

## IDENTIFICACION DE MICORRIZAS VESICULO ARBUSCULARES MEDIANTE LA TECNICA MOLECULAR: NESTED PCR

Gabriela Castillo<sup>1</sup>, Karina Proaño<sup>1</sup> y Alma Koch<sup>1</sup>

### ENUNCIADO DEL PROBLEMA

Los hongos que producen Micorrizas arbusculares (MA) contribuyen de una manera importante y positiva en el crecimiento, nutrición, estabilidad y adaptabilidad de las plantas con respecto al suelo y al ambiente, debido a la simbiosis que forman (Ruiz-Lozano et al., 2002; Rosendahl & Stukenbrock, 2004, Hijri et al., 2007). Esta es una característica que ha impulsado el uso y estudio de las MA como un agente biológico útil en el manejo y/o recuperación agrícola (van Tuinen et al., 1998, Molina et al., 2005). La identificación y taxonomía de este tipo de hongos es sumamente importante para determinar las especies, géneros o variedades que puedan cumplir mejor con objetivos agrícolas o de bioremediación (Ruiz-Lozano, 2002; Wainwright, 1995).

Las técnicas tradicionales que se emplean para identificarlos pueden generar resultados subjetivos, ya que se basan en la observación y descripción de caracteres físicos variables con el medio y el hospedero en el que el hongo se desarrolle (de la Providencia y Fernández, 2004; Molina et al., 2005).

La técnica molecular Nested PCR ha permitido superar estos limitantes. El presente trabajo investigativo se ha encargado de desarrollar, estandarizar y optimizar esta técnica. Ofreciendo una mayor fidelidad en los resultados obtenidos, ya que se basa en las analogías o divergencias del código genético (DNA), dejando a un lado la subjetividad de la morfología. En Ecuador, los datos generados sobre la diversidad individual y de grupos poblacionales de las MA son escasos y todavía no se ha incursionado en el estudio a nivel molecular de este tipo de hongos, lo que dificulta su identificación. Por lo tanto, este trabajo constituye una de las primeras pautas en nuestro país sobre diferencias genéticas entre especies de micorrizas arbusculares del género *Glomus*, el cual es uno de los más ampliamente distribuidos a nivel mundial (Jacquot et al., 2000; Turnau et al., 2001).

La identificación de las MA por medio de técnicas moleculares permitirá un uso rápido y adecuado de las diferentes especies de MA en sus diversas aplicaciones. Además en un futuro, se podría relacionar los aspectos del presente estudio molecular, con las características propias de la diversidad funcional de los fenotipos y los genotipos de las MA.

### OBJETIVOS GENERALES

- Implementar y estandarizar la técnica de extracción de DNA a partir de esporas de micorrizas.
- Implementar, optimizar y estandarizar la técnica molecular de la Nested PCR para la identificación molecular de las micorrizas arbusculares *Glomus mosseae* BEG 25 y BEG 132.

### PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

#### Propagación de MA

Para la multiplicación de MA se realizaron cultivos monospóricos y trampa en sustrato estéril (arena de río) con plantas hospederas de: avena, arroz, alpiste y cebolla. Una vez que se comprobó que la simbiosis se había establecido (mediante la tinción de raíces), se recuperó las esporas de MA mediante la técnica de tamizado húmedo y decantación de Gerdermann y Nicholson (1963) citado por Herrera et al. (2002).

<sup>1</sup> Escuela Politécnica del Ejército (ESPE). Correo electrónico: [adrianag\\_castillo@yahoo.com](mailto:adrianag_castillo@yahoo.com)

## **Extracción de DNA de esporas de MA**

Para determinar el número mínimo de esporas de MA con el que se podía obtener una buena amplificación de DNA en la técnica de la Nested PCR, se ensayó con 1, 3, 6 y 10 esporas del hongo micorrízico *Glomus mosseae*. El protocolo de extracción de DNA, el cual amplifica el extremo 5' de la Subunidad grande del ribosoma de los Glomales, se fundamentó en el método diseñado por van Tuinen *et al.*, (1998); Jacquot *et al.*, (2000) y Turnau *et al.*, (2001). Empleándose TrisHCl y Chelex-100 (BioRad), combinados con un shock térmico y centrifugación para recuperar los ácidos nucleicos de las esporas de MA.

## **Comparación de secuencias nucleotídicas de *Glomus mosseae***

Se comparó las secuencias nucleotídicas de catorce clones de *Glomus mosseae* (números de acceso en NCBI: AF304983, AF304985, AF304986, AF304987, AF304988, AF304989, AF304990, AF304991, AF304993, AF304994, Y07656, AF145735, AJ271924, DQ273793) con el objeto de comprobar si existían regiones polimórficas del DNA que impidieran la hibridación de los primers para la Nested. Para ello se empleó el programa Clustawl del Biology Work Bench, de San Diego Supercomputer Center (SDSC) en línea (<http://workbench.sdsc.edu/>). Los sitios de hibridación de los primers en el DNA se evidenciaron con la ayuda del programa Fast PCR, disponible en la red (<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/download.htm>).

## **Nested PCR para *Glomus mosseae***

Se implementó, optimizó y estandarizó el protocolo de Nested PCR propuesto por van Tuinen *et al.*, 1998, realizando variaciones en:

- Concentración de reactivos (cloruro de magnesio, Taq DNA polimerasa, primers)
- Número de etapas de amplificación del DNA de MA
- Primers empleados
- Temperatura de annealing de los primers en el programa de amplificación del termociclador.

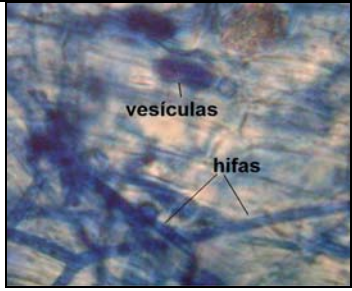
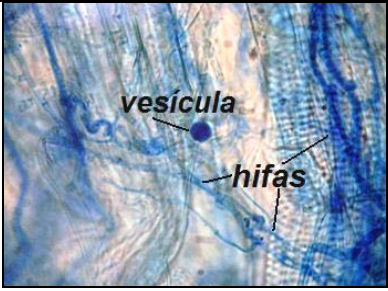
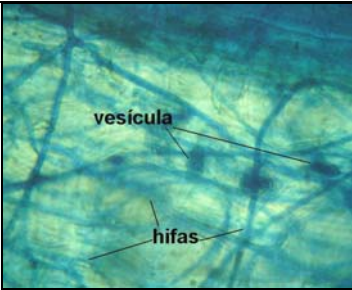
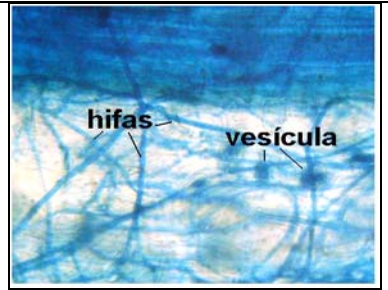
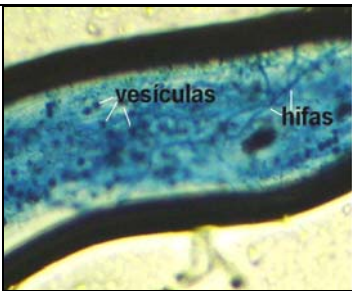
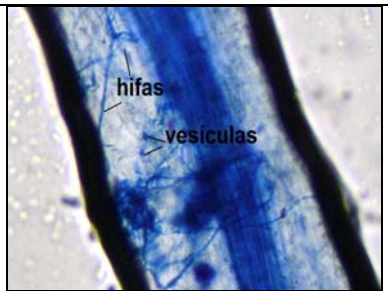
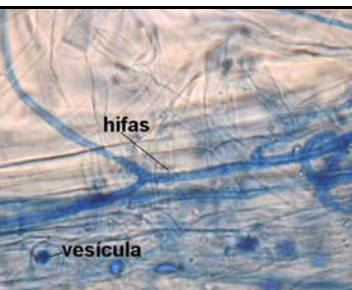
Para cada muestra de DNA que se amplificaba se realizó además un blanco, esto con el objeto de controlar que el proceso de ensamblado de la PCR se haya llevado a acabo correctamente y que no existiera contaminación. Luego de cada amplificación por Nested PCR se montó una electroforesis. Las muestras de DNA se corrieron en un gel de agarosa al 2% con 0,5µl de BrEtd/10 ml de TBE 1X. Como referencia de peso molecular se usaron marcadores moleculares de 100bp o 1Kb. Los resultados de la electroforesis se visualizaron y documentaron en un transiluminador a 498 nm.

## **RESULTADOS**

### **Propagación de MA**

La presencia de estructuras propias de la simbiosis micorrízica, tales como formación de hifas y vesículas, se comprobó mediante su observación en el interior de las raíces de plantas trampa. Para lo cual las raíces se tiñeron con azul de tripano, se montaron en un portaobjetos y se las revisó bajo un microscopio en un aumento de 40X (Figura 1).

**Figura 1.** Fotografías de las raíces colonizadas por *Glomus mosseae* BEG 25 y BEG 132 en plantas trampa de avena, alpiste, cebolla y arroz (aumento: 40X).

		Cepa de <i>Glomus mosseae</i>	
<i>Planta Trampa</i>		<i>BEG 25</i>	<i>BEG 132</i>
<i>Avena</i>			
<i>Alpiste</i>			
<i>Cebolla</i>			
<i>Arroz</i>		No existieron supervivientes	

Fotografías autoría de Gabriela Castillo, 2008. Aumento 40X.

### Identificación mediante Nested PCR de las MA

Se generó un diseño de la técnica de Nested PCR propio de la presente investigación, que permitió reducir el costo y el tiempo necesario para realizarla. Se redujo el proceso de amplificación de tres

etapas (van Tuinen et al., 1998) a sólo dos, usando dos parejas de primers seleccionados específicamente para amplificar a *Glomus mosseae* BEG25 y BEG132. Los primers empleados fueron: NDL22 y LR1 durante la primera etapa y NDL22 junto a 5.21 en la segunda etapa de la Nested PCR. Las especificaciones de los primers se encuentran detalladas en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Características de los primers empleados para la amplificación mediante Nested PCR de *Glomus mosseae*.

<i>Etapa PCR</i>	<i>Nombre de primer</i>	<i>Tamaño</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Autores</i>	<i>Característica</i>	<i>Pb amplificación</i>
I	LR1	20	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGA-3'	Van Tuinen et al., 1998	Primers universales de eucariotas	750
	NDL22	19	5'-TGGTCCGTGTTTCAAGACG-3'			
II	5.21	21	5'-CCTTTTGAGCTCGGTCTCGTG-3'	Van Tuinen et al., 1998	Primer específico de <i>GM</i>	367
	NDL22	19	5'-TGGTCCGTGTTTCAAGACG-3'		Primers universales de eucariotas	

Las concentraciones de los reactivos (Tabla 2): Taq DNA Polimerasa y de los Primers se optimizaron en relación a lo propuesto en el protocolo de van Tuinen et al., (1998). Además, la concentración de Cloruro de magnesio se estandarizó para cada tipo de *Glomus mosseae*, de modo que la banda de amplificación de DNA (amplificación) resultado de la Nested PCR pudiera visualizarse nítidamente (en tamaño y forma) para permitir identificar fácilmente a las MA.

**Tabla 2.** Concentración de los reactivos empleados en la amplificación de *Glomus mosseae* por Nested PCR.

<i>Reactivo</i>	<i>Glomus mosseae BEG 25</i>	<i>Glomus mosseae BEG 132</i>
Buffer PCR (Invitrogen) (20mM Tris-HCl;50mM KCl)	1X	1X
MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen)	2mM	2,5mM
dNTPs (Invitrogen)	200µM	200µM
Primer 1	30pM	30pM
Primer 2	30pM	30pM
Taq polimerasa (Invitrogen)	1U/µl	1U/µl

Luego de realizar gradientes de la temperatura de annealing para los primers en el termociclador, se determinó que el mejor programa de amplificación para cada tipo de *Glomus mosseae* fue el especificado en la Tabla 3.



## DISCUSION

Es importante recalcar que con el presente trabajo de investigación se ha generado por primera vez en nuestro país, información a nivel molecular sobre micorrizas, lo que seguramente constituirá un punto de partida para estudios taxonómicos y evolutivos moleculares de este tipo de simbiosis, la cual tiene gran aplicabilidad en la agricultura y la recuperación de suelos a nivel nacional.

Los resultados de identificación molecular obtenidos a partir del DNA, mediante una técnica molecular de alta fidelidad y reproducibilidad como lo es la Nested PCR, constituyen una ventaja competitiva frente a la identificación morfológica de micorrizas. Ya que permiten una mayor confiabilidad al no depender de la catalogación de las características físicas variables con el medio en que el hongo se desarrolla, como es el caso de la taxonomía tradicional.

### **Propagación de *Glomus mosseae* a partir de sustrato micorrizado**

Se propuso y optimizó un sistema de manejo que comprendió desde el establecimiento de cultivos monospóricos hasta cultivos trampa. Induciendo mediante el sometimiento de la planta a diferentes tipos de estrés, como el de la poda y el hídrico, a la infección por parte del hongo y a la formación de la simbiosis. Aunque dentro de los objetivos de esta investigación no se encontraba el comprobar la influencia de estos parámetros en la formación de micorriza, fue posible observar una colonización extendida en las raíces de las plantas infectadas.

### **Extracción del DNA de esporas de *Glomus mosseae***

Debido a la variabilidad de opiniones con respecto al número de esporas de MA y a la metodología a emplearse para extraer su material genético, fue necesario determinar criterios propios de la presente investigación, que permitieran seleccionar a las condiciones óptimas para obtener un DNA apto para su amplificación en dos etapas de Nested PCR. En el caso del número de esporas, el número de diez fue el preciso para favorecer la amplificación de DNA. En cuanto a la metodología empleada durante la extracción de DNA, si bien se usó el mismo principio de shock térmico, TrisHCl y Chelex-100 propuesto por van Tuinen *et al.*, (1998); Jacquot *et al.*, (2000) y Turnau *et al.*, (2001), se encontraron algunas dificultades de tipo térmico-altitudinales, que no se han mencionado en otros estudios moleculares de micorrizas. Siendo necesario acoplar la técnica a la temperatura máxima de 92,5°C durante el shock térmico.

La metodología de extracción de material genético con Chelex100 es sencilla y rápida, pero debe tomarse en cuenta que el DNA obtenido debería emplearse para su amplificación en el menor período de tiempo posible para evitar su degradación.

### **Nested PCR para la amplificación de *Glomus mosseae***

La técnica de Nested PCR propuesta por van Tuinen *et al.*, (1998) consideraba tres etapas de amplificación. En la presente investigación se optimizó a dos, las cuales fueron suficientes para identificar a las cepas de *Glomus mosseae*, demostrándose así que no es indispensable una reamplificación anidada con un número mayor a dos fases. Luego de estandarizar la técnica de Nested PCR, los resultados obtenidos en temperatura de annealing y cloruro de magnesio demuestran que incluso entre distintas cepas de la misma especie micorrícica, puede ser necesario aplicar diferentes condiciones para mejorar la eficiencia, optimizar la calidad y cantidad de amplificación de su DNA. Por ello, en el caso de *Glomus mosseae* BEG 25 las condiciones estandarizadas de amplificación fueron a 2 mM de Cloruro de magnesio y una temperatura de annealing de 58°C, mientras que para *Glomus mosseae* BEG 132 fue 2,5 mM de Cloruro de magnesio y 61°C de temperatura de annealing. Todas las adaptaciones de la técnica, especialmente las relacionadas con la concentración de reactivos, han permitido reducir de manera importante los costos que cada reacción de Nested PCR implicaba. A

pesar de que el análisis económico de la viabilidad de esta técnica no se encontraba contemplado dentro de los objetivos de esta investigación, es evidente que en nuestro país es necesario encontrar la forma de que las tecnologías moleculares disponibles no se queden restringidas por cuestiones económicas.

Si bien, los resultados de la amplificación de *Glomus mosseae* mediante Nested PCR correspondieron en parte a lo que se esperaba de acuerdo a la bibliografía. Es importante mencionar algunas diferencias que se presentaron especialmente en el amplicón de la primera etapa de amplificación, ya que su presencia se encontró directamente relacionada con el grado de madurez de las esporas de micorrizas empleadas. Aunque la estandarización de la técnica no se basó en la primera etapa de la Nested PCR, porque los resultados que determinaban la identificación de las muestras de micorrizas como *Glomus mosseae* radicaban en la segunda etapa (en que se empleaba el primer específico de especie), es necesario mencionar que: el ensamblaje de la mezcla reactiva se realizó correctamente; los volúmenes de mezcla reactiva, DNA y agua PCR añadidos para su amplificación fueron óptimos y que, a pesar de que en la primera fase podían no haberse observado bandas de amplificación, la sensibilidad de la técnica trabajó de manera eficaz detectando y amplificando a este DNA durante la segunda etapa de amplificación (van Tuinen et al., 1998).

La aplicación y la alta sensibilidad de la Nested PCR constituye una gran ventaja para el investigador, porque en casos en que la técnica se emplee con muestras de campo, en que la cantidad de material micorrízico y su grado de madurez puede fluctuar, se garantizan resultados óptimos para identificar incluso entre diferentes especies de estos hongos (Jacquot *et al.*, 2000; Jacquot *et al.*, 2001; Rosendahl & Stukenbrock, 2004; Turnau et al., 2001).

### **Taxonomía molecular VS Taxonomía morfológica**

Si bien es cierto que todavía no se conoce la relación que existe entre diversidad morfológica y molecular en micorrizas, un tema controversial que ha surgido de la comparación de secuencias nucleotídicas del DNAr es la clasificación taxonómica de las micorrizas. Especialmente si se la compara con la taxonomía tradicional (morfológica). Es importante mencionar parte de las fortalezas y debilidades de cada uno de estos tipos de taxonomía, para entender así su posible complementariedad.

Los métodos moleculares permiten que se pueda identificar el taxa de MA independientemente de los criterios morfológicos, lo que genera secuencias nucleotídicas capaces de brindar bastante información del parentesco entre especies micorrízicas, en contraste con la taxonomía tradicional (basada en caracteres morfológicos). La morfología molecular se usa especialmente para potencializar la información obtenida en los casos en que se obtienen bajos niveles de colonización por MA (van der Heidjen & Sanders, 2002). Sin embargo, aún no está esclarecido el mecanismo que relaciona el comportamiento molecular con la fisiología y ecología de las micorrizas (Wright, 1994).

La taxonomía morfológica en cambio, cobra vital importancia para determinar las relaciones ecológicas entre las diferentes especies de micorrizas y permite además identificar los cambios fenotípicos que se presentan como resultado de la adaptación del hongo a diferentes medios y condiciones del hábitat o ecosistema (van der Heidjen & Sanders, 2002).

## BIBLIOGRAFIA

- De la providencia, I. y F. Fernández. 2004. Factibilidad del uso de un ELISA indirecto para la detección de *Glomus clarum*. *Cultivos Tropicales*, 23: 17-22.
- Hijri, M., H. Niculita, and I. Sanders. 2007. Molecular characterization of chromosome termini of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intradices* (Glomeromycota). *Fungal Genetics and Biology*. [en línea]. Disponible en: <http://elsevier.com/locate/yfgbi>. Consulta 10 de Junio 2007.
- Jacquot-Plumey, E., D. van Tuinen, S. Gianinazzi, and V. Gianinazzi-Pearson. 2000 Monitoring species of arbuscular mycorrhizal fungi in planta and in soil by nested PCR: application to the study of the impact of sewage sludge. *Plant Soil*. 226: 179-188.
- Molina, M., L. Mahecha, y M. Medina. 2005. Importancia del manejo de hongos micorrizógenos en sistemas silvopastoriles. *Revista Colombiana de Ciencias pecuarias*. 18 (2): 162.
- Rosendahl, S. and E. Stukenbrock. 2004. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in undisturbed vegetation revealed by analyses of LSU rDNA sequences. *Molecular Ecology* 13: 3179-3186. [en línea]. Disponible en: <http://www.bi.ku.dk/staff/soerenr/community-ME.pdf>. Consulta 16 Junio 2006.
- Ruiz-Lozano J., C. Collados, R. Porcel, R. Azcón, and J. Barea. 2002. Identification of a cDNA from the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus intradices* that is Expressed During Mycorrhizal Symbiosis and Up-Regulated by N Fertilization. *MPMI*.15(4): 360–367
- Turnau, K., P. Ryszka, V. Gianinazzi-Pearson, and D. van Tuinen. 2001. Identification of arbuscular mycorrhizal fungi in soils and roots of plants colonizing zinc wastes in southern Poland. *Mycorrhiza*. 10: 169-174.
- Van der Heijden, M., J. Klironomos, M. Ursic, P. Moutoglis, R. Streitwolf-Engel and T. Boller *et al.*,. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*. 396: 69-72.
- Van Tuinen, D., E. Jacquot, B. Zhao, A. Gollote, 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: 879-887.
- Wainwright, M. 1995. Introducción a la Biotecnología de los hongos. Department of Molecular Biology and Biotechnology. University of Sheffield.Uk. Zaragoza-España. Pp: 16-18, 9-11, 173-194.
- Wright, L. 1994. Production technology status of woody and herbaceous crops. *Biomass and Bioenergy*. 6:191-209.