

IDENTIFICACIÓN DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES DE PLANTAS NATIVAS DE SONORA MEDIANTE PCR ANIDADA, DGGE Y SECUENCIACIÓN DEL GEN RIBOSOMAL 18S.

Romo-Tamayo F., Armenta-Calderón A. D., Ochoa-Meza A., Rentería-Martínez M. E., Guzmán-Ortíz J. M., Rodríguez J. C., Canseco-Vilchis E. y **Moreno-Salazar S. F.***
Departamento de Agricultura y Ganadería Universidad de Sonora. Tel. 596 02 97 cel: 6621 13 09 65* **Autor para correspondencia** smoreno@guayacan.uson.mx

RESUMEN

Se realizó un protocolo completo para el aislamiento de especies de hongos micorrízicos arbusculares presentes en plantas nativas de Sonora, las cuales son capaces de colonizar raíces de maíz y trigo. El protocolo incluyó la toma de muestras y extracción de esporas de raíces y suelo de leguminosas nativas del estado (*Olneya tesota*, *Cercidium microphyllum* y *Prosopis* Sp.), seguida de inoculación en las semillas de los cereales, seguida de germinación y desarrollo de las plántulas. Después se le cortaron las raicillas y se extrajo su ADN total. El ADN extraído se sometió a PCR anidada, usando los primers AM1 y NS31 para la primera reacción y GLO1 combinado con NS31GC para la segunda. Con esto se logró amplificar un fragmento de ~230 pb del gen ribosomal 18S exclusivamente de las especies de micorrizas arbusculares presentes en cada muestra. Dichos fragmentos se separaron mediante la técnica de DGGE y actualmente las bandas encontradas están siendo purificadas para su secuenciación e identificación.

INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) pertenecientes al phylum *Glomeromycota* se encuentran formando asociaciones simbióticas con un gran número de especies vegetales en los suelos de la mayoría de los ecosistemas (Yang *et al.*, 2010; Sharmah *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2008). Se sabe que los HMA contribuyen de manera significativa en la nutrición, crecimiento, reproducción, adaptabilidad y estabilidad de las plantas en el suelo y el ambiente. Pueden ayudar eficientemente en la absorción y transporte de nutrientes minerales, tales como el fósforo y el zinc pasándolos del suelo a la planta a través de una intrincada red de hifas e intercambiarlos por carbohidratos.

Por otro lado, debido a la formación de micelios y secreción de glomalina, los HMA ayudan también a la estabilidad y estructura de los agregados del suelo. Esto es a través de la construcción de macroporos, los cuales a la vez que permiten la entrada de agua y aire, contribuyen a evitar la erosión, siendo un factor clave para la estructura de las comunidades vegetales y productividad de los ecosistemas (Liang *et al.*, 2008; Rosendahl S. y E. H. Stukenbrock, 2004).

Las plantas con micorrizas son más eficientes para la absorción y acumulación de fósforo especialmente en suelos de baja disponibilidad de dicho nutriente. Dada la baja movilidad del fósforo en el suelo, la raíz debe extenderse más para llegar a él. En raíces con micorrizas el incremento en la absorción del nutriente se debe principalmente a que las hifas del hongo actúan como una extensión de la raíz de la planta. Cada especie tiene diferente grado de dependencia a las micorrizas. Por ejemplo, el maíz y el sorgo tienen alta dependencia, mientras que el trigo, la avena y la cebada poseen baja dependencia. Consecuentemente, el orden de la rotación de cultivos tiene un efecto significativo sobre la asimilación de fósforo y otros nutrientes debido a que la población de micorrizas decrece en el suelo cuando se cultivan especies de baja dependencia a las micorrizas (Coyne 1999).

A pesar de su importancia ecológica y agrícola, se sabe poco sobre la biología de poblaciones y la diversidad de HMA en los diferentes ecosistemas. Anteriormente, los estudios e identificación se basaban principalmente en la morfología de las esporas, pero esta es bastante

difícil en muestras de campo, porque a menudo las esporas no son identificables, debido a su degradación o parasitación por otros organismos (Rousseau et al., 1996).

Por otra parte, debido a que son simbioses obligados, las micorrizas no pueden ser cultivadas en ausencia de su huésped. Se tienen que usar plantas trampa para producir esporas de identificables. Aunque es útil para el aislamiento y la propagación de algunas especies de HMA, esta estrategia indirecta de cultivo es muy tardada y puede haber preferencia de la planta por ciertas especies de HMA por influencia de las condiciones de crecimiento sobre la composición de sus comunidades (De Souza y Berbara, 1999). Así, por estas razones, las técnicas tradicionales pueden generar resultados subjetivos, al estar basadas en la observación y descripción de caracteres físicos que varían con el ambiente y el hospedero en el que se desarrollan.

Las técnicas de marcadores moleculares han permitido superar las limitantes de identificación y clasificación taxonómica tradicional (Liang et al., 2008; Ikeda et al., 2006). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede utilizarse para amplificar secuencias específicas de ADN de los HMA, por ejemplo algún gen específico que se transcribe en alguno de los tipos de ARN ribosomal. Enseguida la variación en la secuencia puede ser visualizada por electroforesis (Clapp et al., 2002). Las técnicas moleculares proporcionan un robusto método para caracterizar poblaciones de HMA, mejorar la comprensión de su filogenia, ecología, y evolución.

Una serie de métodos basados en PCR han sido aplicados en la identificación de HMA, incluyendo polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), el polimorfismo de conformación en cadena simple (CCPC), RFLP terminal (T-RFLP) y PCR anidada (Nested PCR) seguida de electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) o electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE) (Sharmah et al., 2010; Ikeda et al., 2006; Van Overbeek et al., 2006).

La mayoría de los trabajos de PCR anidada-DGGE están orientados a la identificación especies microbianas en una comunidad. Esto se logra a través de secuencias comunes que varían para cada especie, una de las más usuales es la variación en la secuencia del gen de ADN que se transcribe en la molécula de ARN ribosomal 18S. La PCR anidada permite aumentar significativamente la sensibilidad y la especificidad de la reacción. El resultado del análisis de un consorcio de microorganismos puede ser una serie de fragmentos correspondiente al gen de interés, los cuales tendrán la misma longitud pero su secuencia será diferente.

La electroforesis en gel de gradiente desnaturizante es un método para separar fragmentos de ADN según su movilidad en condiciones cada vez más desnaturizantes (generalmente, por concentración creciente de formamida y/o urea).

Por lo tanto en DGGE se pueden separar fragmentos de ADN de la misma longitud pero de diferente secuencia. La separación se basa en la migración de las moléculas amplificadas y su posterior parada, debido a la apertura de la doble cadena del fragmento en un punto determinado de concentración de agente desnaturizante (Liang *et al.*, 2008). Desde su introducción para el análisis de la estructura de comunidades bacterianas por Muyzer *et al.*, (1993), este método ha sido ampliamente utilizado en la caracterización de diferentes consorcios de microorganismos. Kowalchuk *et al.* (2002) fue el primero en aplicar DGGE para evaluar la diversidad de HMA a partir de suelos y muestras de raíz. Este trabajo constituye uno de los primeros estudios sobre la presencia e identificación, por técnicas de biología molecular, de micorrizas arbusculares asociadas con plantas nativas en suelos Sonora.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de campo para el análisis de HMA

Las muestras de suelo se obtuvieron a partir de árboles nativos de *Olneya tesota* (palo fierro), *Cercidium microphyllum* (palo verde) y *Prosopis* Sp. (mezquite), creciendo en suelos no perturbados. Se tomaron muestras a partir de núcleos de suelo (5 cm de profundidad por 49 cm² de superficie) extraídos de la zona radicular de cada una de 5 plantas de maíz elegidas al azar.

Las muestras se mezclaron y tamizaron a 2 mm, dejando una submuestra de 100 g, la cual se almacenó a -20 °C, hasta la extracción de ADN.

En la muestra restante se extrajeron las raicillas para su tinción según la metodología de Phillips y Hayman (1963), y contabilización de los porcentajes de colonización según la técnica de Giovannetti y Mosse (1983). Adicionalmente se determinó el micelio externo e interno y producción de esporas según Herrera-Peraza et al., (2004).

Un concentrado de esporas se inoculó en plantas trampa de trigo y maíz.

Extracción de ADN total en suelo con esporas en las plantas trampa

Se utilizó el kit PowerSoil DNA Isolation (MO Laboratorios BIO, Solana Beach, CA, EE.UU.) para el aislamiento del ADN del suelo de acuerdo a la instrucciones del fabricante y con las modificaciones propuestas por Liang *et al.*, 2008. El rendimiento e integridad del ADN fue verificado por electroforesis en gel de agarosa (0.8%), tinción con Sybr Safe y visualización en UV. Se cuantificó el contenido de ADN en el extracto usando un Nanodrop y posteriormente se almacenó a -20 °C para uso posterior.

Extracción de ADN total en raíces de las plantas trampa

Las raíces se lavaron con agua corriente y cortaron en trozos de 1 cm. 100 mg de material de raíz de cada muestra se colocaron en un tubo de 2 mL con tapón de rosca, conteniendo la mitad del volumen lleno con esferitas de sílice-zirconia (Biospec Products Inc., Techtum laboratorio, Umeå, Suecia). La extracción del ADN se realizó utilizando un kit DNeasy Plant (Qiagen, Crawley, Reino Unido) con un volumen de elución final de 100 µL.

PCR anidada

Para realizar la primera amplificación de PCR se utilizó el primer AM1 (5-GTTTCCCGTAAGGCGCCGAA-3) que es específico para HMA y el primer universal para eucariotas NS31 (5-TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3) para así obtener un fragmento de ~ 580 pb que corresponde al gen de ARN ribosomal 18S (ARNr).

Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf). El volumen final de reacción fue de 25 µL. usando 2 µL del ADN molde extraído, en cada reacción. El programa de termociclado a utilizar fue: 94 °C durante 2 min, 31 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 60 s y 72 °C por 1:30 min, con una extensión final de 72 °C por 10 min. 5 µL de el producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa (0.8% (w/v) de agarosa, 100 V x 60 min) y tinción con SybrSafe para confirmar la presencia del producto. Otros 2 µL del producto de usaron como molde para la segunda ronda de PCR, para la cual se utilizaron los primers NS31-GC (5-CGCCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGTTGGAGGGC AAGTCTGGTGCC-3) y Glo1 (5-GCCTGCTTTAAACACT CTA-3) con la mezcla de reacción igual a la primera ronda de PCR.

Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial durante 5 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos 94 °C por 45 s, 52 °C por 45 s, y 72 °C por 1 min, mas una extensión final a 72 °C durante 30 min. Los amplicones se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (0.8% (w/v) agarosa, 80 V, 60 min) teñidas con Sybr Safe para comprobar la presencia de un fragmento de ~ 230 pb característico. Las muestras obtenidas se almacenaron a -20 °C para el posterior análisis en DGGE.

Separación de bandas por DGGE

Los geles se elaboraron con un equipo y reactivos DGGEK-4001-110: DGGE Kit, con las siguientes características: 6% (p/v) de poliacrilamida (37.5:1 acrilamida/bis-acrilamida), 1 mm de espesor, 16 x 16 cm. Se usó un gradiente desnaturalizante lineal de 35% a 55% para todos los análisis, donde el 100% desnaturalizante se define como la acrilamida que contiene 7 M de urea y 40% de formamida.

La electroforesis se realizó en TAE 0.5X (40 mM Tris-acetato, 1 mM de EDTA) durante 16 horas a 65 V y 60° C. Los geles se teñieron en agua MiliQ conteniendo 0.5 mg L-1 de bromuro de etidio, durante 10 minutos y destiñeron en agua MiliQ durante otros 10 minutos antes de la transiluminación UV. Las fotografías se capturaron con un sistema de documentación Gel Doc 2000

(Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) y digitalizaron con el software versión 4 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.).

Secuenciación y análisis de las bandas obtenidas en DGGE

En el gel conteniendo fragmentos de interés se cortaron las bandas y se eluyeron 20:1 y cada banda se reamplificó por separado usando el par de primers Glo1 y NS31 según lo descrito por Ma *et al.* (2005). Los productos de PCR se purificaron en DGGE como se describió anteriormente. Las muestras de ADN purificado se enviaron a un laboratorio certificado para su secuenciación.

Una vez secuenciadas los fragmentos de ADN, se realizarán comparaciones de similitud, mediante la alineación con secuencias conocidas del gen 18S ADNr encontradas en la base de datos BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN PRELIMINARES

Colonización

La tinción de raicillas y la observación al microscopio y estereoscopio ha permitido observar la colonización y determinar los porcentajes de la misma. Observando el micelio externo e interno, así como la producción de esporas.

La figura 1 muestra la presencia de esporas de micorrizas en muestras de suelo asociadas a las plantas en estudio. En ella se puede observar la presencia de estructuras de esporas y micelios extrarradicales en las proximidades de la raíz.

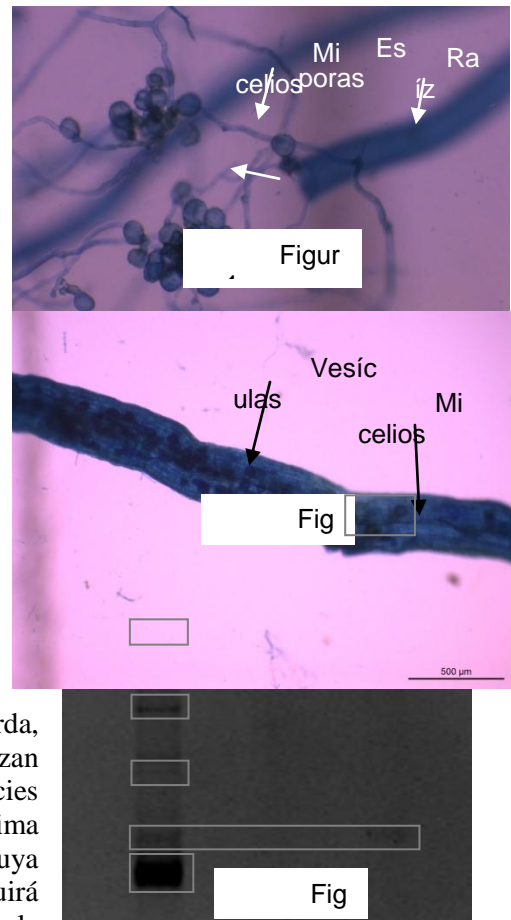
En la figura 2 se observa la presencia de micelios intrarradicales y vesículas formadas durante la colonizando raíces de *Cercidium microphyllum*.

Análisis de Bandas de la DGGE

La figura 3 muestra las bandas encontradas en la electroforesis en gel de gradiente desnaturante, correspondientes al fragmento del gen ribosomal 18S de micorrizas colonizando en las plantas trampa (fragmento de aproximadamente 230 pb después de la segunda PCR). En el pocillo de la izquierda, correspondiente a las especies de micorrizas que colonizan las raíces de maíz se pueden observar al menos 5 especies diferentes de micorrizas que hay que identificar. La última banda probablemente sea una mezcla de especies cuya composición de pares de bases sea muy similar. Se seguirá trabajando en su separación y purificación. El pocillo de la derecha correspondiente a especies de micorrizas colonizando raíces de trigo, revela tres bandas. Las dos primeras bandas sugieren la presencia de especies que no colonizan en raíces de maíz. La tercera es una especie que puede colonizar a ambas especies trampa. De estos primeros resultados se puede observar una mayor diversidad de especies en colonizando las raíces de maíz.

Actualmente las bandas están siendo purificadas y enviadas a secuenciación para definir con precisión las especies colonizantes.

Como puede observarse, las micorrizas nativas de Sonora, son capaces de interactuar simbióticamente con las raíces de los cultivos agrícolas más extendidos de nuestro país. Es importante para determinar las especies, géneros o cepas que afectan positivamente a las plantas



cultivadas. En este sentido, en las siguientes investigaciones buscaremos definir las especies de micorrizas arbusculares que colonizan a las raíces de maíz superdulce cultivado en la Costa de Hermosillo y el efecto de su simbiosis en el rendimiento y calidad del fruto, así como en la asimilación de N y P.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbot L.K., A.D. Robson. 1991. Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Agriculture Ecosystems and Environment*. 35: 121-150.
- Cázares B. X., R. Ruiz Medrano. 2002. Impacto de la biotecnología agrícola en cultivos: el caso de las micorrizas. *Avance y Perspectiva* (21):263-266.
- Clapp J.P., T. Helgason T.J. Daniell, J.P.W. Young. 2002. Genetic studies of the structure and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. In: M.G.A. van der Heijden and I.R. Sanders. Editors, *Mycorrhizal Ecology*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York. pp. 201–224.
- Coyne, M. 1999. *Soil microbiology, An Exploratory Approach*. Delmar Publishers, Albany, New York. Pp 337-347.
- De Souza F.A. and Berbara R.L.L. 1999. *Ontogeny of Glomus clarum in Ri t-DNA transformed roots*. *Mycologia*, 91, pp. 343-350.
- Hamel C, Plenchette C. 2007. *Mycorrhizae in Crop Production*. CRC Press. 376 p.
- Herrera-Peraza, R. A., E. Furrázola, R. L. Ferrer, R. Fernandez-Valle, Y. Torres-Arias. 2004. Functional strategies of root hairs and arbuscular mycorrhizae in an evergreen tropical forest, Sierra del Rosario, Cuba. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 35:113-123.
- Ikeda S., N. Ytow, H. Ezura, K. Minamisawa and T. Fujimura. 2006. Soil microbial community analysis in the environmental risk assessment of transgenic plants. *Technical Review. Plant Biotechnology* (23) 137–151.
- Kowalchuk G. A., F. A. De Souza and J. A. Van Veen. 2002. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes, *Molecular Ecology* 11: 571–581.
- Liang Z., R. A. Drijber, D. J. Lee, I.M. Dwiekat, S. D. Harris, D. A. Wedin. 2008. A DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil. *Soil Biology & Biochemistry* (40): 956–966.
- Ma W.K., S.D. Siciliano, J.J. Germida. 2005. A PCR-DGGE method for detecting arbuscular mycorrhizal fungi in cultivated soils. *Soil Biology & Biochemistry* (37): 1589–1597.
- Rosendahl S., E. H. Stukenbrock. 2004. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in undisturbed vegetation revealed by analyses of LSU rDNA sequences. *Molecular Ecology* (13): 3179-3186.
- Sharmah D., D.K. Jha and R. R. Pandey. 2010. Molecular approaches in arbuscular mycorrhizal research: a review. *Journal of Phytology* 2(7): 75-90
- Smith, S. E., Read, D.J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3ra ed. Academic Press. San Diego, USA. 785 p.
- Van Overbeek L. S., J. van Vuurde, J. D. van Elsas. 2006. Application of Molecular Fingerprinting Techniques to Explore the Diversity of Bacterial Endophytic Communities. In: *Soil Biology, Volume 9. Microbial Root Endophytes*. B. Schulz, C. Boyle, T. N. Sieber (Eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Van Tuinen D., E. Jacquot, B. Zhao, A. Gollotte and V. Gianinazzi-Pearson. 1998. Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Molecular Ecology* (7) 7: 879-887.
- Yang C., C. Hamel, M. P. Schellenberg, J. C. Perez and R. L. Berbara. 2010. Diversity and functionality of arbuscular mycorrhizal fungi in three plant communities in semiarid grasslands National Park, Canada. *Microbial Ecology* DOI 10.1007/s00248-009-9629-2.