

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Instituto de Ciencias Agrícolas



**XVII CONGRESO INTERNACIONAL DE CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

M E M O R I A S

Mexicali Baja California México

9 y 10 de octubre del 2014



MEMORIAS DEL XVII CONGRESO INTERNACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS



Universidad Autónoma de Baja California

**Instituto de Ciencias Agrícolas
Facultad de Ingeniería y Negocios**



Universidad de Sonora

Departamento de Agricultura y Ganadería



Universidad Autónoma de Sinaloa

Facultad de Agronomía

9 y 10 de Octubre del 2014

Comité Científico
XVII Congreso Internacional de Ciencias Agrícolas
Universidad Autónoma de Baja California

Instituto de Ciencias Agrícolas

Dr. Luis Fernando Escoboza García

Presidente del Congreso

Dr. Fidel Núñez Ramírez

Secretario

M.C. Maria Cristina Ruiz Alvarado

Logística

Integrantes

Cuerpo Académico Agua y Suelo ICA-UABC

Dr. Roberto Soto Ortíz
Dra. Silvia Mónica Avilés Marín
Dr. Fidel Núñez Ramírez
M.C. Ángel López López
Dra. María Isabel Escoboza García
Dr. Jesús Adolfo Román Calleros
M.C. Víctor Alberto Cárdenas Salazar
Dr. Fernando Escoboza García
M.C. Cristina Ruiz Alvarado

Universidad Autónoma de Aguascalientes
Centro de Ciencias Agropecuarias

Dr. Alfonso Luna Jimenez

Instituto Tecnológico de Sonora

M.C. Catalina Mungarro Ibarra

Universidad Autónoma de Baja California
Sur

Departamento Académico de Agronomía

Dr. Francisco Higinio Ruíz Espinoza
PhD. Jose Guadalupe Loya Ramirez
Dr. Felix Alfredo Beltran Morales
Dr. Sergio Zamora Salgado

Universidad Autónoma del Estado de México

Dra. Martha Elena Mora Herrera

Universidad Autónoma Agraria Antonio
Narro

Sistemas Sustentables para la Producción
Agropecuaria

Dr. Alejandro Moreno Reséndez

Universidad Autónoma de Chihuahua
Facultad de Contaduría y Administración

Dr. Oscar Alejandro Viramontes Olivas

Universidad de Sonora

Departamento de Investigación y Posgrado
en Alimentos

Dr. Jesús Borboa Flores
Dr. Francisco Javier Wong Corral

Universidad Tecnológica de Culiacan

Dr. Leopoldo Partida Ruvalcaba

Cuerpo Académico Agroecosistemas de Zonas
Áridas ICA-UABC

Dr. Alejandro Manelik García López
Dra. Rosario E. Rodríguez González
Dr. Carlos Enrique Ail Catzim
Dr. Manuel Cruz Villegas

Cuerpo Académico Biotecnología Agrícola
ICA-UABC

M.C. Carlos Ceceña Durán
Dr. Onesimo Grimaldo Juarez
Dra. Lourdes Cervantes Díaz
Dr. Daniel González Mendoza

Instituto de Ciencias Agrícolas UABC

Dr. Jesús Santillano Cázares
Dr. Dagoberto Durán Hernández
M.A. Fernando Navarro Rodriguez
M.C. José Luis Velásco López

Universidad de Sonora

Departamento de Agricultura y Ganadería

Dr. Fidencio Cruz Bautista
Dr. Marco Antonio Huez López
Dr. José Jiménez León
Dr. Jesús López Elías
Dr. Andrés Ochoa Meza
Dr. Edgar Omar Rueda Puente
Dr. Diego Valdez Zamudio

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

M.I. Fabián Robles Contreras
M.C. Raúl Leonel Grijalva Contreras
Dr. Francisco Morales Maza

Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Agronomía

Dr. Tomás Díaz Valdés
Tirzo Paúl Godoy Angulo
Dr. Francisco Javier Wong Corral

Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ingeniería y Negocios

M.C. Aurelia Mendoza Gómez
Dr. Salvador Ruiz Carvajal
Dr. Juan Carlos Vázquez Angulo

DETECCIÓN MOLECULAR DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EN EL CULTIVO DE VID EN SONORA

Armenta-Calderón, Ana D¹., Sergio F. Moreno-Salazar², Andrés Ochoa-Meza²

¹ Estudiante del Posgrado en Biociencias del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora

² Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora. Carretera a Bahía de Kino Km. 21. Hermosillo, Sonora. Tel: +6625960297

*Autor para correspondencia. aochoa@guayacan.uson.mx

Resumen

Con la finalidad de detectar las especies de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) asociados a plantas de vid en un viñedo comercial, se utilizaron métodos moleculares con primers específicos para estos hongos. Se logró establecer por medio de una reacción en cadena de la polimerasa anidada (nested PCR) la presencia de HMA en el suelo de la rizósfera de la vid, observando bandas muy bien definidas de aproximadamente 230 pb para las plantas con micorriza nativa. En el caso de plantas tratadas con inóculo comercial se observan bandas muy poco definidas en un gel de agarosa al 2%, por lo que es necesario optimizar el proceso de amplificación del ADN molde utilizado, así como el proceso de extracción del mismo.

Palabras Clave: Glomales, Biología Molecular, PCR

Abstract

In order to detect the species of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) associated with vines in a commercial vineyard, molecular methods with specific primers for these fungi were used. It was determined the presence of AMF in the rhizosphere soil of the vine, through a nested polymerase chain reaction (nested PCR), having well defined bands in the 2% agarose gel, indicating the expected fragments around 230 bp in plants with native AMF. For samples of commercial treated plants not well defined bands in an agarose gel of 2% are observed, so it is necessary to optimize the process of amplification of the DNA used and the process of extraction.

Keywords: Glomales, Molecular Biology, PCR

Introducción

Los hongos micorrízico arbusculares (HMA) forman una asociación simbiótica del tipo mutualista entre los hongos del orden de los Glomales y las raíces de más del 90% las plantas conocidas. Dicha asociación implica un beneficio para ambos simbios, el hongo obtiene de la planta fotosintatos para su desarrollo y este, con su capacidad de explorar un mayor volumen de suelo, provee a la planta de nutrientes y agua, propiciando un mejor desarrollo de la misma. (Reyes-Jaramillo, 2002; Smith & Read, 2008).

El hecho de que estos hongos sean simbios obligados, ha dificultado en gran medida su análisis taxonómico, principalmente para la determinación de la composición de especies en ambientes nativos. Lo anterior, debido a que para la determinación de especies son necesarias esporas bien conservadas, lo que difícilmente se obtiene de estos medios (Gamper & Leuchtman, 2007). Por otra parte, son pocas las especies de HMA que pueden reproducirse y esporular en medios axénicos; además, los cultivos trampa comúnmente utilizados requieren de 90-120 días para la obtención de propágulos (Nichols, 1999; Lee et al., 2006), y la asociación planta – hongo

depende, en gran medida, del hospedero, los factores ambientales y las condiciones de crecimiento de las plantas, lo que generalmente no implica el éxito del experimento (Sharmah et al., 2018; Gamper & Leuchtman, 2007).

Los métodos moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) y la electroforesis en gel en gradiente desnaturante (DGGE), han sido exitosamente utilizadas para la caracterización de la estructura de la comunidad de los HMA, tanto en suelos de cultivo como de ambientes naturales (Wei et al., 2012; Liang et al., 2008; Ma et al., 2005). No obstante, los primers existentes para la amplificación del ADN extraído de estos hongos presentan una limitada especificidad, por lo que existe una gran cantidad de iniciadores que pueden ser utilizados con esta finalidad (Millner et al., 2001; Liang et al., 2008; Jie et al., 2012).

A pesar de lo anterior, los pares de primers formados por AM1/NS31 y Glo1/NS31-GC han sido los más ampliamente utilizados y es a partir de los fragmentos obtenidos con ellos, que se han integrado las bases de datos más utilizadas para el análisis de secuencias de ADN (Liang et al., 2008). De tal forma, ha sido posible determinar las especies de HMA que colonizan las raíces de las plantas en ambientes naturales y cultivados, partiendo tanto de ADN extraído de tejido radicular, como de propágulos existentes en el suelo de la rizósfera (Jie et al., 2012). El presente trabajo tiene como finalidad probar la detección mediante métodos moleculares, de especies de Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) existentes en la rizósfera de un viñedo comercial en el estado de Sonora.

Metodología

Se recolectaron 11 muestras del suelo de la rizósfera de plantas de vid, en un viñedo comercial en Hermosillo, Sonora, a una profundidad de 5-20 cm. Estas plantas (V1...6) se seleccionaron de dos cuadros de condiciones de cultivo diferentes, uno inoculado con micorriza comercial y otro con micorriza nativa (sin inoculación). Del cuadro inoculado se tomaron dos muestras de suelo en abril del 2013 (M1) y tres más en Septiembre de 2013 (M2). Igualmente, del cuadro con la micorriza nativa se tomó en la primera fecha mencionada se tomó solo una muestra y en el segundo muestro se recolectaron cinco muestras más. Todos los suelos se secaron a temperatura ambiente y se tamizaron por 2 mm. De cada uno se tomó una submuestra de 100 cm³ y se tamizó en húmedo de acuerdo a Gerdemann y Nicholson (1963), con las modificaciones indicadas por Herrera-Peraza et al. (2004), utilizando un tamiz de 125 µm y otro de 44 µm. De esta última fracción se tomaron 0.25 g de suelo y se extrajo el Ácido Desoxirribonucleico (ADN) utilizando el Power Soil™ Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Solana Beach, CA, USA) siguiendo el protocolo de la fábrica, para finalmente eluir el ADN con 100 µL del buffer de elución incluido en el kit. La primera amplificación del rADN del gen 18S se realizó con los primers AM1/NS31, obteniendo fragmentos de aproximadamente 580 pb, mismos que se utilizaron como molde para una siguiente PCR anidada, utilizando el par de primers Glo1/NS31-GC para un fragmento de 230 pb (Liang et al., 2008). Para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) se utilizó un termociclador de Bio Rad C1000™ bajo las condiciones de amplificación utilizadas por Liang et al. (2008).

Resultados y Discusión

De todas las muestras de suelo se logró extraer ADN, aunque en cantidades muy variables, desde 2.8 ng/µL hasta 9.6 ng/µL. En la Fig.1 se muestra un gel de agarosa al 2% en el cual se observan las bandas obtenidas después de la PCR anidada, localizadas entre 150 y 300 pb, correspondiendo a fragmentos de aproximadamente 230 pb. Las bandas más definidas se observan en las muestra V5M2 y V6M2, las cuales pertenecen al cuadro con micorrizas nativas. En el resto de las muestras se logran ver bandas borrosas, lo cual puede deberse a que el ADN molde utilizado es pobre en cantidad y calidad. Sin embargo, se debe tener en cuenta la especificidad de los primers, que en este caso es relativamente limitada (Jie et al., 2012), ya que no se detectan a las familias Archaeosporaceae y Paraglomeraceae; sin embargo, son ampliamente utilizados para la detección de HMA pertenecientes a las familias que agrupan la mayoría de las especies conocidas, a

saber, Glomeraceae, Acaulosporaceae y Gigasporaceae (Redecker, 2000; Liang, et al., 2008), por lo que es probable que no se obtengan bandas completamente definidas en todas las muestras analizadas.

Tomando en cuenta las bandas poco definidas que se presentan en la Fig. 1, así como las limitantes de los primers utilizados, es importante considerar la utilización de otras secuencias de iniciación para la reacción de PCR, así como la optimización del proceso de extracción del ADN molde. Lo anterior, debido a que Ochoa et al. (2014) confirman la presencia de HMA en plantas de vid, independientemente de la inoculación externa de micorrizas arbusculares a las plantas. Dicha optimización implicaría la obtención de ADN a partir del tejido radicular y no del suelo, lo que nos permitiría conocer la identidad de los HMA que se encuentran activos en la transferencia de nutrientes y agua entre la planta y el suelo.

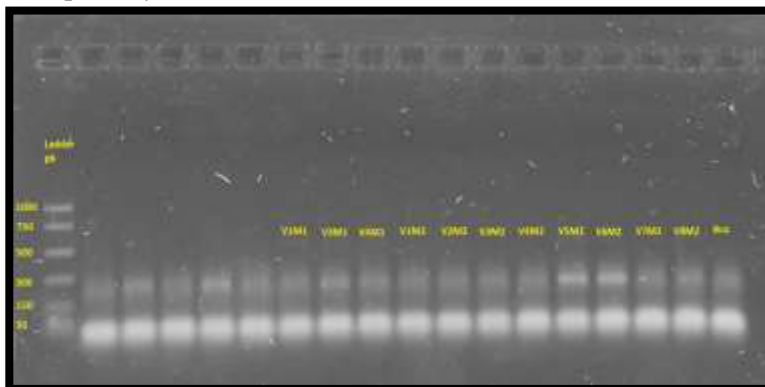


Fig. 1. Imagen de un gel de agarosa al 2%. Plantas con inóculo comercial: V1M1, V4M1, V1M2, V2M2, y V3M2; plantas con micorriza nativa: V3M1, V4M2, V5M2, V6M2, V7M2 y V8M2

De la misma manera, es importante señalar que los estudios moleculares no necesariamente desplazan los morfológicos, por el contrario, deben complementarse para lograr un panorama más preciso de la asociación establecida por ambos organismos.

Conclusiones

La metodología utilizada permite la certeza de que en todas las muestras se detectan los HMA asociados, sin embargo es necesaria una mayor especificidad en las determinaciones, así como una complementación de la identidad con la caracterización morfológica de las esporas obtenidas.

Literatura citada

- Gamper, H. & A. Leuchtmann. 2007. Taxon-specific PCR primers to detect two inconspicuous arbuscular mycorrhizal fungi from temperate agricultural grassland. *Mycorrhiza* 17: 145 -152.
- Jie, W., B. Cai and J. Ge. 2012. Molecular detection and community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of *Phellodendron amurense*. *Annals of Microbiology* 62 : 1769 - 1777.
- Lee, J., S-H. Park and A.H. Eom. 2006. Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungal spores collected in Korea. *Mycorbiology*. 34(1):7 - 13.
- Liang, Z., R.A. Drijber, D.J. Lee, I.M. Dwiekat, S.D. Harris and D.A. Wedin. 2008. A DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 1 (1): 1-11.

- Millner, P.D., W.W. Mulbry and S.L. Reynolds. 2001. Taxon – specific oligonucleotide primers for detection of two ancient endomycorrhizal fungi, *Glomus occultum* and *Glomus brasilianum*. FEMS Microbiology Letters 196:165 -170.
- Nichols, A.K. 1999. Role of iron in the accumulation of glomalins, an arbuscular mycorrhizal fungal glycoprotein. Master's Thesis. West Virginia University. Morgantown, West Virginia, USA.
- Ochoa-Meza A., A. D. Armenta Calderón, S. Moreno-Salazar, F. Pacheco Ayala. 2014. La micorriza arbuscular y su manejo en el viñedo. In: Ochoa-Meza A., Meza-Moller A. Avances de Investigación, Tecnologías para la producción sustentable. Folleto Técnico.
- Redecker, D. 2000. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. Mycorrhiza 10:73 - 80.
- 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.
- Wei, Y, S. Jie Wang, X. Ming Liu and T. Zhi Huang. 2012. Molecular diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in karst ecosystem, Southwest China. African Journal of Biotechnology. 11(80): 4561- 4568.

Conclusiones

- De las líneas y variedades evaluadas solo las líneas BICHENA/AKAKI_7/3/SOMAT_3/PHAX_1//TILO_1/LOTUS_4/7/CHEN_11/POC//TANTLO/5/E NTE/.. Y NETTA_ 4 /DUKEM_12//RASCON_19/3/DIPPER/RISSA//ALTAR84/AOS/4/INTER_8/7/SHAG_21/..... superaron a la variedad RÍO COLORADO C2000, que es la más sembrada en la región, por lo que con éstas puede continuarse con las evaluaciones para la formación de nuevas variedades.

Literatura

- Alvarado-Padilla, J. I., M. A. Camacho-Casas, G. Chávez-Villalba, P. Figueroa-López, E. Avila-Casillas y M. Camarillo-Pulido. 2014. CEMEXI C2008, Descripción de Trigo Duro Macarronero para su Cultivo en el DDR 014, Río Colorado. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 7 (8): 1343-1347 p.
- Figueroa-Lopez, P., J. L. Félix-Fuentes, G. Fuentes-Dávila, V. Valenzuela-Hernández, G. Chávez-Villalba y J. A. Mendoza-Lugo. 2010. CIRNO C2008, Nueva Variedad de Trigo Cristalino con Alto Rendimiento Potencial para el Estado de Sonora. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 1(5): 745-749 p.
- Martínez-Barrera A. y M. A. Camacho-Casa. 2003. Cachanilla F2000 y Río Colorado C2000, Nuevas Variedades de Trigo Harinero y Trigo Duro para Baja California y Norte de Sonora. 11:1-20. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Noroeste. Campo Experimental Valle de Mexicali. Mexicali, México.
- Martínez-Barrera A. 1997. BORLAUG M95 Nueva Variedad de Trigo Harinero para Baja California y Norte de Sonora. 9:1-11. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Noroeste. Campo Experimental Valle de Mexicali. Mexicali, México.
- Villaseñor-Mir H. E., 2000. Reseña del Programa de Mejoramiento Genético de Trigo para Temporal en México. Agricultura Técnica de México. 26:109-123 p.