



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

**SEDE GUAYAQUIL**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**INFLUENCIA DE MICORRIZAS ARBUSCULARES NATIVAS  
EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *PHYSALIS*  
*PUBESCENS* BAJO ESTRÉS SALINO**

*Trabajo de titulación previo a la obtención del  
título de Ingeniero en Biotecnología*

**AUTORES:** CHRISTIAN DOUGLAS SANCHO QUIROZ  
MARTÍN ALEJANDRO CARRIÓN TRAVERSO

**TUTOR:** ING. JAIME ALBERTO NARANJO MORÁN, MSC

GUAYAQUIL – ECUADOR

2024

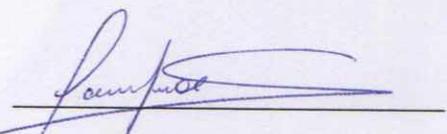
**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN**

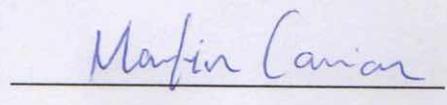
Nosotros, **Martín Alejandro Carrión Traverso** con documento de identificación N° 1719346106 y **Christian Douglas Sancho Quiroz** con documento de identificación N° 0932286180; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 02 de septiembre del año 2024

Atentamente,

  
Christian Douglas Sancho Quiroz  
CI: 0932286180

  
Martín Alejandro Carrión Traverso  
CI: 1719346106

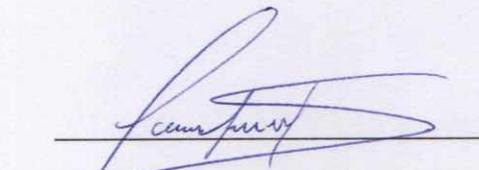
**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

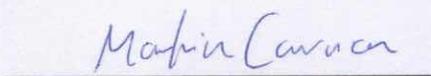
Nosotros, **Martín Alejandro Carrión Traverso** con documento de identificación N° 1719346106 y **Christian Douglas Sancho Quiroz** con documento de identificación N° 0932286180, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo experimental: **INFLUENCIA DE MICORRIZAS ARBUSCULARES NATIVAS EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *PHYSALIS PUBESCENS* BAJO ESTRÉS SALINO**, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniero/a en Biotecnología*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 02 de septiembre del año 2024

Atentamente,

  
Christian Douglas Sancho Quiroz  
CI: 0932286180

  
Martín Alejandro Carrión Traverso  
CI: 1719346106

## CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Jaime Alberto Naranjo Morán** con documento de identificación N° 0927155226, docente de la Universidad Politécnica Salesiana declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación **INFLUENCIA DE MICORRIZAS ARBUSCULARES NATIVAS EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *PHYSALIS PUBESCENS* BAJO ESTRÉS SALINO**, realizado por **Martín Alejandro Carrión Traverso** con documento de identificación N° 1719346106 y por **Christian Douglas Sancho Quiroz** con documento de identificación N° 0932286180, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción de trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 02 de septiembre del año 2024

Atentamente,



---

Jaime Alberto Naranjo Morán  
0927155226

***Dedicatoria***

*Este trabajo se lo dedico a la funga.*

***Agradecimiento***

*A mi familia, por siempre apoyarme.*

*A la Universidad Politécnica*

*Salesiana por haber brindado espacios*

*y todos los materiales necesarios para*

*esta investigación. Al Ing. Jaime Naranjo*

*por todo su apoyo y guía. A mi compañero*

*Douglas, que fue parte vital de este trabajo.*

Martín Alejandro Carrión Traverso

## ***Dedicatoria***

*A la expansión del conocimiento de la funga en Latinoamérica.*

*A todas las personas que han logrado encontrar y explotar aquellas temáticas que tanto les apasiona.*

## ***Agradecimientos***

*A mis padres, por ser soporte fundamental en este proceso académico. A mi madre, por siempre estar presente en aquellos días extenuantes durante mi formación, y ser fiel oyente de mis peripecias educativas. A mi padre, por ser fiel cómplice, junto conmigo, en todo lo relacionado a la ciencia; de él he adquirido las habilidades blandas (comunicación asertiva, adaptabilidad, colaboración) que me han llevado a posicionarme en este mundo de la ciencia.*

*A la carrera de Biotecnología por las oportunidades brindadas durante todos estos años.*

*A la Ing. Carina, por haber sido la primera persona en brindarme una oportunidad en la carrera como tutor.*

*Al Ing. Kevin, por ser un colega y haber compartido día a día su conocimiento técnico, permitiendo desarrollarme como profesional.*

*Al Ing. Ballesteros por confiar en mí y permitirme ser parte de la carrera desde varias aristas. Su apoyo a permitido sentirme a gusto en esta institución.*

*A nuestro tutor, Jaime, por ser un docente comprometido, y siempre brindar consejos. Su interés hacia nuestro desarrollo ha permitido explorar temas de nuestros intereses.*

*A Johannes, por ser un amigo con el que se podía discutir de ciencia y filosofía.*

*A los compañeros de aula, con ellos descubrí mi interés por la enseñanza.*

*A los laboratoristas, por el apoyo constante.*

*Y desde luego a Martín, por haber aceptado este reto en conjunto.*

Christian Douglas Sancho Quiroz

## Resumen

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son un grupo de hongos que forman relaciones simbióticas a través de las raíces con la mayoría de las plantas terrestres. Los HMA colonizan las raíces de la planta introduciéndose en sus células donde se realizará un intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo. Por medio de esta asociación, los HMA benefician a la planta al incrementar la absorción de nutrientes, agua y otros minerales del suelo, a cambio, el hongo recibe carbohidratos producidos por la planta a través de la fotosíntesis. Estos hongos también potencian la tolerancia a estrés abiótico de la planta y su resistencia contra patógenos. Debido a sus beneficios agrícolas, es importante estudiar estos organismos y sus mecanismos.

Este estudio investigó el impacto de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) nativos en las plantas de *Physalis pubescens* sometidas a estrés salino. Se evaluó la colonización micorrízica en las raíces, la densidad de esporas en la micorrizosfera, se identificaron y caracterizaron las esporas de HMA y se midió la actividad antioxidante en la biomasa foliar utilizando el método DPPH. Se hipotetizaba que las plantas inoculadas con HMA mostrarían una mayor actividad antioxidante. Los resultados mostraron que las plantas de *P. pubescens* pueden formar una simbiosis con HMA, pero esta relación disminuye en condiciones de alta salinidad. La densidad de esporas fue moderada y las plantas con estrés salino moderado e inoculación con HMA tuvieron menor actividad antioxidante. Esto podría ser debido al tiempo limitado para la formación de una simbiosis estable. En conclusión, aunque estas plantas pueden establecer una relación simbiótica con los HMA, su eficacia disminuye en condiciones de alta salinidad.

**Palabras claves:** colonización micorrízica, DPPH, simbiosis, solanácea, microscopía

## **Abstract**

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are a group of fungi that form root-mediated symbiotic relationships with most terrestrial plants. AMF colonise plant roots by entering the plant cells where an exchange of nutrients takes place between the plant and the fungus. Through this association, AMF benefit the plant by increasing the plant's uptake of nutrients, water and other minerals from the soil, in return, the fungus receives carbohydrates produced by the plant through photosynthesis. These fungi also enhance the plant's abiotic stress tolerance and resistance against pathogens. Because of their agricultural benefits, it is important to study these organisms and their mechanisms.

This study investigated the impact of native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on *Physalis pubescens* plants under salt stress. We assessed mycorrhizal colonisation in roots, spore density in the mycorrhizosphere, AMF spores were identified and characterised, and antioxidant activity was measured in leaf biomass using the DPPH method. It was hypothesised that AMF-inoculated plants would show higher antioxidant activity. The results showed that *P. pubescens* plants can form a symbiosis with AMF, but this relationship decreases under high salinity conditions. Spore density was moderate and plants with moderate salt stress and AMF inoculation had lower antioxidant activity. This could be due to the limited time for the formation of a stable symbiosis. In conclusion, although these plants can establish a symbiotic relationship with AMF, their efficacy decreases under high salinity conditions.

**Keywords:** mycorrhizal colonization, DPPH, symbiosis, solanaceae, microscopy

## Índice de contenido

<b>Capítulo 1</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Antecedentes</b> .....	<b>1</b>
1.1 Introducción .....	1
1.2 Problema .....	2
1.3 Delimitación .....	3
1.4 Pregunta de investigación .....	4
1.5 Objetivos generales y específicos .....	4
1.5.1 Objetivo general .....	4
1.5.2 Objetivos específicos .....	4
1.6 Hipótesis .....	5
<b>Capítulo 2</b> .....	<b>6</b>
<b>2. Fundamentación teórica</b> .....	<b>6</b>
2.1 Hongos formadores de micorrizas arbusculares .....	6
2.2 Establecimiento de la simbiosis entre hongos micorrízicos arbusculares y raíces de plantas .....	7
2.3 Tolerancia salina en plantas huésped mediada por micorrizas arbusculares .....	8
2.4 Rol de los antioxidantes frente al estrés salino en plantas .....	9
2.4.1 Suelos salinos .....	9
2.4.2 Especies reactivas de oxígeno .....	10
2.4.3 Antioxidantes .....	10
2.4.4 Técnica 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) .....	12
2.5 Solanácea .....	14
2.6 Especie vegetal <i>Physalis pubescens</i> .....	14
2.6.1 Taxonomía .....	14
2.6.2 Descripción .....	15
2.6.3 Morfología .....	16
2.6.4 Hábitat .....	16
2.6.5 Distribución .....	17
2.6.6 Etnobotánica de <i>Physalis pubescens</i> .....	17
<b>Capítulo 3</b> .....	<b>19</b>
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	<b>19</b>

3.1 Materiales .....	19
3.2 Diseño experimental .....	20
3.3 Variables .....	21
3.3.1 Variables dependientes .....	21
3.3.2 Variables independientes .....	21
3.4 Muestreo .....	21
3.5 Método de evaluación de colonización .....	22
3.5.1 Corte y lavado de raíces .....	23
3.5.2 Clarificación de las raíces .....	23
3.5.3 Tinción de raíces con azul de tripano .....	24
3.6 Examinación y cuantificación de micorrización mediante procedimientos morfológicos .....	25
3.6.1 Método de las intersecciones ampliadas de McGonigle (modificado) ..	25
3.7 Recolección de semillas de <i>Physalis pubescens</i> .....	27
3.8 Selección de semillas .....	28
3.8.1 Primer filtro: Color .....	28
3.8.2 Segundo filtro: Área .....	29
3.9 Tamizado húmedo .....	30
3.10 Conteo de esporas HMA .....	31
3.11 Inóculo HMA .....	32
3.11.1 Preparación del antibiótico .....	32
3.11.2 Preparación del inóculo .....	32
3.12 Identificación de esporas .....	33
3.13 Propagación de <i>Physalis pubescens</i> .....	34
3.13.1 Preparación de sustrato .....	34
3.13.2 Sembrado de semillas .....	35
3.13.3 Trasplante .....	36
3.14 Preparación de tratamientos .....	37
3.15 Medición de parámetros morfológicos .....	39
3.16 Preparación de extracto foliar vegetal .....	39
3.17 Medición de la actividad antioxidante por método DPPH .....	40
<b>Capítulo 4 .....</b>	<b>41</b>

<b>4. Resultados y discusiones</b> .....	<b>41</b>
4.1 Porcentaje de micorrización en <i>Physalis pubescens</i> silvestre .....	41
4.2 Densidad de esporas asociado a la micorrizosfera de <i>P. pubescens</i> silvestre .....	44
4.3 Identificación de esporas de HMA nativas de micorrizosfera de <i>P. pubescens</i> ....	46
4.4 Medición de la actividad antioxidante por método DPPH .....	49
<b>Capítulo 5</b> .....	<b>51</b>
<b>5. Conclusiones y recomendaciones</b> .....	<b>51</b>
5.1 Conclusiones .....	51
5.2 Recomendaciones .....	52
Bibliografía .....	53
Anexos .....	67

## Índice de tablas

**Tabla 1.** Taxonomía de la especie vegetal *Physalis pubescens*.....14

**Tabla 2.** Densidad de esporas en *Physalis pubescens* silvestre donde “R” corresponde a las réplicas, (E/g.S) corresponde a esporas por 1 gramo de suelo .....45

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Establecimiento de HMA en raíz (Adaptado de Bonfante y Genre, 2010) ...	8
<b>Figura 2.</b> Mecanismo Antioxidativo – DPPH (Adaptado de CAMAG, s.f.) .....	13
<b>Figura 3.</b> Especie vegetal <i>Physalis pubescens</i> (Los autores, 2024) .....	15
<b>Figura 4.</b> Morfología foliar de la especie vegetal <i>Physalis pubescens</i> (Los autores, 2024) .....	16
<b>Figura 5.</b> Flor de <i>Physalis pubescens</i> (Los autores, 2024) .....	17
<b>Figura 6.</b> Esquema metodológico (Creada con BioRender, los autores, 2024) .....	19
<b>Figura 7.</b> Zona de muestreo (Generada con Google Earth por los autores, 2024) .....	22
<b>Figura 8.</b> Raíces con residuos (A) y raíces luego del lavado (B) (Los autores, 2024) ..	23
<b>Figura 9.</b> Raíces teñidas con azul tripano (A) y montaje de raíces (B) (Los autores, 2024) .....	24
<b>Figura 10.</b> Cuantificación de micorrización mediante la cuadrícula de Labscope (Los autores, 2024) .....	26
<b>Figura 11.</b> Lavado de frutos (A), fruto con envoltura (B) y fruto sin envoltura (C) (Los autores, 2024) .....	28
<b>Figura 12.</b> Variabilidad de color en semillas de <i>P. pubescens</i> (Los autores, 2024) .....	29
<b>Figura 13.</b> 50 semillas de <i>P. pubescens</i> (Los autores, 2024) .....	30
<b>Figura 14.</b> Turba/Arena (A), Esterilización sustrato (B) (Los autores, 2024) .....	34
<b>Figura 15.</b> Semillero de 128 pocillos (A) y plántulas de <i>Physalis pubescens</i> (B) (Los autores, 2024) .....	36
<b>Figura 16.</b> <i>P. pubescens</i> listas para trasplante (A) y trasplante a los recipientes finales (B) (Los autores, 2024) .....	37
<b>Figura 17.</b> Riego con los tratamientos establecidos (Los autores, 2024) .....	38
<b>Figura 18.</b> Estructuras fúngicas en raíces de <i>Physalis pubescens</i> silvestre; Hifa (A), Arbusculos (B) y Vesículas (C) (Los autores, 2024) .....	42

<b>Figura 19.</b> Porcentajes de micorrización de <i>Physalis pubescens</i> silvestre (Los autores, 2024) .....	42
<b>Figura 20.</b> Estructuras fúngicas en raíces de <i>Physalis pubescens</i> T2; Arbúsculo (A), e Hifa (B) (Los autores, 2024) .....	43
<b>Figura 21.</b> Porcentajes de micorrización de T2 (A) y porcentajes de micorrización de T3 (Los autores, 2024) .....	44
<b>Figura 22.</b> <i>Ambispora sp.</i> (A), <i>Acaulospora sp.</i> (D), <i>Septoglomus sp.</i> (E) y <i>Diversispora sp.</i> (F) (Los autores, 2024) .....	46
<b>Figura 23.</b> Esporas de HMA observadas con estereomicroscopio Zeiss (Los autores, 2024) .....	48

## Índice de anexos

<b>Anexo 1.</b> Materiales y equipos .....	67
<b>Anexo 2.</b> Obtención de muestras de <i>Physalis pubescens</i> .....	67
<b>Anexo 3.</b> Secado de semillas de <i>P. pubescens</i> .....	68
<b>Anexo 4.</b> Reactivos para tamizado húmedo y tinción histoquímica .....	68
<b>Anexo 5.</b> Montaje de raíces .....	69
<b>Anexo 6.</b> Trasplante de <i>Physalis pubescens</i> .....	69
<b>Anexo 7.</b> Mortalidad tratamiento con 180 mM NaCl .....	70
<b>Anexo 8.</b> Indicadores de estrés salino .....	70
<b>Anexo 9.</b> Extracto foliar para medición antioxidante .....	71
<b>Anexo 10.</b> Extractos foliares con DPPH para medición antioxidante .....	71
<b>Anexo 11.</b> Equipos de microscopia .....	71
<b>Anexo 12.</b> Medición raíz en image j .....	72
<b>Anexo 13.</b> Tratamientos antes y después .....	72
<b>Anexo 14.</b> Mediciones morfológicas .....	73

## Capítulo 1

### Antecedentes

#### 1.1. Introducción

El estrés salino representa uno de los factores abióticos más desafiantes para la agricultura mundial, esto afecta tanto la fisiología como la productividad de las plantas. Este tipo de estrés desencadena la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (conocidas por sus siglas en inglés ROS), que causan daños oxidativos significativos en las células vegetales al afectar biomoléculas esenciales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Gil & Tuteja, 2010; Avery, 2011). Sin embargo, las plantas han desarrollado mecanismos antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos, que mitigan los efectos negativos del estrés oxidativo, al mejorar la capacidad de adaptación a los ambientes adversos (Caverzan et al., 2012).

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son asociaciones simbióticas que han demostrado ser efectivas en la mejora de la tolerancia de las plantas a diversas condiciones de estrés abiótico (Lenoir et al., 2016), incluida la salinidad (Evelin & Kapoor, 2013). Los HMA facilitan la absorción de nutrientes y agua, además de potenciar la actividad antioxidante (Sun & Shahrajabian, 2023; Moncada et al., 2015; Luna et al., 2016; Sharma et al., 2024), lo que ayuda a las plantas a mantener un equilibrio homeostático frente a los efectos dañinos del estrés salino (Miranda et al., 2012; Yang et al., 2024).

*Physalis pubescens*, una especie de importancia medicinal y agrícola (Grigolo, 2020), es sensible a condiciones de estrés salino (Yildirim et al., 2011), lo que puede comprometer tanto su desarrollo como su rendimiento. En este contexto, el presente trabajo de investigación busca evaluar la influencia de micorrizas arbusculares nativas del

remanente boscoso seco tropical del campus María Auxiliadora, en la actividad antioxidante (como indicador de estrés) de *Physalis pubescens* sometida a condiciones de estrés salino, con el fin de explorar estrategias biotecnológicas que puedan optimizar su cultivo bajo esta forma de estrés abiótico.

## 1.2. Problema

La presión sobre los sistemas agrícolas continúa en constante aumento, debido al exponencial crecimiento de la población (FAO, 2023). La necesidad de producir más alimentos enfrenta limitaciones considerables debido a la degradación de los suelos o la salinización (Stavi et al., 2021; FAO, 2016). Ante este panorama, la agricultura se ve obligada a adaptarse mediante el desarrollo de nuevas estrategias como la aplicación de biofertilizantes para aliviar el impacto de estas condiciones adversas, con el fin de compensar la pérdida de productividad y garantizar la seguridad alimentaria global (Singh, 2021).

La constante búsqueda de nuevos alimentos pone en la mira a *Physalis pubescens*, especie vegetal subutilizada en la región litoral ecuatoriana, punto evidenciado por su falta de oferta en el mercado. No obstante, su posible introducción en el sistema agrícola podría encontrarse con diferentes obstáculos, siendo uno de ellos la salinidad de los suelos, el cual influye de manera negativa la productividad de esta especie (Miranda et al., 2014; Çelikli, 2017; Sholehah, 2022). Trabajos de investigación realizados de la conductividad eléctrica (CE) en áreas de la cuenca baja del río Guayas, muestran que alrededor del 38.4 por ciento de las muestras evaluadas presentan niveles de salinidad que varía de ligera (2.1 - 4.0 mS/cm) a media (4.1- 8.0 mS/cm) y el 10.4 por ciento de alta (4.1-8 mS/cm) a muy alta (8.1 - 16.0 mS/cm) (Cedeño, 2015).

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) se perfilan como una alternativa biotecnológica prometedora para mejorar la resiliencia de las plantas ante circunstancias desfavorables (Cardona et al., 2017; Marro et al., 2022). Estos hongos establecen una simbiosis mutualista con las raíces de las plantas, lo que no solo mejora la absorción de nutrientes esenciales, sino que también activa mecanismos de defensa en las plantas, lo que aumenta su tolerancia al estrés abiótico (Wang, 2022). Este enfoque no solo favorece la sostenibilidad agrícola, sino que también optimiza la producción, contribuyendo a la seguridad alimentaria en un contexto de creciente presión ambiental y demográfica.

### **1.3. Delimitación**

La toma de muestras de semillas de *Physalis pubescens* y consorcio de esporas nativas de HMA a partir de la micorrizosfera de la planta se efectuó en los meses de mayo a junio de 2024. La experimentación tuvo lugar en la Universidad Politécnica Salesiana, campus María Auxiliadora Km 19 Vía a la Costa, en Guayaquil. Las coordenadas del muestreo son: 2°11'47"S 80°02'37"W; dicha zona es un remanente del bosque seco tropical.

En cuanto a la ubicación y la temporalidad de la parte experimental se buscaron las condiciones idóneas para favorecer el objetivo del estudio. Esta, se desarrolló durante los meses de marzo-agosto 2024. Tuvo lugar en los espacios y laboratorios del campus.

La institución gestionó los recursos para llevar a cabo la investigación como parte del proyecto “Caracterización Fitoquímica Mediante Cromatografía Líquida HPLC de Especies Representativas al Remanente Boscoso Seco Tropical del Campus María Auxiliadora de la Universidad Politécnica Salesiana Sede Guayaquil Fitoquímica”, debido a que el presente tema se alinea con los objetivos del proyecto mencionado. El

aporte fue con el uso de laboratorios, materiales y demás recursos para la fase experimental.

Los resultados que se obtengan dentro de la presente investigación servirán como aporte al estudio de la actividad biológica, efecto de la interacción planta-micorriza, en una especie vegetal de la familia Solanácea. Este trabajo sentará las bases para el establecimiento de un banco de esporas de HMA en la Universidad Politécnica Salesiana sede Guayaquil.

#### **1.4. Pregunta de investigación**

¿Hubo una diferencia en la actividad antioxidante entre plantas de *Physalis pubescens* inoculadas y no inoculadas con HMA en condiciones de salinidad?

#### **1.5. Objetivos generales y específicos**

##### **1.5.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto de las micorrizas arbusculares nativas en *Physalis pubescens* bajo estrés salino.

##### **1.5.2. Objetivos específicos**

- Determinar la colonización micorrízica en raíces de *Physalis pubescens* mediante la tinción de azul de tripano.
- Cuantificar la densidad de esporas en la micorrizosfera de *Physalis pubescens*.
- Aislar las esporas de micorrizas arbusculares nativas en la rizosfera de *Physalis pubescens* para su caracterización morfológica

- Inocular un consorcio nativo de micorrizas arbusculares en *Physalis pubescens* y evaluar su aporte a la tolerancia contra estrés salino mediante el método 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) en biomasa foliar.

## **1.6. Hipótesis**

Las plantas de *Physalis pubescens* inoculadas con HMA presentan una mayor actividad antioxidante.

## Capítulo 2

### Fundamentación teórica

#### 2.1. Hongos formadores de micorrizas arbusculares

Se denomina micorriza a la simbiosis entre un hongo y las raíces de plantas terrestres (van der Heijden et al. 2015). En ecosistemas naturales es raro que una planta no posea micorrizas en su sistema radicular lo que convierte esta relación en un fenómeno muy común (Corwell et al., 2001, Strullu y Strullu, 2007). Existen diferentes tipos de asociación micorrízica, de las cuales las más comunes son Ectomicorriza, Orquideomicorrizas, Ericomicorrizas y Micorrizas arbusculares (Bagyaraj, 2014).

El micelio micorrízico brinda a la planta una mayor superficie para la toma de nutrientes, lo cual potencia la eficiencia de esta a la hora de alimentarse. Por otro lado, las hifas pueden alcanzar sitios inaccesibles para las raíces de la planta, lo cual le permite obtener nutrientes más distantes (Finlay, 2004). En esta relación mutualista, ambas partes son beneficiadas. La planta recibe más agua, más minerales, en especial N y P, mientras que el HMA recibe lípidos junto con azúcares derivados de la fotosíntesis de la planta (van der Heijden et al. 2015).

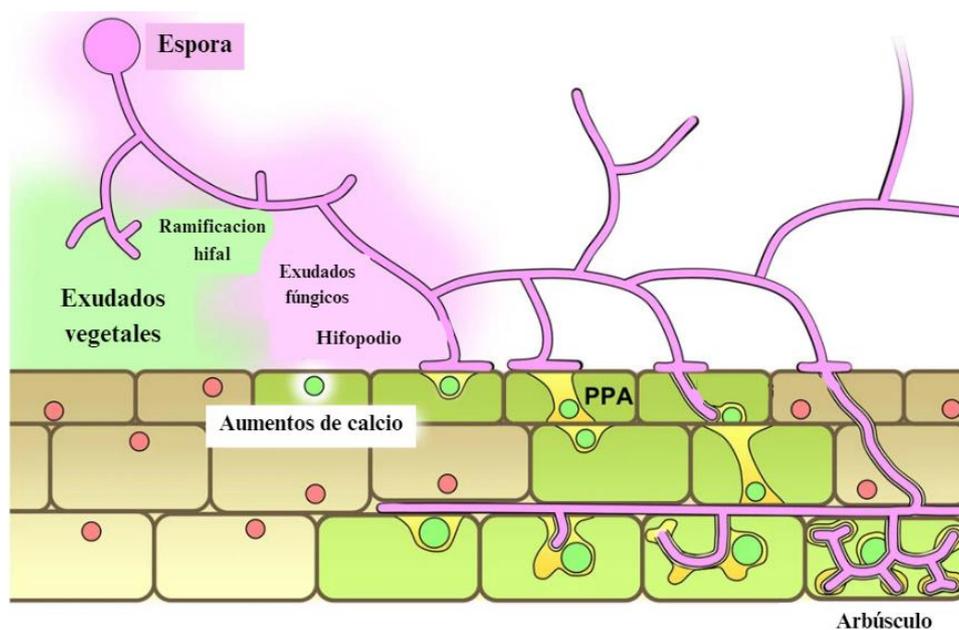
La asociación micorrízica más común es del tipo arbuscular, la cual se da en un rango del 70-90 % de las plantas terrestres, en varios tipos de suelos y condiciones ambientales (Schüßler et al., 2001). En la taxonomía, los HMA pertenecen al filo *Glomeromycota* (Palenzuela et al., 2008).

En detalle los HMA hacen referencia a su característica distintiva que es la formación del "arbusculo", el cual es una estructura hifal con una forma semejante a la de un árbol en el córtex interior de la raíz. Esta estructura cumple como el puente para el intercambio bidireccional de nutrientes (Paszkowski, 2006, Garg et al., 2019,)

## **2.2. Establecimiento de la simbiosis entre hongos micorrízicos arbusculares y raíces de plantas**

La germinación de una espora en estado de reposo es seguida por la formación de un micelio exploratorio corto (Smith, 2008). La secreción de exudados vegetales por parte de la raíz del hospedador provoca una ramificación repetitiva de las hifas, lo que incrementa la posibilidad de un contacto directo entre los simbiositos (Akiyama et al., 2005; Besserer et al., 2006). Al mismo tiempo, la raíz percibe los exudados fúngicos, los cuales activan la vía común SYM (en inglés common symbiotic signaling pathway) (Kosuta et al., 2003; Oldroyd y Downie 2004), desencadenando respuestas celulares y transcripcionales (células y núcleos verdes, ver **figura 1**). El contacto entre la planta y el hongo es seguido por la adherencia de un hifopodio a la superficie de la raíz, lo que inicia la formación de un agregado citoplasmático extenso (de color amarillo, ver **figura 1**), conocido como aparato de prepenetración (PPA) en la célula epidérmica en contacto y en la célula cortical externa subyacente (Genre et al., 2005). La colonización intracelular del hongo sigue la ruta de los PPAs desde la epidermis hacia la corteza interna, donde las hifas intercelulares pueden desarrollarse a lo largo del eje de la raíz. Luego, el mecanismo del PPA se replica en las células corticales internas contactadas, tanto antes de la entrada del hongo como, en menor medida, durante la ramificación. Por último, un arbusculo ramificado ocupa la mayor parte del volumen celular, lo cual le permite tener una extensa superficie para el intercambio de nutrientes (Pumplin y Harrison, 2009).

**Figura 1.** Establecimiento de HMA en raíz.



Nota. adaptado de Bonfante y Genre, 2010

### 2.3. Tolerancia salina en plantas huésped mediada por micorrizas arbusculares

Cuando se utiliza HMA en *Casuarina glauca*, la expresión de ciertos genes como CgNHXs o CgCLCs puede incrementar la biomasa vegetal, el contenido de K<sup>+</sup>, la compartimentalización de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en vacuolas, donde se facilita la resistencia a la salinidad (Wang Y. et al., 2023), tras la simbiosis con HMA, la mayor regulación de SOS1/NHX7 en las raíces de *Robinia pseudoacacia* facilita la tolerancia al estrés salino promoviendo la expulsión de Na<sup>+</sup> desde las raíces (Chen J. et al., 2017). La colonización con HMA bajo estrés salino eleva la expresión de los genes SISOS1 y SISOS2, esto ha permitido una mayor tolerancia en el cultivo de tomate (Liu et al., 2023). En condiciones de salinidad, las plantas micorrizadas muestran una mayor expresión de genes como OsPRX, Os10g, OsHBP1b y OsNCX en comparación con plantas no micorrizadas, lo que incrementa la eliminación de ROS (Zhang B. et al., 2023). Wang et al. (2022) reportaron

que la expresión de genes relacionados con la transferencia de iones, la eliminación de ROS, el metabolismo de carbohidratos, como HAK5, PIP1-2, MYB46, NAC43, GLP10, SKOR, CPER y WRKY19, ha sido potenciado por *Rhizophagus irregularis*, micorriza que aporta a la tolerancia al estrés salino en plantas de *C. glauca*.

## **2.4. Rol de los antioxidantes frente al estrés salino en plantas**

### **2.4.1. Suelos salinos**

La relevancia de la salinidad del suelo para el rendimiento agrícola es considerable (Tester y Davenport, 2003), debido a su influencia en la implantación, crecimiento y desarrollo de las plantas, generando grandes pérdidas en la productividad (Giri et al., 2003; Mathur et al., 2007). Los efectos directos de la sal en el crecimiento vegetal pueden incluir: (a) la reducción del potencial osmótico de la solución del suelo, lo que disminuye la cantidad de agua disponible para la planta, lo que provoca sequía fisiológica; para mitigar este problema, las plantas deben mantener potenciales osmóticos internos más bajos para evitar que el agua se desplace desde las raíces hacia el suelo (Feng et al., 2002; Jahromi et al., 2008); (b) la toxicidad de niveles excesivos de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , cuyos efectos incluyen la alteración de la estructura de enzimas u otras macromoléculas, el daño a organelos celulares, las membranas plasmáticas, y la interrupción de procesos como la fotosíntesis, la respiración o la síntesis de proteínas (Juniper y Abbott, 1993; Feng et al., 2002); (c) el desequilibrio nutricional en la planta, causado por la absorción de nutrientes o su transporte hacia la parte aérea, lo que provoca deficiencias de iones (Marschner, 1995; Adiku et al., 2001).

### 2.4.2. Especies Reactivas de Oxígeno

En estudios relacionados con el estrés salino, se ha observado que las plantas sometidas a este tipo de estrés producen especies reactivas de oxígeno (ROS) (Gill & Tuteja, 2010), las cuales pueden causar daño celular significativo.

Los radicales libres son especies químicas de átomos o moléculas que contienen un electrón desapareado, lo que los hace inestables, de corta vida y reactivos (Gill & Tuteja, 2010). Al reaccionar con otras moléculas, inician una cadena de reacciones que pueden causar la disrupción de células vivas. Los radicales libres, pueden donar o aceptar electrones únicos, lo que los convierte en reactivos significativos en sistemas biológicos (Miller et al., 2010; Chaudhary et al., 2023).

Estos incluyen tanto radicales como no radicales, siendo los primeros inestables y reactivos. Entre los tipos más comunes tipos de ROS se encuentran:

- **Anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ):** Es el ROS más común, generado por la fuga de electrones, y puede producir efectos tóxicos directos e indirectos (Orabi & Hussein, 2019).
- **Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ):** No es un radical, pero actúa como agente oxidante que puede atravesar membranas celulares. Participa en la formación del radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), que puede dañar el ADN, estar relacionado con la mutación y la carcinogénesis (Lin et al. 2021).
- **Radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ):** Es uno de los radicales más reactivos en las células vivas, causante de daños al ADN y productos de peroxidación lipídica (Constanza & Muñoz, 2012).

- **Oxígeno singlete ( $^1O_2$ ):** Aunque no es un radical verdadero, es un oxidante reactivo que puede dañar los tejidos vivos, es decir, en reacciones relacionadas con la exposición a la radiación ultravioleta (Triantaphylidès et al. 2008).

### 2.4.3. Antioxidante

Las plantas están expuestas a situaciones desfavorables e incluso a condiciones ambientales extremas. Dentro de estas condiciones encontramos salinidad, falta de nutrientes, contaminación por metales, etc. Cuando existe estrés por salinidad, la planta acumula ROS las cuales causan varios daños en la planta. Uno de los mecanismos para protegerse contra el estrés salino son los metabolitos antioxidantes que esta misma produce y así combatir la oxidación de otros compuestos vitales para la planta u otros daños oxidativos. Las moléculas antioxidantes son capaces de reducir o prevenir la oxidación de otras moléculas (Orabi et al, 2019).

Las plantas poseen varios mecanismos para poder tolerar el estrés causado por condiciones adversas, estos mecanismos se dividen en enzimáticos y no enzimáticos, juntos componen el sistema antioxidante en las plantas (Orabi & Hussein, 2019).

- **Enzimático**

El mecanismo de defensa antioxidante enzimático (DAE) comprende un grupo de enzimas que protegen las células del organismo (Sies, 1997). Para eliminar ROS se requiere una serie de pasos que evitará que una especie reactiva se convierta en otra más perjudicial. DAE es considerado como la primera línea de defensa contra el estrés oxidativo en plantas (Yu, 1994; Chaudiere & Ferrari-Iliou, 1999).

Dentro de este sistema, actúan enzimas como superóxido dismutasa (SOD) (Scandalios, 1993), catalasa (CAT) (Hertwig et al., 1992), ascorbato peroxidasa (APX) (Orabi et al., 2010; Hasanuzzaman & Fujita, 2011), glutatión reductasas (GR) (Hossain et al., 2011) las cuales se encargan de transformar radicales libres.

- **No Enzimático**

Por otro lado, el mecanismo de defensa antioxidante no enzimático (DANE) está conformado por varias moléculas de carácter hidrófobo o hidrófilo. Estas moléculas se encargan de secuestrar radicales libres y los estabilizan dándoles un electrón (Larkins, 1999).

Antioxidantes no enzimáticos característicos en especies vegetales son el ácido ascórbico (Vitamina C) (Noctor & Foyer, 1998), tocoferol (Vitamina E) (Orabi and Abdelhamid, 2016), glutatión (May et al., 1998), flavonoides (Dai and Mumper, 2010), carotenoides (Foyer & Harbinson, 1993) (Rudenko et al., 2023).

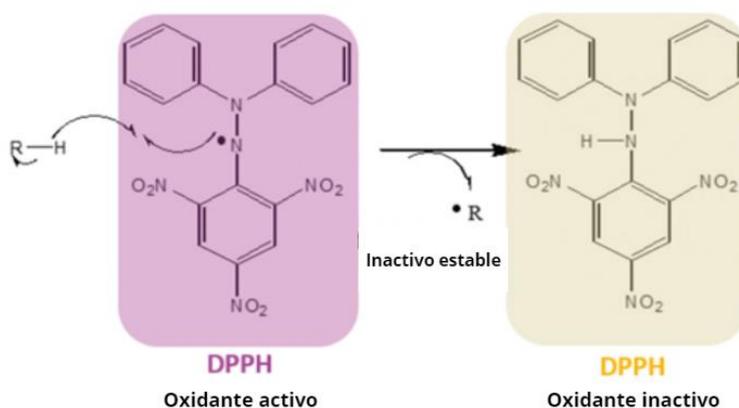
#### **2.4.4. Técnica 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)**

En la mayoría de los ensayos que se basan en la transferencia de electrones, la actividad antioxidante se simula al utilizar una sonda con potencial redox adecuado, es decir, los antioxidantes reaccionan con una sonda fluorescente o con color (agente oxidante) en lugar de interactuar con radicales peroxilo. Las técnicas espectrofotométricas basados en la transferencia de electrones (ET) miden la capacidad de un antioxidante para reducir un oxidante, lo que resulta en un cambio de color cuando se produce la reducción. La magnitud del cambio de color (incremento o disminución de la absorbancia de la sonda a

una longitud de onda específica) se relaciona con la concentración de antioxidantes en la muestra (Bondet et al., 1997). En esencia, estas técnicas basadas en ET incluyen ABTS, DPPH, ensayo de oxidación ferrosa con xilenol naranja (FOX), el método de tiocianato férrico (FTC), FRAP, PFRAP y CUPRAC (Brand-Williams et al., 1995).

La técnica DPPH es utilizada para evaluar la actividad antioxidante, debido a su simplicidad, rapidez y capacidad de proporcionar resultados cuantificables sobre la capacidad de captura de radicales libres de un compuesto o extracto. Esta metodología se basa en la capacidad de los antioxidantes para donar un electrón o un átomo de hidrógeno al radical DPPH, lo que provoca un cambio de color de púrpura intenso a amarillo pálido, que puede ser analizado mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 517 nm (Sánchez-Moreno, 2002).

**Figura 2.** Mecanismo Antioxidativo - DPPH.



Nota. Adaptado de CAMAG, s.f.

## 2.5 Solanácea

Las solanáceas son una familia, de las más extensas, de plantas dicotiledóneas que cuenta con alrededor de 100 géneros y 3000 especies distribuidas en todo el mundo (Morris & Taylor. 2017). Esta familia incluye productos alimenticios, especias y compuestos farmacológicos utilizados a nivel mundial, reflejando su importancia económica (Samuels, 2015).

## 2.6. Especie vegetal *Physalis pubescens*

### 2.6.1 Taxonomía

**Tabla 1.** Taxonomía de la especie vegetal *Physalis pubescens*

<b>Taxonomía de <i>Physalis pubescens</i></b>	
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Viridiplantae
<b>División</b>	Tracheophyta
<b>Subdivisión</b>	Spermatophytina
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Solanales
<b>Familia</b>	Solanacea
<b>Subfamilia</b>	Solanoidea

<b>Género</b>	<i>Physalis</i>
<b>Especie</b>	<i>P. pubescens</i>

Nota. Recuperado de Integrated Taxonomic Information System, s.f.

### 2.6.2. Descripción

*Physalis pubescens* es una especie vegetal herbácea, anual, dicotiledónea, arbustiva que pertenece a la familia Solanácea (Lorenzi et al. 2006). Tiene varios nombres comunes los cuales dependen de su distribución geográfica, sin embargo, su nombre más representativo es “Uvilla” (Fischer & Miranda, 2012).

**Figura 3.** Especie vegetal *Physalis pubescens* (Los autores, 2024).



Nota. Los autores (2024)

### 2.6.3. Morfología

Es una planta pubescente dado que posee tricomas similares a pelos en sus hojas y tallos. Llegan a medir 30 a 50 cm de alto. Es muy ramificada, tiene hojas opuestas, son anchas, tienen forma ovoide a elíptica de 4 a 8 cm de largo y 2 a 5 cm de ancho. Ápice agudo, márgenes aserrados, con dientes espinescentes. Pecíolos de 3 a 8 cm de largo. Su flor es solitaria, posee cáliz acampanado de 5 a 10 mm de largo. Su fruto es una balla ovoide de 1.2 cm de diámetro, color amarillo, a veces morado (Xu, 2017).

**Figura 4.** Morfología foliar de la especie vegetal *Physalis pubescens*.



Nota. Los autores (2024)

### 2.6.4. Hábitat

Esta solanácea prefiere suelos fértiles, condiciones de humedad, puede tolerar escasez de nutrientes. Se encuentra en áreas perturbadas, límites de plantaciones, al pie de carreteras, zonas de desechos y planicies. Por lo general crece en agrupaciones, su población

predomina en zonas ruderales o perturbadas. En ciertos países se considera como una especie invasiva (Xu, Z., 2017).

### 2.6.5. Distribución

*P. pubescens* es una especie nativa de América, incluyendo Estados Unidos, México, América Central y gran parte de Sur América (Xu, Z., 2017).

**Figura 5.** Especie vegetal *Physalis pubescens*



Nota. Los autores (2024)

### 2.6.6. Etnobotánica de *P. pubescens*

*Physalis pubescens*, es una especie vegetal con un amplio valor etnobotánico debido a sus propiedades medicinales, alimenticias y culturales (Zimmer et al., 2019; Cheng et al., 2022) Tradicionalmente, se ha utilizado para tratar diversas afecciones, como dolores posparto, infecciones de la piel y como diurético, gracias a sus altos niveles de

antioxidantes y vitamina C que refuerzan el sistema inmunológico (Grigolo et al., 2020).

Los frutos de *Physalis pubescens* se consumen principalmente frescos, ya que conservan mejor sus compuestos bioactivos, aunque también son utilizados en ensaladas, mermeladas y conservas.

En resumen, *Physalis pubescens* no solo es una fuente de alimentos saludables, sino que también tiene aplicaciones medicinales y artesanales. A pesar de ser menos conocida que otras especies del género, su potencial como cultivo alternativo para pequeños agricultores y sus múltiples beneficios destacan su importancia en diversas culturas, subrayando la necesidad de más estudios sobre sus propiedades y aplicaciones.

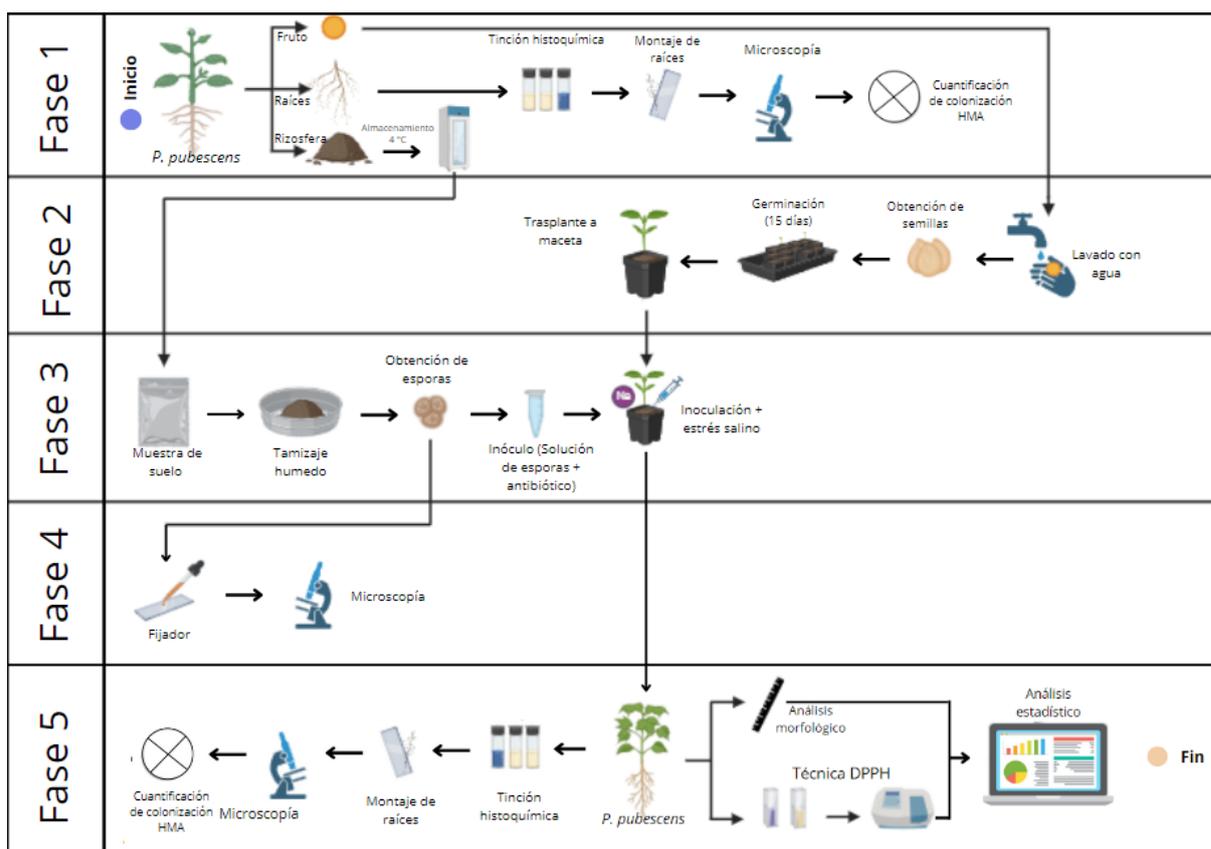
## Capítulo 3

### Materiales y métodos

#### 3.1 Materiales

Para el análisis del impacto de las micorrizas arbusculares frente al estrés salino en *P. pubescens* se utilizaron diversos recursos en cada una de las fases del proceso como la recolección de esporas, semillas, los análisis en laboratorio, y extracción de data a partir de imágenes. En el **anexo 1** puede consultar el listado de materiales que fueron utilizados para el adecuado desarrollo del presente estudio.

**Figura 6.** Esquema metodológico.



*Nota.* Ilustración creada con BioRender por los autores (2024).

### 3.2. Diseño experimental

Para el desarrollo de esta investigación se trabajó con plantas de *P. pubescens* desde la germinación. Cabe recalcar que este experimento solo cubrió hasta la fase vegetativa de los individuos.

Se establecieron seis tratamientos diferentes para evaluar la influencia de las micorrizas arbusculares y la salinidad en las plantas. El blanco (T1) consistió en plantas corrientes sin inóculo de HMA ni estrés salino. El T2 consistió en plantas inoculadas con HMA como control negativo. El T3 consistió en plantas inoculadas con HMA y tratadas con 80 mM de NaCl, mientras que en el T4 se expusieron las plantas únicamente a 80 mM de NaCl, sin la presencia de HMA. El T5 combinó plantas con inóculo de HMA bajo un estrés más severo de 180 mM de NaCl, y el T6 incluyó plantas expuestas a 180 mM de NaCl sin HMA.

Todas las plantas fueron alimentadas con una solución nutritiva comercial como base a la cual se le añadieron concentraciones de NaCl para los tratamientos bajo estrés salino. La solución se mantuvo a un pH de 5.5 a 6.5. Puesto que, fue lo recomendable según el fabricante de la solución nutritiva. Cada planta fue regada con 200 ml de solución cada 3 días, las cantidades de riego y la frecuencia se basaron en el trabajo de Miranda (2012).

En el caso del grupo que se sometió a estrés salino, se utilizaron 2 concentraciones de NaCl: 80 mM y 180 mM. Se eligieron estas concentraciones en base al trabajo de Shoenlah (2022).

Los tratamientos tuvieron una duración de 30 días, desde el trasplante hasta la recolección final de datos.

### **3.3. Variables**

#### **3.3.1 Variables dependientes**

- Porcentaje de inhibición antioxidante
- Densidad de esporas
- Porcentaje de micorrización

#### **3.3.2 Variables independientes**

- Concentración de NaCl
- Consorcio de esporas nativas de HMA
- Tiempo límite de estudio

### **3.4. Muestreo**

Se tomaron muestras a partir de *P. pubescens* silvestres y su suelo, ubicadas en el campus María Auxiliadora de la Universidad Politécnica Salesiana, con coordenadas: 2°11'47"S 80°02'37"W.

**Figura 7.** Zona de muestreo.



*Nota.* Figura generada con Google Earth por los autores (2024)

Se recolectarán las raíces más externas de la planta, para su posterior verificación de la colonización micorrízica en *P. pubescens* silvestre. En paralelo se recogerán los frutos maduros para la posterior obtención de semillas. Además de una muestra de la micorrizosfera para la obtención de esporas que será conservada en refrigeración a 4 °C hasta su procesamiento.

### **3.5. Método de evaluación de colonización por hongos micorrízicos arbusculares**

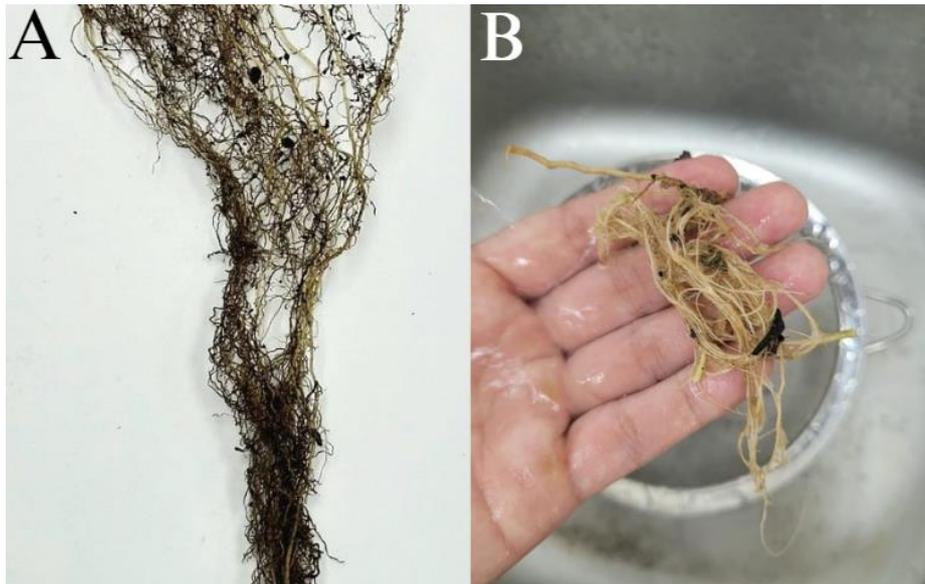
La tinción histoquímica con azul de tripano se realiza siguiendo el método descrito por Phillips y Hayman con algunas modificaciones para raíces de tomate (Ho-Plágaro, *et al.*, 2020).

### 3.5.1 Corte y lavado de raíces

Las raíces recolectadas serán lavadas con agua para eliminar cualquier residuo de tierra.

Se cortaron en tiras de 1 cm (Phillips & Hayman, 1970).

**Figura 8.** Raíces con residuos (A) y raíces luego del lavado (B)



*Nota.* Los autores (2024)

### 3.5.2 Clarificación de las raíces

Las raíces cortadas se depositaron en cassettes histológicos los cuales fueron colocados en un vaso de precipitación con agua destilada, hasta la tinción. En caso de no realizar la tinción en el mismo día que son segmentadas las raíces, es conveniente almacenarlas en refrigeración a 4°C hasta el día siguiente (Ho-Plágaro, *et al.*, 2020).

Se preparó un baño maría con una olla de aluminio en una estufa eléctrica. Se trabajó en una campana de extracción de gases BIOBASE FHI200(P) puesto que el KOH 10 % y el ácido láctico con el que se trabajó producen gases tóxicos al hervir. (Ho-Plágaro, *et al.*, 2020).

Se descartó el agua destilada de las raíces, cubrir con KOH 10 % y colocar el recipiente al baño maría, llevado a ebullición, durante 10 minutos.

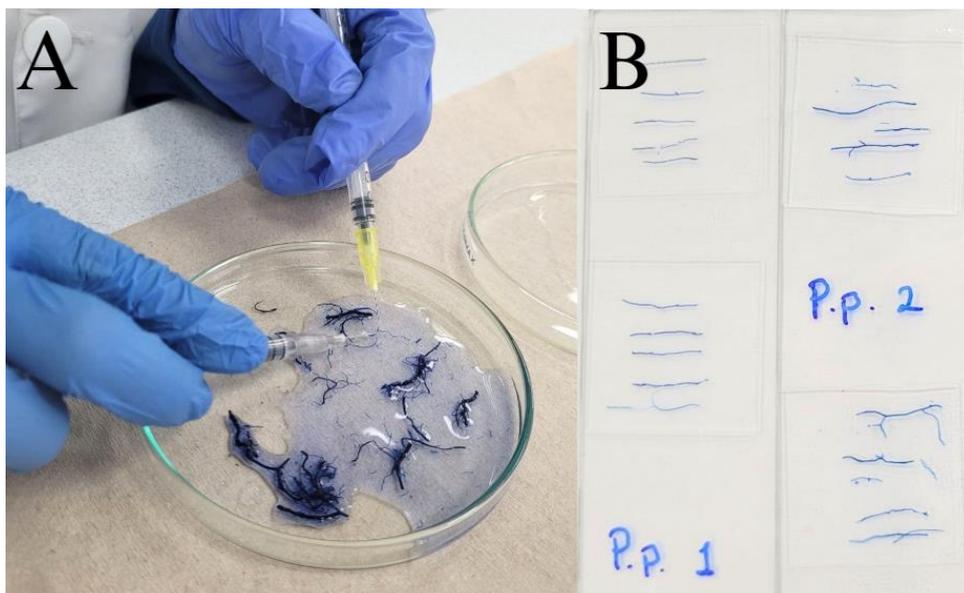
Luego se removió el KOH 10 %, se enjuagaron las raíces con agua potable varias veces.

Una vez retirado el agua de enjuague, se cubrieron las raíces con HCl 1 % durante 3 minutos a temperatura ambiente.

### 3.5.3. Tinción de raíces con azul tripano

Después del tiempo mencionado, se descartó el HCl 1 % sin enjuagar, luego se cubrieron las raíces con una solución de azul de tripano 0.05 % durante 10 minutos. Se removió la solución de azul de tripano 0.05 % y se cubrieron las raíces con una solución de lactoglicerol durante 1 hora para remover el exceso de colorante. Una vez transcurrido el tiempo, se procedió a montar las raíces en placas portaobjetos para su observación microscópica (Ho-Plágaro, *et al.*, 2020).

**Figura 9.** Raíces teñidas con azul tripano (A) y montaje de raíces (B).



*Nota.* Los autores (2024).

Este procedimiento se repite con las raíces obtenidas de los tratamientos establecidos.

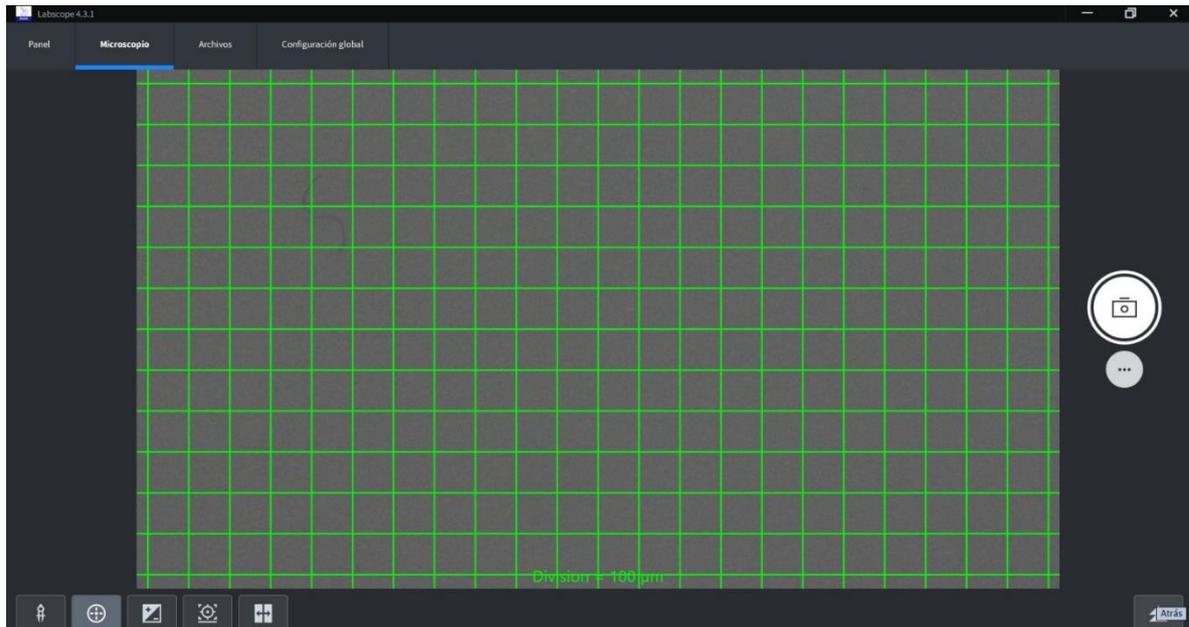
### **3.6. Examinación y cuantificación de micorrización mediante procedimientos morfométricos**

#### **3.6.1. Método de las intersecciones ampliadas de McGonigle (modificado)**

Este es un método mejorado para estimar la colonización micorrízica en una escala de medida más objetiva, que también elimina la interpretación subjetiva de si las hifas observadas en ausencia de arbusculos son micorrízicas. Esta metodología implica que la presencia de arbusculos o vesículas siempre supone la presencia de hifas (McGonigle et al., 1990).

Se preparó por duplicado portaobjetos, cada uno de los cuales contiene 10 fragmentos de raíz de 1 cm. La visualización y cuantificación se realizó mediante un objetivo de 20x LD A-PLAN, un microscopio invertido Carl Zeiss™ Axio Vert.A1, una cámara AxioCam 202 mono, además se utilizó el software Labscope con la opción “Superposiciones de la retícula” con el modo “Cuadrícula”.

**Figura 10.** Cuantificación de micorrización mediante la cuadrícula de Labscope.



*Nota.* Captura de pantalla del software, los autores (2024).

Para la cuantificación se tomaron en cuenta 3 intersecciones por raíz. Las intersecciones con los fragmentos de raíz se clasifican en función de la presencia o ausencia de arbusculos, vesículas e hifas. Por último, se aplican las fórmulas expuestas por McGonigle et al. (1990):

- **Proporción de la longitud de la raíz que contiene arbusculos**

Colonización arbuscular (AC %) = (Número de intersecciones con arbusculares/Número de intersecciones totales) \*100

- **Proporción de la longitud de la raíz que contiene vesículas**

Colonización vesicular (VC %) = (Número de intersecciones con vesículas/Número de intersecciones totales) \*100

- **Proporción de la longitud de la raíz que contiene hifas**

Colonización hifal (HC %) = (Número de intersecciones con hifas/Número de intersecciones totales) \*100

### **3.7. Recolección de semillas de *Physalis pubescens***

Una vez que se comprobó la presencia de colonización por HMA en las raíces de la especie vegetal silvestre se procedió a recolectar los frutos maduros para la obtención de semillas. La madurez del fruto garantiza que las semillas presentan condiciones óptimas (Edwards & Sundstrom, 1987; Vidigal et al. 2009).

A los frutos se les removió la envoltura externa y fueron lavados con agua potable. Luego, fueron cortados a la mitad con un bisturí, se retiraron las semillas para luego ser lavadas con agua potable con ayuda de un colador con la finalidad de remover excesos de pulpa (Tapia, 2019).

**Figura 11.** Lavado de frutos (A), fruto con envoltura (B) y fruto sin envoltura (C)



*Nota.* Los autores (2024)

Se sumergieron las semillas en un vaso de precipitación con agua para descartar las semillas que flotan, esto se debe a que estas semillas presentan un embrión poco desarrollado formando una cámara de aire que permite que la semilla flote (Varela & Arana, 2011). Por último, las semillas fueron depositadas en un plato bajo el sol para su secado.

### 3.8. Selección de semillas

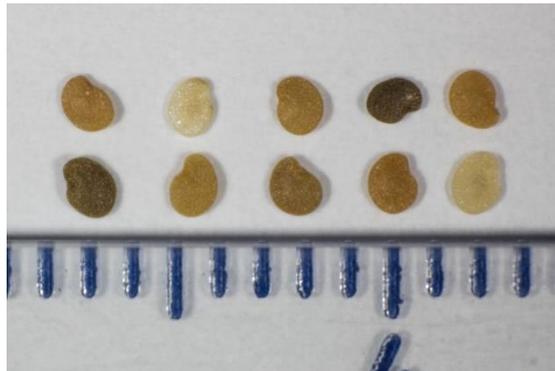
Después del secado, las semillas fueron sometidas a un criterio de uniformidad en cuestión de color y tamaño de área.

#### 3.8.1. Primer filtro: Color

En cuanto al color, se observaron de manera visual las semillas de *Physalis pubescens*, con el fin de ver si estas presentan o no una variación en el color. Mediante la plataforma web ArtyClick Colors se comprueba si las semillas presentan códigos Hex

similares/cercanos o distintos/lejanos. Se obtienen códigos Hex representativos, luego se emplea la función “ALEATORIO” en Microsoft Excel, para elegir al azar el color de semilla con el que se trabajara.

**Figura 12.** Variabilidad de color en semillas de *P. pubescens*.



*Nota.* Los autores (2024)

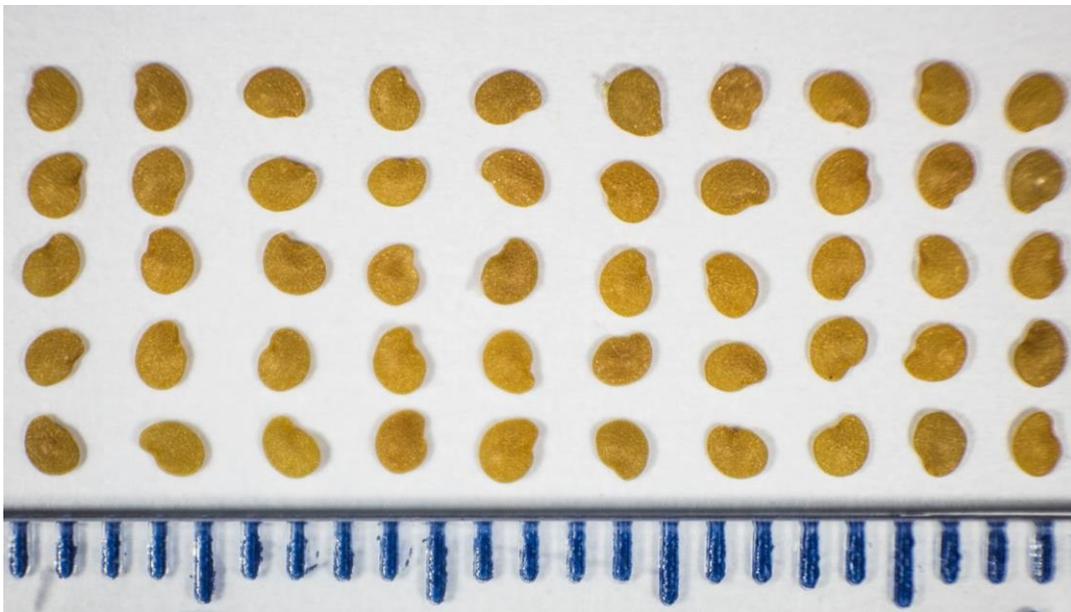
### 3.8.2. Segundo Filtro: Área

Se separaron 50 semillas al azar con las características del color elegido. Las semillas se ordenaron en una matriz de 5x10 como se observa en la **figura 13**, se evitó que estas se tocaran entre sí para una mejor visualización, y además se colocó una regla de referencia para el posterior análisis. Luego, con una cámara Canon Rebel T6 se procedió a realizar un registro fotográfico con las muestras para poder obtener el área de estas mediante el software Fiji v.2.14, plataforma para el análisis de imágenes biológicas (Schindelin et al., 2012). Se siguió los siguientes pasos: Open Fiji> File> Open> Select File> Set Scale> Image> Type> 8-bit> Image> Adjust> Threshold> Fill Holes > Convert To Mask> Set Measurements > Area> Analyze > Analyze Particle.

De las 50 semillas se eligieron 30 semillas al azar. Pero previo a aquello se realizó una estadística descriptiva (media, desviación estándar, mínimo, máximo, mediana, cuartil

25%, cuartil 75%, test de normalidad de Shapiro-Wilk), visualizaciones mediante un histograma y diagrama de caja. Esta data permitirá confirmar si las semillas presentan áreas similares. Para el análisis estadístico se empleó el lenguaje Python mediante el IDE “PyCharm” en conjunto con las librerías estadísticas: pandas, numpy, matplotlib.pyplot, y scipy.stats.

**Figura 13.** 50 semillas de *P. pubescens*.



Nota. Los autores (2024)

### 3.9. Tamizado húmedo

Las esporas fueron extraídas del suelo recolectado, teniendo como base el protocolo de Tamizado Húmedo propuesto por Gerdemann y Nicolson (1963), que se encuentra descrito en la página web del INVAM (West Virginia University, 2016). La metodología se modificó para acoplarse a los materiales disponibles en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana.

A partir de la muestra de suelo se pesaron 10 g con ayuda de una balanza, al cual se les agregó 1 L de agua destilada en un vaso de precipitación. Luego se agitó con ayuda de una cuchara hasta homogeneizar la solución. Con el fin de eliminar residuos, la muestra se deja pasar a través de un juego de tamices de 425  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 125  $\mu\text{m}$  y 75  $\mu\text{m}$ . Se hace un lavado constante con agua, pero sin perder el contenido retenido en los tamices. Se recolecta el contenido del tamiz de 75  $\mu\text{m}$  en un vaso de precipitación de 50 ml, luego este volumen se reparte en tubos Falcon de 15 ml, aforando hasta 1 ml, donde se agregará una solución de sacarosa + Tween 80 hasta completar los 10 ml de los tubos. Los tubos pasaron a ser centrifugados a 3000 rpm durante 5 minutos. Se vierten los sobrenadantes en varias cajas Petri que luego serán llevadas al estereomicroscopio para iniciar el conteo.

### **3.10. Conteo de esporas de HMA**

Las cajas Petri fueron llevadas a un estereomicroscopio Zeiss Discovery V8 para su observación. Se separaron de los residuos de tierra u otros materiales exógenos. Se utilizó una fuente de luz fría CL 6000 LED (D) Zeiss para facilitar el proceso de visualización. Con la Axiocam 208 Color (cámara acoplada al estereomicroscopio), el software Zeiss Labscope y la opción “Contar”, se realizó la enumeración en vivo.

Para el conteo, se utilizó el método expuesto por Guerra y Chacón (2012) donde una densidad baja corresponde a  $< 1$  esporas por gramo de suelo (E/g.S); una densidad media corresponde a 1 a 10 E/g.S y una densidad alta corresponde a  $> 10$  E/g.S. De los 10 g de suelo pesados, se observó el número de esporas depositados en las cajas Petri para registrar la cantidad. Repetir el **punto 3.8** 2 veces más, anotar las cantidades de esporas de las cajas Petri. Con estos 3 valores se calculó un promedio, lo que permitió tener conocimiento de la cantidad de esporas aproximadas por cada 10 g de suelo.

Las esporas utilizadas para este conteo fueron almacenadas en solución Ringer y puestas a refrigeración a 4°C (Maitra et al., 2021), para su posterior identificación. Este proceso se llevó a cabo con ayuda de jeringas de 1 mm para poder manipular las esporas con precisión y ser transportadas a un tubo Eppendorf de 2 ml con la solución.

### **3.11. Inóculo HMA**

#### **3.11.1. Preparación del antibiótico**

Se añadió 2,4 ml de agua destilada o solución salina provista por el fabricante a la ampolla de Penicilina G benzatínica [1'200000 UI] GA, lo que reconstituye la Penicilina a una concentración de 500,000 UI/ml. Luego se transfiere la totalidad del volumen de la solución a un vaso de precipitación de 100 ml. Se agregó 1 g de Estreptomicina a esta solución y se mezcló con un agitador magnético. Se aforó la solución a 100 ml con agua destilada. Se esterilizó la solución por filtración con un disco para jeringa con membrana de PTFE con poros de 0,22 µm. Se preparó alícuotas en tubos cónicos de 15 ml para solución stock, en microtubos de 1.5 ml para uso inmediato (Mayor et al., 2005; Galicia, 2008).

#### **3.11.2. Preparación del inóculo**

Al no contar con un banco de esporas o propágulos previos, se trabajó con esporas aisladas. El proceso metodológico para el aislamiento es complicado e implica mayor inversión de trabajo y tiempo. Se determinó que los inóculos para este estudio cuenten con un rango mínimo de esporas.

Del promedio que se obtuvo en el **punto 3.9** conteo de esporas se estableció que los inóculos estarán conformados de la cantidad aproximada de esporas que provengan de 20 g de suelo micorrizosférico por inóculo.

Para la preparación de un inóculo de HMA se trabajó vertiendo los sobrenadantes provenientes de 20 g de suelo micorrizosférico que se obtienen del tamizado húmedo, en un vaso plástico de 200 ml. Este proceso se repite 14 veces más para un total de 15 inóculos, valor definido por la cantidad de tratamientos en este estudio.

### **3.12. Identificación de esporas**

Para la identificación taxonómica de esporas de HMA, se llevó a cabo un registro fotográfico a partir del software Zeiss Labscope. Las imágenes capturadas fueron comparadas con diversos manuales morfológicos de acceso libre, se complementó este análisis con consultas en bases de datos especializadas, como por ejemplo la base de datos del INVAM (International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi) de la Universidad de Kansas. Este enfoque permitió una identificación aproximada al correlacionar características morfológicas clave de las esporas, así como las descripciones taxonómicas disponibles en la literatura, manuales validados y otras bases datos reconocidas.

Este paso se realizó con un estereomicroscopio Zeiss Discovery V8 y un microscopio Zeiss Primostar 3.

### 3.13. Propagación de *Physalis pubescens*

#### 3.13.1. Preparación de sustrato

El sustrato que se utilizó para la propagación de la especie vegetal seleccionada para este estudio consistió en una mezcla de turba y arena, en una proporción 1:1. Se utilizó turba la cual brinda el soporte necesario para el desarrollo de las plántulas (Agrosavia, 2019). La arena en cambio se utilizó con el fin de aumentar la porosidad del sustrato para mejorar la infiltración del agua, además incrementa la aireación de las raíces, así como facilita la expansión del HMA en el medio (INVAM, 2024).

**Figura 14.** Turba/Arena (A), Esterilización sustrato (B)



*Nota.* Los autores (2024)

Para la preparación de la mezcla, ambos componentes fueron esterilizados en una estufa Memmert a 85 °C durante 30 minutos, para asegurar la inocuidad del sustrato (Wolf et al., 1994). Luego se procedió a mezclar la turba junto con la arena en un balde con ayuda de una pala hasta lograr una consistencia homogénea.

Se guardó el sustrato en porciones separadas en fundas Ziploc y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

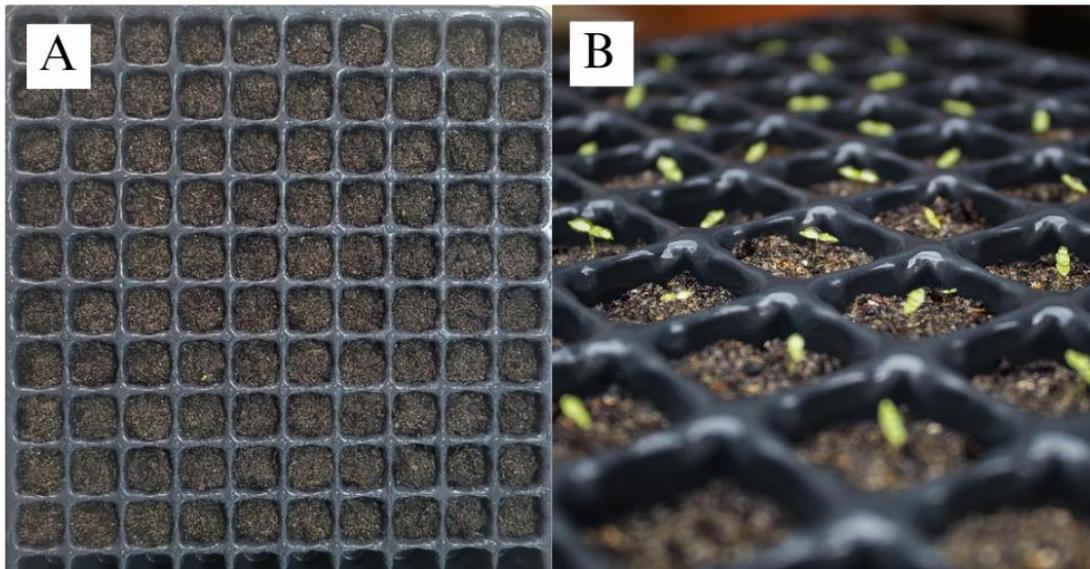
### **3.13.2. Sembrado semillas**

Para la propagación de *Physalis pubescens* por medio de las semillas recolectadas y seleccionadas, se utilizó un semillero de 128 pocillos, cada pocillo de 6 cm de altura.

Se humedece los pocillos con el fin de que el sustrato se adhiera y con ayuda de una cuchara, se colocó sustrato de turba con arena (1:1) en cada pocillo hasta cubrir un 75 % de cada pocillo, 30 pocillos fueron rellenos con el sustrato. Después, se colocó una semilla en el centro de cada pocillo y se presionó sin llegar a enterrarlas.

Finalmente se humedece una última vez la superficie del sustrato, se cubre la bandeja con papel plástico para generar un cálido ambiente húmedo mientras que permite el paso de luz solar para crear las condiciones perfectas de germinación (de Freitas et al., 2021). Las semillas fueron germinadas a temperaturas ambientales que oscilaron en un rango de 21 °C a 31 °C durante 20 días.

**Figura 15.** Semillero de 128 pocillos (A) y plántulas de *Physalis pubescens* (B)



*Nota.* Los autores (2024)

### 3.13.3. Trasplante

Una vez que las plántulas alcanzaron el estadio de planta se procedió al trasplante a los recipientes finales. Para ello se utilizaron fundas plásticas perforadas de siembra de 1.2 L, las cuales fueron rellenas con el sustrato turba y arena 1:1. Se procedió a realizar una cavidad de 8 cm de profundidad en el medio del recipiente.

Con ayuda de una espátula, se retiraron con cuidado las plantas de cada pocillo del semillero y fueron colocadas en el agujero realizado en los recipientes. Una vez que la planta se encontraba posicionada en la cavidad se procedió a irrigar con el inóculo de HMA, bañando tanto las raíces como las paredes del agujero, esto con el fin de asegurar el mayor contacto entre el inóculo y la planta.

Luego, se rellenan los espacios vacíos con más sustrato hasta rellenar la cavidad y asegurar el soporte de las plantas. Es de carácter menester que este paso sea realizado con cautela, se debe evitar que las raíces sean maltratadas a la hora de trasplantar lo cual afectaría el desarrollo de la planta.

**Figura 16.** *P. pubescens* listas para trasplante (A) y trasplante a los recipientes finales

(B)



*Nota.* Los autores (2024)

### 3.14. Preparación de los tratamientos

Una vez que las plantas fueron trasplantadas a los recipientes, damos inicio a los tratamientos.

En el experimento se establecieron seis tratamientos diferentes para evaluar la influencia de las micorrizas arbusculares y la salinidad en las plantas. El blanco consistió en plantas corrientes sin inóculo de HMA ni estrés salino, corresponde al tratamiento 1 (T1). El T2 consistió en plantas inoculadas con HMA como control negativo. El T3 consistió en plantas inoculadas con HMA y tratadas con 80 mM de NaCl, mientras que en el T4 se expusieron las plantas únicamente a 80 mM de NaCl, sin la presencia de HMA. El T5 combinó plantas con inóculo de HMA bajo un estrés más severo de 180 mM de NaCl, y el T6 incluyó plantas expuestas a 180 mM de NaCl sin HMA.

Todas las plantas fueron alimentadas con una solución nutritiva comercial como base a la cual se le añadieron concentraciones de NaCl para los tratamientos bajo estrés salino. La

solución se mantuvo a un pH de 5.5 a 6.5, valor recomendado por el fabricante de la solución nutritiva. Cada planta fue regada con 200 ml de solución cada 3 días, las cantidades de riego y la frecuencia se basaron en el trabajo de Miranda (2012).

En el caso del grupo que se sometió a estrés salino, se utilizaron dos concentraciones de NaCl: 80 mM y 180 mM. Se eligieron estas concentraciones en base al trabajo de Shoenlah (2022).

Los tratamientos tuvieron una duración de 30 días, desde el trasplante hasta la recolección final de datos.

**Figura 17.** Riego con los tratamientos establecidos



*Nota.* Los autores (2024)

### **3.15. Medición de parámetros morfológicos**

En el día 30 se tomaron los siguientes datos: altura de planta, área de hojas, tamaño/longitud y peso de raíces.

Para la medición de la altura de las plantas, se utilizó una regla de 30 cm, se tomó como inicio la base de la planta. Todos los individuos fueron medidos.

En cuanto a la medición del área de las hojas se recortan las hojas de la zona media de la planta con ayuda de una tijera y se procede a realizar un registro fotográfico. Las medidas se tomaron con el software de análisis de imágenes Fiji v.2.14.

Se tomó el sistema radicular de dos individuos de cada tratamiento de forma aleatoria. Las plantas fueron removidas de sus recipientes, con ayuda de un bisturí se removió el sistema radicular sin afectar la integridad de las raíces. Estas fueron sacudidas para remover todos los excesos de sustrato y luego fueron llevadas a una balanza para ser pesadas. Se generó el registro fotográfico, luego se procedió a tomar las mediciones de longitud con ayuda del software Fiji v.2.14.

### **3.16. Preparación del extracto foliar vegetal**

Se secaron suficientes hojas maduras de los diferentes tratamientos por duplicado a 45° durante 48h, en una estufa Memmert y se empleó un mortero para la molienda. Con 0.5 gramos de muestra de cada tratamiento, se preparó una mezcla con 10 ml de metanol 99.8 % en un baño ultrasonido GNATUS por 20 min; del extracto, se separaron 15 ml, porción que se centrifugó a 14000 rpm durante 8 min en un centrífuga mrc LGCEN-307. Luego se separó 2 ml del sobrenadante y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga Eppendorf MiniSpin (Atanassova et al., 2011).

Los extractos se diluyen a diferentes concentraciones: 200 y 500  $\mu\text{L ml}^{-1}$ .

### 3.17. Medición de la actividad antioxidante por método DPPH

- Preparamos una solución de DPPH al 0.004 % en metanol al 98.8 % (Pesamos 4 mg de DPPH, se aforó a 100 ml de metanol en oscuridad), colocamos en un frasco cubierto con aluminio, y se mantuvo en refrigeración hasta el momento de uso.
- En tubos, 1 ml de los extractos a las concentraciones indicadas fueron añadidos a 4 ml de una solución de DPPH 0.004 %.
- Se organizaron los tubos en una gradilla y se pusieron en agitación a 200 rpm en una incubadora agitadora (marca) durante 45 minutos en completa oscuridad.
- Se encendió el espectrofotómetro UV-VIS DR6000 HACH, se programó la longitud de onda a 517 nm.
- Enceramos el equipo con metanol al 99.8 %.
- Medimos la absorbancia del blanco (DPPH + metanol).
- Medimos las absorbancias de las diferentes muestras a 517 nm.

El porcentaje de inhibición se calculó con ayuda de la siguiente fórmula:

$$I\% = [(Abs_{\text{blanco}} - Abs_{\text{muestra}}) / Abs_{\text{blanco}}] \times 100$$

Donde Abs representa la absorbancia.

## Capítulo 4

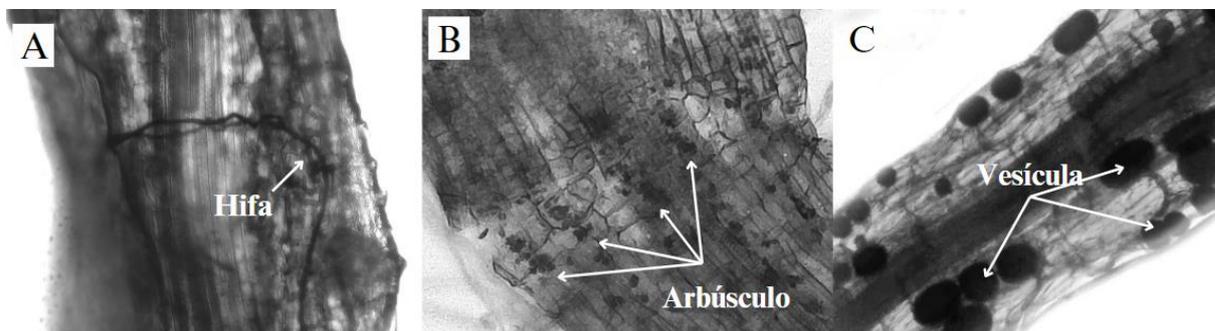
### Resultados y discusiones

#### 4.1. Porcentaje de micorrización de *Physalis pubescens* silvestre

Se cuantificó el porcentaje de colonización de HMA en raíces del ejemplar silvestre de *P. pubescens*. Con un porcentaje de micorrización total (MT) de 56,6 % el cual se desglosa en: 90% de hifa, 48,3 % de vesícula y 31,6 % de arbuscúlos tal como se muestra en la **Figura 18**.

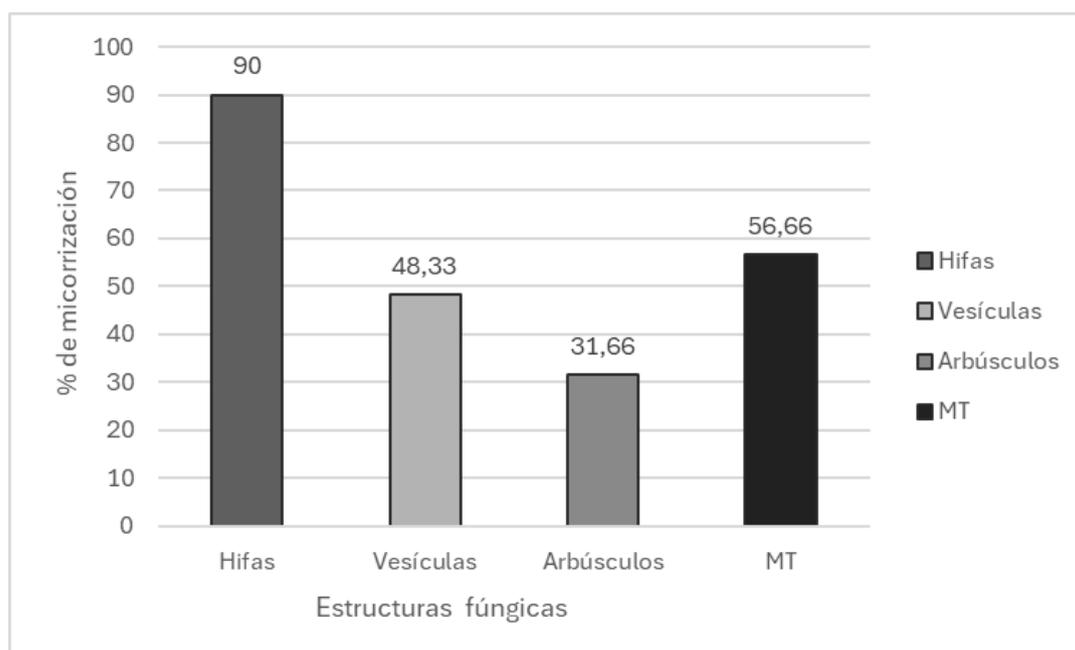
Montana (2018) reportó un 52% de micorrización en *Solanum hindsianum*; por otro lado, los investigadores Songachang & Kayang (2012) demostraron que tres especies del género *Solanum spp.* Presentaron un porcentaje de micorrización total no mayor al 42%. Otra especie de la familia solanácea, *Nicotiana plumbaginifolia* reportó un porcentaje de micorrización del 74% (Mandal & De, 2024). Una pariente cercana, *Physalis peruviana* reportó un MT del 68,5% (Ramírez et al., 2019). En comparación con estos valores, el MT del ejemplar silvestre del presente estudio cuenta con un valor superior. Sin embargo, no se puede afirmar con certeza que *Physalis pubescens* cuente con una mayor capacidad para promover la colonización micorrícica, para ello se debe proyectar en trabajar con un mayor volumen de raíces para obtener una mejor estadística a la hora de cuantificar la micorrización. Además, la información referente a la micorrización asociada a *P. pubescens* es limitada o nula.

**Figura 18.** Estructuras fúngicas en raíces de *Physalis pubescens* silvestre; Hifa (A), Arbúsculos (B) y Vesículas (C).



*Nota.* Los autores, 2024.

**Figura 19.** Porcentajes de micorrización de *Physalis pubescens* silvestre



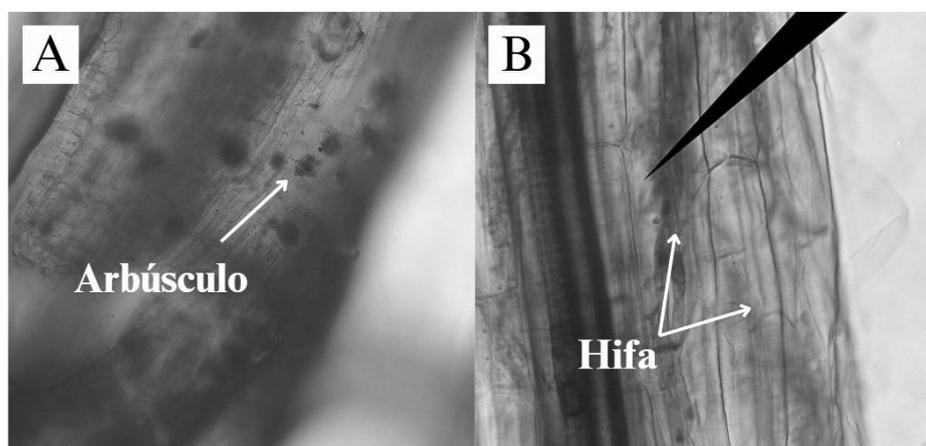
*Nota.* Los autores (2024)

El grupo de plantas inoculadas con HMA nativos presento un porcentaje de MT del 34,2 %. Con respecto a las estructuras fúngicas observadas se obtuvo un 58,33 % de hifa, 18,33 % de vesícula y un 11,66 % de arbúsculo.

El porcentaje de colonización micorrízica decayó a medida que la concentración de NaCl aumento. Se observo una reducción de estructuras fúngicas, en consecuencia, un porcentaje menor de micorrización. El tratamiento de mayor concentración de NaCl (180 mM) no demostró presencia de HMA lo cual sugiere que las concentraciones de extrema salinidad interfieren con el potencial colonizador de los HMA nativos. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Miranda (2012) donde concluyó que concentraciones elevadas de NaCl inhiben la micorrización en plantas de *P. peruviana*.

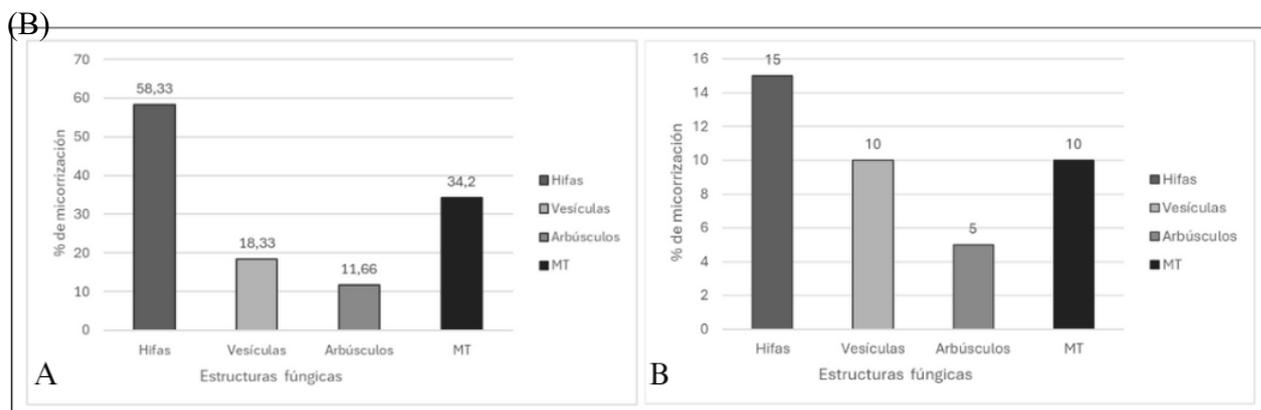
Diversos estudios (Estrada et al., 2012; Aroca et al., 2013; Lenoir et al., 2016) reportan el impacto de la salinidad en el desarrollo de los HMA. Estos trabajos evidencian la disminución de las capacidades de los HMA a la hora de colonizar a sus hospederos y el daño fisiológico que esta salinidad causa en las esporas o estructuras fúngicas, donde se mencionan bajos porcentajes de germinación en esporas y pobre desarrollo de hifas germinativas. Estos hallazgos respaldan los resultados obtenidos en el presente estudio, además, esto resalta la necesidad de investigar HMA con tolerancia a altos niveles de salinidad en los suelos.

**Figura 20.** Estructuras fúngicas en raíces de *Physalis pubescens* T2; Arbúsculo (A), e Hifa (B)



*Nota.* Los autores (2024)

**Figura 21.** Porcentajes de micorrización de T2 (A) y porcentajes de micorrización de T3



*Nota.* Los autores (2024)

#### 4.2. Densidad de esporas asociado a la micorrizosfera de *P. pubescens*

##### silvestre

Se evidenció que por cada 10 gramos de suelo hubo un promedio de 22,67 esporas. Este valor refleja una densidad media. Una cantidad intrigante si se toma en cuenta que el suelo se encontraba en una zona perturbada por actividades antropogénicas (sitios de construcción, herbicidas, entre otros). Akond (2008) reportó una densidad baja-media (1-2 esporas E/g.S) en solanáceas cultivadas en suelos maltratados por la actividad antropogénica en Bangladesh.

**Tabla 2.** Densidad de esporas en *Physalis pubescens* silvestre donde “R” corresponde a las réplicas, (E/g.S) corresponde a esporas por 1 gramo de suelo.

<i>Densidad de esporas en micorrizosfera de Physalis pubescens silvestre</i>			
	Esporas/10 g suelo	E/g.S	Densidad
R1	22	2,2	MEDIA
R2	17	1,7	MEDIA
R3	29	2,9	MEDIA

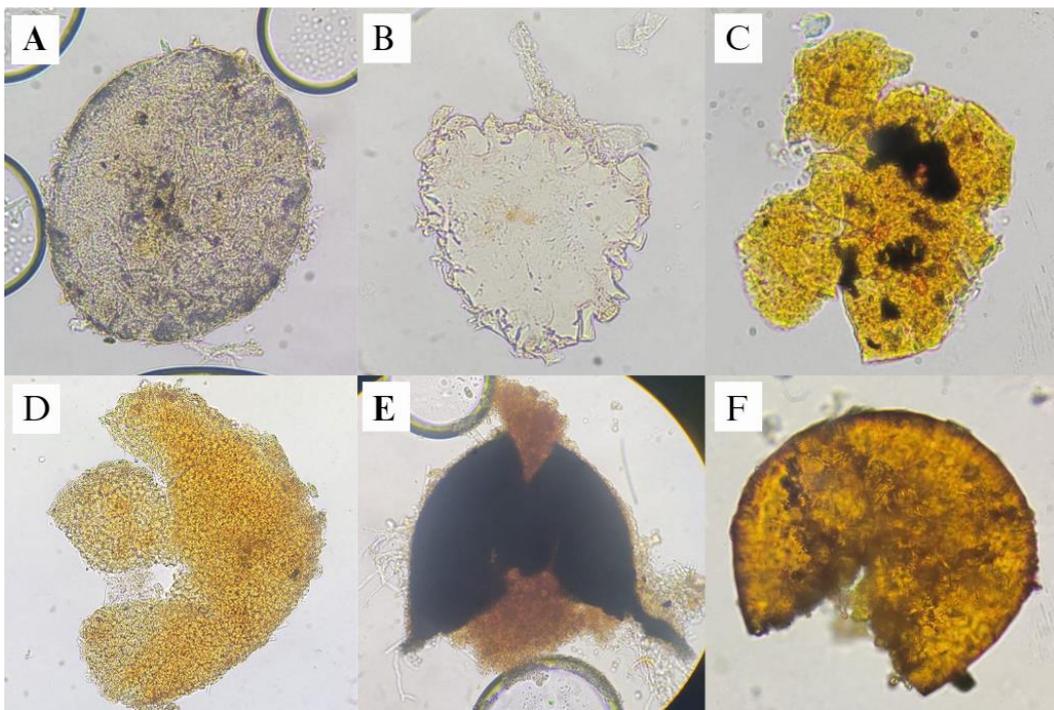
Por otro lado, existen estudios que demuestran una alta densidad de esporas de HMA asociada a la micorrizosfera de varias especies de solanáceas con valores de entre 19,42 a 29,6 E/g.S (Songachang y Kayang, 2008). Otros trabajos (Hage-Ahmed et al., 2019; Zocco et al., 2008) demuestran que algunos géneros de HMA se ven afectados en presencia de herbicidas y fungicidas, inhibiendo el desarrollo de hifas o de la espora misma, lo cual lleva a la muerte del propágulo por falta de un anfitrión.

El valor que se obtuvo de E/g.S permitió delimitar la cantidad de esporas que se empleó para la elaboración del inóculo de los tratamientos. Serralde (2022) en el manual “Multiplicación de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) a pequeña escala para producción de plántulas de uchuva” sugiere aplicar 70 esporas por plántula. Vale la pena recalcar que en este manual las esporas se obtuvieron a partir de plantas trampa, lo que aseguraba una gran cantidad de esporas para los inóculos. No obstante, en el contexto del presente estudio no se contaba con un banco de esporas o planta trampa, por lo que la

única vía de obtención era el aislamiento manual de las esporas asociadas a la micorrizosfera de *Physalis pubescens* silvestre.

#### 4.3. Identificación de esporas de HMA nativas de micorrizosfera de *P. pubescens*

**Figura 22.** *Ambispora* sp. (A), *Acaulospora* sp. (D), *Septoglosum* sp. (E) y *Diversispora* sp. (F)



*Nota.* Los autores (2024)

Del suelo micorrizosférico asociado a *P. pubescens* silvestre, se obtuvieron diferentes morfotipos de esporas de HMA. De las esporas encontradas se identificaron al menos tres generos: *Acaulospora* sp., *Ambispora* sp., *Septoglosum* sp., *Diversispora* sp. tal como se indica en la **figura 22**. Ciertas esporas no se lograron identificar debido a que a la hora de hacer el montaje en placa, estas no se aplastaron de manera correcta quedando

deforme la muestra, esto dificultó la identificación puesto que las estructuras y ornamentaciones no se podían distinguir.

La identificación se dio a cabo utilizando manuales y catálogos con el fin de comparar las características de nuestras esporas con las de cada género revisado. En caso de *Acaulospora sp.*, una de sus características es la capa externa ya que esta es muy flexible y forma esa apariencia rugosa lo cual era bastante notorio en algunas esporas encontradas. Con respecto a los otros posibles géneros, se hizo una comparativa del color y la forma, pero no se podría confirmar, ya que el montado no se realizó de manera correcta como se mencionó antes.

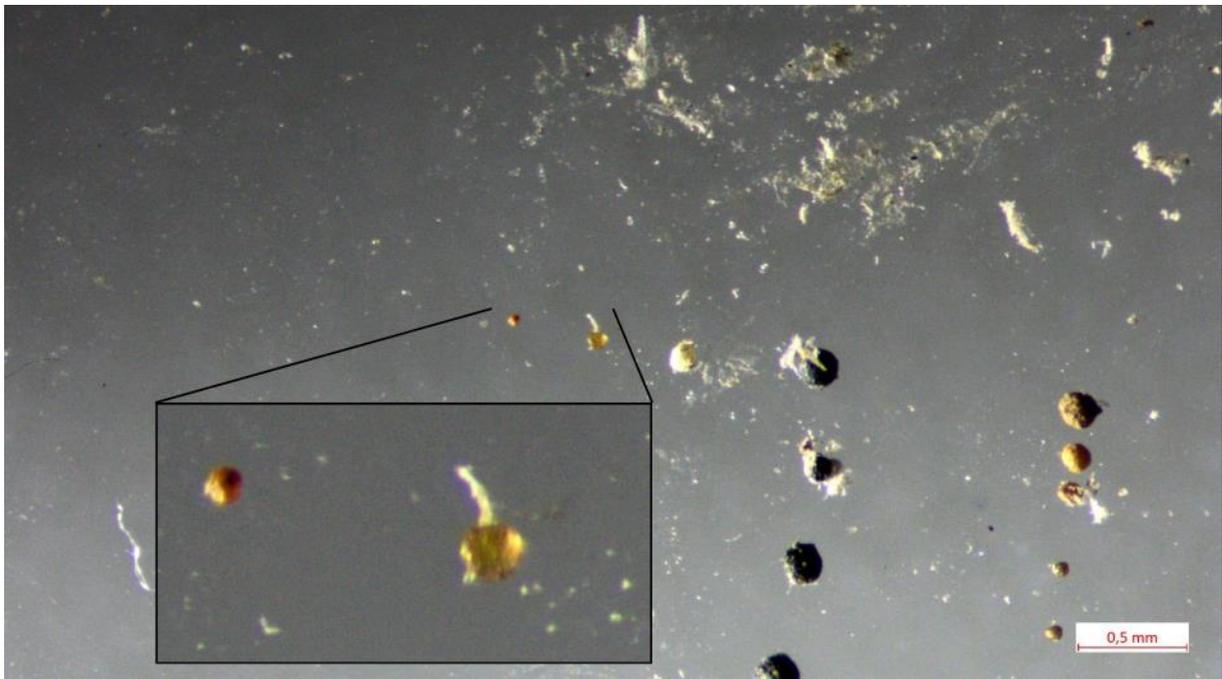
Estos géneros de HMA se han reportado anteriormente en solanáceas (Ramírez et al., 2019; Taurinanda & Banjarnahor, 2023). Por otro lado, es importante señalar la naturaleza cosmopolita de los HMA, donde se puede encontrar las mismas familias en diferentes especies vegetales, siendo *Glomeraceae*, *Acaulosporaceae* y *Gigasporaceae* las familias más predominantes de acuerdo con los hallazgos de Cofré (2019) donde realiza una revisión de la diversidad de HMA en suelos de Sur América.

La **figura 23** aunque no permite identificar el género de una espora, debido al empleo de un estereomicroscopio que no cuenta con magnificaciones superiores, si permite de manera global observar diferentes tamaños, colores y formas. Esta variabilidad de parámetros permite un primer acercamiento para confirmar que en efecto se tiene diferentes géneros de HMA.

Estos hallazgos nos brindan un pequeño vistazo a la diversidad de HMA nativos en el campus María Auxiliadora de la Universidad Politécnica Salesiana. No obstante, el muestreo se limitó a una pequeña porción de suelos que han sido intervenidos por

actividades antropogénicas, por ello, es necesario realizar un muestreo más amplio para determinar la biodiversidad de HMA con mayor exactitud.

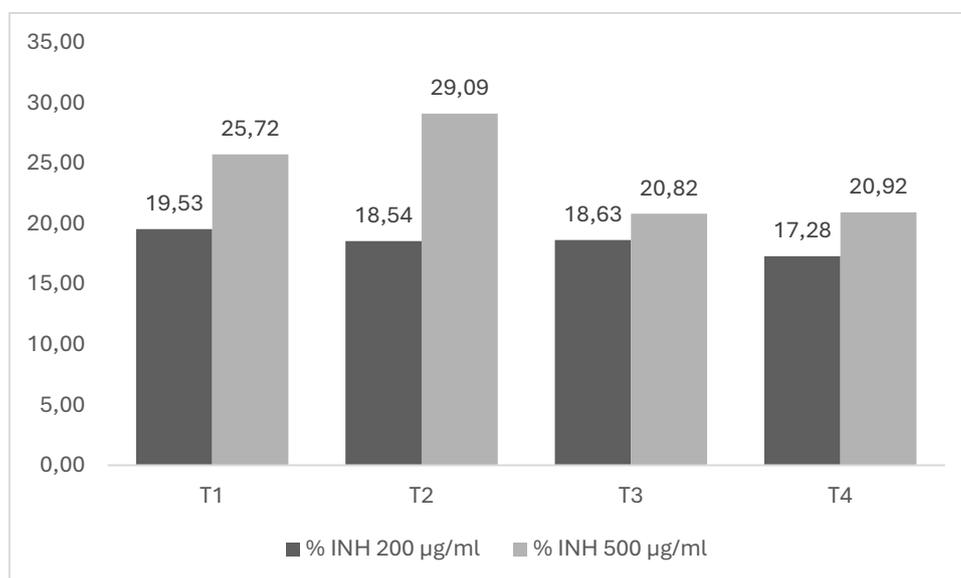
**Figura 23.** Esporas de HMA observadas con estereomicroscopio Zeiss



*Nota:* Los autores (2024)

#### 4.4. Medición de la actividad antioxidante por método DPPH

**Figura 24.** Histograma de la actividad antioxidante en *Physalis pubescens*



*Nota.* Los autores (2024)

Previo al análisis se verificó que las plantas hayan pasado de manera exitosa por un proceso de estrés. Aquello se confirmó observando síntomas como clorosis en las hojas (ver **anexo 8**), disminución en el tamaño de las raíces (ver **anexo 8**), y caída de hojas en los tratamientos con NaCl. Además de una marcada mortalidad en el tratamiento con NaCl 180 mM (ver **anexo 7**).

La actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH, se empleó como otro indicador de estrés abiótico. Se esperaba que a medida que aumentará la concentración de NaCl en las plantas, la producción de compuestos antioxidantes también aumentara. La literatura menciona que la asociación micorrízica incrementa la producción de antioxidantes (Zhang B. et al., 2023), no obstante, al observar la **figura 24**, se evidencia como el T3 (tratamiento con NaCl 80 mM + HMA) presenta un menor nivel de inhibición (lo que indica baja producción de antioxidantes), 18,63 % [200 µL/ml<sup>-1</sup>] y 20,82 % [500 µL/ml<sup>-1</sup>].

<sup>1</sup>], en comparación con el T1 (tratamiento sin estrés salino ni HMA), 19,53 % [200  $\mu\text{L}/\text{ml}^{-1}$ ] y 25,72 % [500  $\mu\text{L}/\text{ml}^{-1}$ ].

Aunque los valores parecen indicar que las plantas de *Physalis pubescens* inoculadas con HMA no presentan una mayor actividad antioxidante, hay que tomar en cuenta que este estudio se trabajó con un consorcio (con valores aleatorios de cada especie de HMA en los inóculos) de esporas, por lo que no se puede asegurar cual especie de HMA sería la encargada de brindar una mayor capacidad antioxidante a la planta. Además, Gao et al. (2023) indica que toma alrededor de tres semanas para iniciar el contacto entre la raíz y el HMA. En cambio, una simbiosis estable se empieza a presentar a partir de sexta semana. *P. pubescens* parece no ser la excepción, donde el estudio duró 30 días a partir de la inoculación de esporas. Un valor interesante fue el del T2 (tratamiento solo HMA), donde a una concentración de 500  $\mu\text{L}/\text{ml}^{-1}$  presentó el mayor porcentaje de inhibición, 29,09 %, sin estar frente a un estrés salino. Sin embargo, el resultado de este tratamiento no se le puede asignar con certeza a la micorrización, sino más bien parece estar ligado al hecho de que este fue un tratamiento sin estrés salino.

En este estudio se omitió para la medición de actividad antioxidante a los tratamientos con NaCl 180 mM, debido a que el tratamiento T5 inoculado con HMA, no presentó micorrización en sus raíces.

## Capítulo 5

### 5. Conclusiones y recomendaciones

#### 5.1. Conclusiones

- Basado en los resultados de micorrización mediante la tinción histoquímica con azul de tripano, *Physalis pubescens* es una especie vegetal capaz de generar simbiosis con hongos micorrízicos arbusculares en un porcentaje mayor al 50 %. Aunque en condiciones de estrés salino, NaCl 80 mM, este porcentaje es menor al 20 % a los 30 días de inoculación. En cambio, en condición de NaCl 180 mM, se presentó 0% porcentaje de micorrización.
- El análisis morfológico de las esporas de HMA asociado a la micorrizosfera de *Physalis pubescens* demostró la presencia de al menos cuatro géneros de HMA probables, siendo *Acaulospora sp.*, *Ambispora sp.*, *Septoglomus sp.*, *Diversispora sp.*
- Los valores de inhibición en la actividad antioxidante resultaron bajos en el tratamiento con NaCl 80 mM inoculados con HMA, sin embargo, esta repuesta parece estar influenciado por el limitado tiempo que tuvo *P. pubescens* para generar una simbiosis estable con los HMA.

## 5.2. Recomendaciones

- Se sugiere optar por otras técnicas de microscopía para la visualización-conteo de estructuras como las hifas, y arbusculos. La tinción de las estructuras con WGA Alexa Fluor 488, y el empleo de un microscopio de fluorescencia confocal, permitirá observar mejor las estructuras que pasan desapercibidas usando un microscopio de campo claro.
- En futuras investigaciones similares, es importante tener tiempos de experimentación más largos para poder observar mejor como avanza la micorrización en el hospedero.
- Se sugiere realizar una identificación molecular mediante los genes de ARNr, o el gen que codifica a la proteína tubulina beta, para un acercamiento más exacto a la diversidad de HMA nativos al campus María Auxiliadora.
- Se sugiere para investigaciones similares que el inóculo de HMA este compuesto por una sola especie para evitar variabilidad en los resultados. Lo que vuelve imperativo la necesidad de contar con plantas trampas para poder acceder a un mayor numero de esporas de HMA, de la especie que se piense evaluar.
- Se sugiere el uso de un microscopio DIC para una mejorar visualización de las capas de esporas de HMA, lo que permitirá una mejorar identificación.

## Bibliografía

- Abbaspour H, Pour FSN, Abdel-Wahhab MA. Arbuscular mycorrhizal symbiosis regulates the physiological responses, ion distribution and relevant gene expression to trigger salt stress tolerance in pistachio. *Physiol Mol Biol Plants*. 2021;27:1765–78.
- Akiyama, K., Matsuzaki, K.-i., & Hayashi, H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435, 824-827. <https://doi.org/10.1038/nature03608>
- Aroca, R., Ruiz-Lozano, J. M., Zamarreño, Á. M., Paz, J. A., García-Mina, J. M., Pozo, M. J., & López-Ráez, J. A. (2013). Arbuscular mycorrhizal symbiosis influences strigolactone production under salinity and alleviates salt stress in lettuce plants. *Journal of Plant Physiology*, 170(1), 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.08.020>
- Atanassova, Maria & Georgieva, Silvia & Ivancheva, K.. (2011). Total Phenolic And Total Flavonoid Contents, Antioxidant Capacity And Biological Contaminants In Medicinal Herbs. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*. 46. 81-88.
- Avery, S.V., 2011. Molecular targets of oxidative stress. - *Biochem. J.* 434: 201-210.
- Bagyaraj, D.. (2014). Mycorrhizal Fungi. *Proceedings of the Indian National Science Academy*. 80. 415. [10.16943/ptinsa/2014/v80i2/55118](https://doi.org/10.16943/ptinsa/2014/v80i2/55118).
- Besserer, A., Puech-Pagès, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A., Roy, S., Portais, J.-C., Roux, C., Bécard, G., & Séjalon-Delmas, N. (2006). Strigolactones

stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology*, 4(7), e226. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040226>

Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method. *Food Science and Technology*, 30, 609–615.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT—Food science and Technology*, 28(1), 25–30.

Cardona, William Andrés, Gutiérrez D., Joan Sebastián, Monsalve C., Oscar Iván, & Bonilla C., Carmen Rosa. (2017). Efecto de la salinidad sobre el crecimiento vegetativo de plantas de mora de Castilla ( *Rubus glaucus* Benth.) micorrizadas y sin micorrizar. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 11(2), 253-266. <https://doi.org/10.17584/rcch.2017v11i2.6109>

Caverzan, A., G. Passaia, S. B. Rosa, C. W. Ribeiro, F. Lazzarotto, and M. Margis-Pinheiro, 2012. Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4): 1011–1019

Cedeño E. 2015. Enmiendas para disminuir la salinidad y mejorar la fertilidad de tres suelos dedicados al cultivo de arroz de inundación. Universidad Tecnológica Equinoccial. Santo Domingo, Ecuador. 26-27 pp.

Çelikli, F. Burcu & Akkelle, Pinar & Onus, A.. (2017). In vitro Salinity Evaluation Studies in Golden Berry (*Physalis peruviana* L.). *Biotechnology Journal International*. 20. 1-8. 10.9734/BJI/2017/37097.

- Chaudhary, P., Janmeda, P., Docea, A. O., Yeskaliyeva, B., Abdull Razis, A. F., Modu, B., Calina, D., & Sharifi-Rad, J. (2023). Oxidative stress, free radicals and antioxidants: Potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. *Frontiers in Chemistry*, *11*, 1158198. <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1158198>
- Chaudière, J., & Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: From chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, *37*(9-10), 949-962. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(99\)00090-3](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(99)00090-3)
- Chen, G., Yang, A., Wang, J., Ke, L., Chen, S., & Li, W. (2024). Effects of the synergistic treatments of arbuscular mycorrhizal fungi and trehalose on adaptability to salt stress in tomato seedlings. *Microbiology Spectrum*, *12*(3), e03404-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03404-23>
- Chen, J., Zhang, H., Zhang, X., and Tang, M. (2017). Arbuscular mycorrhizal symbiosis alleviates salt stress in black locust through improved photosynthesis, water status, and K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> homeostasis. *Front. Plant Sci.* 8:1739. doi: 10.3389/fpls.2017.01739
- Chen, J., Zhang, H., Zhang, X., and Tang, M. (2017). Arbuscular mycorrhizal symbiosis alleviates salt stress in black locust through improved photosynthesis, water status, and K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> homeostasis. *Front. Plant Sci.* 8:1739. doi: 10.3389/fpls.2017.01739
- Cheng, X.-P., Yin, B., Zheng, Q.-K., Xu, Z.-P., Xu, L.-T., Peng, G.-C., Wang, X.-N., & Shen, T. (2022). A review of the ethnobotanical value, phytochemistry, and pharmacology of *Physalis pubescens* L. *TMR Modern Herbal Medicine*, *5*(3), 18. <https://www.tmrjournals.com/mhm>
- Cofré, M. N., Soteras, M. F., Iglesias, M. del R., Velázquez, M. S., Abarca, C. L., Risio Allione, L., Ontivero, E., Cabello, M. N., Domínguez, A. S., & Lugo, M. A.

(2019). *Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in South America: A review*. En M. Lugo & L. Cabello (Eds.), *Mycorrhizal fungi in South America* (pp. 49-72). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-15228-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-15228-4_3)

Corrales, L. C., & Muñoz Ariza, M. M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*, 10(18), 125-137. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v10n18/v10n18a08.pdf>

CORWELL W., BEDFORD B., CHAPIN C. 2001. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in a phosphorus poor wetland and mycorrhizal response to phosphorus fertilization. *American Journal of Botany*, 88 (10), p. 18-24.

Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>

De, S., & Mandal, N. (2024). Diversity, abundance, and richness of arbuscular mycorrhizal fungi associated with some Solanaceous medicinal plants of Ballavpur Wildlife Sanctuary in West Bengal. *Journal of Mycopathological Research*, 62(1), 77-83. <https://doi.org/10.57023/JMycR.62.1.2024.077>

Development and validation of an HPTLC-DPPH assay method for the acteoside content of Ribwort ipowder®. (n.d.). Retrieved from <https://www.camag.com/article/cbs/129/development-and-validation-hptlc-dpph-assay-method-acteoside-content-ribwort-ipowder>

Estrada, B., Barea, J. M., Aroca, R., & Ruiz-Lozano, J. M. (2013). A native *Glomus intraradices* strain from a Mediterranean saline area exhibits salt tolerance and enhanced symbiotic efficiency with maize plants under salt stress conditions. *Plant and Soil*, 366, 333-349. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1418-9>

- Evelin, H., Kapoor, R., & Giri, B. (2009). Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Annals of botany*, 104(7), 1263–1280. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp251>
- Finlay, R. D. (2004). Mycorrhizal fungi and their multifunctional roles. *Mycologist*, 18(2), 91-96. [https://doi.org/10.1017/S0269-915X\(04\)00205-8](https://doi.org/10.1017/S0269-915X(04)00205-8)
- Fischer, G. & Miranda, D. 2012. Uchuva (*Physalis peruviana* L.). En: Fischer, G. (Ed.). Manual para el cultivo de frutales en el trópico. Produmedios. Bogotá, p. 851-873.
- Foyer, C. H., & Harbinson, J. (1993). Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. En *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants* (pp. 1-42). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351070454>
- Gao Y, Huang S, Wang Y, Lin H, Pan Z, Zhang S, Zhang J, Wang W, Cheng S, Chen Y. Analysis of the molecular and biochemical mechanisms involved in the symbiotic relationship between *Arbuscular mycorrhiza* fungi and *Manihot esculenta* Crantz. *Front Plant Sci.* 2023 Mar 7;14:1130924. doi: 10.3389/fpls.2023.1130924. PMID: 36959933; PMCID: PMC10028151.
- Garg, N., Bharti, A., Sharma, A., Bhalla, S. (2019). Plant-Mycorrhizal and Plant-Rhizobial Interfaces: Underlying Mechanisms and Their Roles in Sustainable Agroecosystems. In: Varma, A., Tripathi, S., Prasad, R. (eds) *Plant Microbe Interface*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-19831-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-19831-2_2)
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P., & Barker, D. G. (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *The Plant Cell*, 17(12), 3489-3499. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035410>

- Gill, S.S. and N. Tuteja, 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. – *Plant Physiol. Biochem.*, 48. : 909-930
- Giri B, Kapoor R, Mukerji KG. 2003. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and salinity on growth, biomass and mineral nutrition of *Acacia auriculiformis*. *Biology and Fertility of Soils* 38: 170–175
- Grigolo, C. R., de Cacia Oliveira, M., Schroll Loss, E., Ropelato, J., Oldoni, T., & Boeira Batista, C. (2020). Caracterización físicoquímica y contenido antioxidante de frutas de *Physalis*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(3), 607–618.
- Guerra, B. E., & Chacon, M. R. (2012). Simbiosis micorrízica arbuscular y acumulación de aluminio en *Brachiaria decumbens* y *Manihot esculenta*. *Revista de la Universidad de Santander*, 10(2). <https://revistas.udes.edu.co>
- Hajiboland R, Aliasgharzadeh N, Laiegh SF, Poschenrieder C. Colonization with arbuscular mycorrhizal fungi improves salinity tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Plant Soil*. 2010;331:313–27.
- Hasanuzzaman, M., & Fujita, M. (2011). Selenium pretreatment upregulates the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system and confers enhanced tolerance to drought stress in rapeseed seedlings. *Biological Trace Element Research*, 143(3), 1758-1776. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-8998-9>
- Hertwig, B., Streb, P., & Feierabend, J. (1992). Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiology*, 100(3), 1547-1553. <https://doi.org/10.1104/pp.100.3.1547>

Hossain, M.A., Hasanuzzaman, M. & Fujita, M. Coordinate induction of antioxidant defense and glyoxalase system by exogenous proline and glycinebetaine is correlated with salt tolerance in mung bean. *Front. Agric. China* **5**, 1–14 (2011). <https://doi.org/10.1007/s11703-010-1070-2>

<https://doi.org/10.5066/F7KH0KBK>

J., Quiroga & Kirschbaum, Daniel. (2021). *Physalis* (uchuva): especies frutales nativas de las Yungas subandinas con alto potencial de cultivo en Argentina. *Physalis* (goldenberry): native fruit species of the sub-Andean Yungas with high cultivation potential in Argentina. *Revista Horticultura Argentina* 40(103):90-114. <http://id.caicyt.gov.ar/ark:/s18519342/b1hh3umjs>. 40. 90-114.

Jahromi F, Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM. 2008. Influence of salinity on the in vitro development of *Glomus intraradices* and on the in vivo physiological and molecular responses of mycorrhizal lettuce plants. *Microbial Ecology* 55: 45–53.

Jorge, Luna & Romero, Isaac & Rojas, Keidys & Agrarios, Temas. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungi and its effect on the pepper plants development (*Capsicum annuum*, Solanaceae). *Temas Agrarios*. 21. 76-85.

Juniper S, Abbott LK. 2006. Soil salinity delays germination and limits growth of hyphae from propagules of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 16: 371–379.

Kosuta, S. et al. Diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 131, 952 – 962 (2003).

Larkins, N. J. (1999). Free radical biology and pathology. *Journal of Equine Veterinary Science*, 19(2), 84-85. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(99\)80075-6](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(99)80075-6)

- Lenoir, I., Fontaine, J., & Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: A review. *Phytochemistry*, *123*, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.01.002>
- Lin, Y., Lin, Y., Lin, M., Fan, Z., & Lin, H. (2021). Influence of hydrogen peroxide on the ROS metabolism and its relationship to pulp breakdown of fresh longan during storage. *Food Chemistry*: *X*, *12*, 100159. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100159>
- Liu, M.-Y., Li, Q.-S., Ding, W.-Y., Dong, L.-W., Deng, M., Chen, J.-H., Tian, X., Hashem, A., Al-Arjani, A. F., Alenazi, M. M., Abd-Allah, E. F., & Wu, Q.-S. (2023). Arbuscular mycorrhizal fungi inoculation impacts expression of aquaporins and salt overly sensitive genes and enhances tolerance of salt stress in tomato. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, *10*, Article 5. <https://doi.org/10.1186/s40538-023-00163-2>
- Lorenzi, H., Bacher, L., Lacerda, M., & Sartori, S. (2006). *Brazilian fruits and cultivated exotics*. Instituto Plantarum de Estudos da Flora. ISBN: 9788586714245
- Marro, N., Grilli, G., Soteras, F., Caccia, M., Longo, S., Cofré, N., Borda, V., Burni, M., Janoušková, M., & Urcelay, C. (2022). The effects of arbuscular mycorrhizal fungal species and taxonomic groups on stressed and unstressed plants: A global meta-analysis. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.18102>
- Mathur N, Singh J, Bohra S, Vyas A. 2007. Arbuscular mycorrhizal status of medicinal halophytes in saline areas of Indian Thar Desert. *International Journal of Soil Science* 2: 119–127

- May, M.J., Vernoux, T., Leaver, C., Van Montagu, M. and Inzé, D. (1998) Glutathione Homeostasis in Plants: Implications for environmental Sensing and Plant Development. *Journal of Experimental Botany*, 49, 649-667.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment*, 33(4), 453-467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x>
- Miranda, D., Fischer, G., Mewis, I., Rohn, S., & Ulrichs, C. (2014). Salinity effects on proline accumulation and total antioxidant activity in leaves of the cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 87, 67-73. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2014.087.010>
- Miranda, Diego & Ulrichs, Christian & Fischer, Gerhard. (2012). Efecto del cloruro de sodio (NaCl) sobre el crecimiento y la colonización micorrízica en uchuva (*Physalis peruviana* L.).
- Montana Torres Chávez, R. (2018). *Hongos micorrízicos asociados a Solanum hindsianum* (Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology*, 49, 249-279. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.249>
- Oldroyd, G. E. & Downie, J. A. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes . *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 566 – 576 ( 2004 ).

- Orabi, S. A., & Abdelhamid, M. T. (2016). Protective role of  $\alpha$ -tocopherol on two *Vicia faba* cultivars against seawater-induced lipid peroxidation by enhancing capacity of anti-oxidative system. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 15(2), 145-154. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2014.08.001>
- oses. Tansley review. *New Phytol.* 172, 35–46 (2006)
- Palenzuela, Javier & Ferrol, Nuria & Boller, Thomas & Azcon-Aguilar, Concepcion & Oehl, Fritz. (2008). *Otospora bareai*, a new fungal species in the Glomeromycetes from a dolomitic shrub land in Sierra de Baza National Park (Granada, Spain). *Mycologia*. 100. 296-305. 10.1080/15572536.2008.11832484.
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2014). *Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. Environmental Science and Pollution Research*, 22(6), 4056–4075. doi:10.1007/s11356-014-3739-1
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., and Prasad, S. M. (2015). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 4056–4075. doi: 10.1007/s11356-014-3739-1
- Paszkowski, U. A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbi-
- Pérez Moncada, U. A., Ramírez Gómez, M. M., Zapata Narváez, Y. A., & Córdoba Sánchez, J. M. (2015). Efecto de la inoculación simple y combinada con Hongos Formadores de Micorriza Arbuscular (HFMA) y Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV) en plántulas micropropagadas de mora (*Rubus glaucus* L.). *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 16(1), 95-103.
- Pumplin, N., & Harrison, M. J. (2009). Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in *Medicago truncatula* roots during

arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology*, 151(2), 809-819.  
<https://doi.org/10.1104/pp.109.141879>

Ramírez-Gómez, M., Pérez-Moncada, U., Serralde-Ordoñez, D., Peñaranda-Rolón, A., Roveda-Hoyos, G., & Rodriguez, A. (2019). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi communities associated with cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) crops. *Agronomía Colombiana*, 37(3), Suelos, fertilización y manejo de aguas.  
<https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v37n3.74008>

Retrieved [June, 23, 2024], from the Integrated Taxonomic Information System (ITIS) on-line database, [www.itis.gov](http://www.itis.gov), [CC0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Samuels, J. Biodiversity of Food Species of the Solanaceae Family: A Preliminary Taxonomic Inventory of Subfamily Solanoideae. *Resources* 2015, 4, 277-322.  
<https://doi.org/10.3390/resources4020277>

Sánchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121–137.

Scandalios, J. G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*, 101(1), 7-12. <https://doi.org/10.1104/pp.101.1.7>

Schüßler, A., Schwarzott, D., & Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the *Glomeromycota: phylogeny and evolution*. *Mycological Research*, 105(12), 1413–1421. doi:10.1017/s0953756201005196

Sharma, S., Fayaz, S., Kumar, R., Rana, N., Kashyap, R., Kumar, S., Bisarya, D., Bhat, T. A., & Nazir, A. (2024). Activity of antioxidants on various crops by the

- inoculation of Mycorrhiza under drought stress: A review. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 12(1). <https://doi.org/10.7324/JABB.2024.153715>
- Sholehah, D. N., Hariyanto, S., & Purnobasuki, H. (2022). Adaptation of *Physalis angulata* L. to salinity stress as an environmental factor in terms of morphological response. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 977(1), Article 012019. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/977/1/012019>
- Sies, H. (1997). *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. *Experimental Physiology*, 82(2), 291–295. doi:10.1113/expphysiol.1997.sp004
- Singh, A. (2021). Soil salinization management for sustainable development: A review. *Journal of Environmental Management*, 277, 111383. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111383>
- Smith, S.E. and Read, D.J. (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd Edition, Academic Press, London.
- Songachan, L.S., Kayang, H. Diversity and Distribution of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in *Solanum* Species Growing in Natural Condition. *Agric Res* 1, 258–264 (2012). <https://doi.org/10.1007/s40003-012-0026-6>
- Stavi, I., Thevs, N., & Priori, S. (2021). Soil salinity and sodicity in drylands: A review of causes, effects, monitoring, and restoration measures. *Frontiers in Environmental Science*, 9, 712831. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.712831>
- STRULLU-DERRIEN CH., STRULLU DG. Mycorrhization of fossil and living plants. 2007. *Systematic Palaeontology (Palaeobotany)*, 6: 483–494.

- Tapia, G. 2019. Valorización de variedades antiguas de tomate como una nueva opción en la Región del Maule. Boletín INIA N° 390, 108 p. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Chillán, Chile.
- Taurinanda, Adventio & Banjarnahor, Dina. (2023). Mycorrhiza Diversity in Some Intercropping Systems of Potato (*Solanum tuberosum* L) and Faba Bean (*Vicia faba* L). *Jurnal Teknik Pertanian Lampung (Journal of Agricultural Engineering)*. 12. 495. [10.23960/jtep-l.v12i2.495-508.0](https://doi.org/10.23960/jtep-l.v12i2.495-508.0)
- Triantaphylidès, C., Krischke, M., Hoerberichts, F. A., Ksas, B., Gresser, G., Havaux, M., Van Breusegem, F., & Mueller, M. J. (2008). Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiology*, 148(2), 960–968. <https://doi.org/10.1104/pp.108.125690>
- van der Heijden, M. G. A., Martin, F. M., Selosse, M.-A., & Sanders, I. R. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: The past, the present, and the future. *New Phytologist*, 205(4), 1406-1423. <https://doi.org/10.1111/nph.13288>
- Wang, Q., Liu, M., Wang, Z., Li, J., Liu, K., & Huang, D. (2024). The role of arbuscular mycorrhizal symbiosis in plant abiotic stress. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1323881>
- Wang, Y., Dong, F., & Tang, M. (2021). Transcriptome analysis of arbuscular mycorrhizal *Casuarina glauca* in damage mitigation of roots on NaCl stress. *Microorganisms*, 10(1), 15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010015>
- Wang, Y., Dong, F., and Tang, M. (2022a). Transcriptome analysis of arbuscular mycorrhizal *Casuarina glauca* in damage mitigation of roots on NaCl stress. *Microorganism* 10:15. doi: 10.3390/microorganisms10010015

- Wang, Y., Dong, F., Chen, H., Xu, T., and Tang, M. (2023). Effects of arbuscular mycorrhizal fungus on sodium and chloride ion channels of *Casuarina glauca* under salt stress. *Int. J. Mol. Sci.* 24:3680. doi: 10.3390/ijms24043680
- West Virginia University. (01 de Junio de 2024). INVAM. Disponible en: <http://invam.wvu.edu/methods/spores/spore-extraction>
- Xu, Z., & Chang, L. (2017). *Solanaceae. Identification and Control of Common Weeds: Volume 3, 267–295*. doi:10.1007/978-981-10-5403-7\_9
- Yildirim, E., Karlidag, H., & Dursun, A. (2011). Salt tolerance of *Physalis* during germination and seedling growth. *Pakistan Journal of Botany*, 43(6).
- Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, 74(1), 139-162. <https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.1.139>
- Zhang, B., Shi, F., Zheng, X., Pan, H., Wen, Y., & Song, F. (2023). Effects of AMF compound inoculants on growth, ion homeostasis, and salt tolerance-related gene expression in *Oryza sativa* L. under salt treatments. *Rice*, 16(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s12284-023-00635-2>
- Zimmer, T. B. R., Otero, D. M., & Zambiasi, R. C. (2019). Functional properties of *Physalis pubescens* Linnaeus: A literature review. *Journal of Biotechnology Research*, 5(12), 128-139. <https://doi.org/10.32861/jbr.512.128.139>

## ANEXOS

## Anexo 1. Materiales y equipos

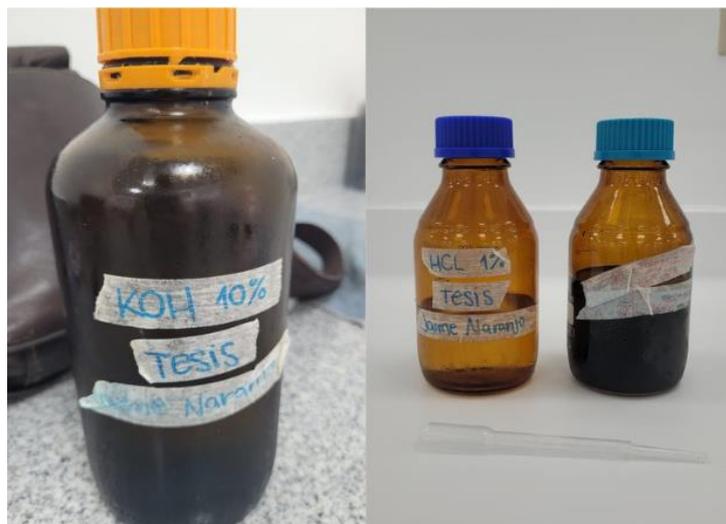
Equipos	Materiales	Reactivos
Centrifuga	Tamiz 425	KOH 10%
Microscopio invertido	Tamiz 250	Azul de tripano
Microscopio campo claro	Tamiz 125	Agua destilada
Estereomicroscopio	Tamiz 75	Sacarosa
Estufa	Cajas Petri	Ácido láctico
Baño de ultrasonido	Cassettes histológicos	Glicerol
Espectrofotómetro	Placa portaobjeto	Tween 80
Campana de extracción de gases	Placa cubreobjeto	Metanol 99.8%
Refrigeradora	Jeringas	DPPH
Micropipeta	Bisturí	Solución Ringer
Balanza	Tubo Falcon 15 ml	HCl 1%
	Gradilla	
	Vasos de precipitación	
	Celdas espectrofotómetro	
	Tubos de ensayo	
	Papel aluminio	

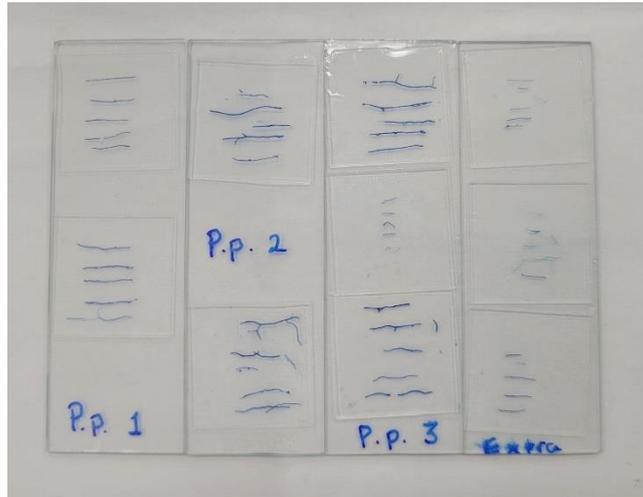
Anexo 2. Obtención de muestras de *Physalis pubescens*

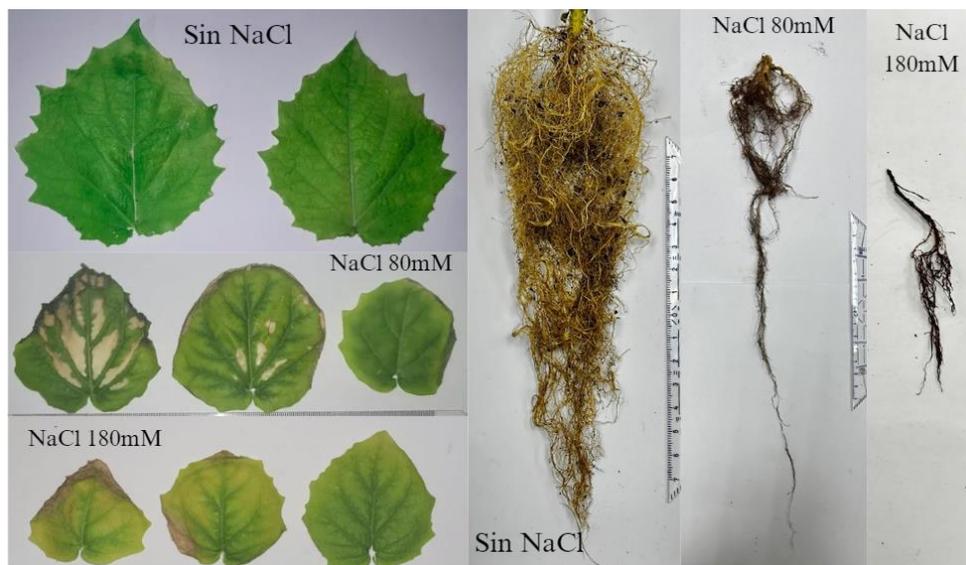
**Anexo 3.** Secado de semillas de *P. pubescens*



**Anexo 4.** Reactivos para tamizado húmedo y tinción histoquímica

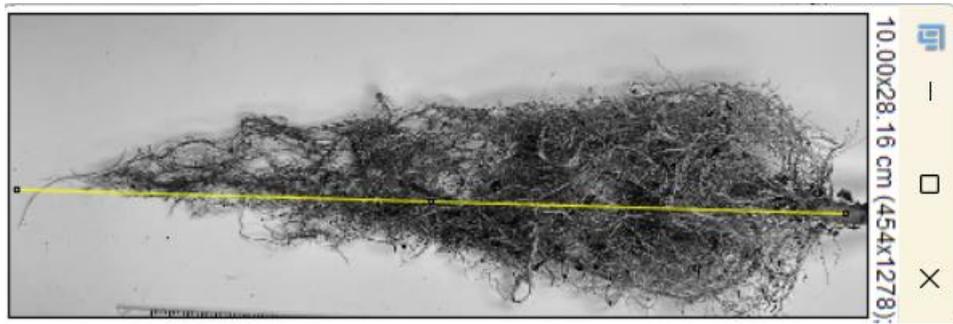


**Anexo 5. Montaje de raíces****Anexo 6. Trasplante de *Physalis pubescens***

**Anexo 7.** Mortalidad tratamiento con 180 mM NaCl**Anexo 8.** Indicadores de estrés salino

**Anexo 9.** Extracto foliar para medición antioxidante**Anexo 10.** Extractos foliares con DPPH para medición antioxidante**Anexo 11.** Equipos de microscopia

### Anexo 12. Medición raíz en Fiji



### Anexo 13. Tratamientos antes y después



**Anexo 14.** Mediciones morfológicas

Tratamiento	Réplica	Altura (cm)	Promedio área hoja (cm <sup>2</sup> )	Longitud de raíces (cm)	Peso de raíces (g)
T1	R1	20	73,305	17,153	1,85
	R2	22,7	70,284	17,041	1,86
	R3	21,3	80,574		
	R4	21	72,192		
	R5	17	75,886		
T2	R1	23	81,643	23,683	2,32
	R2	19,1	77,614		
	R3	18,2	83,972		
	R4	19	78,945	25,443	2,51
	R5	19,7	84,447		
T3	R1	13,5	41,61	38,886	1,1
	R2	11,8	36,554		
	R3	10,7	28,964		
	R4	13,7	39,794		
	R5	14,8	46,256	36,289	1,18
T4	R1	10,5	32,481	34,558	0,895
	R2				
	R3	11,1	35,894		
	R4	11	45,388		0,964
	R5	11,2	48,721	32,712	
T5	R1	4,3	13,762	8,892	0,0568
	R2				
	R3				
	R4	2,4	13,545	9,327	0,0562
	R5				
T6	R1				
	R2				
	R3	4,2	11,235	7,898	0,0539
	R4				
	R5	3,4	12,366	7,538	0,0541

(T1) Planta; (T2) Planta + HMA; (T3) Planta + HMA + 80mM NaCl; (T4) Planta + 80 mM NaCl; (T5) Planta + HMA + 180nM NaCl; (T6) Planta + 180 mM NaCl