carbon partitioning between plants and AMF in which the coordinated action of sucrose biosynthesis, transport, and catabolism plays a role in the generation of hexose gradients to supply carbon to AMF, and to control the amount of carbon assigned to the fungus.

**Keywords:** arbuscular mycorrhiza; sucrose metabolism and translocation; lipid metabolism; translocation



**Citation:** Salmeron-Santiago, I.A.; Martínez-Trujillo, M.; Valdez-Alarcón, J.J.; Pedraza-Santos, M.E.; Santoyo, G.; Pozo, M.J.; Chávez-Bárcenas, A.T. An Updated Review on the Modulation of Carbon Partitioning and Allocation in Arbuscular Mycorrhizal Plants. *Microorganisms* **2022**, *10*, 75. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010075>

Academic Editors: Paola Bonfante and Valentina Fiorilli

Received: 28 October 2021

Accepted: 27 December 2021

Published: 30 December 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Arbuscular mycorrhiza (AM) is a mutualistic association between fungi from the Glomeromycotina group and plants from most phylogenetic clades [1,2]. The mutualistic nature of arbuscular mycorrhizae implies a bidirectional flow of nutrients between plant roots and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). The plant gives up part of its photoassimilates to the fungus, an obligate symbiont with a heterotrophic metabolism that grows and develops in the internal root tissues [3]. One key benefit for the host plants from this biological interaction is the improved acquisition of water and mineral nutrients, in particular phosphorus (P) [4–6]. The regulation of this resource exchange between the plant and fungal partners is key for the functioning of symbiosis, as it determines the net outcome of the interaction. Major research efforts have been devoted in the last few decades to an understanding of the trading of resources between the plant and fungal symbiont [7,8].

During mycorrhizal colonization, AMF form intraradical tree-like branched hyphae structures called arbuscules, which are the main nutrient and water exchange sites between symbionts. Arbuscules develop within the cortical cells of the roots, but they do not compromise the integrity of the host cell; instead, arbuscules are surrounded by the cortical cell's plasma membrane, forming the so-called periarbuscular membrane [9,10]. The fungus takes from the soil minerals such as P and nitrogen and releases them in the periarbuscular space, which is the interface between the periarbuscular membrane and the arbuscule. These nutrients are then imported into the plant cell by specific nutrient transporters, assisted by H<sup>+</sup>-ATPases located in the periarbuscular membrane [11–13].

The presence of the fungal symbiont implies an extra demand of energy from the plant and, therefore, alters carbon distribution. It has been estimated that 4 to 23% of the total photoassimilated carbon is destined for the maintenance of symbiosis [14,15]. Indeed, significant increases in photosynthesis have been reported in mycorrhizal plants, and this increase has been associated with the fungal symbiont acting as an additional carbon sink in the root system [16]. In fact, in mycorrhizal cucumber (*Cucumis sativus*), a 10 to 40% reduction in the photosynthetic capacity occurs after the removal of extraradical mycelia, denoting the sink stimulation promoted by the AMF colonization [17]. It has also been suggested that the increase in the photosynthetic rate occurs as a consequence of the improvement in nutrient acquisition, particularly phosphorus, promoted by AMF [18]. However, a meta-analysis of legumes proposed that the increased nutrient acquisition in mycorrhizal plants does not fully explain their improvement in photosynthesis; however, other plant traits promoted by the symbiosis, such as the increased harvest index (the ratio of seed production to total shoot dry matter), may increase the sink strength and act as additional stimulators of photosynthesis [19]. Moreover, the dynamics of carbon distribution in mycorrhizal plants are also determined by the genetic background of both symbionts and their developmental stage, together with the biotic and abiotic environmental factors that influence the symbiosis [12].

During photosynthesis, CO<sub>2</sub> is assimilated into carbohydrates. Sucrose (Suc) is the main carbohydrate used by most plants to transport carbon from the photosynthetic (source) to the heterotrophic (sink) tissues. Suc is biosynthesized in the cytoplasm of mesophyll cells by the coupled action of Suc-P synthase (SPS; EC 2.4.1.14) and Suc-P phosphatase (SPP; EC 3.1.3.24). It has been suggested that SPS is a key enzyme and one of the rate-limiting steps controlling the carbon flux to Suc biosynthesis [20,21].

The Suc synthesized in mesophyll cells is transported to the phloem by symplastic and apoplastic pathways mediated by Suc Transporters (SUT) and Sugar Will Eventually be Exported Transporters (SWEET) [22,23]. In the phloem, Suc diffuses through mass flow until it reaches the sink tissues, where it may be the substrate to different catabolic pathways to obtain energy or be a precursor for structural or storage molecules [24]. Depending on the pathway, Suc is cleaved by Suc synthase (SuSy; EC 2.4.1.13) to produce UDP-Glucose (UDP-Glc) and Fructose (Fru), or it is hydrolyzed by invertases (EC 3.2.1.26) to yield Glucose (Glc) and Fru [25]. In mycorrhizal roots, these hexoses are transported across the periarbuscular and fungal plasma membranes in arbusculated cells to reach the fungal partner [26].

In addition to the carbon in the form of hexoses, the host plants also contribute lipids to AMF [27,28]. Lipid auxotrophy, as a metabolic property of AMF, explains their obligate biotrophy. This auxotrophy is caused by the absence of the fatty acid synthase type I (type I FAS) molecular complex that controls de novo lipid biosynthesis in fungi and other eukaryotes [29,30]. The recent characterization of the lipid acquisition by AMF in the mycorrhizae, established with bryophytes and vascular plants, revealed that the mechanisms of lipid biosynthesis and transport are conserved among land plants. This supports the hypothesis that land colonization by plants during the Ordovician was favored by mycorrhizal interactions reminiscent of the arbuscular type and primitive plants [31–33].

While the molecular mechanisms involved in the carbohydrate and lipid translocation from plant to fungi in mycorrhizae have not been fully unraveled, there is significant

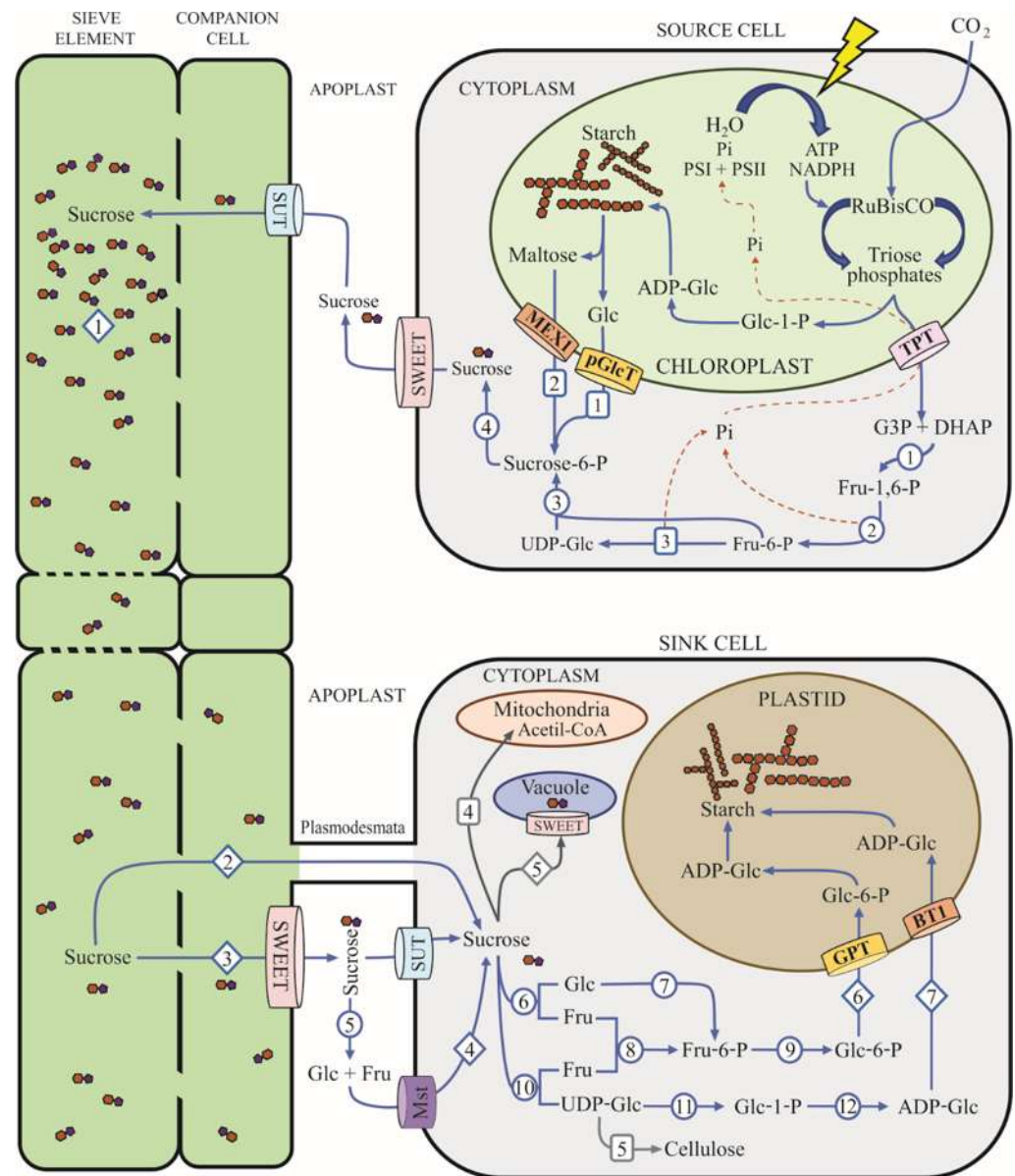
evidence related to the role of particular enzymes or transporters [34]. For example, transcripts encoding hexose transporters from a superfamily of Glc and Fru facilitators [35] and apoplastic invertases involved in Suc hydrolyzation to hexoses [36,37] have been detected in arbusculated cells [8]. Transcriptional fusions of SWEET promoters to reporter genes have also located the SWEET promoter activity in arbuscule-containing cells, and SUT proteins have been specifically located in the periarbuscular membrane by immunolocalization [8,38,39]. The WRINKLED transcription factors, the main controllers of lipid biosynthesis in plants [40] are also involved in the regulation of key genes involved in lipid transfer to the AMF [33,41,42], such as Required for Arbuscular Mycorrhization 2 (*RAM2*) encoding a glycerol-3-phosphate acyl transferase (EC: 2.3.1.15) and Stunted Arbuscule 1 and 2 (*STR1* and *STR2*), which belong to the heterodimeric Adenosine Triphosphate (ATP)-Binding Cassette (ABC) transporter family [27,43–45].

The goal of this review is to analyze the current state of the art on the role of carbon metabolism in mycorrhizae interactions, and to propose an integrated model of carbon partitioning during this symbiotic association.

## 2. Sucrose Metabolism in Plants

**Sucrose** is a non-reducing disaccharide synthesized in source tissues either from chloroplast carbon assimilation products in leaves, mainly triose phosphates (triose-Ps) or starch (Figure 1), or from starch accumulated in storage organs such as tubers or seeds. Triose-Ps are the first stable products of photosynthetic carbon fixation. They are formed in the chloroplasts of mesophyll cells and moved to the cytoplasm through the Triose Phosphate Translocator (TPT) located at the inner membrane of chloroplasts. The TPT is an antiporter that exports triose-Ps in exchange for inorganic phosphate (Pi) from the cytoplasm [46]. The imported Pi is later used to regenerate ATP by the light reactions of photosynthesis, while the triose-Ps are condensed to fructose-1,6-bisphosphate (Fru-1,6-BP) by fructose 1,6-bisphosphate aldolase (FBP; EC 4.1.2.13) [47]. Then, Fru-1,6-BP is dephosphorylated by fructose bisphosphatase (FBPase; EC 3.1.3.11) to render fructose-6-phosphate (Fru-6-P). Subsequently, Fru-6-P is isomerized to Glucose-6-phosphate (Glc-6-P) by phosphoglucisomerase (PGI; EC 5.3.1.9); then Glc-6-P is isomerized by phosphoglucumutase (PGM; EC 5.4.2.2) to Glucose-1-phosphate (Glc-1-P), which is then used as a substrate of UDP-glucose pyrophosphorylase (UDPase; EC 2.7.7.9) to produce UDP-Glucose (UDP-Glc). The transfer of a glucosyl moiety from UDP-Glc to Fru-6-P is catalyzed by SPS, and the Sucrose-6-P (Suc-6-P) obtained is dephosphorylated by SPP to yield Suc as the final product [48–50] (Figure 1).

The metabolic pathway of Suc biosynthesis is modulated by the enzymatic activities of FBPase and SPS as the major rate-limiting steps of the pathway and photosynthate partitioning in leaves [55]. FBPase catalyzes the first irreversible reaction bearing the intermediate metabolite in Suc biosynthesis, and its enzymatic activity is also regulated by both fine and coarse control mechanisms; the rise of photosynthesis rates increases the accumulation of triose-Ps and their later translocation to the cytosol causes the increment of Fru-1,6-P, activating FBPase [56]. The accumulation of hexose phosphates in cytosol leads to the down-regulation of FBPase by the synthesis of its allosteric inhibitor fructose-2,6-bisphosphate (Fru-2,6-BP), which blocks the pathway towards Suc production [57]. Under these conditions, the concentration of Pi lowers in the cytosol; thus, triose-Ps are no longer translocated from the chloroplast [48,57].



**Figure 1.** Common plant pathways of carbon assimilation and partitioning from source to sink tissues. This diagram shows a current model for organic carbon biosynthesis and translocation from photosynthetic to heterotrophic cells (based on previous models by MacNeill et al., 2017 and López-González et al., 2019 [51,52]). Blue arrows trace the current carbon flow routes, the discontinued orange arrows show Pi flux, and the colored barrels designate carbohydrate transporters. Enzymes are indicated in numbered circles as: (1) Fructose 1,6-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13); (2) FBPase (EC 3.1.3.11); (3) SPS (EC 2.4.1.14); (4) SPP (EC 3.1.3.24); (5) Apoplastic invertase (EC 3.2.1.26); (6) Neutral (cytoplasmic) invertase; (7) Hexokinase (EC 2.7.1.1); (8) Fructokinase (EC 2.7.1.4); (9) Phosphoglucosomerase (EC 5.3.1.9); (10) SuSy (EC 2.4.1.13); (11) UDPase (EC 2.7.7.9); (12) ADP-glucose pyrophosphorylase (EC 2.7.7.27) [52]. The numbers in rounded rectangles denote specific metabolic pathways: (1) and (2) starch-derived carbohydrates translocated to cytoplasm by Maltose Excess Protein (MEX1; [52,53]) or Plastidic Glucose Translocator (pGlcT; [52,54]), as possible precursors for Suc biosynthesis; (3) synthesis of UDP-Glucose from Fructose-6-P; (4) Suc catabolism for energy metabolism; (5) Cellulose biosynthesis. Diamonds indicate potential carbon fluxes as: (1) Suc mass flow from source to sink tissues through the phloem; (2) symplastic transport of Suc from phloem to the sink cells; (3) apoplastic transport of Suc from the phloem to sink cells; (4) Monosaccharides transported from the apoplast to sink cells by Monosaccharide transporters (Mst), as potential

substrates for Suc biosynthesis; (5) Vacuole import of Suc for transient storage; 6 and (7) Glc-6-P and ADP-Glc imported into plastids by specific transporters (GPT; Glc-6-P/Pi translocator and BT1; Adenine nucleotide transporter Brittle1, respectively, (see [51,52,54] for review) and directed to starch biosynthesis.

Despite the importance of FBPase in carbon partitioning to Suc biosynthesis, the knockout of the cytosolic FBPase gene in *Arabidopsis* does not lead to strong phenotypic modifications, nor does it compromise the plant viability regardless of the carbon imbalance, which was observed as an increase in the starch content of the leaves without modification of the Suc content [58]. In cytosolic FBPase antisense potato (*Solanum tuberosum*) lines, the accumulation of starch in leaves increased compared to the wild-type, and this was more pronounced when the transgenic plants were exposed to light; however, the development of organs such as tubers and the levels of soluble sugars, including Suc, were mostly unaltered [59]. Thus, a compensatory mechanism for the carbon imbalance generated by the cytosolic FBPase mutation involves the mobilization of the starch from chloroplasts to provide hexoses as the carbon source exported to the cytosol to drive Suc biosynthesis [59,60]. This suggests that Suc biosynthesis can avoid the triose-Ph translocation and the further reaction catalyzed by FBPase (Figure 1).

The reaction catalyzed by SPS is freely reversible in vitro. However, the values of standard free energy calculated for in vivo conditions are lower than those in vitro, displacing the reversible SPS reaction from equilibrium to sucroseogenesis; this is thought to be due to the rapid removal of Pi from Suc-6-P by SPP under in vivo conditions, which suggests a close interaction between both the SPS and SPP enzymes [20,21,61]. The contribution of SPS in the control of C partitioning to Suc has been demonstrated by gene overexpression and antisense repression approaches, which resulted in alterations in Suc synthesis and allocation, and the photosynthetic capacity of the transgenic plants [57]. The pattern of expression of SPS genes is highly regulated at the tissue and developmental levels, and its enzymatic activity also responds to positive (Glc-6P) and negative (Pi) allosteric effectors, as well as to covalent modification by phosphorylation [62,63].

Once synthesized in photosynthetic tissues, Suc is transported to the phloem parenchyma cells where SWEET catalyzes the efflux of Suc into the phloem apoplast to achieve the phloem loading [23]. Then SUT uptakes Suc to the phloem, which is translocated to heterotrophic tissues by mass flow driven by the concentration gradient. Then it enters the sink tissues by symplastic routes through the plasmodesmata or by apoplastic pathways involving the participation of SWEET and SUT [22,24]. There, Suc is released into the apoplastic space, and it can be actively transported to the sink cells by plasmodesmata, or it may be previously hydrolyzed by apoplastic invertases to produce Glc and Fru that are later incorporated in the sink cells by hexose transporters [24,64] (Figure 1).

Sucrose downloaded into the sink tissues can be the substrate for different metabolic pathways to generate energy or it can act as a C-skeleton to support the biosynthesis of structural molecules, reserve polymers, or specific metabolites in response to environmental conditions (Figure 1). The expression and enzymatic activity of the SPS gene have been observed in diverse non-photosynthetic organs such as germinating seedlings, leaves during the sink-to-source transition, and the pollen of immature inflorescences, where Suc biosynthesis and allocation also occur, to support the formation of polymeric compounds and the accumulation of carbohydrates in response to environmental stresses, including water deficits and extreme temperatures [63,65–71].

### 3. Plant SPS Isoforms and Their Role in Sucrose Biosynthesis, Tissue Allocation, and Plant-Beneficial Microbe Interactions

SPS is encoded by a small multigenic family of three to seven gene copies in angiosperms [72–74]. Different SPS genes may exhibit redundancy on the tissue-specific pattern of expression in a plant species [21,69,73,75]. Certain SPS genes within a plant may play particular physiological roles, and thus may be expressed in specific tissues, at precise diurnal periods or in concrete developmental stages [63,69,71,75]. During the germination

of rice (*Oryza sativa*) seeds, the expression of starch hydrolytic enzymes and SPS is coordinated, suggesting that the harmonic activity of both enzymes drives Suc biosynthesis from starch to support embryo development; in opposite circumstances, the expression of SPS genes has been observed in pollen, related to starch anabolism and accumulation during immature grain development [63,70,71].

*Arabidopsis thaliana* genes *AtSPS1* and *AtSPS2* are expressed in the floral nectaries, and their enzymatic products together with SWEET proteins constitute the nectar secretion mechanism; SPS enzymes in the nectary parenchyma drive starch-derived Suc synthesis, which is then exported to the extracellular space via SWEET proteins. Subsequently, Suc is cleaved by apoplastic invertase, elevating the osmotic potential and latterly the water flow [76]. Some SPS genes are expressed preferentially or exclusively in heterotrophic tissues such as roots, flowers, and fruits in model plants such as *A. thaliana* [75] or tobacco [21], suggesting that SPS is also a key enzyme of Suc synthesis in non-photosynthetic tissues.

The role of SPS and Suc biosynthesis in mutualistic interactions has been substantially studied in the rhizobium–legume symbiosis between *Medicago sativa* and *Sinorhizobium meliloti* [77,78]. Three genes encode the different SPS isoforms in *M. sativa* *MsSPSA*, *MsSPSB*, and *MsSPSB3*. When *M. sativa* was inoculated with *S. meliloti*, *MsSPSB* and *MsSPSB3* were exclusively expressed in leaves, while *MsSPSA* expression was enhanced in nodules, and their protein isoforms responded differentially to allosteric regulation by Glc-6-P and Pi. The study of SPS, SuSy, and SPP in WT and Fix<sup>−</sup> mutant nodules suggested that SPS activity plays an important role in the physiology of the nodule and in the mobilization of carbon towards the symbiotic microorganism [77]. Further studies in *M. sativa* defined that *SPSB* controls sucrose biosynthesis in leaves, while *SPSA* is crucial for the maintenance of the regulatory cycles of sucrose biosynthesis/breakdown from sucrose and starch catabolic products [78]. These results suggest that SPS could be involved in the modulation of the C amount provided to the symbiont through the Suc synthesis in the nodules, and that the nodule-induced SPS gene expression from a particular phylogenetic family is specifically regulated in response to the interaction of the plant with mutualistic microorganisms [77,78]. Suc transported to the nodules is primarily catabolized in the vascular tissues, and the hexoses obtained are then transported to the central part of the nodules, where they are routed to starch biosynthesis. A later canalization of C from starch to Suc is required to maintain a stable carbohydrate/energy supply for the optimum functioning of the nitrogen-fixing nodule. A correct supply of carbohydrates is needed for N<sub>2</sub> fixation and N assimilation through the glycolytic or the oxidative pentose phosphate pathways to obtain phosphoenolpyruvate (PEP), oxaloacetic acid and L-malate or  $\alpha$ -ketoglutarate to fuel nitrogen fixation and the assimilation of ammonia [79].

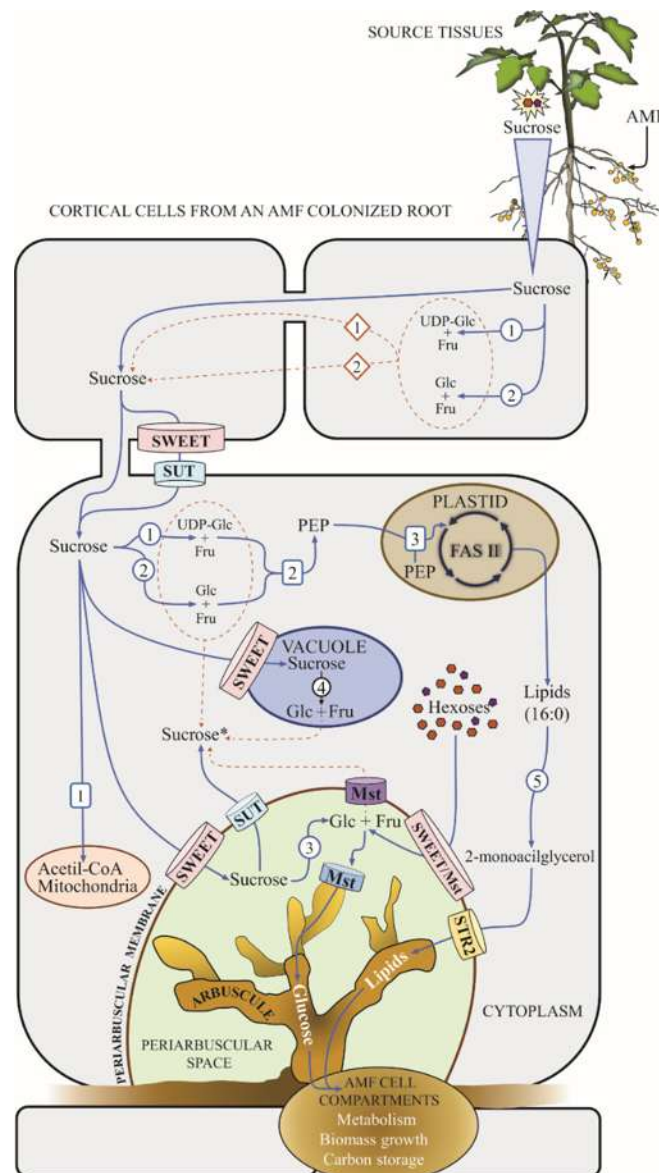
The modulation of the photosynthetic rates in mycorrhizal plants may imply the regulation of SPS gene expression and enzymatic activity to establish a Suc distribution that meets the plant's demands and allows the carbon supply to the AMF. Nonetheless, experimental evidence on the role of SPS in controlling carbon partitioning in the AM symbiosis is not conclusive: for example, no differences in SPS activities in leaves from mycorrhizal and non-mycorrhizal plants were found in *C. sativus* under different P levels [18], while SPS activity increased in the leaves of mycorrhizal *Poncirus trifoliata* [80]. The latter study revealed a correlation between the increase in the net activity of Suc metabolic enzymes and the soluble sugar content in the leaves of AM plants, which was even more pronounced when plants were exposed to drought conditions, suggesting that SPS modulates Suc production in the source tissues to support the demand for C during symbiosis, but also to maintain the osmolyte accumulation under water-limiting conditions [80].

The increase in P in the plant tissues promoted by AM may indirectly impact SPS modulation and Suc biosynthesis, since Pi is fundamental to the translocation of triose-Ps from the chloroplast [81], and it also regulates the enzymatic activity of SPS by covalent modification and allosteric modulation [62]. Therefore, approaches to studying Suc biosynthesis in mycorrhizal plants must consider the availability and dynamics of P in relation

to the transcriptional and post-transcriptional regulation of SPS and the sink stimulation exerted by the mycorrhizal establishment.

Thus, the reported studies suggest that the genetic elements and molecular mechanisms regulating SPS isoforms respond to the mutualistic interactions. Indeed, the synthesis of Suc is modulated in areas where the exchange of nutrients between the symbionts takes place during the plant–microbe interaction and determines the amount of carbon that is provided by the plant to the microorganism.

The scheme in Figure 2 integrates the current knowledge on carbon allocation to root cells during plant–AMF interactions. We propose that Suc biosynthesis occurring in colonized cells may control the carbon supply to the AMF in the form of carbohydrates and lipids.



**Figure 2.** Carbon flux to the cortical root cells during arbuscular–mycorrhizal interactions. Photosynthates flow through the mycorrhizal plant from the leaves to the arbusculated cortical cells in the roots. The catabolism of Suc in the arbusculated and other cortical cells close to them promotes Suc mass flow and enables the translocation of hexoses, Suc, and lipids to the periarbuscular space towards the fungal arbuscule, imposing a carbon sink (Updated from Wipf et al., 2019; Roth and Paszkowski, 2017; and Manck-Götzenberger and Requena, 2016 [8,34,39]). Blue arrows trace the

current carbon flow routes, the discontinued orange arrows show the “futile” cycles of sucrose catabolism and synthesis, the colored barrels designate the carbohydrate transporters. Enzymes are indicated in numbered circles as: (1) Sucrose synthase; (2) Neutral invertase; (3) Apoplastic invertase; (4) Vacuolar invertase; (5) Glycerol-3-phosphate acyl transferase. Numbers in rounded rectangles denote specific metabolic pathways: (1) Suc as a source for aerobic respiration; (2) Glycolytic pathway to render phosphoenolpyruvate; (3) lipid synthesis mediated by the plastid Type I FAS molecular complex. Diamonds indicate potential carbon fluxes as: (1) symplastic and (2) apoplastic routes of hexoses entry to sink cells. Sucrose \* indicates the sucrose biosynthesized in the arbusculated cell.

#### 4. Sucrose Transporters and Sucrose Mobilization in Mycorrhizal Plants

To achieve carbon loading in non-photosynthetic tissues, Suc synthesized in mesophyll cells reaches the apoplast adjacent to the phloem, where phloem loading is mediated by SUT [22]. The SUT proteins form a small three clade family divided into types I, II, and III; SUT types I and II are found in the phloem tissues and they import Suc into the phloem for the mobilization of carbon from the source to the sink tissues. The transporters of the type III clade are located in the tonoplast membrane where they transiently load Suc into the tonoplast [82].

A semiquantitative RT-PCR transcriptional analysis of SUT transporters in tomato (*S. lycopersicum*) plants colonized by *Glomus caledonium* or *G. intraradices* estimated the down-regulation of *SISUT1* in the source tissues of mycorrhizal *S. lycopersicum*, and its expression was not influenced by the availability of P, but it was related to the presence of the AMF in the roots [83]. Further quantitative RT-PCR (qRT-PCR) studies in *F. mosseae* colonized *S. lycopersicum* plants revealed an up-regulation of *SISUT1* (type I), *SISUT2* (type II), and *SISUT4* (type III) in the leaves. While *SISUT1* and *SISUT4* were up-regulated in the roots, *SISUT2* was not [84].

In *M. truncatula*, the increased expression of *MtSUT1-1*, *MtSUT2*, and *MtSUT4-1* (orthologous to *SISUT1*, *SISUT2*, and *SISUT4*, respectively) was described by qRT-PCR in the leaves and roots of plants grown at low P concentrations ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.13 mM); the expression of those genes in the leaves was even higher under *Rhizophagus* sp. colonization, suggesting that AMF induces carbon flux from the source tissues to the phloem [85]. The roots also showed more *MtSUT1-1* transcript accumulation in low P when plants were mycorrhized; however, *MtSUT2* and *MtSUT4-1* were similar in mycorrhizal and non-mycorrhizal plants [85].

According to the studies reported above, the *S. lycopersicum* and *M. truncatula* SUT orthologous from the same divergent clades exhibit similar expression patterns in the source and sink tissues in response to mycorrhizal colonization. While genes from the three SUT types were up-regulated in the leaves of both plant species, only type I and III transporters were transcriptionally up-regulated in mycorrhized roots. Thus, we propose that the enhanced expression of SUT orthologous genes in the source and sink tissues in response to mycorrhizal colonization in angiosperms of divergent lineages is the result of a conserved molecular mechanism to supply carbon to AMF in which the Suc flow mediated by SUT transporters is a common trait in higher plants.

The enhanced SUT expression observed in mycorrhizal *S. lycopersicum* correlated with Suc and Fru accumulation and the decrease in Glc in the roots [84]. These results suggest that the carbon delivered to the roots as Suc is catabolized to generate Glc that is preferably used to supply carbon to the AMF, thus contributing to Fru accumulation in the root tissues [84]. In *M. truncatula*, lower concentrations of Suc, Glc, and Fru in the leaves of mycorrhizal plants was proposed to be a consequence of higher sugar transport activity in source tissues [85].

The heterologous expression of the spinach (*Spinacia oleracea*) SUT1 transporter gene (*SoSUT1*) fused to the constitutive CaMV 35S promoter led to an increase in the colonization capacity of *R. irregularis* in *S. tuberosum*, despite high P levels in the soil. This high P concentration strongly inhibited AMF colonization in the wild-type genotype and in a silenced *SUT1* mutant that was also tested under the same conditions, supporting the claim

that the carbon supply exerted by the source tissues controls AMF colonization [86]. Plants inoculated with *R. irregularis* at a low P content showed similar levels of colonization in the wild type and the overexpressing and the silenced *SUT1* *S. tuberosum* mutants; therefore, it was hypothesized that when phloem loading is impaired due to *SUT1* silencing, plants tend to prioritize carbon delivery to sustain the mycorrhizal symbiosis. In agreement with this hypothesis, mycorrhized silenced *SUT1* plants showed a lower biomass accumulation [86].

In grafting experiments in which *S. lycopersicum* *SUT2*-silenced mutants and wild-type genotypes were combined, Bitterlich et al. (2014) demonstrated a reproducible increase in root colonization by *F. mosseae* or *R. irregularis* when inoculated independently in silenced *SISUT2* root stocks, indicating a root-specific function of *SUT2* in the carbon flux to AMF. Furthermore, the positive growth response to AMF colonization was abolished in *SISUT2* antisense plants [38]. Remarkably, the *SUT2* transporter was specifically immunolocalized in the periarbuscular membrane in cortical cells, suggesting that *SUT2* transports Suc from the periarbuscular matrix back to the cytoplasm of the plant cell. Thus, *SUT2* exerts an important influence on carbon distribution between symbionts in mycorrhizal associations, regulating the amount of Suc in the periarbuscular space and controlling the carbon supplied to the fungal symbiont [38]. The phenotype of *S. lycopersicum* *SUT2*-silenced plants can be partially rescued by the exogenous application of brassinosteroids, suggesting that the biosynthetic/signaling pathway of this plant growth regulator is linked to the Suc-carbon partitioning pathway, mediated by *SUT2*. Therefore, it is possible that brassinosteroids may be involved in carbon distribution to AMF during the arbuscular mycorrhizal interaction [38,87].

The most recently discovered plant carbohydrate transporter proteins are the **SWEET transporters** [23]. They are encoded by a multigenic family that clusters four subgroups classified by their affinity for carbohydrates. In *S. lycopersicum*, the four groups are subsequently separated into Class I transporters that mediate Glc and Fru transport, and Class II transporters, which have a higher affinity for Glc and Suc [88]. SWEET transporters function as Suc exporters, releasing Suc to the apoplast, and their function is essential for phloem loading [89]. Several events of plant development such as the embryonic and reproductive tissue development in *A. thaliana*, *Glycine max*, and *Petunia axillaris* have been related to the carbohydrate transport activity of SWEET proteins [90–92].

Increasing evidence indicates that SWEET transporters play major roles in the mutualistic and pathogenic interactions of plants with microorganisms [39,93–95]. The differential regulation of some SWEET genes has been demonstrated. For example, the genome of *Lotus japonicus* contains 13 SWEET codifying genes. The transcriptional analysis of this gene family during symbiosis revealed that only *LjSWEET3* is up-regulated in nodules formed by *Mesorhizobium loti*, and its expression was also increased in roots colonized by *R. irregularis* [94]. The expression level of the 35 SWEET genes in the *S. tuberosum* genome was analyzed in roots inoculated with *R. irregularis* in three temporally defined stages of mycorrhizal development, and 22 of these genes were differentially expressed in at least two of the three stages studied [39]. The study led to the identification of three SWEET genes from divergent clades in the transporter family that were induced by the mycorrhiza. The promoter of these three genes was subsequently fused to the  $\beta$ -glucuronidase gene to characterize their expression in non-mycorrhized and mycorrhized *M. truncatula* plants. In all cases, the reporter gene expression was specifically detected in the cortical cells containing arbuscules. In particular, the promoter of *StSWEET2a*, a putative Suc transporter, controlled the expression of the reporter gene only at the root apex of non-mycorrhized plants. According to these authors, the induced specific expression of *StSWEET2a* in the arbusculated cortical cells supports the claim that Suc is an important source that helps the carbon demands of the fungal symbiont in arbuscular mycorrhizal interactions to be met [39]. This transcriptional analysis of SWEET genes in *S. tuberosum* showed that *StSWEET1a*, *StSWEET1b*, and *StSWEET7a* are genes that are up-regulated in mycorrhized plants [39]. Their putative orthologs in *M. truncatula*, *MtSWEET1b*, and *MtSWEET6* also showed higher expression levels in mycorrhizal plants [96]. Remarkably, the simultaneous

colonization of *M. truncatula* by *R. irregularis* and *Ensifer meliloti* in a tripartite association led to a reduction in mycorrhizal colonization, the down-regulation of *MtSWEET1b* and *MtSWEET6* expression in the roots, and the up-regulation of *MtSWEET15d* in the root nodules. Accordingly, the authors concluded that *MtSWEET1b* and *MtSWEET6* play a key role in the specific carbon transfer to the AMF [96]. An et al. (2019) further characterized this mycorrhiza-upregulated *MtSWEET1b* as a Glc transporter located in the periarbuscular membrane [97]. Phylogenetically, *MtSWEET1b* shares its origin with *MtSWEET1a*, as both are homologous to the *A. thaliana* gene *AtSWEET1*, a bidirectional uniporter facilitator of Glc that is highly expressed in flowers and pollen tubes, but with a weak expression in the roots [97,98]. There are at least two SWEET genes homologous to *AtSWEET1* in the genome of plants that belong to both lineages of angiosperms such as *O. sativa*, *L. japonicus*, and *S. tuberosum*, and as reported for *M. truncatula*, at least one of those genes showed an up-regulation in mycorrhized plants [97].

As proposed for SUT transporters, the activity of the SWEET genes described in AM points to a common molecular mechanism for carbon delivery to the fungus in divergent clades of angiosperms, and they appear to play an essential role in plant–microbe interactions. Moreover, the lack of mycorrhizal-responsive homologs of SWEET transporters in *A. thaliana* suggests that, besides the inability for proper molecular signaling with AMF, non-mycorrhizal plants may have lost the genes required to maintain an efficient carbon efflux to the fungal symbiont (Figure 2). In this regard, it was recently reported that non-mycorrhizal plants are unable to interact with AMF due to the loss or pseudogenization of key genes essential for plant-microbial signaling [99].

In addition to the sugar transporters belonging to the SUT and SWEET families, **monosaccharide transporters** have also been associated with carbon partitioning to the fungal symbiont in arbuscular mycorrhizal interactions. The first experimental evidence for the induced expression of an *M. truncatula* hexose transporter (*Mtst1*) in the roots of *M. truncatula* and *M. sativa* colonized by an AMF was presented by Harrison (1996). She also reported the induced expression of *Mtst1* in *Medicago* roots colonized by *G. versiforme* and located its transcripts in arbusculated cortical cells by in-situ hybridization [35].

The *S. lycopersicum* transporter *SISFP7* (formerly named *LeST3*) was subsequently identified and characterized by García-Rodríguez et al. (2005) as a hexose transporter of the major facilitator superfamily [100,101]. Its expression level increases in the source tissues in plants colonized by different AMF and by the phytopathogen *Phytophthora parasitica*, while the level of expression remains constant in the roots. The authors suggested that the up-regulation of this monosaccharide transporter in the leaves is the result of the increased carbon demand imposed by the pathogenic or mutualistic fungal interaction, and its function is to mobilize hexoses from the source tissues to the roots [100]. Ge et al. (2008) also compared the expression of *SISFP7* in plants colonized by AMF. They described that when *S. lycopersicum* roots were colonized by *G. intraradices*, the expression level of *SISFP7* increased in the leaves and roots. However, in plants colonized by *G. caledonium*, the expression levels of this transporter were reduced compared to the control plants, in disagreement with the former hypothesis of *SISFP7* responding to fungal interactions independently of its parasitic or mutualistic behavior, as proposed by García-Rodríguez et al. (2005) [100]. Remarkably, *SISFP7* was the only sugar transporter evaluated by Ge et al. (2008) that showed a transcriptional response to mycorrhization. The contrasting response in the expression of *SISFP7* in *S. lycopersicum* plants colonized by different AMF species was interpreted as the recruitment of different molecular elements in a single plant species by different AMF species to obtain a carbon supply [83].

The previous studies suggested that different AMF species may exert different levels of carbon sink strength, and thus the level of stimulation of carbon allocation to the symbiotic interphase. A fine-tuned regulation of the expression of plant carbohydrate transporters was also described as involved in the carbon allocation towards the fungal symbiont [85]. Moreover, positive growth responses in mycorrhizal plants showed an up-regulation of SWEET, while non-cooperative mycorrhizal interactions did not [102].

Based on these results, we propose that the ability of AM to impact plant carbon allocation and establish itself as a sink depends in part on the ability of AMF to stimulate the expression and activity of plant carbohydrate transporters, resulting in the amount of carbon received from the host. Consequently, a mycorrhizal interaction that promotes sink stimulation will promote plant growth.

Increased expression of the monosaccharide transporter *ZmMST1* was detected in maize roots colonized by *G. intraradices*. The up-regulation of this gene was observed under conditions of P scarcity and was related to an increase in the concentration of soluble sugars in roots, supporting the role of this transporter in the carbon allocation to AMF [103].

In summary, an analysis of sugar transporters in AMF-colonized plants suggests that to sustain carbon uptake by AMF, sugar is exported to the periarbuscular space through molecular mechanisms controlled by SWEET proteins in the periarbuscular membrane. SWEET proteins have also been proposed as active controllers of the carbon supply by acting as cytoplasmic importers of Suc/hexoses released to the periarbuscular space. The common expression patterns of orthologous genes observed in different model plants upon AMF colonization support the hypothesis of a common molecular mechanism that supplies carbohydrates to the symbiont in vascular plants, in which SUT, SWEET, and monosaccharide transporters have a common role.

## 5. Mycorrhizal Symbiosis and Sucrose Catabolism in Plants

The genes encoding the SuSy and invertase enzymes are present in small families in plant genomes [104,105]. **Plant invertases** are located subcellularly in the cytoplasm, mitochondria, chloroplast, vacuole, and in the cell wall [105]. It has been proposed that in arbuscular mycorrhizal interactions, cell wall invertases, also named apoplastic invertases, hydrolyze Suc in the periarbuscular space and generate the hexoses that will be taken up by AMF. In this regard, promoter analyses and in-situ hybridization studies have revealed the expression of the *S. lycopersicum* *LIN6* promoter activity, which encodes an apoplastic invertase in arbusculated cells [36]. *LIN6* transcription was also up-regulated in response to environmental stresses, mechanical stimuli, and by pathogen infection [106].

The experimental evidence obtained for *S. lycopersicum* and *S. tuberosum* has led to recent models that describe carbon transfer from the host plant to the fungal symbiont, where apoplastic invertases directly generate hexoses delivered to AMF [36,37,39]. Vacuolar invertase expression is also induced in *Phaseolus vulgaris* roots colonized by *G. intraradices* [107], while the specific enzymatic activity of cytosolic invertases increased in *G. max*, colonized by *G. mosseae* compared to other types of invertases [108]. This supports the claim that the regulatory cycles of Suc biosynthesis and catabolism in subcellular compartments participate in carbon allocation to AMF during mycorrhizal interaction (Figure 2).

Tobacco plants overexpressing a yeast-derived invertase under the constitutive 35S promoter were inoculated with *G. intraradices*. Heterozygous lines with different increased invertase levels in the leaves displayed a higher accumulation of hexoses in their source leaves, but no increase in invertase activity or hexose accumulation was observed in the roots, regardless of the activity levels achieved in leaves. The plant lines with higher invertase activity showed lower hexoses content in the roots, together with the up-regulation of the pathogenesis-related (PR) genes *PAR1*, *PR-Q*, and *PR-1b* in the leaves, and reduced levels of root mycorrhization. These results indicated that hexoses accumulated in the leaves activated defense mechanisms potentially with a negative effect on AMF; moreover, they suggest that changes in carbohydrate metabolism in shoots influence the establishment of mycorrhizal interaction in the roots, and that this influence is not exclusively determined by the carbon supply to roots [109]. Interestingly, yeast invertase expression specifically targeted to the tobacco root system increased hexose accumulation, but it did not affect AM colonization [110]. Similarly, the transformed roots of *M. truncatula* expressing apoplast-, cytosol-, or vacuolar-located yeast-derived invertases accumulated hexoses, but this did not impact mycorrhization [110]. Thus, the authors concluded that the increase in hexose levels did not significantly impact the symbiosis physiology, and that the invertase-controlled

carbon supply to the fungus is not a limiting factor. This suggests the existence of other controllers of carbon allocation in the roots [110], as the mechanism previously described regarding SUT transporters [38].

Similar to invertases, **Suc synthases (SuSy)** are encoded by a small family of genes in most plant species. In *M. truncatula*, five genes encoding SuSy have been identified in the genome, but only one, *MtSucS1*, was induced in mycorrhizal roots with *G. mosseae*. The fusion of specific regions of *MtSucS1* to the *gusAint* reporter gene led to the localization of the chimeric protein in arbusculated cells, but also in the adjacent cells [111]. An analogous pattern of expression of SuSy transcripts in the roots of *P. vulgaris* colonized by *G. intraradices* was previously observed by in-situ hybridization [107]. To further analyze mycorrhizal physiology, *M. truncatula MtSucS1*-antisense lines were inoculated with *G. mosseae*. The arbuscules in the roots of these plants were early-senescent, did not reach complete differentiation, and colonization was impaired compared to the wild-type phenotype. This aberrant mycorrhizal phenotype was also accompanied by a reduced expression of mycorrhiza-induced plant genes, such as the Pi transporter *MtPT4*. This led to the conclusion that *MtSucS1* is essential to maintain normal arbuscular development and its influence in carbon distribution cannot be replaced solely by invertase activity [112]. Indeed, mycorrhizal colonization-induced genes encoding SuSy and invertases with different subcellular localization, including the LIN6 gene in *S. lycopersicum* [100]. It has been proposed that SuSy is an important element that generates Suc mobilization gradients to arbusculated cells by maintaining Suc cleavage in the cytoplasm to generate products that could be used to fuel the metabolically active colonized cell, or to export hexoses to the AMF during the interaction [100,107,111].

In summary, it is widely recognized that apoplastic invertase activity generates hexoses from Suc catabolism to be delivered to the fungal partner during mycorrhizal interactions; therefore, its function is to reduce the concentration of Suc in the periarbuscular space to maintain a constant Suc efflux to this zone, while the influx of Suc to the arbusculated cell is also maintained by SuSy and invertases located in other subcellular spaces such as the vacuole and the cytoplasm.

## 6. Lipids in Carbon Partitioning to the Arbuscular Mycorrhiza

Early strategies for the study of AMF carbon metabolism used transformed carrot (*Daucus carota*) roots inoculated under in vitro conditions with both symbionts placed in separated compartments [113,114]. The use of radiolabeled carbon substrates delivered to either compartment, containing the host root or the fungi, allowed the tracing of the carbon partitioning in the mycorrhizae by analyzing the pattern of storage and structural labeled molecules. This approach revealed that the carbon transferred as carbohydrates from the host to the AMF was metabolized to triacylglycerols (TAG) in the intraradical mycelium, and then translocated to the extraradical mycelium to constitute the major fungal carbon storage, which is mainly found in spores, vesicles, and hyphae [114]. The analysis of aymbiotically germinating spores indicated that the gluconeogenesis and the glyoxylate pathway were both active in germination tubes, but evidence to support fatty acid (FA) synthesis at this stage was lacking. Thus, it was speculated that FA synthesis would be restricted for membrane synthesis [115], and this limiting condition would prevent the formation of new propagules, explaining the obligate biotrophy of the AMF [116]. Additional studies have indicated that hexoses acquired by AMF are metabolized in the intraradical mycelium to form triacylglycerol (TAG) and glycogen, rather than trehalose. According to this, TAG and glycogen would be subsequently translocated to the extraradical mycelium to maintain the biosynthesis of storage and structural polymers such as chitin [117].

The idea of FA de novo synthesis occurring in the intraradical mycelium from carbohydrates and its translocation to the extraradical mycelium prevailed until the sequencing and publication of the *R. irregularis* genome and transcriptome [118,119]. Wewer et al. (2014) found sufficient evidence to indicate that *R. irregularis* have the molecular mechanisms to drive FA oxidation and elongation/desaturation, but not for the presence of the mul-

tidomain type I FAS, responsible for the de novo biosynthesis of FA [29]. De novo FA biosynthesis, a central pathway in the primary metabolism, is controlled by type I FAS, a macromolecular complex that controls C16:0 and C18:0 biosynthesis in fungi and mammals [120,121]. The lack of de novo FA biosynthesis machinery in AMF may explain their obligate biotrophy, and supports the idea that palmitic acid (C16:0) is supplied by the host during mycorrhizal interaction [29]. A few years after this scenario was proposed, Jiang et al. (2017) and Luginbuehl et al. (2017) provided new evidence to demonstrate that lipids are synthesized de novo in the host plant and allocated to the AMF. They also confirmed that carbon supply to the AMF as lipids is essential to achieve a normal mycorrhizal phenotype in *M. truncatula* [27,28]. Moreover, the absence of the type I FAS molecular complex in the AMF as *Gigaspora margarita* and *R. clarus*, indicated that the inability to synthesize lipids de novo is a common feature among AMF [30,122].

Recently, new studies on the regulation of FA biosynthesis are shedding light on the regulation of the mycorrhizal functioning. WRINKLED transcription factors from the AP2-EREBP family (APETALA2-ethylen-responsive element binding protein) control FA biosynthesis in *Arabidopsis* [40]. In *L. japonicus*, *CTT Motif-Binding Transcription Factor1 (CBX1)*, a *WRINKLED1* homologue, has been described to activate the mycorrhizal-inducible genes encoding the phosphate transporter 4 (*LjPT4*), H<sup>+</sup>-ATPase (*LjHA1*), and *RAM2* [42]. Similarly, *M. truncatula* transcription factors *WRI5*, *WRI5/Erf1*, and *WRI5/c* regulate the expression of *STR* and *MtPT4* genes, and are involved in the formation of the periarbuscular membrane [41].

Rich et al. (2021) demonstrated that the transcriptional activation of FA biosynthesis is a common response to AMF in angiosperms and lower plants such as Bryophytes [33]. They showed that the liverwort *Marchantia palacea* can transfer lipids to *R. irregularis* and that the orthologous genes *RAM2* and *STR/STR2*, are induced in mycorrhizal thalli under the control of a WRINKLED transcription factor (*MpaWRI*) [33].

These data indicate the existence of a common molecular program shared between Bryophytes and angiosperms to activate lipid transfer to the AMF could be present in primitive plants, prior to the divergence between Bryophytes and vascular plants. This supports the hypothesis that AM establishment was a key factor during the early stages of Earth colonization by plants, 450 million years ago [31–33].

The discovery of the lipid auxotrophy in AMF led to the improvement of axenic culture techniques. By adding myristate or a mixture of myristate and palmitic acid to culture media, Sugiura et al. (2020) managed to germinate in vitro spores of *R. irregularis* and *G. margarita*, producing masses of fungal hyphae that formed functional spores, so that for the first time the spores generated in axenic cultures preserved the potential to colonize roots [123]. Additionally, adding strigolactones, jasmonic acid, and organic nitrogen to the culture media supplemented with myristate produced an even higher number of spores; moreover, the so-obtained spores promoted plant growth in symbiotic culture systems [124]. These advances in AMF in vitro axenic cultivation paved the way for a further improvement of AMF mass production for agrobiotechnological applications, but they have also opened new possibilities for studies on AMF development, genetics, and metabolism without the need or influence of a host.

Despite these advances, the significance of host carbon transfer as lipids or as carbohydrates to the fungus in the terms of host growth and development during mycorrhizal symbiosis remains an open question. Transcriptomic evidence has shown that the AMF-inoculated roots of *G. max* plants with different levels of colonization and plant growth promotion increased the expression of genes related to sugar transport and Suc catabolism only when plant growth was promoted, and Suc, Glc, and Fru content increased [102]. In the same study, *RAM2* and *STR/STR2* were up-regulated in colonized plants, independently of the inocula used and the growth promotion achieved. The contrasting reconfiguration of sugar compared to lipid gene expression suggested that growth enhancement in plants is strongly related to the stimulation of sugar transport and Suc catabolism in the host plant [102].

Glycolysis also participates in the regulation of sugar accumulation in plant organs, contributing to carbon distribution. PEP can be used to fuel lipid biosynthesis controlled by the plastid FAS molecular complex. Thus, plant lipid biosynthesis occurs within plastid organelles, where the Suc catabolism and hexose oxidation are essential steps to provide a carbon source for de novo lipid biosynthesis [125,126]. The disruption of the glycolytic pathway by the antisense silencing of cytosolic Triose-Phosphate Isomerase (TPI, EC 5.3.1.1) caused an increase in Suc, Glc, Glc-6-P, Fru, fumarate, and isocitrate in the roots of silenced TPI genotypes, which was accompanied by an increased in the total lipid concentration [127]. In parallel to PEP from glycolysis, alternate Suc catabolism sub-products, such as Glc-6-P, can be translocated into the plastids and can subsequently be used to synthesize PEP (Figure 2) in the stroma by plastidic glycolysis to support lipid biosynthesis [126,128].

Consistent with the increases in Suc content reported in arbuscular mycorrhized roots in several plant models [84,85,102], a higher concentration of Suc in arbusculated cortical cells has been shown by metabolite profiling after laser capture microdissection [129]. However Suc accumulation in *Arabidopsis*, a non-mycorrhizal model, mediates KIN10 inactivation, a negative regulator of WRINKLED1 (WRI1), which causes FA accumulation, suggesting that sugar/Suc homeostasis plays a regulatory role in lipid biosynthesis [130,131]. This suggests that mycorrhization can trigger the accumulation of Suc in roots and arbusculated cells, as a mycorrhiza-derived signal, impacting the lipid biosynthetic pathway (Figure 2). Suc content seems to be dynamically modified by the phenology and physiology of the mycorrhizae as indicated by studies on root Suc content showing that differences between non-mycorrhizal and mycorrhizal plants depend on plant age and the progression of mycorrhizal colonization [37]. How this dynamic regulation affects lipids is yet to be addressed.

## 7. Conclusions

Several studies have reported that AM colonization has a strong influence on the carbon assimilation capacity of the plant, and on carbon partitioning and allocation towards the plant organs. The additional carbon sink imposed by the presence of AMF in the roots activates a molecular machinery that controls carbon partitioning, coordinating the activities of Suc biosynthesis, transport, and catabolism to generate carbon-based molecules that will be translocated to the AMF. The molecular elements involved in carbon transfer to AMF as carbohydrates and lipids, as well as the mechanisms of their regulation, appear to be conserved among plant lineages.

The role of Suc in the AM interaction is not limited to the plant primary metabolite and the carbon and energy source for carbon-based molecules to support AMF growth and development. Suc accumulation in plant tissues provides a cellular environment that promotes lipid biosynthesis by complex regulatory mechanisms. Therefore, it is plausible to consider that the Suc accumulation is a mycorrhiza-derived signal, promoted by the sink capacity of AMF, to control the host cell environment to achieve distinct goals: (1) to increase the hexoses content to become susceptible to be taken up by the AMF; (2) to increase the carbon supply to maintain the root metabolism and to generate carbon precursors to ensure lipid biosynthesis; and (3) to control the stability of key molecular elements to increase and maintain lipid biosynthesis and transport to sustain AMF lipid auxotrophy.

Fine-tuning the cost and benefits of the symbiosis is key for the plant. The re-incorporation of Suc from the periarbuscular space to the cytoplasm of arbusculated cells, driven by SUT proteins, supports the existence of symbiosis regulatory mechanisms to restrict the fungal growth to levels not detrimental for the plant. Although important advances have been achieved in the last few decades regarding the control of carbon partitioning in the mycorrhizal symbiosis, the elucidation of additional mechanisms will be useful to optimize the use of AMF inoculants for plant growth promotion.

**Author Contributions:** Conceptualization, I.A.S.-S., M.M.-T. and A.T.C.-B.; writing—original draft preparation, I.A.S.-S. and A.T.C.-B.; writing—review and editing, M.M.-T., J.J.V.-A., M.E.P.-S., G.S.

and M.J.P.; supervision, A.T.C.-B.; funding acquisition, J.J.V.-A., M.M.-T. and A.T.C.-B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** I.A.S.-S. received a scholarship granted by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México (732373). Funding support was provided to A.T.C.-B. from Coordinación de la Investigación Científica Project 5872608, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

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

## References

- Bonfante, P.; Genre, A. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 48. [[CrossRef](#)]
- Spatafora, J.W.; Chang, Y.; Benny, G.L.; Lazarus, K.; Smith, M.E.; Berbee, M.L.; Bonito, G.; Corradi, N.; Grigoriev, I.; Gryganskyi, A.; et al. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* **2016**, *108*, 1028–1046. [[CrossRef](#)]
- Genre, A.; Lanfranco, L.; Perotto, S.; Bonfante, P. Unique and common traits in mycorrhizal symbioses. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 649–660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Smith, S.E.; Smith, F.A. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: New paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2011**, *62*, 227–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ferrol, N.; Azcón-Aguilar, C.; Pérez-Tienda, J. Review: Arbuscular mycorrhizas as key players in sustainable plant phosphorus acquisition: An overview on the mechanisms involved. *Plant Sci.* **2019**, *280*, 441–447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- van Creijl, J.; Wang, P.; Limpens, E. Arbuscular Mycorrhiza, a Fungal Perspective. In *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture*, 1st ed.; Sharma, V., Salawan, R., Tawfeeq Al-Ani, L.K., Eds.; Elsevier: London, UK, 2020; ISBN 9780128184691. [[CrossRef](#)]
- Konečný, J.; Hřelová, H.; Bukovská, P.; Hujslová, M.; Jansa, J. Correlative evidence for co-regulation of phosphorus and carbon exchanges with symbiotic fungus in the arbuscular mycorrhizal *Medicago truncatula*. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0224938. [[CrossRef](#)]
- Wipf, D.; Krajinski, F.; van Tuinen, D.; Recorbet, G.; Courty, P.-E. Trading on the arbuscular mycorrhiza market: From arbuscules to common mycorrhizal networks. *New Phytol.* **2019**, *223*, 1127–1142. [[CrossRef](#)]
- Gutjahr, C.; Parniske, M. Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2013**, *29*, 593–617. [[CrossRef](#)]
- Ivanov, S.; Austin, J.; Berg, R.H.; Harrison, M.J. Extensive membrane systems at the host–arbuscular mycorrhizal fungus interface. *Nat. Plants* **2019**, *5*, 194–203. [[CrossRef](#)]
- Harrison, M.J.; Dewbre, G.R.; Liu, J. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* **2002**, *14*, 2413–2429. [[CrossRef](#)]
- Guether, M.; Neuhäuser, B.; Balestrini, R.; Dynowski, M.; Ludewig, U.; Bonfante, P. A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiol.* **2009**, *150*, 73–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Liu, J.J.; Chen, J.; Xie, K.; Tian, Y.; Yan, A.; Liu, J.; Huang, Y.; Wang, S.; Zhu, Y.; Chen, A.; et al. A mycorrhiza-specific H<sup>+</sup>-ATPase is essential for arbuscule development and symbiotic phosphate and nitrogen uptake. *Plant Cell Environ.* **2020**, *43*, 1069–1083. [[CrossRef](#)]
- Smith, S.; Read, D. *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd ed.; Elsevier: London, UK, 2008; ISBN 9780123705266. [[CrossRef](#)]
- Valentine, A.J.; Mortimer, P.E.; Kleinert, A.; Kang, Y.; Benedito, V.A. Carbon metabolism and costs of arbuscular mycorrhizal associations to host roots. In *Symbiotic Endophytes*, 1st ed.; Aroca, R., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2013; Volume 37, pp. 233–252. ISBN 978-3-642-39316-7. [[CrossRef](#)]
- Wright, D.P.; Read, D.J.; Scholes, J.D. Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant Cell Environ.* **1998**, *21*, 881–891. [[CrossRef](#)]
- Gavito, M.E.; Jakobsen, I.; Mikkelsen, T.N.; Mora, F. Direct evidence for modulation of photosynthesis by an arbuscular mycorrhiza-induced carbon sink strength. *New Phytol.* **2019**, *223*, 896–907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Black, K.G.; Mitchell, D.T.; Osborne, B.A. Effect of mycorrhizal-enhanced leaf phosphate status on carbon partitioning, translocation and photosynthesis in cucumber. *Plant Cell Environ.* **2000**, *23*, 797–809. [[CrossRef](#)]
- Kaschuk, G.; Kuyper, T.W.; Leffelaar, P.A.; Hungria, M.; Giller, K.E. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? *Soil Biol. Biochem.* **2009**, *41*, 1233–1244. [[CrossRef](#)]
- Lunn, J.E.; ap Rees, T. Apparent equilibrium constant and mass-action ratio for sucrose-phosphate synthase in seeds of *Pisum sativum*. *Biochem. J.* **1990**, *267*, 739–743. [[CrossRef](#)]

21. Chen, S.; Hajirezaei, M.; Börnke, F. Differential expression of sucrose-phosphate synthase isoenzymes in tobacco reflects their functional specialization during dark-governed starch mobilization in source leaves. *Plant Physiol.* **2005**, *139*, 1163–1174. [[CrossRef](#)]
22. Kühn, C.; Grof, C.P.L. Sucrose transporters of higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2010**, *13*, 287–297. [[CrossRef](#)]
23. Braun, D.M. SWEET! The pathway is complete. *Science* **2012**, *335*, 173–174. [[CrossRef](#)]
24. Milne, R.J.; Grof, C.P.; Patrick, J.W. Mechanisms of phloem unloading: Shaped by cellular pathways, their conductances and sink function. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2018**, *43*, 8–15. [[CrossRef](#)]
25. Ruan, Y.-L.; Jin, Y.; Yang, Y.-J.; Li, G.-J.; Boyer, J.S. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: Roles in development, yield potential, and response to drought and heat. *Mol. Plant* **2010**, *3*, 942–955. [[CrossRef](#)]
26. Parniske, M. Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 763–775. [[CrossRef](#)]
27. Jiang, Y.; Wang, W.; Xie, Q.; Liu, N.; Liu, L.; Wang, D.; Zhang, X.; Yang, C.; Chen, X.; Tang, D.; et al. Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi. *Science* **2017**, *356*, 1172–1175. [[CrossRef](#)]
28. Luginbuehl, L.H.; Menard, G.N.; Kurup, S.; Van Erp, H.; Radhakrishnan, G.V.; Breakspear, A.; Oldroyd, G.E.D.; Eastmond, P.J. Fatty acids in arbuscular mycorrhizal fungi are synthesized by the host plant. *Science* **2017**, *356*, 1175–1178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Wewer, V.; Brands, M.; Dörmann, P. Fatty acid synthesis and lipid metabolism in the obligate biotrophic fungus *Rhizophagus irregularis* during mycorrhization of *Lotus japonicus*. *Plant J.* **2014**, *79*, 398–412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Kobayashi, Y.; Maeda, T.; Yamaguchi, K.; Kameoka, H.; Tanaka, S.; Ezawa, T.; Shigenobu, S.; Kawaguchi, M. The genome of *Rhizophagus clarus* HR1 reveals a common genetic basis for auxotrophy among arbuscular mycorrhizal fungi. *BMC Genom.* **2018**, *19*, 465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Pirozynski, K.A. Interactions between fungi and plants through the ages. *Can. J. Bot.* **1981**, *59*, 1824–1827. [[CrossRef](#)]
32. Remy, W.; Tylor, T.N.; Hass, H.; Kerp, H. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 11841–11843. [[CrossRef](#)]
33. Rich, M.K.; Vigneron, N.; Libourel, C.; Keller, J.; Xue, L.; Hajheidari, M.; Radhakrishnan, G.V.; Le Ru, A.; Diop, S.I.; Potente, G.; et al. Lipid exchanges drove the evolution of mutualism during plant terrestrialization. *Science* **2021**, *372*, 864–868. [[CrossRef](#)]
34. Roth, R.; Paszkowski, U. Plant carbon nourishment of arbuscular mycorrhizal fungi. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2017**, *39*, 50–56. [[CrossRef](#)]
35. Harrison, M.J. A sugar transporter from *Medicago truncatula*: Altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *Plant J.* **1996**, *9*, 491–503. [[CrossRef](#)]
36. Schaarschmidt, S.; Roitsch, T.; Hause, B. Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 4015–4023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. García-Rodríguez, S.; Azcón-Aguilar, C.; Ferrol, N. Transcriptional regulation of host enzymes involved in the cleavage of sucrose during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Physiol. Plant.* **2007**, *129*, 737–746. [[CrossRef](#)]
38. Bitterlich, M.; Krügel, U.; Boldt-Burisch, K.; Franken, P.; Kühn, C. The sucrose transporter SISUT2 from tomato interacts with brassinosteroid functioning and affects arbuscular mycorrhiza formation. *Plant J.* **2014**, *78*, 877–889. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Manck-Götzenberger, J.; Requena, N. Arbuscular mycorrhiza symbiosis induces a major transcriptional reprogramming of the potato SWEET sugar transporter family. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 487. [[CrossRef](#)]
40. To, A.; Joubès, J.; Barthole, G.; Lécureuil, A.; Scagnelli, A.; Jasinski, S.; Lepiniec, L.; Baud, S. WRINKLED transcription factors orchestrate tissue-specific regulation of fatty acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2012**, *24*, 5007–5023. [[CrossRef](#)]
41. Jiang, Y.; Xie, Q.; Wang, W.; Yang, J.; Zhang, X.; Yu, N.; Zhou, Y.; Wang, E. *Medicago* AP2-domain transcription factor WRI5a is a master regulator of lipid biosynthesis and transfer during mycorrhizal symbiosis. *Mol. Plant* **2018**, *11*, 1344–1359. [[CrossRef](#)]
42. Xue, L.; Klinnawee, L.; Zhou, Y.; Saridis, G.; Vijayakumar, V.; Brands, M.; Dörmann, P.; Gigolashvili, T.; Turck, F.; Bucher, M. AP2 transcription factor CBX1 with a specific function in symbiotic exchange of nutrients in mycorrhizal *Lotus japonicus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E9239–E9246. [[CrossRef](#)]
43. Zhang, Q.; Blaylock, L.A.; Harrison, M.J. Two *Medicago truncatula* half-ABC transporters are essential for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Cell* **2010**, *22*, 1483–1497. [[CrossRef](#)]
44. Gutjahr, C.; Radovanovic, D.; Geoffroy, J.; Zhang, Q.; Siegler, H.; Chiapello, M.; Casieri, L.; An, K.; An, G.; Guiderdoni, E.; et al. The half-size ABC transporters STR1 and STR2 are indispensable for mycorrhizal arbuscule formation in rice. *Plant J.* **2012**, *69*, 906–920. [[CrossRef](#)]
45. Wang, E.; Schornack, S.; Marsh, J.F.; Gobbato, E.; Schwessinger, B.; Eastmond, P.; Schultze, M.; Kamoun, S.; Oldroyd, G.E.D. A common signaling process that promotes mycorrhizal and oomycete colonization of plants. *Curr. Biol.* **2012**, *22*, 2242–2246. [[CrossRef](#)]
46. Flügge, U.I.; Fischer, K.; Gross, A.; Sebald, W.; Lottspeich, F.; Eckerskorn, C. The triose phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts: Nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and import of the *in vitro* synthesized precursor protein into chloroplasts. *EMBO J.* **1989**, *8*, 39–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Lu, W.; Tang, X.; Huo, Y.; Xu, R.; Qi, S.; Huang, J.; Zheng, C.; Wu, C. Identification and characterization of fructose 1,6-bisphosphate aldolase genes in *Arabidopsis* reveal a gene family with diverse responses to abiotic stresses. *Gene* **2012**, *503*, 65–74. [[CrossRef](#)]
48. Daie, J. Cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase: A key enzyme in the sucrose biosynthetic pathway. *Photosynth. Res.* **1993**, *38*, 5–14. [[CrossRef](#)]

49. Koch, K. Sucrose metabolism: Regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2004**, *7*, 235–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Salerno, G.L.; Curatti, L. Origin of sucrose metabolism in higher plants: When, how and why? *Trends Plant Sci.* **2003**, *8*, 63–69. [[CrossRef](#)]
51. MacNeill, G.J.; Mehrpouyan, S.; Minow, M.A.A.; Patterson, J.A.; Tetlow, I.J.; Emes, M.J. Starch as a source, starch as a sink: The bifunctional role of starch in carbon allocation. *J. Exp. Bot.* **2017**, *68*, 4433–4453. [[CrossRef](#)]
52. López-González, C.; Juárez-Colunga, S.; Morales-Eliás, N.C.; Tiessen, A. Exploring regulatory networks in plants: Transcription factors of starch metabolism. *PeerJ* **2019**, *7*, e6841. [[CrossRef](#)]
53. Stettler, M.; Eicke, S.; Mettler, T.; Messerli, G.; Hörtensteiner, S.; Zeeman, S.C. Blocking the metabolism of starch breakdown products in *Arabidopsis* leaves triggers chloroplast degradation. *Mol. Plant* **2009**, *2*, 1233–1246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Cho, M.-H.; Lim, H.; Shin, D.H.; Jeon, J.-S.; Bhoo, S.H.; Park, Y.-I.; Hahn, T.-R. Role of the plastidic glucose translocator in the export of starch degradation products from the chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* **2011**, *190*, 101–112. [[CrossRef](#)]
55. Kerr, P.S.; Huber, S.C. Coordinate control of sucrose formation in soybean leaves by sucrose-phosphate synthase and fructose-2,6-bisphosphate. *Planta* **1987**, *170*, 197–204. [[CrossRef](#)]
56. Stitt, M.; Quick, W.P. Photosynthetic carbon partitioning: Its regulation and possibilities for manipulation. *Physiol. Plant.* **1989**, *77*, 633–641. [[CrossRef](#)]
57. Winter, H.; Huber, S.C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: Localization and regulation of activity of key enzymes. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* **2000**, *19*, 31–67. [[CrossRef](#)]
58. Rojas-González, J.A.; Soto-Suárez, M.; García-Díaz, Á.; Romero-Puertas, M.C.; Sandalio, L.M.; Mérida, Á.; Thormählen, I.; Geigenberger, P.; Serrato, A.J.; Sahrawy, M. Disruption of both chloroplastic and cytosolic FBPase genes results in a dwarf phenotype and important starch and metabolite changes in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **2015**, *66*, 2673–2689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Zrenner, R.; Krause, K.-P.; Apel, P.; Sonnewald, U. Reduction of the cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase in transgenic potato plants limits photosynthetic sucrose biosynthesis with no impact on plant growth and tuber yield. *Plant J.* **1996**, *9*, 671–681. [[CrossRef](#)]
60. Serrato, A.J.; Barajas-López, J.D.; Chueca, A.; Sahrawy, M. Changing sugar partitioning in FBPase-manipulated plants. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 2923–2931. [[CrossRef](#)]
61. Maloney, V.J.; Park, J.-Y.; Unda, F.; Mansfield, S.D. Sucrose phosphate synthase and sucrose phosphate phosphatase interact *in planta* and promote plant growth and biomass accumulation. *J. Exp. Bot.* **2015**, *66*, 4383–4394. [[CrossRef](#)]
62. Huber, S.C.; Huber, J.L. Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1996**, *47*, 431–444. [[CrossRef](#)]
63. Chávez-Bárceñas, A.T.; Valdez-Alarcón, J.J.; Martínez-Trujillo, M.; Chen, L.; Xoconostle-Cázares, B.; Lucas, W.J.; Herrera-Estrella, L. Tissue-specific and developmental pattern of expression of the rice *sps1* gene. *Plant Physiol.* **2000**, *124*, 641–654. [[CrossRef](#)]
64. Sauer, N. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 2309–2317. [[CrossRef](#)]
65. Zhang, X.M.; Liu, S.H.; Du, L.Q.; Yao, Y.L.; Wu, J.Y. Activities, transcript levels, and subcellular localizations of sucrose phosphate synthase, sucrose synthase, and neutral invertase and change in sucrose content during fruit development in pineapple (*Ananas comosus*). *J. Hort. Sci. Biotechnol.* **2019**, *94*, 573–579. [[CrossRef](#)]
66. Bilska-Kos, A.; Mytych, J.; Suski, S.; Magoń, J.; Ochodzki, P.; Zebrowski, J. Sucrose phosphate synthase (SPS), sucrose synthase (SUS) and their products in the leaves of *Miscanthus × giganteus* and *Zea mays* at low temperature. *Planta* **2020**, *252*, 23. [[CrossRef](#)]
67. Xue, X.; Yu, Y.-C.; Wu, Y.; Xue, H.; Chen, L.-Q. Locally restricted glucose availability in the embryonic hypocotyl determines seed germination under abscisic acid treatment. *New Phytol.* **2021**, *231*, 1832–1844. [[CrossRef](#)]
68. Yang, J.; Zhang, J.; Niu, X.-Q.; Zheng, X.-L.; Chen, X.; Zheng, G.-H.; Wu, J.-C. Comparative transcriptome analysis reveals key genes potentially related to organic acid and sugar accumulation in loquat. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0238873. [[CrossRef](#)]
69. Solís-Guzmán, M.G.; Argüello-Astorga, G.; López-Bucio, J.; Ruiz-Herrera, L.F.; López-Meza, J.E.; Sánchez-Calderón, L.; Carreón-Abud, Y.; Martínez-Trujillo, M. *Arabidopsis thaliana* sucrose phosphate synthase (*sps*) genes are expressed differentially in organs and tissues, and their transcription is regulated by osmotic stress. *Gene Expr. Patterns* **2017**, *25–26*, 92–101. [[CrossRef](#)]
70. Hirose, T.; Hashida, Y.; Aoki, N.; Okamura, M.; Yonekura, M.; Ohto, C.; Terao, T.; Ohsugi, R. Analysis of gene-disruption mutants of a sucrose phosphate synthase gene in rice, *OsSPS1*, shows the importance of sucrose synthesis in pollen germination. *Plant Sci.* **2014**, *225*, 102–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Okamura, M.; Aoki, N.; Hirose, T.; Yonekura, M.; Ohto, C.; Ohsugi, R. Tissue specificity and diurnal change in gene expression of the sucrose phosphate synthase gene family in rice. *Plant Sci.* **2011**, *181*, 159–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Langenkämper, G.; Fung, R.W.M.; Newcomb, R.D.; Atkinson, R.G.; Gardner, R.C.; MacRae, E.A. Sucrose phosphate synthase genes in plants belong to three different families. *J. Mol. Evol.* **2002**, *54*, 322–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Castleden, C.K.; Aoki, N.; Gillespie, V.J.; MacRae, E.A.; Quick, W.P.; Buchner, P.; Foyer, C.H.; Furbank, R.T.; Lunn, J.E. Evolution and function of the sucrose-phosphate synthase gene families in wheat and other grasses. *Plant Physiol.* **2004**, *135*, 1753–1764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Jiang, S.-Y.; Chi, Y.-H.; Wang, J.-Z.; Zhou, J.-X.; Cheng, Y.-S.; Zhang, B.-L.; Ma, A.; Vanitha, J.; Ramachandran, S. Sucrose metabolism gene families and their biological functions. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17583. [[CrossRef](#)]

75. Volkert, K.; Debast, S.; Voll, L.M.; Voll, H.; Schießl, I.; Hofmann, J.; Schneider, S.; Börnke, F. Loss of the two major leaf isoforms of sucrose-phosphate synthase in *Arabidopsis thaliana* limits sucrose synthesis and nocturnal starch degradation but does not alter carbon partitioning during photosynthesis. *J. Exp. Bot.* **2014**, *65*, 5217–5229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Lin, I.W.; Sosso, D.; Chen, L.-Q.; Gase, K.; Kim, S.-G.; Kessler, D.; Klinkenberg, P.M.; Gorder, M.K.; Hou, B.-H.; Qu, X.-Q.; et al. Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter SWEET9. *Nature* **2014**, *508*, 546–549. [[CrossRef](#)]
77. Aleman, L.; Ortega, J.L.; Martinez-Grimes, M.; Seger, M.; Holguin, F.O.; Uribe, D.J.; Garcia-Ibárceta, D.; Sengupta-Gopalan, C. Nodule-enhanced expression of a sucrose phosphate synthase gene member (*MsSPSA*) has a role in carbon and nitrogen metabolism in the nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Planta* **2010**, *231*, 233–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Padhi, S.; Grimes, M.M.; Muro-Villanueva, F.; Ortega, J.L.; Sengupta-Gopalan, C. Distinct nodule and leaf functions of two different sucrose phosphate synthases in alfalfa. *Planta* **2019**, *250*, 1743–1755. [[CrossRef](#)]
79. Liu, A.; Contador, C.A.; Fan, K.; Lam, H.-M. Interaction and regulation of carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in root nodules of legumes. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Wu, H.-H.; Zou, Y.-N.; Rahman, M.M.; Ni, Q.-D.; Wu, Q.-S. Mycorrhizas alter sucrose and proline metabolism in trifoliate orange exposed to drought stress. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Häusler, R.E.; Schlieben, N.H.; Nicolay, P.; Fischer, K.; Fischer, K.L.; Flügge, U.-I. Control of carbon partitioning and photosynthesis by the triose phosphate/phosphate translocator in transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). I. Comparative physiological analysis of tobacco plants with antisense repression and overexpression of the triose phosphate/phosphate translocator. *Planta* **2000**, *210*, 371–382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Reinders, A.; Sivitz, A.B.; Ward, J.M. Evolution of plant sucrose uptake transporters. *Front. Plant Sci.* **2012**, *3*, 22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Ge, L.; Sun, S.; Chen, A.; Kapulnik, Y.; Xu, G. Tomato sugar transporter genes associated with mycorrhiza and phosphate. *Plant Growth Regul.* **2008**, *55*, 115–123. [[CrossRef](#)]
84. Boldt, K.; Pörs, Y.; Haupt, B.; Bitterlich, M.; Kühn, C.; Grimm, B.; Franken, P. Photochemical processes, carbon assimilation and RNA accumulation of sucrose transporter genes in tomato arbuscular mycorrhiza. *J. Plant Physiol.* **2011**, *168*, 1256–1263. [[CrossRef](#)]
85. Doidy, J.; Van Tuinen, D.; Lamotte, O.; Corneillat, M.; Alcaraz, G.; Wipf, D. The *Medicago truncatula* sucrose transporter family: Characterization and implication of key members in carbon partitioning towards arbuscular mycorrhizal fungi. *Mol. Plant* **2012**, *5*, 1346–1358. [[CrossRef](#)]
86. Gabriel-Neumann, E.; Neumann, G.; Leggewie, G.; George, E. Constitutive overexpression of the sucrose transporter *SoSUT1* in potato plants increases arbuscular mycorrhiza fungal root colonization under high, but not under low, soil phosphorus availability. *J. Plant Physiol.* **2011**, *168*, 911–919. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Hansch, F.; Jaspar, H.; von Sivers, L.; Bitterlich, M.; Franken, P.; Kühn, C. Brassinosteroids and sucrose transport in mycorrhizal tomato plants. *Plant Signal. Behav.* **2020**, *15*, 1714292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Feng, C.-Y.; Han, J.-X.; Han, X.-X.; Jiang, J. Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of the *SWEET* gene family in tomato. *Gene* **2015**, *573*, 261–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Chen, L.-Q.; Qu, X.-Q.; Hou, B.-H.; Sosso, D.; Osorio, S.; Fernie, A.R.; Frommer, W.B. Sucrose efflux mediated by *SWEET* proteins as a key step for phloem transport. *Science* **2012**, *335*, 207–211. [[CrossRef](#)]
90. Chen, L.-Q.; Lin, I.W.; Qu, X.-Q.; Sosso, D.; McFarlane, H.E.; Londoño, A.; Samuels, A.L.; Frommer, W.B. A cascade of sequentially expressed sucrose transporters in the seed coat and endosperm provides nutrition for the *Arabidopsis* embryo. *Plant Cell* **2015**, *27*, 607–619. [[CrossRef](#)]
91. Patil, G.; Valliyodan, B.; Deshmukh, R.; Prince, S.; Nicander, B.; Zhao, M.; Sonah, H.; Song, L.; Lin, L.; Chaudhary, J.; et al. Soybean (*Glycine max*) *SWEET* gene family: Insights through comparative genomics, transcriptome profiling and whole genome re-sequence analysis. *BMC Genom.* **2015**, *16*, 520. [[CrossRef](#)]
92. Iftikhar, J.; Lyu, M.; Liu, Z.; Mehmood, N.; Munir, N.; Ahmed, M.A.A.; Batool, W.; Aslam, M.M.; Yuan, Y.; Wu, B. Sugar and hormone dynamics and the expression profiles of SUT/SUC and *SWEET* sugar transporters during flower development in *Petunia axillaris*. *Plants* **2020**, *9*, 1770. [[CrossRef](#)]
93. Chong, J.; Piron, M.-C.; Meyer, S.; Merdinoglu, D.; Bertsch, C.; Mestre, P. The *SWEET* family of sugar transporters in grapevine: *VvSWEET4* is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*. *J. Exp. Bot.* **2014**, *65*, 6589–6601. [[CrossRef](#)]
94. Sugiyama, A.; Saida, Y.; Yoshimizu, M.; Takanashi, K.; Sosso, D.; Frommer, W.B.; Yazaki, K. Molecular characterization of *LjSWEET3*, a sugar transporter in nodules of *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol.* **2017**, *58*, 298–306. [[CrossRef](#)]
95. Bezruczyk, M.; Yang, J.; Eom, J.-S.; Prior, M.; Sosso, D.; Hartwig, T.; Szurek, B.; Oliva, R.; Vera-Cruz, C.; White, F.F.; et al. Sugar flux and signaling in plant-microbe interactions. *Plant J.* **2018**, *93*, 675–685. [[CrossRef](#)]
96. Kafle, A.; Garcia, K.; Wang, X.; Pfeiffer, P.E.; Strahan, G.D.; Bücking, H. Nutrient demand and fungal access to resources control the carbon allocation to the symbiotic partners in tripartite interactions of *Medicago truncatula*. *Plant Cell Environ.* **2019**, *42*, 270–284. [[CrossRef](#)]
97. An, J.; Zeng, T.; Ji, C.; de Graaf, S.; Zheng, Z.; Xiao, T.T.; Deng, X.; Xiao, S.; Bisseling, T.; Limpens, E.; et al. A *Medicago truncatula* *SWEET* transporter implicated in arbuscule maintenance during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* **2019**, *224*, 396–408. [[CrossRef](#)]

98. Chen, L.-Q.; Hou, B.-H.; Lalonde, S.; Takanaga, H.; Hartung, M.L.; Qu, X.-Q.; Guo, W.-J.; Kim, J.-G.; Underwood, W.; Chaudhuri, B.; et al. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **2010**, *468*, 527–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Radhakrishnan, G.V.; Keller, J.; Rich, M.K.; Vernié, T.; Mbadanga Mbadanga, D.L.; Vigneron, N.; Cottret, L.; Clemente, H.S.; Libourel, C.; Cheema, J.; et al. An ancestral signalling pathway is conserved in intracellular symbioses-forming plant lineages. *Nat. Plants* **2020**, *6*, 280–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. García-Rodríguez, S.; Pozo, M.J.; Azcón-Aguilar, C.; Ferrol, N. Expression of a tomato sugar transporter is increased in leaves of mycorrhizal or *Phytophthora parasitica*-infected plants. *Mycorrhiza* **2005**, *15*, 489–496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Reuscher, S.; Akiyama, M.; Yasuda, T.; Makino, H.; Aoki, K.; Shibata, D.; Shiratake, K. The sugar transporter inventory of tomato: Genome-wide identification and expression analysis. *Plant Cell Physiol.* **2014**, *55*, 1123–1141. [[CrossRef](#)]
102. Zhao, S.; Chen, A.; Chen, C.; Li, C.; Xia, R.; Wang, X. Transcriptomic analysis reveals the possible roles of sugar metabolism and export for positive mycorrhizal growth responses in soybean. *Physiol. Plant.* **2019**, *166*, 712–728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Wright, D.P.; Scholes, J.D.; Read, D.J.; Rolfe, S.A. European and african maize cultivars differ in their physiological and molecular responses to mycorrhizal infection. *New Phytol.* **2005**, *167*, 881–896. [[CrossRef](#)]
104. Xu, X.; Yang, Y.; Liu, C.; Sun, Y.; Zhang, T.; Hou, M.; Huang, S.; Yuan, H. The evolutionary history of the sucrose synthase gene family in higher plants. *BMC Plant Biol.* **2019**, *19*, 566. [[CrossRef](#)]
105. Tauzin, A.S.; Giardina, T. Sucrose and invertases, a part of the plant defense response to the biotic stresses. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 293. [[CrossRef](#)]
106. Proels, R.K.; Roitsch, T. Extracellular invertase LIN6 of tomato: A pivotal enzyme for integration of metabolic, hormonal, and stress signals is regulated by a diurnal rhythm. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 1555–1567. [[CrossRef](#)]
107. Blee, K.A.; Anderson, A.J. Transcripts for genes encoding soluble acid invertase and sucrose synthase accumulate in root tip and cortical cells containing mycorrhizal arbuscules. *Plant Mol. Biol.* **2002**, *50*, 197–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Schubert, A.; Allara, P.; Morte, A. Cleavage of sucrose in roots of soybean (*Glycine max*) colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.* **2004**, *161*, 495–501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Schaarschmidt, S.; Kopka, J.; Ludwig-Müller, J.; Hause, B. Regulation of arbuscular mycorrhization by apoplastic invertases: Enhanced invertase activity in the leaf apoplast affects the symbiotic interaction. *Plant J.* **2007**, *51*, 390–405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Schaarschmidt, S.; González, M.-C.; Roitsch, T.; Strack, D.; Sonnewald, U.; Hause, B. Regulation of arbuscular mycorrhization by carbon. The symbiotic interaction cannot be improved by increased carbon availability accomplished by root-specifically enhanced invertase activity. *Plant Physiol.* **2007**, *143*, 1827–1840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Hohnjec, N.; Perlick, A.M.; Pühler, A.; Küster, H. The *Medicago truncatula* sucrose synthase gene *MtSucS1* is activated both in the infected region of root nodules and in the cortex of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2003**, *16*, 903–915. [[CrossRef](#)]
112. Baier, M.C.; Keck, M.; Gödde, V.; Niehaus, K.; Küster, H.; Hohnjec, N. Knockdown of the symbiotic sucrose synthase *MtSucS1* affects arbuscule maturation and maintenance in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **2010**, *152*, 1000–1014. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. St-Arnaud, M.; Hamel, C.; Vimard, B.; Caron, M.; Fortin, J.A. Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an in vitro system in the absence of host roots. *Mycol. Res.* **1996**, *100*, 328–332. [[CrossRef](#)]
114. Pfeffer, P.E.; Douds, D.D.; Bécard, G.; Shachar-Hill, Y. Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol.* **1999**, *120*, 587–598. [[CrossRef](#)]
115. Bago, B.; Pfeffer, P.E.; Douds, D.D., Jr.; Brouillette, J.; Bécard, G.; Shachar-Hill, Y. Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiol.* **1999**, *121*, 263–271. [[CrossRef](#)]
116. Bago, B.; Pfeffer, P.; Shachar-Hill, Y. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiol.* **2000**, *124*, 949–958. [[CrossRef](#)]
117. Bago, B.; Pfeffer, P.E.; Abubaker, J.; Jun, J.; Allen, J.W.; Brouillette, J.; Douds, D.D.; Lammers, P.J.; Shachar-Hill, Y. Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiol.* **2003**, *131*, 1496–1507. [[CrossRef](#)]
118. Tisserant, E.; Kohler, A.; Dozolme-Seddas, P.; Balestrini, R.; Benabdellah, K.; Colard, A.; Croll, D.; Da Silva, C.; Gomez, S.K.; Koul, R.; et al. The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytol.* **2012**, *193*, 755–769. [[CrossRef](#)]
119. Tisserant, E.; Malbreil, M.; Kuo, A.; Kohler, A.; Symeonidi, A.; Balestrini, R.; Charron, P.; Duensing, N.; Frei dit Frey, N.; Gianinazzi-Pearson, V.; et al. Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 20117–20122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Singh, K.; Graf, B.; Linden, A.; Sautner, V.; Urlaub, H.; Tittmann, K.; Stark, H.; Chari, A. Discovery of a regulatory subunit of the yeast fatty acid synthase. *Cell* **2020**, *180*, 1130–1143.e20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Schweizer, E.; Hofmann, J. Microbial Type I Fatty Acid Synthases (FAS): Major players in a network of cellular FAS systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2004**, *68*, 501–517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Rich, M.K.; Nouri, E.; Courty, P.-E.; Reinhardt, D. Diet of arbuscular mycorrhizal fungi: Bread and butter? *Trends Plant Sci.* **2017**, *22*, 652–660. [[CrossRef](#)]

123. Sugiura, Y.; Akiyama, R.; Tanaka, S.; Yano, K.; Kameoka, H.; Marui, S.; Saito, M.; Kawaguchi, M.; Akiyama, K.; Saito, K. Myristate can be used as a carbon and energy source for the asymbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 25779–25788. [[CrossRef](#)]
124. Tanaka, S.; Hashimoto, K.; Kobayashi, Y.; Yano, K.; Maeda, T.; Kameoka, H.; Ezawa, T.; Saito, K.; Akiyama, K.; Kawaguchi, M. Asymbiotic mass production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus*. *bioRxiv* **2020**. [[CrossRef](#)]
125. Lim, G.-H.; Singhal, R.; Kachroo, A.; Kachroo, P. Fatty acid- and lipid-mediated signaling in plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2017**, *55*, 505–536. [[CrossRef](#)]
126. Ma, Y.; Yin, Z.; Ye, J. Lipid biosynthesis and regulation in *Jatropha*, an emerging model for woody energy plants. In *The Jatropha Genome. Compendium of Plant Genomes*, 1st ed.; Tsuchimoto, S., Ed.; Springer: Cham, Switzerland, 2017; pp. 113–127. [[CrossRef](#)]
127. Dorion, S.; Clendenning, A.; Jeukens, J.; Salas, J.J.; Parveen, N.; Haner, A.A.; Law, R.D.; Force, E.M.; Rivoal, J. A large decrease of cytosolic triosephosphate isomerase in transgenic potato roots affects the distribution of carbon in primary metabolism. *Planta* **2012**, *236*, 1177–1190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Borchert, S.; Harborth, J.; Schünemann, D.; Hoferichter, P.; Heldt, H.W. Studies of the enzymic capacities and transport properties of pea root plastids. *Plant Physiol.* **1993**, *101*, 303–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Gaude, N.; Bortfeld, S.; Erban, A.; Kopka, J.; Krajinski, F. Symbiosis dependent accumulation of primary metabolites in arbuscule-containing cells. *BMC Plant Biol.* **2015**, *15*, 234. [[CrossRef](#)]
130. Zhai, Z.; Liu, H.; Shanklin, J. Phosphorylation of WRINKLED1 by KIN10 results in its proteasomal degradation, providing a link between energy homeostasis and lipid biosynthesis. *Plant Cell* **2017**, *29*, 871–889. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Zhai, Z.; Liu, H.; Xu, C.; Shanklin, J. Sugar potentiation of fatty acid and triacylglycerol accumulation. *Plant Physiol.* **2017**, *175*, 696–707. [[CrossRef](#)]

## ORIGINAL RESEARCH

# Carbohydrate and lipid balances in the positive plant phenotypic response to arbuscular mycorrhiza: increase in sink strength

Isaac A. Salmeron-Santiago<sup>1</sup> | Miguel Martínez-Trujillo<sup>1</sup> |  
 Juan J. Valdez-Alarcón<sup>2</sup> | Martha E. Pedraza-Santos<sup>3</sup> | Gustavo Santoyo<sup>4</sup> |  
 Pedro A. López<sup>5</sup> | John Larsen<sup>6</sup> | María J. Pozo<sup>7</sup> | Ana T. Chávez-Bárceñas<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mexico

<sup>2</sup>Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mexico

<sup>3</sup>Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Uruapan, Mexico

<sup>4</sup>Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mexico

<sup>5</sup>Colegio de Postgraduados-Campus Puebla, San Pedro Cholula, Mexico

<sup>6</sup>Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Morelia, Mexico

<sup>7</sup>Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, Granada, Spain

## Correspondence

Ana T. Chávez-Bárceñas, Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez," Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Uruapan, México.  
 Email: tztzqui.chavez@umich.mx

## Funding information

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Grant/Award Number: 732373; Coordinación de la Investigación Científica, Grant/Award Number: 5872608

Edited by H. Saitoh

## Abstract

The exchange of phosphorus (P) and carbon (C) between plants and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) is a major determinant of their mutualistic symbiosis. We explored the C dynamics in tomato (*Solanum lycopersicum*) inoculated or not with *Rhizophagus irregularis* to study their growth response under different NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> concentrations (Null P, 0 mM; Low P, 0.065 mM; High P, 1.3 mM). The percentage of AMF colonization was similar in plants under Null and Low P, but severely reduced under High P. However, the AMF mass biomarker 16:1ω5 revealed higher fungal accumulation in inoculated roots under Low P, while more AMF spores were produced in the Null P. Under High P, AMF biomass and spores were strongly reduced. Plant growth response to mycorrhiza was negative under Null P, showing reduction in height, biovolume index, and source leaf (SL) area. Under Low P, inoculated plants showed a positive response (e.g., increased SL area), while inoculated plants under High P were similar to non-inoculated plants. AMF promoted the accumulation of soluble sugars in the SL under all fertilization levels, whereas the soluble sugar level decreased in roots under Low P in inoculated plants. Transcriptional upregulation of *SILIN6* and *SISUS1*, genes related to carbohydrate metabolism, was observed in inoculated roots under Null P and Low P, respectively. We conclude that P-limiting conditions that increase AMF colonization stimulate plant growth due to an increase in the source and sink strength. Our results suggest that C partitioning and allocation to different catabolic pathways in the host are influenced by AMF performance.



Physiologia Plantarum

**Carbohydrate and lipid balances in the positive plant phenotypic response to arbuscular mycorrhiza: increased of the sink strength**

Journal:	<i>Physiologia Plantarum</i>
Manuscript ID	PPL-2022-00394
Manuscript Type:	Regular manuscript - Biochemistry and metabolism
Date Submitted by the Author:	13-Jul-2022
Complete List of Authors:	Salmeron-Santiago, Isaac A.; Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo Facultad de Biología; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" Martínez-Trujillo, Miguel; Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo Facultad de Biología Valdez-Alarcón, Juan J.; Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Pedraza-Santos, Martha E.; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" Santoyo, Gustavo; Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo Instituto de Investigaciones Químico Biológicas López, Pedro A.; Colegio de Postgraduados, Campus Puebla Larsen, John; Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad Pozo Jiménez, María José; Estación Experimental del Zaidín, Micorrizas Chávez-Bárceñas, Ana T.; Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez"
Key Words:	arbuscular mycorrhiza, lipid metabolism and translocation during mycorrhizal symbiosis, carbohydrates metabolism and translocation

## Carbohydrate and lipid balances in the positive plant phenotypic response to arbuscular mycorrhiza: increased of the sink strength

### Abstract

The mutualistic symbiosis between plants and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) is based on the trade of phosphorus (P) and carbon (C) between the partners. We explored the dynamics of C partitioning in *Solanum lycopersicum* inoculated with *Rhizophagus irregularis* by comparing morphometric, physiological, and biochemical traits in contrasting mycorrhizal plant phenotypes produced by different levels of P fertilization of inoculated and non-inoculated plants. Concentrations of P fertilization corresponded to 0 mM (Null P), 0.065 mM (Low P), and 1.3 mM (High P)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Plants under Null and Low P conditions showed similar high percentages of AMF colonization. However, the fungal lipid biomarker 16:1 $\omega$ 5 was higher in Low P plants, while the highest number of spores was extracted from the substrate of the Null P treatment. Plants under Null P expressed a negative phenotype in response to mycorrhizal interaction, Low P reverted the negative phenotype, and plants increase the area of their source leaves, while mycorrhizal plants at High P showed low AMF colonization and no significant phenotypic changes compared to the non-inoculated plants. Mycorrhiza promoted soluble sugar accumulation in source leaves under all P conditions and increased their total soluble sugars to starch ratio. Roots of mycorrhizal plants exhibiting a positive phenotype had lower levels of total soluble and reducing sugars than non-mycorrhizal plants under the same Low P conditions. We conclude that the positive effects in plants attributed to the establishment of mycorrhizal symbiosis imply a larger investment of carbon in the form of carbohydrates and lipids from the host.

### Introduction

Carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ) in the atmosphere is the main source of carbon for plants. Photosynthetic leaves of vascular plants or source tissues produce sucrose and starch as end products of photosynthesis. Starch is the main form of plant carbon and energy storage found in plastids and sucrose biosynthesis occurs in the cytoplasm of the source tissues. Sucrose is the main soluble carbohydrate that most plants use to translocate carbon from source tissues to non-photosynthetic or sink tissues. Carbon partitioning and allocation in plants are mediated by a complex molecular machinery involving intrinsic plant processes related to cell differentiation and organ development during the plant ontogenetic cycle (Poorter & Nagel, 2000; Poorter & Pothmann, 1992). During these processes, the activity of key enzymes involved in sucrose biosynthesis, such as Sucrose-Phosphate Synthase (SPS; EC 2.4.1.14) and Fructose bis-phosphatase (FBPase; EC 3.1.3.11) (Chen et al., 2005; Kerr & Huber, 1987; Lunn & ap Rees, 1990), but also the sucrose catabolic

1  
2  
3 35 enzymes Sucrose Synthase (SuSy; EC 2.4.1.13) and Invertases (EC 3.2.1.26), play fundamental roles  
4 36 (Bihmidine et al., 2013; Koch, 2004; Koch et al., 1996). Carbon dynamics in plants are also determined by  
5 37 the activity of transporter proteins such as the monosaccharide transporters from the major facilitator  
6 38 superfamily, the Sugar Will Eventually be Exported Transporters (SWEET) and Sucrose Transporters  
7 39 (SUT) (Braun, 2012; Kühn & Grof, 2010; Reuscher et al., 2014).

11 40 Plants can establish complex interactions with mutualistic microorganisms that have the potential to modify  
12 41 the activities of source or sink tissues, or both, resulting in alterations in the dynamics of carbon partitioning  
13 42 and allocation (Hartmann et al., 2020; Hennion et al., 2019). A ubiquitous plant-microbial interaction is the  
14 43 so-called arbuscular mycorrhiza. Arbuscular mycorrhiza (AM) is established with a wide variety of plant  
15 44 species from most phylogenetic clades and a monophyletic group of fungi clustered in the subphylum  
16 45 Glomeromycotina (Spatafora et al., 2016). Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are heterotrophic  
17 46 organisms that require establishing a mycorrhizal association with plants to complete their life cycle. They  
18 47 develop within cortical cells forming dichotomously branched structures called arbuscules, which are  
19 48 considered the main site of nutrient exchange between the AMF and the plant (Genre et al., 2020). The  
20 49 arbuscules have a complex anatomy: they are surrounded by the periarbuscular membrane that originates as  
21 50 an extension from the plasma membrane of the cortical cell; the apoplastic space between the periarbuscular  
22 51 membrane and the arbuscule is called the periarbuscular space (Gutjahr & Parniske, 2013; Ivanov et al.,  
23 52 2019). When the mycorrhizal interaction is established, AMF demand a carbon source from the plant in the  
24 53 form of carbohydrates and lipids derived from fatty acid (FA) such as 2-monoacylglycerol (Jiang et al.,  
25 54 2017; Luginbuehl et al., 2017; Salmeron-Santiago et al., 2022; Wipf et al., 2019). In return, the fungus  
26 55 improves plant acquisition of mineral nutrients and water from the soil, and other benefits for the host,  
27 56 including increased tolerance to biotic and abiotic stresses (Begum et al., 2019; Jung et al., 2012), thus the  
28 57 symbiosis is considered as mutualistic (Genre et al., 2020).

29 58 Even when AMF have been widely recognized as plant growth promoters, there is a broad phenotypic  
30 59 response of plants to mycorrhizae. When plant growth improves as a result of the AMF colonization, it is  
31 60 defined as a positive phenotypic response; a response is considered neutral when the mycorrhiza does not  
32 61 cause significant changes in plant growth; conversely, a negative plant phenotype is expressed when plant  
33 62 growth is repressed as the result of AMF colonization in roots (Lü et al., 2018; Smith et al., 2011).

34 63 AMF can enhance plant uptake of minerals such as nitrogen, phosphorus (P), potassium, and micronutrients  
35 64 from the soil, and this is believed to be a key aspect of plant growth promotion (Chen et al., 2018; Liu et al.,  
36 65 2019; Ruytinx et al., 2020; Smith et al., 2011; Wang et al., 2020; Xu et al., 2007). Notably, AM colonization  
37 66 is highly responsive to P availability and its uptake by a mycorrhizal-dependent pathway is a plant strategy  
38 67 to cope with low P availability in soils (Chiu & Paszkowski, 2019; Ferrol et al., 2019). In different plant  
39 68 models, AMF colonization is limited or inhibited when plants develop under conditions of P sufficiency,

1  
2  
3 69 while low P availability triggers AMF colonization in roots and the expression of genetic elements that  
4 70 encompass the molecular mechanisms of P uptake through AM-dependent pathways (Balzergue et al., 2013;  
5 71 Ferrol et al., 2019; Nouri et al., 2014; Xu et al., 2007). However, plants growing under low P conditions  
6 72 may also exhibit negative phenotypes to the AM symbiosis (for review, see Janos 2007).

7 73 Plant growth enhancement by AMF is a multifactorial phenomenon. Metadata analysis in mycorrhizal  
8 74 legumes revealed that enhancement of nutrient uptake by AM does not fully explain plant growth promotion,  
9 75 but is also related to stimulation of sink activity, increasing the harvest index (seed production in relation to  
10 76 total shoot dry weight) (Kaschuk et al., 2009). This suggests that carbon partitioning and allocation also  
11 77 play a significant role in promoting the growth of mycorrhizal plants.

12 78 AMF carbon demands are fulfilled by carbohydrates transported from source tissues to the sink colonized  
13 79 roots (Gutjahr et al., 2011). Regarding FA, it is also known that sucrose and its catabolic products are the  
14 80 main carbon source that supports their biosynthesis in plant tissues (Lim et al., 2017; Ma et al., 2017).  
15 81 Studies performed in *S. lycopersicum* have revealed the existence of a molecular mechanism that controls  
16 82 the amount of carbohydrates in the periarbuscular space; the disruption of this mechanism, mediated by a  
17 83 SUT transporter, abolishes the positive phenotype displayed by the mycorrhizal colonization, suggesting  
18 84 that the control of the carbon supply to the AMF is crucial to favor the expression of positive growth  
19 85 responses in mycorrhizal plants (Bitterlich et al., 2014).

20 86 Regarding the trade of P and carbon in arbuscular mycorrhizae, AMF species promoting P uptake in  
21 87 *Medicago truncatula* allocate higher amounts of carbon from the host than those that do not significantly  
22 88 enhance P uptake, suggesting that during symbiosis, both, the plant and the fungal partners may sense  
23 89 differences on the nutrients supplied and that both can regulate their own allocation of resources (Kiers et  
24 90 al., 2011). Similar approaches comparing AMF species displaying positive or neutral phenotypes in *Glycine*  
25 91 *max* genotypes have explored the importance of carbon and lipid metabolism in such interactions, and have  
26 92 proposed that while lipid metabolism is stimulated to the same level in mycorrhizal plants exhibiting  
27 93 different phenotypes, there is a significant reconfiguration of carbon metabolism in terms of sucrose  
28 94 transport and catabolism in mycorrhizal plants with positive phenotypes (Zhao et al., 2019).

29 95 We hypothesize that the amount and source of carbon invested in AM by the plant will depend on the P  
30 96 availability and will determine the phenotype of the plant and the mycorrhizal performance. To gain insight  
31 97 into the carbon dynamics in plants displaying contrasting phenotypes in response to AM symbiosis, we  
32 98 manipulated P supply to *S. lycopersicum* plants inoculated with *Rhizophagus irregularis* to promote the  
33 99 expression of positive, neutral, and negative phenotypes. We quantified the performance of the AMF in the  
34 100 roots of inoculated plants by staining fungal structures within roots, quantifying the intraradical fungal lipid  
35 101 biomarker 16:1 $\omega$ 5, and determining the number of spores in their substrate. We also analyzed the pattern of

1  
2  
3 102 soluble sugars and starch content in source leaves and roots, in response to AMF inoculation in the three  
4 103 contrasting phenotypes.

5  
6 104

## 7 105 **Materials and methods**

### 8 106 **Plant and fungal models, experimental design, and culture conditions**

9 107 The fungus *R. irregularis* (DAOM 197198) was propagated by inoculating spores obtained from monoxenic  
10 108 carrot root cultures (Maldonado-Mendoza & Harrison, 2018) into tomato (*Solanum lycopersicum*) plants  
11 109 kept in nursery bags containing sand. Tomato plants were grown for at least eight weeks under greenhouse  
12 110 conditions and the sand was subsequently used as mycorrhizal inoculum. The inoculum contained one spore  
13 111 of *R. irregularis* per g and carried tomato colonized root fragments and mycelia. The macronutrient content  
14 112 of the mycorrhizal inoculum in milligrams per kilogram ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) corresponded to 35.8, P (Bray extractable  
15 113 P); 5.72, N-NO<sub>3</sub>; 21.3, K; 345, Ca; 12.3, Mg; 105, Na; and 9.26, S.

16 114 Tomato (*S. lycopersicum*) seeds of the Río Grande genotype were surface disinfected in 5% commercial  
17 115 solution of sodium hypochlorite (10 min) and rinsed five times with sterilized distilled water. The seeds  
18 116 were then placed in tyndallised peat and watered with distilled water until germination. After 15 days, the  
19 117 seedlings with expanded cotyledons were transplanted into nursery bags and maintained under greenhouse  
20 118 conditions. Prior to transplanting, arbuscular mycorrhizal inoculation was performed by adding 150 g of  
21 119 mycorrhizal inoculum in nursery bags filled with 1 L of tyndallised silica sand. Non-colonized controls were  
22 120 supplemented with 150 g of the same mycorrhizal inoculant, previously tyndallised to eliminate mycorrhizal  
23 121 propagules. After transplanting, non-inoculated controls were supplemented with 50 mL of a mycorrhizal  
24 122 inoculum suspension (10 grams of inoculum and suspended in 90 mL of distilled water) filtered through a  
25 123 37  $\mu\text{M}$  sieve and cotton fibber.

26 124 Colonized and non-colonized plants were fertilized twice a week with 25 mL of Long-Ashton nutrient  
27 125 solution with different concentrations of monobasic sodium phosphate corresponding to 0 mM (Null P),  
28 126 0.065 mM (Low P), and 1.3 mM (High P) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, this last concentration of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> is the one originally  
29 127 described as the source of inorganic phosphate (Pi) for the Long-Ashton nutrient solution (Smith et al. 1983).  
30 128 The plants were watered with 25-50 mL of distilled water when necessary.

31 129 Tomato plants were kept under greenhouse conditions for eight weeks after transplanting, arranged in a  
32 130 completely randomized design consisting of six treatments, each with five biological replicates. Each  
33 131 biological replicate consisted of a nursery bag containing one tomato plant from each treatment.

34 132

### 35 133 **Non-destructive morphometric and physiological determinations and plant harvest**

36 134 Morphometric and physiologic variables were quantified from non-mycorrhizal and mycorrhizal 10-week-  
37 135 old tomato plants. Height (cm), stem diameter (mm), and root length (cm) were measured. The biovolume

1  
2  
3 136 index was calculated according to the formula proposed by Hatchel et al. (1985). Root volume (cm<sup>3</sup>) was  
4 137 determined by water displacement in a graduated cylinder and root length (cm) was measured. Total shoot  
5 138 and root fresh weight (FW) (g) was also registered. Leaf area and SPAD units were calculated from the two  
6 139 youngest, fully expanded leaves closest to the shoot apex, these two leaves will be subsequently referred to  
7 140 as source leaf 1 (SL1) and source leaf 2 (SL2), the youngest and the second youngest expanded leaves,  
8 141 respectively (Figs. 2B, C). The leaf area of SL1 and SL2 was estimated using digital photographs and the  
9 142 software image J (Schneider et al., 2012), and the SPAD units with a SPAD-502 meter.  
10 143 SL1 and SL2 leaflets and roots aliquots from all biological replicates per treatment were cut and snap-frozen  
11 144 in liquid nitrogen during the 9 to 11 AM light period, and subsequently stored at -80°C. The rest of the plant  
12 145 tissues were fresh weighted and later dried at 70°C (48 h) to determine shoot and root dry weight (DW).  
13 146

#### 147 **Quantification of mycorrhizal colonization of roots and the spore content of the substrate**

148 To visualize AM colonization, dried tomato roots were cleared and stained using a modified Phillips and  
149 Hayman (1970) protocol. Roots were hydrolysed by autoclaving at 121°C in 10% KOH (10 min), after  
150 decanting the KOH solution, roots were rinsed three times with distilled water and cleared with 1% HCl (1  
151 min); then 0.05% trypan blue in acetoglycerol (27 mL acetic acid; 33 mL glycerol; 40 mL H<sub>2</sub>O) was added  
152 and autoclaved at 121°C (10 min). Thirty-six 1 cm long root fragments from three biological replicates of  
153 each treatment were mounted on slides and observed under light microscopy to classify the mycorrhizal  
154 colonization and quantify arbuscules and vesicles according to Trouvelot et al. (1896).

155 AMF spores were extracted from the substrate where the plants grew during the experiment. Spores were  
156 extracted by wet sieving and decantation (Gerdemann & Nicolson, 1963) followed by centrifugation (595  
157 g, 1 min) with 46% sucrose. The number of spores is expressed as the mean of three independent replicates  
158 of 50 g of substrate.  
159

#### 160 **Quantification of the AM biomarker lipid 16:1 $\omega$ 5**

161 The quantification of the AM biomarker lipid 16:1 $\omega$ 5 was performed in at least three replicates of each  
162 treatment from non-mycorrhizal and mycorrhizal roots by gas chromatography with the Microbial  
163 Identification System (MIDI, Inc., Newark, DE, USA). The results are expressed in nanomole of the AM  
164 biomarker lipid 16:1 $\omega$ 5 per gram of FW (nM g FW). Whole-cell fatty acids (WCFA) were extracted from  
165 the root samples employing a four-step fatty acid extraction procedure according to a method by Sasser  
166 (Sasser, 1990): (i) saponification, (ii) methylation, (iii) extraction, and (iv) base wash. To enable  
167 quantification of the extracted fatty acid methyl esters, an internal standard, nonadeconoate fatty acid methyl  
168 ester, was added to each sample. Twenty-five mg freeze-dried root samples were saponified in 2.0 ml of a  
169 solution of NaOH in 50% methanol in a glass vial placed in a 100 °C water bath for 5 min. The glass vial

1  
2  
3 170 was vigorously vortexed for 10 s and returned to the water bath for an additional 25 min. After cooling,  
4  
5 171 samples were methylated by adding 4 ml of a solution of 325 ml of 6 N HCl + 275 ml of methanol (99.9%)  
6  
7 172 and placed in an 80 °C water bath for 10 min. The fatty acid methyl esters were extracted by adding 2.5 ml  
8  
9 173 of a 50% hexane 50% methyl tert-butyl ether solution and mixing the vials for 5 min in a rotary shaker,  
10  
11 174 followed by removal of the aqueous lower phase. The organic extract was washed with 6 ml of a 0.3 M  
12  
13 175 solution of NaOH in H<sub>2</sub>O to remove non-methylated fatty acids and other residues. The organic phase was  
14  
15 176 then transferred to another glass vial and capped.

16 177 Analyses of fatty acid methyl esters were performed using the software package Sherlock (version 6.0;  
17  
18 178 MIDI Inc., Newark, DE) and an HP6890 GC fitted with a 25-m fused silica capillary column (HP part no.  
19  
20 179 19091B-102) and hydrogen as carrier gas. The injector temperature was 250°C and the detector temperature  
21  
22 180 was 300°C. The temperature program was as follows: initial temperature of 170°C increasing to 270°C at  
23  
24 181 5°C/min. In all, 2 µl per sample was injected. The MIDI software automatically controlled all gas  
25  
26 182 chromatography operations, including calibration, subsequent sample sequencing, peak integration, and  
27  
28 183 naming. Calibration standards contained a mixture of straight-chain saturated and hydroxy fatty acid methyl  
29  
30 184 esters with a length of 10 to 20 carbon (MIDI part no. 1200A).

31  
32 185  
33  
34 186 **Soluble sugar and starch content**

35 187 Frozen plant tissues were pulverized in a mortar with liquid nitrogen. Grinded aliquots from each sample  
36  
37 188 (25-50 mg) were mixed with 500 µL of 80% ethanol (v/v) and incubated at 80°C (30 min). Then, it was  
38  
39 189 centrifuged at 14875 g (15 min) and the supernatant was collected in a 2 mL tube. The aqueous-ethanolic  
40  
41 190 extraction steps were repeated four times and the supernatants were collected in a single tube per sample.  
42  
43 191 Later, the 80% ethanol was evaporated by incubating at 60°C (12-15 h) and the content of the tube was  
44  
45 192 resuspended in 1 mL distilled water, centrifuged as described above, and transferred to a new tube, obtaining  
46  
47 193 the soluble sugar extract (SSE). The mass debris from each 25-50 mg sample was additionally extracted  
48  
49 194 twice more with 80% ethanol, subsequently, the debris pellet was dried and stored to later quantify starch.

50 195 Total soluble sugars were quantified by the phenol-sulfuric acid method (DuBois et al., 1956). The reaction  
51  
52 196 mixtures consisted of 50 µL SSE, 80 µL of 5% phenol, and 500 µL of 98% sulphuric acid. Distilled water  
53  
54 197 was added to a final volume of 780 µL. Reactions were incubated at room temperature (15 min) and  
55  
56 198 absorbance was measured at 490 nm. Total soluble sugars were estimated from a calibration curve using  
57  
58 199 glucose as standard and reported as µg of glucose per mg of FW (µg Glc mg<sup>-1</sup> FW).

59 200 Total reducing sugars were quantified using the Somogy-Nelson reagents (Nelson, 1944; Somogyi, 1952).  
60  
61 201 Reaction mixtures consisted of 50 µL SSE mixed with 400 µL Somogy's copper reagent and distilled water  
62  
63 202 to a final volume of 600 µL. Reactions were incubated at 100°C (45 min) and after this, cooled at room  
64  
65 203 temperature in darkness (30 min). Then, 400 µL of Nelson's reagent was added to a final volume of 1 mL,

204 and reactions were incubated in darkness at room temperature (30 min). Absorbance was measured at 550  
205 nm. A calibration curve using glucose as standard was performed. Reducing sugars are reported as  $\mu\text{g}$  of  
206 glucose per mg of FW ( $\mu\text{g Glc mg}^{-1}$  FW).

207 Total ketose sugars were quantified based on the resorcinol reagent method (Roe, 1934). Reaction mixtures  
208 consisted of 50  $\mu\text{L}$  of SSE, 100  $\mu\text{L}$  of resorcinol reagent (0.1% resorcinol; diluted in 96% ethanol), and 700  
209  $\mu\text{L}$  of concentrated HCl. Distilled water was added to a final volume of 1 mL. Reactions were incubated at  
210 80°C (15 min) and cooled at room temperature (15 min). Absorbance was measured at 520 nm. Total ketose  
211 sugar content was estimated from a calibration curve using fructose as standard and expressed as  $\mu\text{g}$  of  
212 fructose per mg of FW ( $\mu\text{g Fru mg}^{-1}$  FW).

213 Non-reducing ketoses were quantified with the resorcinol reagent. An aliquot of 50  $\mu\text{L}$  of SSE was first  
214 incubated at 100°C with 0.2 N NaOH at a final volume of 400  $\mu\text{L}$  to hydrolyse free hexoses. Reactions were  
215 mixed with 100  $\mu\text{L}$  resorcinol reagent and 500  $\mu\text{L}$  of HCl, then were incubated at 80°C (15 min).  
216 Absorbance was measured at 520 nm. The content of total non-reducing ketose sugars was estimated from  
217 a calibration curve using sucrose as standard and reported as  $\mu\text{g}$  of sucrose per mg of FW ( $\mu\text{g Suc mg}^{-1}$   
218 FW).

219 Reducing ketoses were estimated by subtracting the calculated molar fructose equivalents in the fraction of  
220 non-reducing ketoses from total ketoses; the result is expressed in mass units as  $\mu\text{g Fru mg}^{-1}$  FW.

221 Starch was quantified based on the protocol reported by Smith and Zeeman (2006) with modifications as  
222 follows: the ethanol-extracted and dried debris pellets were resuspended in 200  $\mu\text{L}$  of distilled water and  
223 heated at 100°C (45 min), then it was cooled at room temperature (15 min). Subsequently, 300  $\mu\text{L}$  of a  
224 reaction mixture consisting of 1.7  $\mu\text{L}$  of  $\alpha$ -amylase (Sigma A3403) and 1.1  $\mu\text{L}$   $\alpha$ -amylglucosidase (Sigma  
225 A1602) in 0.2 M sodium acetate buffer (pH 5.4) was added. The reactions were incubated at 37°C (24 h).  
226 Reducing sugars were quantified from a 50  $\mu\text{L}$  aliquot of a 1:10 dilution of the enzymatically hydrolysed  
227 starch with Somogy-Nelson's reagents as described above. Starch content was estimated from a calibration  
228 curve using glucose as standard and expressed as  $\mu\text{g}$  of glucose per mg of FW ( $\mu\text{g Glc mg}^{-1}$  FW). Total  
229 soluble sugar to starch ratios were calculated as the amount of total soluble sugars per starch content based  
230 on individual leaves and roots samples.

231  
232 **Statistical analysis**

233 Statistical analyses were performed using SAS OnDemand for Academics (SAS Institute Inc.) software. At  
234 least three independent replicates per treatment were used to conduct the statistical analysis. Data normality  
235 was evaluated by the Shapiro-Wilk test and the homogeneity of variance using the Levene test. Data that  
236 met normality and homoscedasticity were compared using Student's *t*-test or analysis of variance (ANOVA)  
237 by means of the ANOVA or GLM procedures when data were balanced or unbalanced, respectively,

1  
2  
3 238 followed by Fischer's or Tukey's comparisons of means, respectively ( $p=0.05$ ). Pearson's correlation  
4 239 coefficient was calculated with the PROC CORR procedure (SAS).

5  
6 240 To compare the influence of  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  concentration and mycorrhizal colonization among the six treatments  
7  
8 241 on the data obtained, we performed a comparison by two-factorial ANOVA, considering  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  condition  
9 242 (Null, Low, and High P) and plant *R. irregularis* colonization (presence or absence). These analyses were  
10 243 followed by Tukey's comparison of means test ( $p = 0.05$ ).

12 244

## 14 245 **Results**

### 16 246 **Intraradical AMF biomass and spore yield accumulate differentially under contrasting P levels**

17 247 To find three doses of P that lead to contrasting levels of mycorrhizal colonization, we set up a preliminary  
18  
19 248 experiment of *R. irregularis* inoculation in tomato plants maintained under six different concentrations of  
20 249  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ranging from 0 mM to 1.3 mM. We also evaluated the potential effect of the modified osmotic  
21  
22 250 potential of Long-Ashton nutrient solution under lower  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  concentrations on mycorrhizal  
23  
24 251 colonization. Our results showed that 0 mM, 0.065 mM, and 1.3 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , referred to here as Null P,  
25 252 Low P, and High P, respectively, exhibited contrasting patterns of mycorrhizal colonization. We also  
26  
27 253 observed that modifications of the osmotic potential of the nutrient solution by reducing or eliminating the  
28 254 P source did not significantly change colonization levels in mycorrhizal plants (data not shown).

29  
30 255 To analyze the performance of AM colonization under the three P fertilization conditions, we compared the  
31 256 quantification of intraradical mycorrhizal structures according to Trouvelot et al. (1986); the accumulation  
32  
33 257 of fungal biomass by quantifying 16:1 $\omega$ 5 in roots and the content of spores in the substrate of mycorrhizal  
34  
35 258 tomato plants.

36 259 Mycorrhizal plants in Null and Low P showed a high percentage of colonization in all mycorrhizal  
37 260 parameters measured, presenting more than 60% intensity of intraradical mycorrhizal colonization (M%)  
38 261 and over 50% arbuscule abundance (A%), with no significant differences between the two P conditions;  
39 262 while all mycorrhizal colonization parameters were drastically reduced in plants growing in High P. The  
40  
41 263 mycorrhizal colonization intensity within the colonized root fragments (m%) was the only parameter with  
42  
43 264 similar results between the three P conditions (Fig. 1A).

44  
45 265 To compare colonization percentages with intraradical fungal biomass accumulation, we quantified the  
46 266 neutral lipid fatty acid 16:1 $\omega$ 5, which is a quantitative biomarker to estimate AM biomass in plant roots in  
47 267 mycorrhizal and non-mycorrhizal plants. The accumulation of the neutral lipid fatty acid 16:1 $\omega$ 5, showed a  
48  
49 268 negative Pearson correlation coefficient with the P condition ( $r^2 = -0.77816$ ;  $p>0.05$ ), suggesting that the  
50  
51 269 reduction of P correlates with the increase in AM biomass accumulation. The accumulation of 16:1 $\omega$ 5 in  
52  
53 270 colonized plants under Low P was 3.5 and 40 times higher than under Null P and High P, respectively (Fig.  
54  
55 271 1B).|

1  
2  
3 272 The quantification of spores negatively correlated with the concentration of P ( $r^2 = -0.93031$ ;  $p > 0.05$ ). The  
4 273 substrate spore count of Null P plants was significantly ( $p > 0.05$ ) higher, showing 1.63 to 125 times more  
5 274 spores than Null P and High P, respectively. (Fig. 1C).  
6  
7

8 275

### 9 276 **Phosphate availability modulates host phenotypic response to arbuscular mycorrhiza**

10 277 The phenotypic response of tomato to *R. irregularis* was characterized under the three P conditions. The  
11 278 morphometric phenotype of ten-week-old tomato plants was dramatically different under the three P  
12 279 fertilization conditions. While High P plants showed the highest and most developed morphometric and  
13 280 physiological phenotypes, all development values were significantly reduced ( $p > 0.05$ ) in plants under Low  
14 281 and Null P (Fig. 2A). Additionally, decreasing the level of P fertilization in Null P and Low P plants,  
15 282 significantly reduced ( $p > 0.05$ ) the values of the variables corresponding to the shoots DW, roots DW, and  
16 283 total DW. Shoot DW was reduced more than 10- and 6-fold under Null P and Low P conditions, respectively,  
17 284 compared to shoot DW from High P plants, while root and total DW were reduced more 15-fold in Low and  
18 285 Null P plants, compared to High P plants; the values of these variables were not significantly different  
19 286 between mycorrhizal and non-mycorrhizal plants at each level of P fertilization (Table 1).  
20

21 287 Mycorrhizal colonization under Null P significantly ( $p > 0.05$ ) reduced plant development. In this condition,  
22 288 the height of colonized plants was reduced by 0.73 times, the biovolume index decreased by 0.72 times, and  
23 289 the leaf area of SL1 was reduced by 0.7 times, compared to non-colonized plants (Figs. 3A-C). However,  
24 290 SPAD units in the source leaves of Null P mycorrhizal plants were significantly ( $p > 0.05$ ) increased by at  
25 291 least six units in both SL1 and SL2 (Figs. 3E, F).  
26

27 292 Low P conditions reversed the growth suppression exerted by the mycorrhizal treatment that was observed  
28 293 in Null P plants. In fact, mycorrhizal plants under Low P showed a 1.3-fold increase in SL1 area, compared  
29 294 to non-mycorrhizal plants under the same P level (Fig. 3C). Although, no significant ( $p > 0.05$ ) differences  
30 295 were found in the SPAD units of source leaves (SL1 and SL2) between mycorrhizal and non-mycorrhizal  
31 296 plants in Low P.  
32

33 297 Mycorrhizal plants under High P showed morphometric and physiological variables statistically similar to  
34 298 non-mycorrhizal plants, except for SL1 SPAD units that increased by 3 units in the mycorrhizal treatment  
35 299 ( $p > 0.05$ ) (Fig. 3E).  
36

37 300 Root developmental parameters were altered by P availability, but mycorrhizal conditions did not show a  
38 301 significant effect. Root volume was significantly ( $p > 0.05$ ) decreased by P reduction in the nutrient solution  
39 302 more than 3-fold in Null P and Low P plants, compared to High P plants. Root length was statistically  
40 303 similar in all treatments, but the ratio of root length to shoot height was at least 1.4-fold greater in Null P  
41 304 and Low P plants than in High P, which denotes changes in root architecture under conditions of P deficiency  
42 305 (Fig. S1).  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 306 **Soluble sugars and starch partitioning and allocation in source and sink tissues are modified by the**  
4  
5 307 **P availability and the mycorrhizal colonization**

6 308 To ascertain whether carbohydrate partitioning and allocation in plants are altered under the three P  
7  
8 309 fertilization and mycorrhizal colonization conditions, different soluble sugar fractions and starch content  
9  
10 310 were quantified in source leaves and roots.

11 311 Starch content in plant source leaves was not significantly altered by mycorrhizal colonization at any P level  
12  
13 312 (Fig. 4A). However, source leaves of all mycorrhizal plants showed an increase in soluble sugars content of  
14  
15 313 1.7 to 2.2 times higher than non-mycorrhizal plants, regardless of the P condition (Fig. 4B).

16 314 Mycorrhizal colonization under Null P significantly ( $p>0.05$ ) promoted the increase of total reducing sugars  
17  
18 315 by 1.3 times more than in non-mycorrhizal plants, as well as the content of both total ketoses and total  
19  
20 316 reducing ketoses, which increased 1.2 times in mycorrhizal plants (Figs. 4C, D, F), but no significant  
21  
22 317 differences were shown in non-reducing ketoses (Fig. 4E). All quantified soluble sugar fractions in source  
23  
24 318 leaves were statistically similar between mycorrhizal and non-mycorrhizal plants under Low and High P  
25  
26 319 conditions (Figs. 4C-F).

27 320 As observed in the source leaves, no differences were found in the starch content of the roots of mycorrhizal  
28  
29 321 and non-mycorrhizal plants under any P conditions (Fig. 5A). However, while total soluble sugars and total  
30  
31 322 reducing sugars were statistically similar in mycorrhizal roots in Null P and High P treatments compared to  
32  
33 323 non-mycorrhizal plants in the same P conditions, mycorrhizal colonization at Low P caused a decrease in  
34  
35 324 the content of soluble sugars in the roots. In Low P, total soluble sugars, total reducing sugars, and reducing  
36  
37 325 ketoses in roots were 1.69, 1.84, and 1.28 times higher in non-mycorrhizal than in mycorrhizal plants (Figs.  
38  
39 326 5B, C, F). Under Null P, the roots of non-mycorrhizal plants showed a 1.25-fold increase in total ketoses  
40  
41 327 than mycorrhizal plants (Fig. 5D). Nevertheless, the reduction of total ketoses in the roots of mycorrhizal  
42  
43 328 plants did not significantly modify the accumulation of total soluble sugars, compared to non-mycorrhizal  
44  
45 329 plants (Fig. 5B).

46 330 To further explore the effect of P availability and mycorrhizal colonization on carbohydrate partitioning and  
47  
48 331 allocation in plants, the ratio of total soluble sugars to starch in source leaves and roots was determined. The  
49  
50 332 ratio of total soluble sugars to starch in source leaves was significantly ( $p>0.05$ ) 1.6-fold higher in  
51  
52 333 mycorrhizal plants than in non-mycorrhizal plants under High P conditions (Fig. 6A). The overall effect of  
53  
54 334 mycorrhizal colonization caused a 1.6 -fold increase in the ratio of total soluble sugar to starch in source  
55  
56 335 leaves (Fig. 6B); while reducing the P content in the nutrient solution at Null P and Low P caused a 3- and  
57  
58 336 3.1-fold decreased, respectively, in the ratio of the total soluble sugars to starch ratio compared to High P  
59  
60 337 was observed as a 3- and 3.1-fold decrease in the total soluble sugars to starch (Fig. 6C). Mycorrhizal  
61  
62 338 colonization did not significantly changed the ratio of total soluble sugar to starch in the roots of plants  
63  
64 339 growing at any P level (Fig. 6 D), these results were consistent when comparing mycorrhizal and non-

1  
2  
3 340 mycorrhizal plants regardless of the level of P applied during fertilization (Fig. 6E). As in the source leaves,  
4 341 roots of plants under Null P and Low P, the ratio of total soluble sugars to starch were reduced by 1.87 and  
5 342 1.8, respectively, compared to High P (Fig. 6F). These results suggest that arbuscular mycorrhiza promotes  
6 343 the allocation of the carbon fixed during photosynthesis to the biosynthesis of soluble sugars that would be  
7 344 subsequently partitioned to mycorrhizal roots, despite the carbon accumulation as starch that caused the  
8 345 reduction of the total soluble sugar and starch ratio in source leaves under Null and Low P conditions.  
9 346 Similarly, Null P and Low P plants also accumulate starch in roots as a response to P deficiency.  
10  
11  
12  
13  
14  
15

## 16 348 **Discussion**

### 17 349 **Specific mycorrhizal *S. lycopersicum* phenotype depending on P availability**

18  
19 350 Different degrees of colonization and plant growth responses, from positive to negative, have been  
20 351 previously described in mycorrhizal interactions, which can result from colonization by different AM fungi  
21 352 or the plant species or even varieties in the interaction. The outcome of the plant growth phenotype depends  
22 353 on the balance of benefits and costs of the interaction, determined not only by the interaction of plant and  
23 354 AM but also by environmental conditions, including P availability (Smith et al., 2011).

24  
25  
26  
27 355 Here we show that *S. lycopersicum* responds to P fertilization levels in most of the measured plant variables.  
28 356 Furthermore, the impact of mycorrhizal colonization on plant phenotype was dependent on P fertilization  
29 357 levels, revealing a broad plant phenotypic response to AM symbiosis according to nutrient availability.

30  
31 358 Plants lacking P fertilization (Null P) only had available P added with the mycorrhizal inoculant. This  
32 359 extremely limiting condition caused a very poor development of the plants. However, Null P plants  
33 360 inoculated with *R. irregularis* showed abundant intraradical AM colonization, yet exhibited a negative  
34 361 growth response, evidenced by a reduction of morphometric variables such as height and biovolume index,  
35 362 but also marked reduction in the source leaf area (Figs. 3A-C) which could be due to P competition between  
36 363 plant and fungal symbionts (Fig. 7). Mycorrhizal colonization could reduce plant growth under conditions  
37 364 of low P availability through P-limiting competition between AMF and the host plant, coupled with  
38 365 increased carbon sink strength of AMF colonized roots, while photosynthetic organs in young mycorrhizal  
39 366 plants are still poorly developed, which also limits photosynthates for plant establishment (Janos, 2007).  
40  
41 367 However, it has been previously described that *S. lycopersicum* seedlings inoculated with *Funneliformis*  
42 368 *mosseae* show better growth features and reduced stress response compared to non-inoculated seedlings  
43 369 when grown under a P condition that improves the growth of mycorrhizal plants (Cesaro et al., 2020). It  
44 370 was previously proposed that negative responses to plant growth in mycorrhizae in their early stages of  
45 371 development may be transitory until plants develop photosynthetic tissues to ensure carbon supply (Janos,  
46 372 2007). However, we observed suppression of mycorrhizal plant growth under P starvation in plants that had  
47 373 already developed true leaves.  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### 374 **Mycorrhizal colonization in contrasting plant growth phenotypes**

375 The “aggressiveness” of AMF colonization has also been proposed as a cause of growth suppression in  
376 mycorrhizal plants, whereby AMF species that colonize roots heavily may reduce the growth of wheat  
377 (*Triticum aestivum* cv. Kulin) under both low and high P fertilization (Graham & Abbott, 2000). *R.*  
378 *irregularis* is characterized by a high root colonization capacity in short periods of time, compared to other  
379 AMF species (Hart & Reader, 2002; Werner & Kiers, 2015). Here we found that the content of intraradical  
380 mycorrhizal structures was high and similar in plants under Null or Low P, but the intraradical fungal  
381 biomass determined by the concentration of 16:105 in roots indicated a higher content of AMF in plants  
382 under Low P, which had shown a positive response to mycorrhizal colonization (Fig. 1). Likewise, high  
383 levels of colonization have been achieved in *Petunia hybrida* fertilized with  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  concentrations ranging  
384 from 0 to 0.1 mM (Nouri et al., 2014), and in *Medicago truncatula* plants fertilized with 0.0075 mM  
385  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Balzergue et al., 2013). Therefore, the aggressiveness of the mycorrhizal colonization in the root  
386 system does not correlate with our observations regarding the expression of negative or positive effects on  
387 plants in response to the colonization by a single AMF species. In contrast, we observed that despite high  
388 colonization of plant tissues and very high accumulation of AMF fungal biomass in the roots, mycorrhizal  
389 colonization can generate a positive response in *S. lycopersicum*, which was expressed as an increase in the  
390 source tissues in plants under Low P.

### 392 **Positive mycorrhizal response relates to higher photosynthetic potential**

393 Solubility and composition of P sources were recently reported to affect the interaction between tomato and  
394 *R. irregularis* (Andrino et al., 2021). Mycorrhizal plants fertilized with a highly soluble Pi source ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )  
395 showed higher leaf area and photosynthetic rate than non-mycorrhizal or mycorrhizal plants fertilized with  
396 an organic P source (phytic acid) or with a low-solubility P source (apatite) (Andrino et al., 2021). These  
397 results suggest that the P provided as orthophosphate is more efficiently taken up from the substrate, assisted  
398 by the AMF, and plants increase their photosynthetic area and carbon fixation rate to meet the carbon  
399 demands of AMF (Andrino et al., 2021). Our results on the increased area and soluble sugars of source  
400 leaves of *S. lycopersicum* promoted by *R. irregularis* under Low P support this idea, suggesting that in this  
401 condition, P is transferred to the plant by the AMF.

402 We also found higher SPAD values in SL1 from mycorrhizal plants under Null and High P conditions, with  
403 a more pronounced difference in Null P, this was also observed in SL2 SPAD units from mycorrhizal plants  
404 under Null P conditions. Increased SPAD unit values due to mycorrhizal colonization have been previously  
405 noticed in different plant species (Campanelli et al., 2013; Lopez de Andrade et al., 2015; Saia et al., 2020).  
406 There is a positive correlation between the increase in SPAD units and the improvement of photosynthetic  
407 rate (Reis et al., 2009). However, increased SPAD units have also been associated with impaired PSII and

1  
2  
3 408 are considered an indicator of stress responses in flag leaves, the main source tissues in rice (Kumagai et  
4 409 al., 2009). We observed positive responses to mycorrhizal colonization as an increase in the photosynthetic  
5 410 area of source leaves at Low P, without significantly altering SPAD units, whereas mycorrhizal plants  
6 411 expressing a negative or neutral response showed significant increases in SPAD units, regardless of the  
7 412 absence of changes in the leaf area. Suggesting that when mycorrhizae promote growth responses in P-  
8 413 limiting conditions, the increased partitioning of fixed carbon for the biosynthesis of soluble sugars in source  
9 414 leaves could be the result of increases in photosynthetic rate and photosynthetic leaf area, along with  
10 415 attenuation of the stress response in photosynthetic tissues.  
11  
12  
13  
14  
15  
16

#### 17 416 18 417 **P availability determines soluble sugars and starch partitioning and allocation in mycorrhizal plants**

19 418 It has been previously reported that the levels of soluble sugar content and SPS activity in *Poncirus trifoliata*  
20 419 leaves increase in response to AM colonization by different AMF species (Wu et al., 2017). The in vivo  
21 420 irreversible reaction catalyzed by SPS activity is a rate-limiting step in the sucrose biosynthesis from  
22 421 photosynthesis-derived triose-P (Lunn & ap Rees, 1990), thus determining the amount of carbon that can  
23 422 be partitioned between plant organs. The overall increase in the ratio of total soluble sugar to starch in the  
24 423 source leaves in mycorrhizal tomato plants observed in our results suggests that *R. irregularis* colonization  
25 424 promotes carbon partitioning for the biosynthesis of soluble sugars that would be allocated to sink organs,  
26 425 regardless of the phenotypic response to mycorrhizal colonization.  
27  
28  
29  
30

31 426 Previous reports have shown that P deficiency upregulates AGPase activity, increasing starch content and  
32 427 releasing P from Calvin Cycle intermediates to ATP biosynthesis during photophosphorylation (MacNeill  
33 428 et al., 2017), while starch accumulation in the roots is the result of greater sink strength, together with an  
34 429 increased C partitioning to starch biosynthesis (Hammond & White, 2008). Here we report that P starvation  
35 430 favors starch accumulation in source leaves and roots and reduces the soluble sugar to starch ratio, compared  
36 431 to High P conditions; while the starch content between mycorrhizal and non-mycorrhizal plants growing at  
37 432 the three P levels was statistically similar in source leaves or roots. Suggesting that P starvation increases  
38 433 starch content in source and sink tissues. The evaluation of *Lotus japonicus* mutants impaired in starch  
39 434 biosynthesis or degradation concluded that root starch metabolism is not altered by mycorrhizal  
40 435 colonization, and suggested that the fungus takes up most of the carbon in the form of soluble sugars  
41 436 transported from source tissues to the colonized roots (Gutjahr et al., 2011). Our results support this view  
42 437 and additionally suggest that starch metabolism in source leaves and roots is not significantly altered when  
43 438 plants exhibit positive or negative growth responses to AM colonization.  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### 442 **Enhancement of the sink capacity of roots in mycorrhizal plants**

443 A reduction in the soluble sugar content in leaves has been previously described as a response to increased  
444 mobilization of soluble sugars from source tissues to mycorrhizal roots (Doidy et al., 2012; Goddard et al.,  
445 2021). These differences could be related to factors that control nutrient supply to the AMF, such as  
446 circadian regulation, light quality and intensity, plant age, and mycorrhizal stage of development (Salmeron  
447 et al., 2022).

448 The colonization of *S. lycopersicum* by *F. mosseae* promotes the accumulation of sucrose and fructose and  
449 reduces the glucose content in roots, which suggests an improvement of the sink capacity of roots colonized  
450 by AM, allocating greater amounts of sucrose than in the roots of non-mycorrhizal plants, while the reduction  
451 of the glucose fraction in the roots points to the hexose uptake capacity of AMF (Boldt et al., 2011). These  
452 effects on the soluble sugars content are consistent with increased activity of SUT transporters and  
453 apoplastic invertases in the periarbuscular space, which promote the translocation of sucrose from source  
454 tissues to mycorrhizal roots and the periarbuscular space, where sucrose is hydrolysed to glucose and  
455 fructose (Bitterlich et al., 2014; Boldt et al., 2011; García-Rodríguez et al., 2007; Schaarschmidt et al.,  
456 2006). In our results, only the roots of mycorrhizal plants under Low P conditions showed a reduced content  
457 of total soluble sugars compared to non-mycorrhizal plants, particularly in the fraction of total reducing  
458 sugars, which includes glucose and total reducing ketoses. Suggesting that mycorrhizal plants exhibiting  
459 positive growth responses increase their carbohydrate catabolic capacity to provide hexoses that are directly  
460 taken up by AMF.

461 The increase in the amount of 16:1 $\omega$ 5 quantified in mycorrhizal plants grown under Low P suggests that  
462 positive mycorrhizal phenotypes are related to higher intraradical fungal biomass and that it promotes the  
463 allocation of carbon to AMF in the form of lipids, promoting P uptake via AMF under P limiting conditions.  
464 This view supports the hypothesis that plants invest more carbon when they perceive a benefit in terms of  
465 P uptake from AMF (Kiers et al., 2011).

466 Plants that showed a negative growth response to mycorrhizal colonization had similar total soluble sugar  
467 content in their roots to non-mycorrhizal plants. This result suggests that carbon may not be the limiting  
468 factor in a negative response to AM colonization; instead, P deficiency could be the main driver of a negative  
469 plant phenotype (Fig. 7). In addition, the lower development of intraradical fungal biomass under this P  
470 conditions suggests that the carbon transferred to the AMF depends on the “reward” received by the AMF  
471 (van’t Padje et al., 2021).

472

### 473 **P availability determines carbon partitioning to the AMF.**

474 Spores are the final carbon sinks of AMF, the fungal structures where they store mainly lipids and, to a  
475 lesser extent, glycogen (Rich et al., 2017). In previous studies, in vitro sporulation of *R. irregularis* in

1  
2  
3 476 monoxenic cultures was enhanced by reducing the concentration of P in the media; likewise, in mycorrhizal  
4 477 *Zea mays* under greenhouse conditions, spore formation was greater when fertilization with P was omitted  
5  
6 478 (Maitra et al., 2021). Consistent with this, we observed the highest number of spores in the substrate of  
7  
8 479 mycorrhizal plants grown under Null P, which exhibited a negative response to mycorrhization. During the  
9  
10 480 time course of the experiment, the Null P mycorrhizal plants only obtained the P contained in the  
11  
12 481 mycorrhizal inoculum. It suggests that under P-limiting conditions, AMF allocates the received carbon  
13  
14 482 predominantly towards extraradical resistance structures (Fig. 7). When positive growth responses to the  
15  
16 483 mycorrhizae were observed, AMF increased their intraradical biomass and significantly reduced  
17  
18 484 sporulation. Suggesting that under such conditions, the carbon allocated to the AMF is predominantly used  
19  
20 485 to build the intraradical hyphae network to support the bidirectional flow of nutrients between both  
21  
22 486 symbionts (Fig. 7).

23  
24 487 The reincorporation of sucrose from the periarbuscular space to the cytoplasm of the cortical cell has been  
25  
26 488 previously proposed as a mechanism to control the supply of carbon to the AMF. In *S. lycopersicum* this  
27  
28 489 reincorporation is mediated by the SISUT2 transporter; thus, silencing *SISUT2* abolishes the positive growth  
29  
30 490 response to AM symbiosis and increases fungal colonization in roots (Bitterlich et al., 2014). In *M.*  
31  
32 491 *truncatula*, the increased expression of the SUT transporter family members under low P conditions  
33  
34 492 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.13 mM) was even greater under *Rhizophagus* sp. colonization (Doidy et al., 2012). These  
35  
36 493 findings suggest that both P-limiting conditions and the presence of AMF in roots promote the expression  
37  
38 494 of this mechanism to regulate carbon allocation to AMF. Consistent with this conception, in our results,  
39  
40 495 plants that exhibited a negative response to AM colonization showed reduced fungal biomass in the roots,  
41  
42 496 compared to plants with a positive phenotype (Fig. 1 B), suggesting that this mechanism could be highly  
43  
44 497 expressed under extreme P starvation, reducing the intraradical fungal development. However, it could also  
45  
46 498 suggest that alternative mechanisms related to lipid transfer to AMF directly impact AMF biomass  
47  
48 499 accumulation when P becomes a limiting factor.

49  
50 500 Carbohydrates are the main source of carbon transferred from plants to AMF, yet they are also required to  
51  
52 501 support FA biosynthesis (Ma et al., 2017). To generate these storage lipids, 2-monoacylglycerol is first  
53  
54 502 produced in the host plant, and subsequently transferred to the AMF where FA biosynthesis and biomass  
55  
56 503 accumulation are completed (Jiang et al., 2017; Luginbuehl et al., 2017).

57 504

## 58 505 **Conclusion**

59 506 The scheme in Fig. 7 integrates our findings and conclusions. Consistent with our results, we hypothesize  
60 507 that AM colonization enhances sink strength even at low levels of colonization; moreover, C allocated to  
508 starch biosynthesis in source tissues promoted by P deficiency under Null and Low P conditions does not  
509 limit the source strength stimulation exerted by mycorrhizal colonization. The increased source strength

510 provides a greater amount of soluble sugars to be delivered to mycorrhizal sinks. Simultaneously, sink  
511 strength is enhanced in mycorrhizal roots by the presence of the AMF.

512 The accumulation of soluble sugars in the roots of mycorrhizal plants under P deficient conditions is a  
513 consequence of the increased sink capacity of roots, leading to suppression of plant growth. But the host  
514 plant would restrict the C reward to the fungal partner, as a consequence of the low P provided by the AMF,  
515 limiting the growth of fungal intraradical biomass. Resource restriction to the AMF would thus promote  
516 spore formation.

517 A positive growth response to AM colonization requires the host plant to invest a higher proportion of  
518 carbohydrates, but also lipids, in supplying to the AMF. In such conditions, the host plant allocates a higher  
519 proportion of soluble sugars to the AMF, as well as of 2-monoacylglycerol, which supports the 16:1 $\omega$ 5  
520 biosynthesis and, subsequently, biomass production and carbon storage in AMF. Consequently, it leads to  
521 the reduction of the content of soluble sugars in the mycorrhizal roots. Mycorrhizal plants growing under  
522 Low P would take up P via the mycorrhizal pathway, thus C taken up by AMF would be preferentially  
523 allocated to fungal biomass synthesis to maintain a bidirectional nutrient flux, while the C allocated to spores  
524 formation would be reduced.

525 This suggests that positive or negative plant growth responses to mycorrhizal colonization are a consequence  
526 of partitioning and allocation of carbon among tissues and metabolism in the host, influenced by AMF.  
527 Further studies on gene expression and enzymatic activities of molecular elements that regulate carbon  
528 partitioning and allocation in plants will reveal the host-imposed molecular mechanisms to regulate the  
529 amount of C allocated to sustain AMF demand in the mycorrhizal symbiosis.

530 |

### 531 **Author contributions**

532  
533 A.T.C.-B., I.A.S.-S., and M.M.-T. conceived the idea; A.T.C.-B. and I.A.S.-S. performed the experiments;  
534 J.L. conducted the lipid quantification analysis experiments; I.A.S.-S., and A.T.C.-B. writing—original  
535 draft preparation; A.T.C.-B., J.J.V.-A., and M.M.-T. funding acquisition; All authors participated in data  
536 analysis, writing-review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the  
537 manuscript.

538

### 539 **Acknowledgments**

540  
541 The authors wish to acknowledge I. E. Maldonado-Mendoza and M. López-Meyer for the kind donation of  
542 the *in vitro* monoxenic cultured spores of *R. irregularis* (DAOM 197198), which we propagated to generate  
543 the inoculum used in this work. I. A. S.-S. received a scholarship (732373) granted by the Consejo Nacional

1  
2  
3 544 de Ciencia y Tecnología (CONACYT). To conduct this research A. T. C.-B. provided funding from  
4 545 Coordinación de la Investigación Científica (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo), project  
5 546 (5872608).  
6  
7

8 547

9 548 **Data availability statement**

10 549

11 550 The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable  
12 551 request.  
13  
14  
15

16 552

17 553 **References**

18  
19 554 Andrino, A., Guggenberger, G., Sauheitl, L., Burkart, S., & Boy, J. (2021). Carbon investment into  
20 555 mobilization of mineral and organic phosphorus by arbuscular mycorrhiza. *Biology and Fertility of*  
21 556 *Soils*, 57(1), 47–64. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01505-5>

22  
23 557 Balzergue, C., Chabaud, M., Barker, D. G., Bécard, G., & Rochange, S. F. (2013). High phosphate reduces  
24 558 host ability to develop arbuscular mycorrhizal symbiosis without affecting root calcium spiking  
25 559 responses to the fungus. *Frontiers in Plant Science*, 4, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00426>

26  
27 560 Begum, N., Qin, C., Ahanger, M. A., Raza, S., Khan, M. I., Ashraf, M., Ahmed, N., & Zhang, L. (2019).  
28 561 Role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant growth regulation: Implications in abiotic stress  
29 562 tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01068>

30  
31 563 Bihmidine, S., Hunter, C. T., Johns, C. E., Koch, K. E., & Braun, D. M. (2013). Regulation of assimilate  
32 564 import into sink organs: Update on molecular drivers of sink strength. *Frontiers in Plant Science*, 4,  
33 565 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00177>

34  
35 566 Bitterlich, M., Krügel, U., Boldt-Burisch, K., Franken, P., & Kühn, C. (2014). The sucrose transporter  
36 567 SISUT2 from tomato interacts with brassinosteroid functioning and affects arbuscular mycorrhiza  
37 568 formation. *Plant Journal*, 78(5), 877–889. <https://doi.org/10.1111/tpj.12515>

38  
39 569 Boldt, K., Pörs, Y., Haupt, B., Bitterlich, M., Kühn, C., Grimm, B., & Franken, P. (2011). Photochemical  
40 570 processes, carbon assimilation and RNA accumulation of sucrose transporter genes in tomato  
41 571 arbuscular mycorrhiza. *Journal of Plant Physiology*, 168(11), 1256–1263.  
42 572 <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.01.026>

43  
44 573 Braun, D. M. (2012). SWEET! The pathway is complete. *Science*, 335(6065), 173–174.  
45 574 <https://doi.org/10.1126/science.1216828>

46  
47 575 Campanelli, A., Ruta, C., Mastro, G. De, & Morone-Fortunato, I. (2013). The role of arbuscular mycorrhizal  
48 576 fungi in alleviating salt stress in *Medicago sativa* L. var. icon. *Symbiosis*, 59(2), 65–76.  
49 577 <https://doi.org/10.1007/s13199-012-0191-1>

- 1  
2  
3 578 Cesaro, P., Massa, N., Cantamessa, S., Todeschini, V., Bona, E., Berta, G., Barbato, R., & Lingua, G. (2020).  
4 579 Tomato responses to *Funneliformis mosseae* during the early stages of arbuscular mycorrhizal  
5 580 symbiosis. *Mycorrhiza*, 30(5), 601–610. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00973-9>  
6  
7  
8 581 Chen, A., Gu, M., Wang, S., Chen, J., & Xu, G. (2018). Transport properties and regulatory roles of nitrogen  
9 582 in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 74, 80–88.  
10 583 <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.06.015>  
11  
12 584 Chen, S., Hajirezaei, M., & Börnke, F. (2005). Differential expression of sucrose-phosphate synthase  
13 585 isoenzymes in tobacco reflects their functional specialization during dark-governed starch  
14 586 mobilization in source leaves. *Plant Physiology*, 139(3), 1163–1174.  
15 587 <https://doi.org/10.1104/pp.105.069468>  
16  
17  
18 588 Chiu, C. H., & Paszkowski, U. (2019). Mechanisms and impact of symbiotic phosphate acquisition. *Cold*  
19 589 *Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034603>  
20  
21  
22 590 Doidy, J., Van Tuinen, D., Lamotte, O., Corneillat, M., Alcaraz, G., & Wipf, D. (2012). The *Medicago*  
23 591 *truncatula* sucrose transporter family: Characterization and implication of key members in carbon  
24 592 partitioning towards arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Plant*, 5(6), 1346–1358.  
25 593 <https://doi.org/10.1093/mp/sss079>  
26  
27  
28 594 DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for  
29 595 determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.  
30 596 <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>  
31  
32  
33 597 Ferrol, N., Azcón-Aguilar, C., & Pérez-Tienda, J. (2019). Review: Arbuscular mycorrhizas as key players  
34 598 in sustainable plant phosphorus acquisition: An overview on the mechanisms involved. *Plant Science*,  
35 599 280, 441–447. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.11.011>  
36  
37  
38 600 García-Rodríguez, S., Azcón-Aguilar, C., & Ferrol, N. (2007). Transcriptional regulation of host enzymes  
39 601 involved in the cleavage of sucrose during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Physiologia Plantarum*,  
40 602 129(4), 737–746. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00873.x>  
41  
42  
43 603 Genre, A., Lanfranco, L., Perotto, S., & Bonfante, P. (2020). Unique and common traits in mycorrhizal  
44 604 symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 18(11), 649–660. [https://doi.org/10.1038/s41579-020-](https://doi.org/10.1038/s41579-020-0402-3)  
45 605 0402-3  
46  
47  
48 606 Gerdemann, J. W., & Nicolson, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil  
49 607 by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46(2), 235–244.  
50 608 [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(63)80079-0)  
51  
52  
53 609 Goddard, M. L., Belval, L., Martin, I. R., Roth, L., Laloue, H., Deglène-Benbrahim, L., Valat, L., Bertsch,  
54 610 C., & Chong, J. (2021). Arbuscular mycorrhizal symbiosis triggers major changes in primary  
55 611 metabolism together with modification of defense responses and signaling in both roots and leaves of

- 1  
2  
3 612 *Vitis vinifera*. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.721614>
- 4  
5 613 Graham, J. H., & Abbott, L. K. (2000). Wheat responses to aggressive and non-aggressive arbuscular  
6 614 mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 220(1–2), 207–218. <https://doi.org/10.1023/a:1004709209009>
- 7  
8 615 Gutjahr, C., Novero, M., Welham, T., Wang, T., & Bonfante, P. (2011). Root starch accumulation in  
9 616 response to arbuscular mycorrhizal colonization differs among *Lotus japonicus* starch mutants. *Planta*,  
10 617 234(3), 639–646. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1472-2>
- 11  
12 618 Gutjahr, C., & Parniske, M. (2013). Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis.  
13 619 *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 29, 593–617. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122413>
- 14  
15 620  
16 621 Hammond, J. P., & White, P. J. (2008). Sucrose transport in the phloem: Integrating root responses to  
17 622 phosphorus starvation. *Journal of Experimental Botany*, 59(1), 93–109.  
18 623 <https://doi.org/10.1093/jxb/erm221>
- 19  
20 624 Hart, M. M., & Reader, R. J. (2002). Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular  
21 625 mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 153(2), 335–344. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646X.2001.00312.x>
- 22  
23 626  
24 627 Hartmann, H., Bahn, M., Carbone, M., & Richardson, A. D. (2020). Plant carbon allocation in a changing  
25 628 world – challenges and progress: introduction to a Virtual Issue on carbon allocation. *New Phytologist*,  
26 629 227(4), 981–988. <https://doi.org/10.1111/nph.16757>
- 27  
28 630 Hatchel, G. E., Berry, C. R., & Muse, H. D. (1985). Nondestructive indices related to aboveground biomass  
29 631 of young loblolly and sand pines on ectomycorrhizal and fertilizer plots. *Forest Science*, 31(2), 419–  
30 632 427. <https://doi.org/doi.org/10.1093/forestscience/31.2.419>
- 31  
32 633 Hennion, N., Durand, M., Vriet, C., Doidy, J., Maurousset, L., Lemoine, R., & Pourtau, N. (2019). Sugars  
33 634 en route to the roots. Transport, metabolism and storage within plant roots and towards  
34 635 microorganisms of the rhizosphere. *Physiologia Plantarum*, 165(1), 44–57.  
35 636 <https://doi.org/10.1111/ppl.12751>
- 36  
37 637 Ivanov, S., Austin, J., Berg, R. H., & Harrison, M. J. (2019). Extensive membrane systems at the host–  
38 638 arbuscular mycorrhizal fungus interface. *Nature Plants*, 5(2), 194–203.  
39 639 <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0364-5>
- 40  
41 640 Janos, D. P. (2007). Plant responsiveness to mycorrhizas differs from dependence upon mycorrhizas.  
42 641 *Mycorrhiza*, 17(2), 75–91. <https://doi.org/10.1007/s00572-006-0094-1>
- 43  
44 642 Jiang, Y., Wang, W., Xie, Q., Liu, N., Liu, L., Wang, D., Zhang, X., Yang, C., Chen, X., Tang, D., & Wang,  
45 643 E. (2017). Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi.  
46 644 *Science*, 356(6343), 1172–1175. <https://doi.org/10.1126/science.aam9970>
- 47  
48 645 Jung, S. C., Martinez-Medina, A., Lopez-Raez, J. A., & Pozo, M. J. (2012). Mycorrhiza-induced resistance  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 646 and priming of plant defenses. *Journal of Chemical Ecology*, 38(6), 651–664.  
4 647 <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0134-6>
- 6 648 Kaschuk, G., Kuyper, T. W., Leffelaar, P. A., Hungria, M., & Giller, K. E. (2009). Are the rates of  
7 649 photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal  
8 650 symbioses? *Soil Biology and Biochemistry*, 41(6), 1233–1244.  
9 651 <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.03.005>
- 12 652 Kerr, P. S., & Huber, S. C. (1987). Coordinate control of sucrose formation in soybean leaves by sucrose-  
13 653 phosphate synthase and fructose-2,6-bisphosphate. *Planta*, 170(2), 197–204.  
14 654 <https://doi.org/10.1007/BF00397888>
- 17 655 Kiers, E. T., Duhamel, M., Beesetty, Y., Mensah, J. A., Franken, O., Verbruggen, E., Fellbaum, C. R.,  
18 656 Kowalchuk, G. A., Hart, M. M., Bago, A., Palmer, T. M., West, S. A., Vandenkoornhuys, P., Jansa,  
19 657 J., & Bücking, H. (2011). Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis.  
20 658 *Science*, 333(6044), 880–882. <https://doi.org/10.1126/science.1208473>
- 23 659 Koch, K. (2004). Sucrose metabolism: Regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant  
24 660 development. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(3), 235–246.  
25 661 <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.03.014>
- 28 662 Koch, K. E., Wu, Y., & Xu, J. (1996). Sugar and metabolic regulation of genes for sucrose metabolism:  
29 663 potential influence of maize sucrose synthase and soluble invertase responses on carbon partitioning  
30 664 and sugar sensing1. *Journal of Experimental Botany*, 47(Special\_Issue), 1179–1185.  
31 665 [https://doi.org/10.1093/jxb/47.Special\\_Issue.1179](https://doi.org/10.1093/jxb/47.Special_Issue.1179)
- 33 666 Kühn, C., & Grof, C. P. L. (2010). Sucrose transporters of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*,  
34 667 13(3), 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.02.001>
- 38 668 Kumagai, E., Araki, T., & Kubota, F. (2009). Correlation of chlorophyll meter readings with gas exchange  
39 669 and chlorophyll fluorescence in flag leaves of rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Plant Production Science*,  
40 670 12(1), 50–53. <https://doi.org/10.1626/pp.12.50>
- 42 671 Lim, G. H., Singhal, R., Kachroo, A., & Kachroo, P. (2017). Fatty acid- and lipid-mediated signaling in  
43 672 plant defense. *Annual Review of Phytopathology*, 55, 505–536. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035406>
- 47 674 Liu, J., Liu, J., Liu, J., Cui, M., Huang, Y., Tian, Y., Chen, A., & Xu, G. (2019). The potassium transporter  
48 675 SIHAK10 is involved in mycorrhizal potassium uptake. *Plant Physiology*, 180(1), 465–479.  
49 676 <https://doi.org/10.1104/pp.18.01533>
- 52 677 Lopez de Andrade, S. A., Domingues, A. P., & Mazzafera, P. (2015). Photosynthesis is induced in rice  
53 678 plants that associate with arbuscular mycorrhizal fungi and are grown under arsenate and arsenite  
54 679 stress. *Chemosphere*, 134, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.023>

- 1  
2  
3 680 Lü, L.-H., Zou, Y.-N., & Wu, Q.-S. (2018). Relationship between arbuscular mycorrhizas and plant growth:  
4 improvement or depression? In B. Giri, R. Prasad, & A. Varma (Eds.), *Root biology*. Elsevier, Cham,  
5 681 Switzerland, pp. 451–464. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75910-4\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75910-4_18)  
6 682  
7  
8 683 Luginbuehl, L. H., Menard, G. N., Kurup, S., Van Erp, H., Radhakrishnan, G. V., Breakspear, A., Oldroyd,  
9 G. E. D., & Eastmond, P. J. (2017). Fatty acids in arbuscular mycorrhizal fungi are synthesized by the  
10 684 host plant. *Science*, 356(6343), 1175–1178. <https://doi.org/10.1126/science.aan0081>  
11 685  
12 686 Lunn, J. E., & ap Rees, T. (1990). Apparent equilibrium constant and mass-action ratio for sucrose-  
13 phosphate synthase in seeds of *Pisum sativum*. *Biochemical Journal*, 267(3), 739–743.  
14 687 <https://doi.org/10.1042/bj2670739>  
15 688  
16 689 Ma, Y., Yin, Z., & Ye, J. (2017). Lipid Biosynthesis and Regulation in *Jatropha*, an Emerging Model for  
17 Woody Energy Plants. In S. Tsuchimoto (Ed.), *The Jatropha genome. Compendium of plant genomes*.  
18 690 Springer, Cham, Switzerland, pp. 113-127. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-49653-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-49653-5_7)  
19 691  
20 692 MacNeill, G. J., Mehrpouyan, S., Minow, M. A. A., Patterson, J. A., Tetlow, I. J., & Emes, M. J. (2017).  
21 Starch as a source, starch as a sink: The bifunctional role of starch in carbon allocation. *Journal of*  
22 693 *Experimental Botany*, 68(16), 4433–4453. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx291>  
23 694  
24 695 Maitra, P., Al-Rashid, J., Barman, N. C., Khan, M. N. M., Mandal, D., Rasul, N. M., Chowdhury, A., El-  
25 696 Sappah, A. H., & Li, J. (2021). Sand particle size and phosphorus amount affect *Rhizophagus*  
26 697 *irregularis* spore production using in vitro propagated spore as a starter inoculum in rhizosphere of  
27 698 maize (*Zea mays*) plantlets. *Journal of Fungi*, 7(10). <https://doi.org/10.3390/jof7100846>  
28 699  
29 699 Maldonado-Mendoza, I. E., & Harrison, M. J. (2018). RiArsB and RiMT-11: Two novel genes induced by  
30 700 arsenate in arbuscular mycorrhiza. *Fungal Biology*, 122(2–3), 121–130.  
31 701 <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.11.003>  
32 702  
33 702 Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose.  
34 703 *Journal of Biological Chemistry*, 153(2), 375–380. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)71980-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)71980-7)  
35 704  
36 704 Nouri, E., Breuillin-Sessoms, F., Feller, U., & Reinhardt, D. (2014). Phosphorus and nitrogen regulate  
37 705 arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Petunia hybrida*. *PLoS ONE*, 9(3), e90841.  
38 706 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090841>  
39 707  
40 707 Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and  
41 708 vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British*  
42 709 *Mycological Society*, 55(1). [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(70)80110-3)  
43 710  
44 710 Poorter, H., & Nagel, O. (2000). The role of biomass allocation in the growth response of plants to different  
45 711 levels of light, CO<sub>2</sub>, nutrients and water: a quantitative review. *Australian Journal of Plant*  
46 712 *Physiology*, 27(12), 595–607. [https://doi.org/10.1071/PP99173\\_CO](https://doi.org/10.1071/PP99173_CO)  
47 713  
48 713 Poorter, H., & Pothmann, P. (1992). Growth and carbon economy of a fast-growing and a slow-growing

- 1  
2  
3 714 grass species as dependent on ontogeny. *New Phytologist*, 120(1), 159–166.  
4 715 <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1992.tb01069.x>  
5  
6 716 Reis, A. R., Favarin, J. L., Malavolta, E., Júnior, J. L., & Moraes, M. F. (2009). Photosynthesis, chlorophylls,  
7 717 and SPAD readings in coffee leaves in relation to nitrogen supply. *Communications in Soil Science*  
8 718 *and Plant Analysis*, 40(9–10), 1512–1528. <https://doi.org/10.1080/00103620902820373>  
9  
10 719 Reuscher, S., Akiyama, M., Yasuda, T., Makino, H., Aoki, K., Shibata, D., & Shiratake, K. (2014). The  
11 720 sugar transporter inventory of tomato: Genome-wide identification and expression analysis. *Plant and*  
12 721 *Cell Physiology*, 55(6), 1123–1141. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu052>  
13  
14 722 Rich, M. K., Nouri, E., Courty, P. E., & Reinhardt, D. (2017). Diet of arbuscular mycorrhizal fungi: Bread  
15 723 and butter? *Trends in Plant Science*, 22(8), 652–660. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.05.008>  
16  
17 724 Roe, J. H. (1934). A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine. *Journal of*  
18 725 *Biological Chemistry*, 107(1), 15–22. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)75382-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)75382-9)  
19  
20 726 Ruytinx, J., Kafle, A., Usman, M., Coninx, L., Zimmermann, S. D., & Garcia, K. (2020). Micronutrient  
21 727 transport in mycorrhizal symbiosis; zinc steals the show. *Fungal Biology Reviews*, 34(1), 1–9.  
22 728 <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2019.09.001>  
23  
24 729 Saia, S., Aissa, E., Luziatelli, F., Ruzzi, M., Colla, G., Ficca, A. G., Cardarelli, M., & Roupahel, Y. (2020).  
25 730 Growth-promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi differentially benefit tomato and corn  
26 731 depending upon the supplied form of phosphorus. *Mycorrhiza*, 30(1), 133–147.  
27 732 <https://doi.org/10.1007/s00572-019-00927-w>  
28  
29 733 Salmeron-Santiago, I. A., Martínez-Trujillo, M., Valdez-Alarcón, J. J., Pedraza-Santos, M. E., Santoyo, G.,  
30 734 Pozo, M. J., & Chávez-Bárceñas, A. T. (2022). An updated review on the modulation of carbon  
31 735 partitioning and allocation in arbuscular mycorrhizal plants. *Microorganisms*, 10(1), 1–20.  
32 736 <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010075>  
33  
34 737 Sasser, M. (1990). Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Tech. Note 101,  
35 738 Microbial ID, Inc., Newark.  
36  
37 739 Schaarschmidt, S., Roitsch, T., & Hause, B. (2006). Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the  
38 740 apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Journal of Experimental Botany*  
39 741 57(15), 4015–4023. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl172>  
40  
41 742 Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image  
42 743 analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>  
43  
44 744 Smith, A. M., & Zeeman, S. C. (2006). Quantification of starch in plant tissues. *Nature Protocols*, 1(3),  
45 745 1342–1345. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.232>  
46  
47 746 Smith, G. S., Johnston, C. M., & Cornforth, I. S. (1983). Comparison of nutrient solutions for growth of  
48 747 plants in sand culture. *New Phytologist*, 94(4), 537–548. <https://doi.org/10.1111/j.1469->

- 1  
2  
3 748 8137.1983.tb04863.x  
4  
5 749 Smith, S. E., Jakobsen, I., Grønlund, M., & Smith, F. A. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant  
6 750 phosphorus nutrition: Interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal  
7 751 roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition.  
8 752 *Plant Physiology*, 156(3), 1050–1057. <https://doi.org/10.1104/pp.111.174581>  
9  
10 753 Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, 195(1), 19–23.  
11 754 [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50870-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50870-5)  
12  
13 755 Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., Bonito, G., Corradi,  
14 756 N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A., James, T. Y., O'Donnell, K., Roberson, R. W., Taylor, T. N.,  
15 757 Uehling, J., Vilgalys, R., White, M. M., & Stajich, J. E. (2016). A phylum-level phylogenetic  
16 758 classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108(5), 1028–1046.  
17 759 <https://doi.org/10.3852/16-042>  
18  
19 760 Trouvelot, A., Kough, J. L., & Gianinazzi-Pearson, V. (1896). Mesure du taux de mycorrhization VA d'un  
20 761 système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In V.  
21 762 Gianinazzi-Pearson & S. Gianinazzi (Eds.), *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae* (pp.  
22 763 217–221). INRA Press.  
23  
24 764 van't Padje, A., Werner, G. D. A., & Kiers, E. T. (2021). Mycorrhizal fungi control phosphorus value in  
25 765 trade symbiosis with host roots when exposed to abrupt 'crashes' and 'booms' of resource availability.  
26 766 *New Phytologist*, 229(5), 2933–2944. <https://doi.org/10.1111/nph.17055>  
27  
28 767 Wang, S., Chen, A., Xie, K., Yang, X., Luo, Z., Chen, J., Zeng, D., Ren, Y., Yang, C., Wang, L., Feng, H.,  
29 768 López-Arredondo, D. L., Herrera-Estrella, L. R., & Xu, G. (2020). Functional analysis of the  
30 769 OsNPF4.5 nitrate transporter reveals a conserved mycorrhizal pathway of nitrogen acquisition in  
31 770 plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(28),  
32 771 16649–16659. <https://doi.org/10.1073/pnas.2000926117>  
33  
34 772 Werner, G. D. A., & Kiers, E. T. (2015). Order of arrival structures arbuscular mycorrhizal colonization of  
35 773 plants. *New Phytologist*, 205(4), 1515–1524. <https://doi.org/10.1111/nph.13092>  
36  
37 774 Wipf, D., Krajinski, F., van Tuinen, D., Recorbet, G., & Courty, P. E. (2019). Trading on the arbuscular  
38 775 mycorrhiza market: from arbuscules to common mycorrhizal networks. *New Phytologist*, 223(3),  
39 776 1127–1142. <https://doi.org/10.1111/nph.15775>  
40  
41 777 Wu, H.-H., Zou, Y.-N., Rahman, M. M., Ni, Q.-D., & Wu, Q.-S. (2017). Mycorrhizas alter sucrose and  
42 778 proline metabolism in trifoliolate orange exposed to drought stress. *Scientific Reports*, 7(1), 42389.  
43 779 <https://doi.org/10.1038/srep42389>  
44  
45 780 Xu, G. H., Chague, V., Melamed-Bessudo, C., Kapulnik, Y., Jain, A., Raghobama, K. G., Levy, A. A., &  
46 781 Silber, A. (2007). Functional characterization of LePT4: A phosphate transporter in tomato with

782 mycorrhiza-enhanced expression. *Journal of Experimental Botany*, 58(10), 2491–2501.  
 783 <https://doi.org/10.1093/jxb/erm096>

784 Zhao, S., Chen, A., Chen, C., Li, C., Xia, R., & Wang, X. (2019). Transcriptomic analysis reveals the  
 785 possible roles of sugar metabolism and export for positive mycorrhizal growth responses in soybean.  
 786 *Physiologia Plantarum*, 166(3), 712–728. <https://doi.org/10.1111/ppl.12847>

787

## 788 Figure Legends

789

790 **Fig. 1.** Mycorrhizal colonization of tomato plants under three P fertilization conditions. Intraradical AM  
 791 quantification according to Trouvelot et al. (1986) parameters (A). Root content of AM biomarker lipid  
 792 16:1 $\omega$ 5 (B). *R. irregularis* spore density in the substrate (C). F%, frequency of mycorrhizal colonization;  
 793 M%, intensity of mycorrhizal colonization in the root system; m%, intensity of mycorrhizal colonization in  
 794 root fragments; A%, arbuscule abundance in the root system; a%, arbuscule abundance in colonized root  
 795 fragments; V%, vesicle abundance in the root system; v%, vesicle abundance in colonized root fragments.  
 796 Data represent the average of at least three replicates; significance was determined by ANOVA (A and C)  
 797 or by the GLM procedure (B); error bars are the standard error of the mean; different letters indicate  
 798 significant differences according to Tukey's test ( $\alpha=0.05$ ).

799

800 **Fig. 2** Morphometric phenotype of plants in response to P fertilization and mycorrhizal colonization. Ten-  
 801 week-old tomato plants fertilized twice a week with Long-Ashton nutrient solution with different  
 802 concentrations of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (A). Schematic representation of the position of source leaves in Null and Low  
 803 P (B) and High P (C) plants respectively. M-, non-mycorrhizal plants; M+, mycorrhizal plants; Null P, Low  
 804 P, and High P conditions represent Long Ashton's nutrient fertilization under three NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> concentrations  
 805 (0, 0.065, and 1.3 mM, respectively); IL, immature leaves; SL1, source leaf 1; SL2, source leaf 2.

806

807 **Fig. 3.** Tomato shoot and leaf morphometric response to mycorrhizal colonization under different P  
 808 fertilization conditions. Plant height (A), Biovolume index (B), leaf area of SL1 and SL2 (C and D,  
 809 respectively), and SPAD units corresponding to SL1 and SL2 (E and F, respectively). Data represent the  
 810 average of five replicates; error bars are the standard error of the mean; the asterisk indicates significant  
 811 differences between M – and M+ plants for each P fertilization level (*t*-test,  $\alpha=0.05$ ). M-, non-mycorrhizal  
 812 plants; M+, mycorrhizal plants; Null P, Low P, and High P conditions represent Long Ashton's nutrient  
 813 fertilization under three NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> concentrations (0, 0.065, and 1.3 mM, respectively)

814

1  
2  
3 815 **Fig. 4.** Effect of P availability and mycorrhizal conditions on starch and soluble sugar content in source  
4 816 leaves. Data represent the average of five replicates corresponding to starch (A), total soluble sugars (B),  
5 817 total reducing sugars (C), total ketoses (D), non-reducing ketoses (E), and reducing ketoses (D); error bars  
6 818 are the standard error of the mean; the asterisks indicate significant differences between M- and M+ plants  
7 819 for each P fertilization levels ( $t$ -test,  $\alpha=0.05$ ). M-, non-mycorrhizal plants; M+, mycorrhizal plants; Null P,  
8 820 Low P, and High P conditions represent Long Ashton's nutrient fertilization under three  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
9 821 concentrations (0, 0.065, and 1.3 mM, respectively).  
10  
11  
12  
13

14 822  
15  
16 823 **Fig.5.** Effect of P availability and mycorrhizal conditions on starch and soluble sugar content in tomato  
17 824 roots. Data represent the average of three replicates corresponding to starch (A), total soluble sugars (B),  
18 825 total reducing sugars (C), total ketoses (D), non-reducing ketoses (E), and reducing ketoses (F); error bars  
19 826 are the standard error of the mean; the asterisks indicate significant differences between M - and M+ plants  
20 827 for each P fertilization levels ( $t$ -test,  $\alpha=0.05$ ). M-, non-mycorrhizal plants; M+, mycorrhizal plants; Null P,  
21 828 Low P, and High P conditions represent Long Ashton's nutrient fertilization under three  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
22 829 concentrations (0, 0.065, and 1.3 mM, respectively)  
23  
24  
25  
26

27 830  
28 831 **Fig. 6:** Total soluble sugars to starch ratio in tomato plants growing under the different  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  levels and  
29 832 *R. irregularis* inoculation conditions. Data comparisons represent the average of at least three replicates  
30 833 per treatment of the ratio calculated in source leaves (A) and roots (D). Data were compared by two-way  
31 834 factorial ANOVA considering the three P fertilization levels in source leaves (B) and roots (E) as well as *R.*  
32 835 *irregularis* inoculation in source leaves (C) and roots (F). Error bars are the standard error of the mean;  
33 836 different letters indicate statistical differences according to Tukey's test ( $\alpha=0.05$ ). M-, non-mycorrhizal  
34 837 plants; M+, mycorrhizal plants; Null P, Low P, and High P conditions represent Long Ashton's nutrient  
35 838 fertilization under three  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  concentrations (0, 0.065, and 1.3 mM, respectively).  
36  
37  
38  
39  
40

41 839  
42  
43 840 **Fig. 7.** Effect of P availability and AM colonization on carbon flux and mycorrhizal development. The  
44 841 expression of negative, positive, or neutral plant growth responses to mycorrhizal colonization under three  
45 842 P availability conditions is related to different AM colonization performances, driven by different P  
46 843 acquisition conditions and modified patterns of carbon allocation and partitioning. Patterns of carbon  
47 844 allocation to starch or soluble sugar biosynthesis at High P are modified under Null P or Low P, increasing  
48 845 starch accumulation in source leaves and roots. The presence of AM symbiosis promotes the allocation of  
49 846 carbon to the biosynthesis of the soluble sugars in source tissues, regardless of the plant phenotypic  
50 847 response; while the allocation of carbohydrates and lipids to AMF is increased in plants that show a positive  
51 848 growth response. The development of mycorrhizal colonization also depends on the availability of P,  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 849 showing greater performance under Low P conditions. The dark blue arrows indicate the allocation and  
4 850 partitioning of soluble sugars in source tissues and mycorrhizal roots; light blue arrows indicate carbon  
5 851 allocation to starch biosynthesis in source tissues and roots. Carbon partitioning and allocation in  
6 852 mycorrhizal roots are indicated by arrows as described at the bottom of the scheme. The differences in the  
7 853 thickness of the arrows are in agreement with the intensity of the nutrient fluxes between plant tissues or  
8 854 AMF structures. The Null P, Low P, and High P conditions represent Long Ashton's nutrient fertilization  
9 855 under three  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  concentrations (0, 0.065, and 1.3 mM, respectively).  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

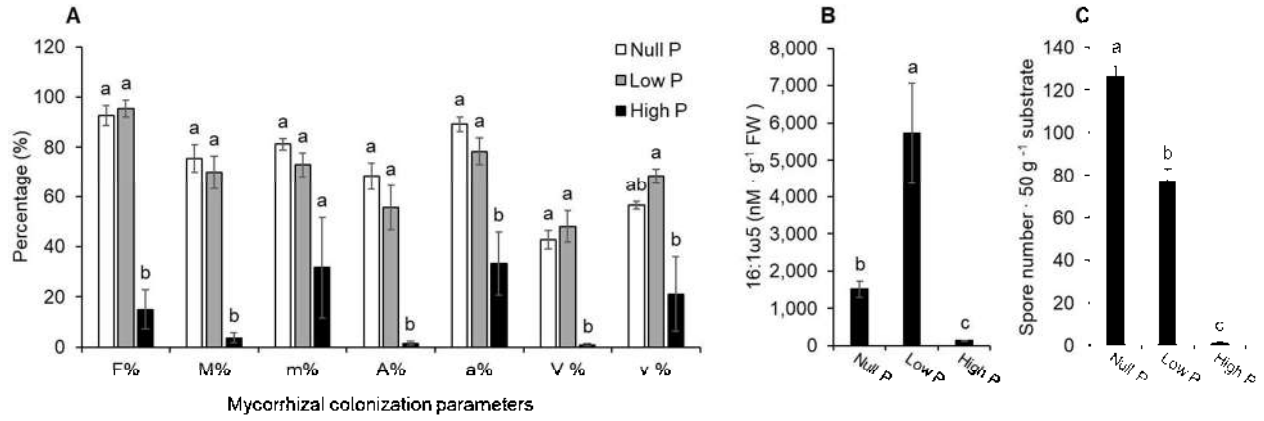


Fig. 1.

875  
876  
877  
878  
879  
880  
881  
882  
883  
884  
885  
886  
887

For Peer Review

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

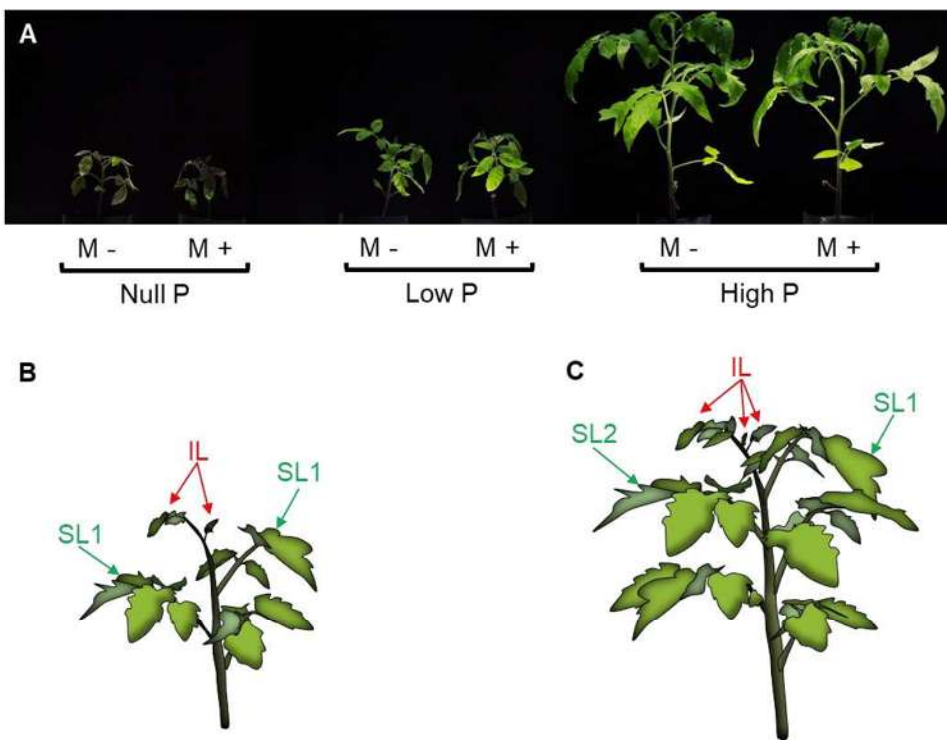


Fig. 2

Peer Review

1  
2  
3 906 **Table 1.** The dry weight of non-mycorrhizal (M -) and mycorrhizal (M +) plants. Data represent the average  
4 of five replicates; significance was determined by ANOVA; ( $\pm$ ) are the standard error of the mean; different  
5 907 letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $\alpha=0.05$ ).  
6 908  
7

8 909

9 910

10 911

11 912

12 913

13 914

14 915

15 916

16 917

17 918

18 919

19 920

20 921

21 922

22 923

23 924

24 925

25 926

26 927

27 928

28 929

29 930

30 931

31 932

32 933

33 934

34 935

35 936

36 937

37 938

38

39

40

41

42

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> concentration	<i>R. irregularis</i> inoculation	Shoot DW	Root DW	Total DW
Null P	M -	0.173 (±0.025) b	0.119 (±0.017) b	0.292 (±0.041) b
	M+	0.126 (±0.014) b	0.098 (±0.018) b	0.224 (±0.03) b
Low P	M -	0.205 (±0.02) b	0.136 (±0.047) b	0.342 (±0.066) b
	M+	0.213 (±0.019) b	0.219 (±0.041) b	0.432 (±0.052) b
High P	M -	1.322 (±0.057) a	3.543 (±0.518) a	4.865 (±0.575) a
	M+	1.279 (±0.068) a	2.384 (±0.485) a	3.66 (±0.522) a

939

940

941

942

943

944

945

946

947

For Peer Review

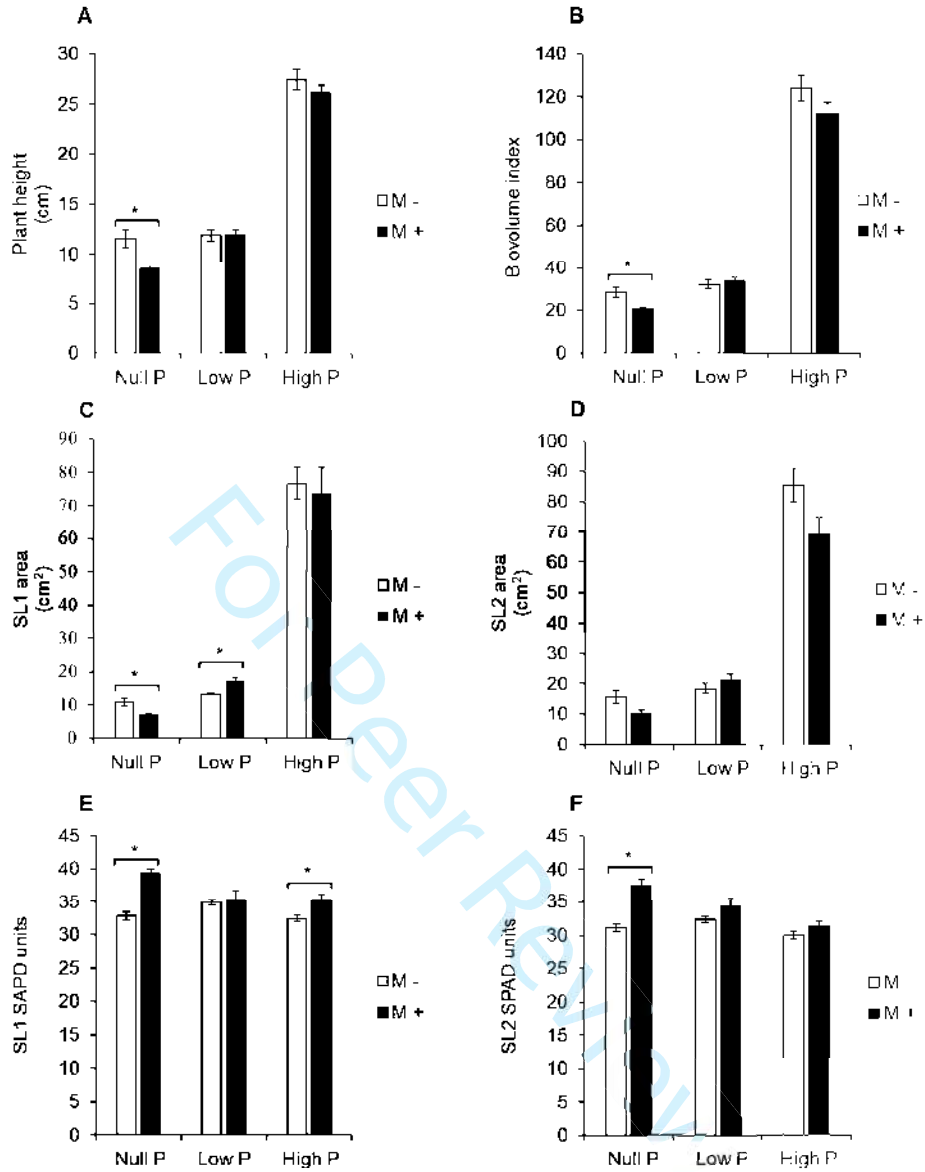


Fig. 3.

948

949

950

951

952

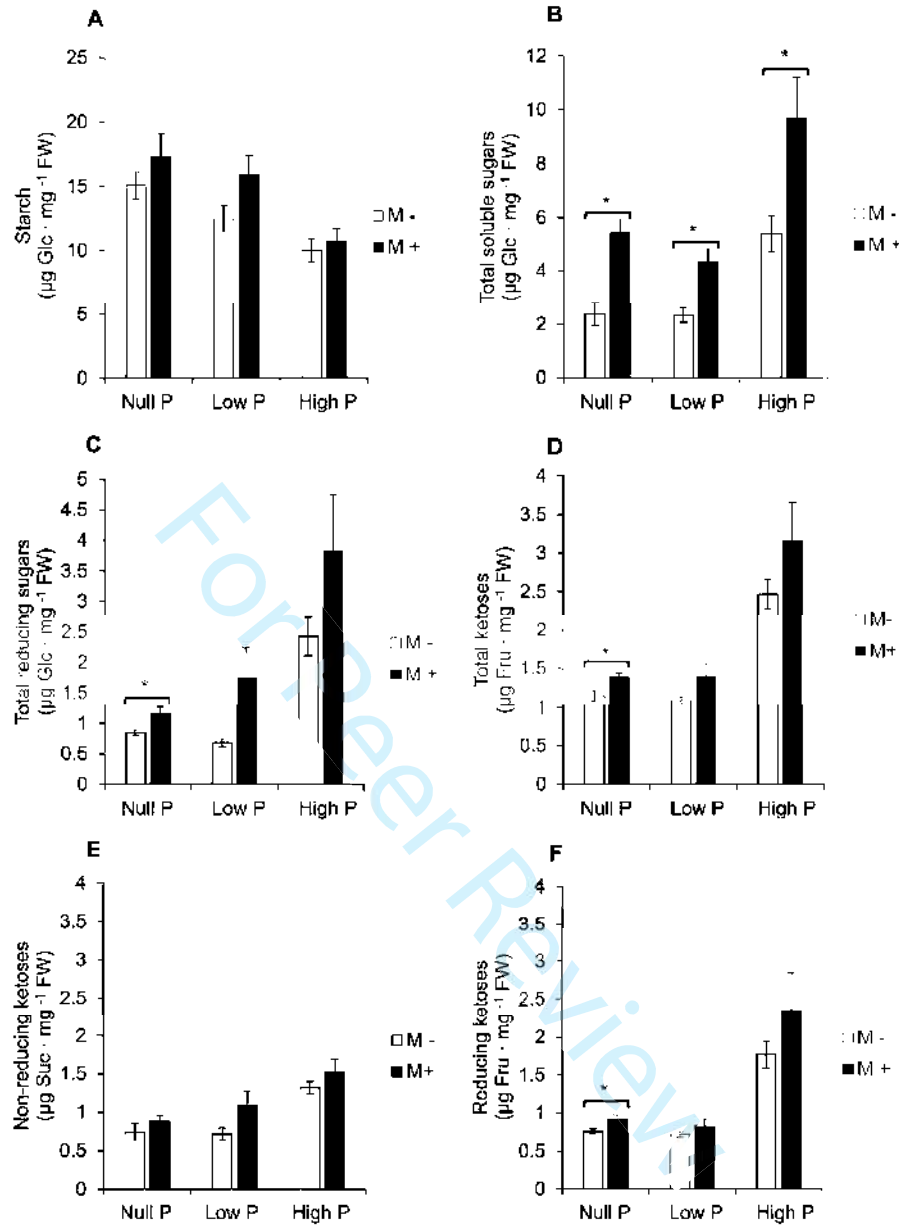


Fig. 4.

953

954

955

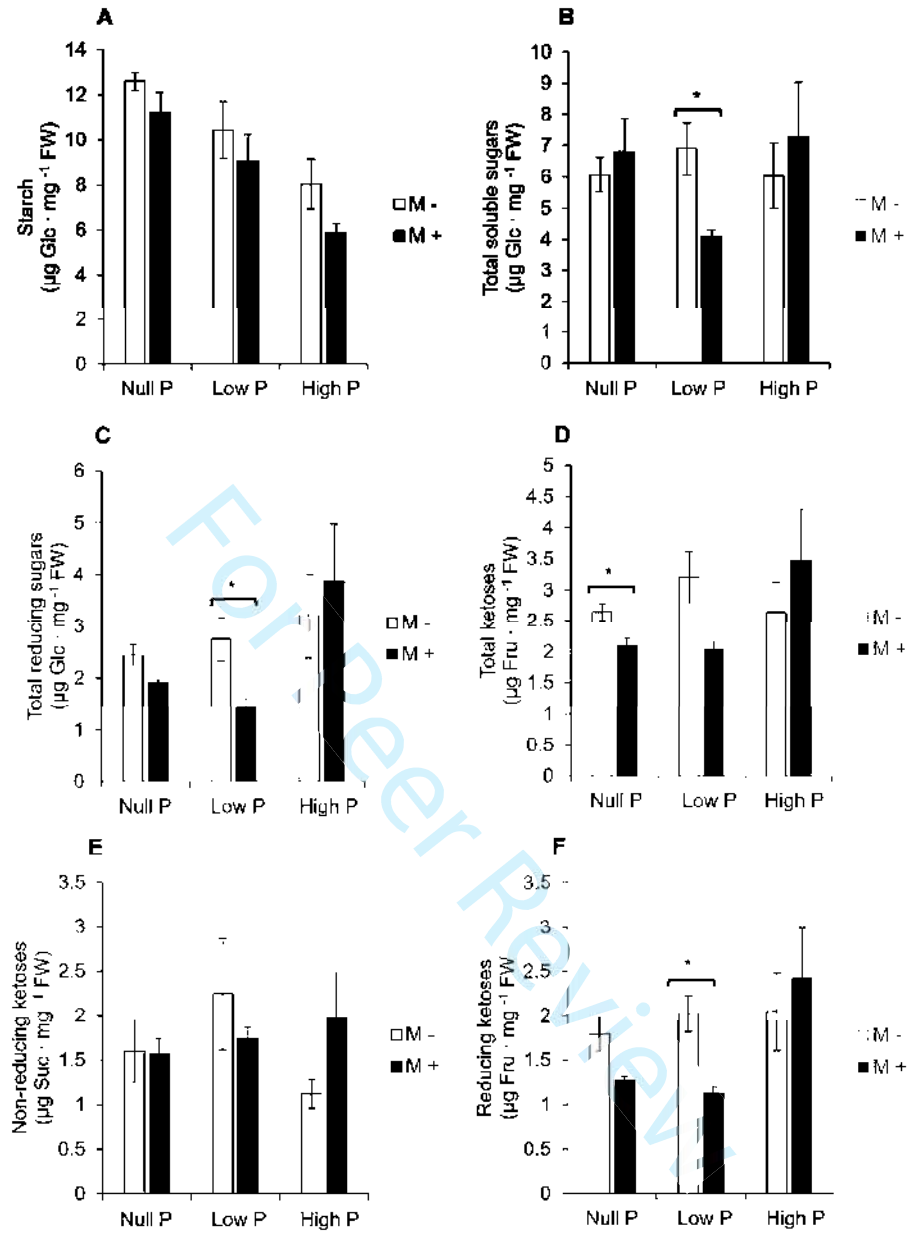


Fig.5.

956

957

958

959

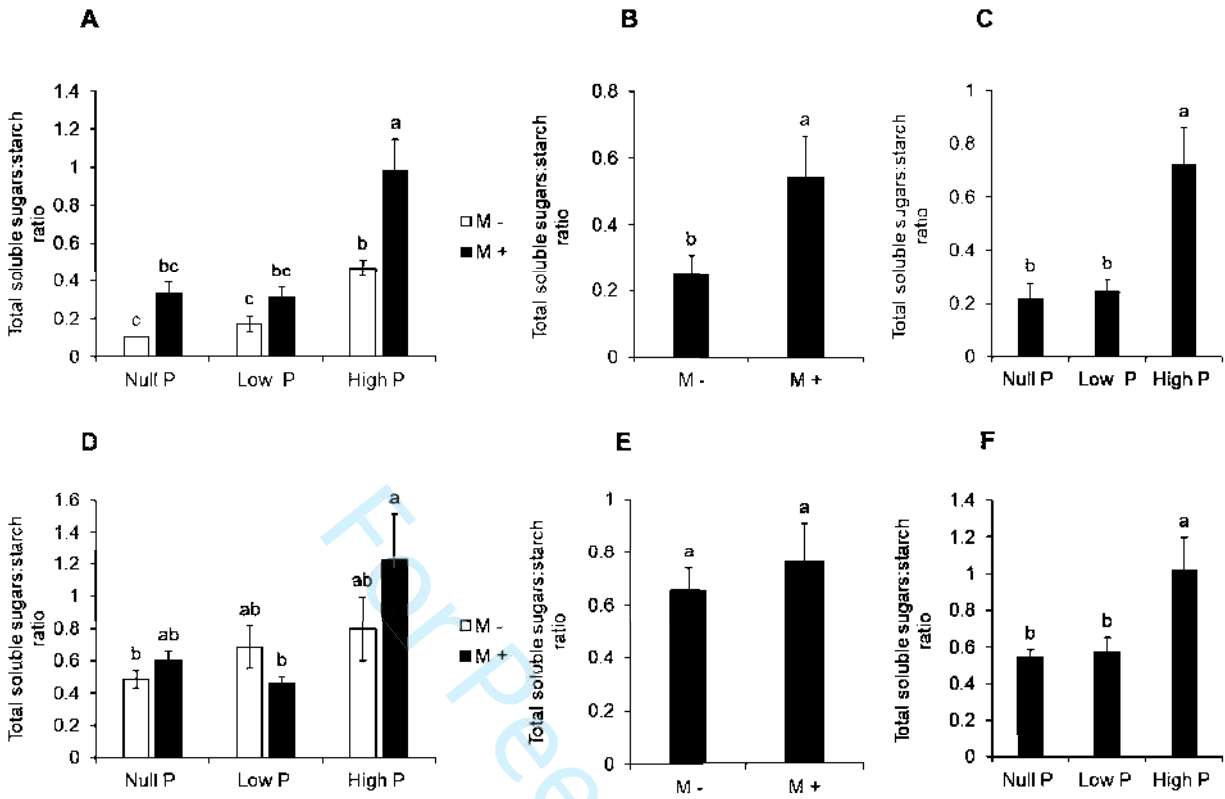


Fig. 6.

960  
961  
962  
963  
964  
965  
966  
967  
968  
969

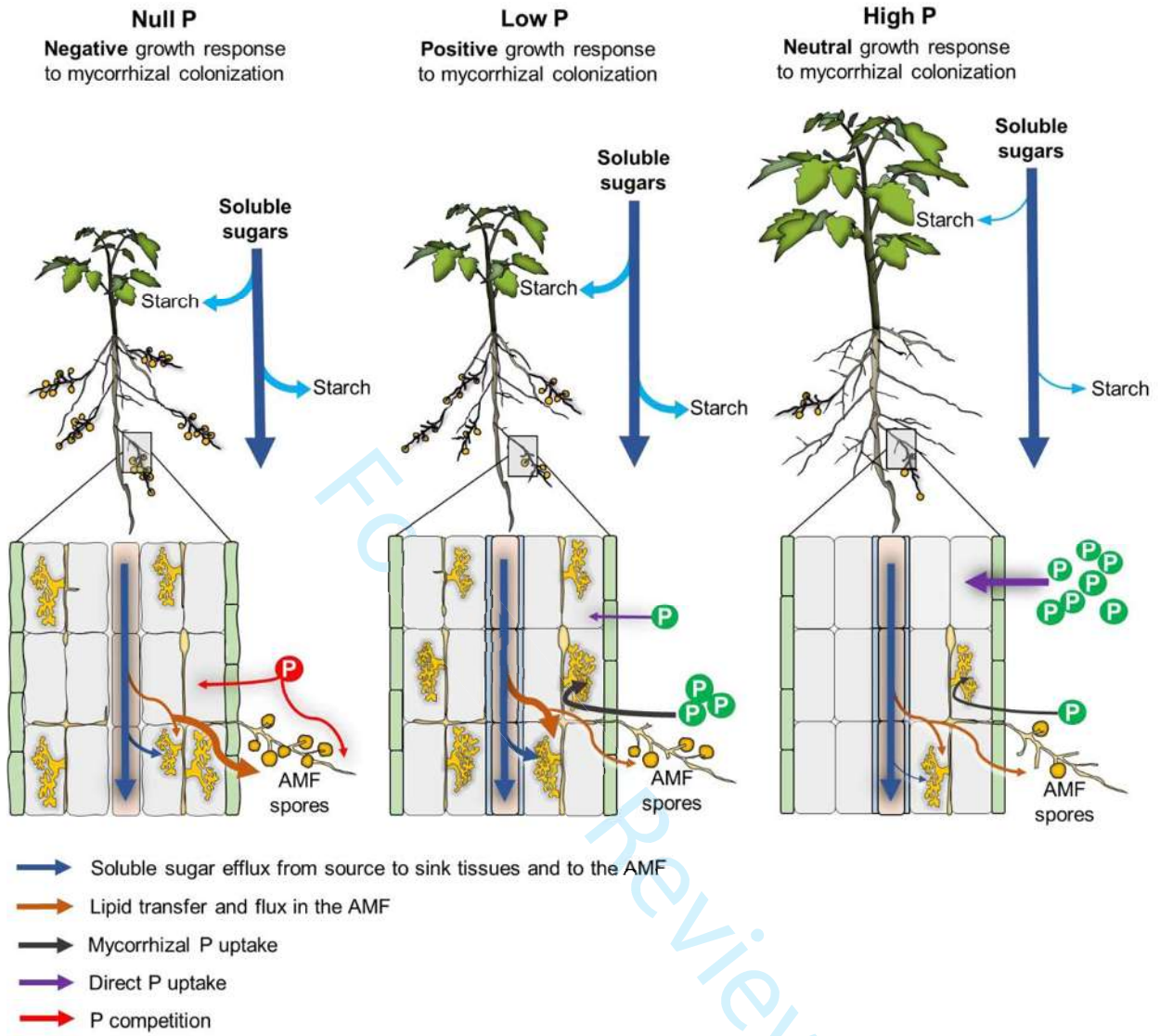


Fig. 7.

970

971