

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

## *PARTE INTRODUCTORIA*

Listado de Tablas. ....	<b>ix</b>
Listado de Cuadros.....	<b>x</b>
Listado de Figuras. ....	<b>xi</b>
Listado de Anexos. ....	<b>xiii</b>
Resumen. ....	<b>xiv</b>
Abstract. ....	<b>xv</b>

## *CUERPO DE LA TESIS*

<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Formulación del Problema .....	<b>1</b>
1.2 Justificación del Problema.....	<b>3</b>
1.3 Objetivos de la Investigación.....	<b>7</b>
1.3.1 Objetivo General.....	<b>7</b>
1.3.2 Objetivos Específicos.....	<b>7</b>
1.4 Marco Teórico.....	<b>8</b>
1.4.1 Los Hongos Micorrícicos.....	<b>8</b>
1.4.2. Micorrizas vesículo arbusculares .....	<b>11</b>
1.4.2.1 Taxonomía Morfológica de las Micorrizas Arbusculares.....	<b>14</b>
1.4.2.2 Taxonomía Molecular de las Micorrizas Arbusculares.....	<b>16</b>
1.4.3 Caracterización molecular de las Micorrizas Vesículo Arbusculares.....	<b>19</b>
1.4.3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para Micorrizas Vesículo Arbusculares.....	<b>19</b>
1.4.3.2 Nested PCR.....	<b>22</b>
1.4.3.3 DNA ribosomal (DNAr) de Micorrizas Arbusculares.....	<b>23</b>
1.5 Sistema de Hipótesis.....	<b>26</b>

## **CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....27**

2.1. Participantes.....27

2.2 Zona de estudio.....27

2.3 Período de tiempo de investigación.....27

2.4 Análisis de datos.....27

2.5 Métodos.....28

2.5.1 Propagación de *Glomus mosseae* a partir de sustrato micorrizado.....28

2.5.1.1 Extracción de esporas de *Glomus mosseae* a partir de sustrato micorrizado.....28

2.5.1.2 Propagación de *Glomus mosseae* en Cultivos Monospóricos y Cultivos Trampa. ....29

2.5.1.3 Tinción de raíces.....30

2.5.2 Análisis molecular de *Glomus mosseae*.....31

2.5.2.1 Extracción y cuantificación de DNA de esporas de *Glomus mosseae*.....31

2.5.2.2 Comparación de secuencias nucleotídicas de *Glomus mosseae* .....32

2.5.2.3 Nested PCR para *Glomus mosseae* BEG 25 y BEG 132. ....33

2.5.2.4 Visualización de los productos de amplificación de DNA por electroforesis. ....37

## **CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....38**

3.1 Propagación de *Glomus mosseae* a partir de sustrato micorrizado .....38

3.1.1 Cultivos monospóricos y Cultivos trampa.....38

3.1.2 Tinción de raíces colonizadas con *Glomus mosseae*.....38

3.2 Análisis molecular de *Glomus mosseae* .....40

3.2.1 Extracción de DNA a partir de esporas de *Glomus mosseae*.....40

3.2.2 Comparación de secuencias de DNA de <i>Glomus mosseae</i> .....	41
3.2.3 Optimización de la técnica molecular Nested PCR para amplificación de DNAr de <i>Glomus mosseae</i> .....	43
<b>CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.....</b>	<b>52</b>
4.1 Propagación de <i>Glomus mosseae</i> a partir de sustrato micorrizado .....	52
4.2 Análisis molecular de <i>Glomus mosseae</i> .....	54
<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....</b>	<b>63</b>
<b>CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.....</b>	<b>64</b>
<b>CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>66</b>
Glosario.....	79

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1 Secuencias nucleotídicas de <i>Glomus mosseae</i> , por autor, año y número de acceso de la secuencia en NCBI (Internet). .....	33
Tabla 2.2 Primers usados durante la amplificación con Nested PCR para <i>Glomus mosseae</i> BEG 25 (GM 25) y BEG 132 (GM 132) por: etapa de la Nested PCR, nombre, tamaño, secuencia, autores, característica y tamaño del amplicón (en pares de bases, pb). .....	34
Tabla 2.3 Programa de amplificación aplicado inicialmente en el termociclador (Techne TC-512) para la Nested PCR. ....	35
Tabla 2.4 Rango de temperaturas de annealing <i>T<sub>a</sub></i> calculadas en Fast PCR para cada pareja de primers. ....	36
Tabla 2.5 Concentración inicial de reactivos empleados en la amplificación de <i>Glomus mosseae</i> por Nested PCR. ....	36
Tabla 3.1 Concentraciones de reactivos optimizadas para la Nested PCR de GM25 y GM132.. ....	48
Tabla 3.2 Volúmenes ( $\mu$ l) estandarizados de los componentes usados para la amplificación de GM 25 y GM132.....	49
Tabla 3.3 Programa de amplificación de DNA empleado para la Nested PCR de GM 25 y 132.....	49
Tabla 3.4 Tamaño de amplicón obtenido luego de las diferentes etapas de la Nested PCR.....	51

## **LISTADO DE CUADROS**

Cuadro 1.1 Clasificación de los hongos micorrícicos arbusculares de acuerdo a la taxonomía morfológica de sus esporas.....	<b>15</b>
--	-----------

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Fotografía de la espora de una MA ( <i>Glomus claroideum</i> ) en germinación. ....	8
Figura 1.2. Fotografía de la hifa de una micorriza formando el apresorio para ingresar a la raíz de una planta. ....	9
Figura 1.3. a) Raíz micorrizada de una planta, en la que se evidencia el incremento del área superficial efectiva de absorción; b) Agregados de suelo formados por la acción del micelio del hongo.....	10
Figura 1.4 Esquema de las estructuras propias de las micorrizas vesículo arbusculares, al interior y exterior de la raíz. ....	12
Figura 1.5 Fotografía del arbúsculo de <i>Glomus mosseae</i> .....	13
Figura 1.6. Características morfológicas típicas de las especies <i>Glomus</i> .....	15
Figura 1.7 Árbol filogenético de la taxonomía de los <i>Glomerycota</i> , basado en el análisis de secuencias SSU de DNAr; contiene los taxos recientemente incluidos (2007) y la nueva clasificación del orden de los Diversisporales (2004) .....	18
Figura 1.8 Esquema de una unidad repetitiva de DNAr de MVA, constituida por: Subunidad Menor 18S (SSU), Región ITS, Subunidad mayor 25-28S (LSU) y Espacios Intragénicos (IGS). ....	24
Figura 3.1 Fotografías de las raíces colonizadas por GM25 y GM132 en plantas trampa de avena, alpiste, cebolla y arroz.....	39
Figura 3.2 Secuencia del DNAr de LSU de <i>Glomus mosseae</i> y regiones a las que los primers NDL22, LR1 y 5.21 se hibridan .....	42

Figura 3.3 Comparación entre secuencias de diferentes clones (NCBI) de <i>Glomus mosseae</i> .....	<b>43</b>
Figura 3.4 Ensayos de estandarización de Temperatura de annealing y Concentración de MgCl <sub>2</sub> en la Nested PCR para GM25. ....	<b>45</b>
Figura 3.5 Ensayos de estandarización de Temperatura de annealing y Concentración de MgCl <sub>2</sub> en la Nested PCR para GM132. ....	<b>47</b>
Figura 3.6 Amplicones de GM25 y GM132 obtenidos por Nested PCR (optimizada) .....	<b>50</b>

## LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Secuencia nucleotídica del gen ribosomal 28S de <i>Glomus mosseae</i> (DQ273793).....	<b>80</b>
---	-----------

# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

## 1.1 Formulación del Problema

En el suelo, la rizósfera constituye el lugar en el que ocurre una amplia gamma de flujos de energía y de minerales entre los componentes biológicos, físicos y químicos (Wright, 1994). Estos flujos promueven la presencia de relaciones simbióticas entre microorganismos del suelo, como los hongos, o las bacterias con las plantas (Diouf, Diop & Ndoye, 2003), donde una o ambas especies se benefician a consecuencia de su coexistencia (McNaughton & Wolf, 1984). De los diferentes tipos de asociaciones existentes entre hongos y raíces de especies vegetales, la más ampliamente distribuida en el reino vegetal es la micorriza arbuscular (MA) (Smith & Read, 1997; van der Heidjen & Sanders, 2002; Rodríguez, 2004; Molina, Mahecha y Medina, 2005).

La MA es una asociación simbiótica mutualista de hifas de hongos con raíces de plantas vasculares o con los rizoides de las briofitas (Herrera y Ulloa, 1998). La planta autotrófica proporciona los compuestos carbonados procedentes de la fotosíntesis al otro miembro, el hongo heterotrófico (Molina *et al.*, 2005). El movimiento bidireccional de materiales a través de la interfase planta-hongo (Herrera y Ulloa, 1998) influye de manera esencial en las condiciones edáficas. La simbiosis permite un incremento de la adaptabilidad (salud y crecimiento), mejora la toma de nutrientes del suelo y la captación de agua por parte de la planta (Werner, 1992; Smith & Read, 1997; Diouf *et al.*, 2003; Molina *et al.* 2005).

Actualmente, nos enfrentamos a problemas graves de degradación de la calidad del suelo. Además de los factores abióticos que influyen en él, el hombre ha contribuido notablemente a que su deterioro vaya en aumento, debido al mal manejo que le ha dado (Sieverding, 1991; van Tuinen, Jacquot, Zhao, Gollote & Gianinazzi-Pearson, 1998; van der Heijden & Sanders, 2002).

Algunas prácticas agrícolas mal llevadas como el empleo excesivo de fertilizantes y plaguicidas (van Tuinen *et al.*, 1998; Jacquot, van Tuinen, Chatagnier,

Gianinazzi & Gianinazzi-Pearson, 2001) y el desarrollo de actividades productivas como la minera o petrolera, generan la acumulación de contaminantes y metales pesados en el suelo. Situación que provoca el deterioro del ambiente, la destrucción de ecosistemas y la disminución de la diversidad de micorrizas (van der Heijden & Sanders, 2002); lo cual induce una disfunción de su relación simbiote (Turnau, Ryszka, Gianinazzi-Pearson & van Tuinen, 2001). El equilibrio normal del suelo y el flujo habitual de materia y energía se ve alterado (Jacquot *et al.*, 2001; Vandenkoornhuyse, Leyval & Bonnin, 2001).

Los problemas en la calidad y estabilidad del suelo son índices de degradación que repercuten negativamente sobre la biodiversidad de las plantas (Van Der Heijden, Klironomos, Ursic, Moutoglis, Streitwolf-Engel & Boller *et al.*, 1998) y sobre los niveles de fertilidad y rendimiento de las mismas (Jacquot *et al.*, 2000, 2001). Todos ellos son factores en gran parte responsables del cambio climático global (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2001; van der Heijden & Sanders, 2002).

El uso racional de MA en ecosistemas agrícolas o industriales podría representar una alternativa interesante para reducir o sustituir el uso de fertilizantes y pesticidas (van Tuinen *et al.*, 1998), y para recuperar suelos degradados (Molina *et al.*, 2005) por contaminación con metales pesados (Turnau *et al.*, 2001; González-Chávez, 2004).

El punto de partida para el uso de MA es el estudio e identificación de las especies nativas que existen dentro de la población afectada, ya que el hábitat en que se desarrollen influye directamente sobre la distribución ecológica y su afinidad por diferentes hospederos.

Para estos estudios se requieren grandes cantidades de esporas y material fúngico de MA (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2001) los cuales no se pueden obtener en medios artificiales (Redecker *et al.*, 2000a; Burnett, 2003), sino en plantas trampa en la que la simbiosis se ha establecido (Jacquot *et al.*, 2001; de Souza, Kowalchuk, Leeflang, van Veen & Smit, 2004).

Se han reportado varias dificultades en la descripción morfológica de MA, entre ellas, que el método empleado convencionalmente para teñir raíces colonizadas por el

hongo no es del todo efectivo para varias de las especies de MA caracterizadas recientemente (Redecker, Morton & Bruns, 2000b).

Otro inconveniente es que los patrones estructurales e histológicos de la simbiosis micorrícica varían según la especie del hongo, la planta involucrada y el medio ambiente en que se desarrollen ambos (Herrera y Ulloa, 1998), por lo que los fenotipos expresados bajo condiciones de campo y de laboratorio pueden diferir en su estructura (Jacquot *et al.*, 2001).

Uno de los aspectos más difíciles de sobrellevar es la subjetividad y variedad de criterios para clasificar e identificar micorrizas arbusculares. La clasificación, especialmente para distinguir los hongos del orden *Glomales* por tanto, se vuelve dependiente de la experiencia y pericia del investigador para observar, reconocer e interpretar las diferencias fisiológicas o morfológicas observables de las esporas, hifas, vesículas y arbusculos de las MA (de la Providencia y Fernández, 2004; de Souza *et al.*, 2004). Es importante, además, el tiempo que lleve en adquirir este conocimiento y que se lo pueda aplicar.

En nuestro país, a pesar de tener un potencial agrícola fuerte, lo referente a MA es un campo en el que se ha incursionado recientemente. La información y experiencia generada en el tema a nivel local es escasa, por lo cual se vuelve vital la promoción de estudios y tecnologías en que se aproveche la diversidad de poblaciones micorrícicas de que disponemos para obtener una mejor calidad del suelo y promover la conservación del ecosistema.

## **1.2 Justificación del Problema**

Las características positivas que se derivan de la implementación del uso de MA en cuanto al crecimiento, salud, nutrición, estabilidad y adaptabilidad de las plantas con respecto al suelo y al ambiente (Blanco y Salas, 1997; van der Heijden *et al.*, 1998; van der Heijden & Sanders, 2002; Ramos y Guadarrama, 2004), han generado a nivel internacional un gran interés en el estudio, aplicación y uso de tecnologías de las MA. El objetivo principal es el de desarrollar sistemas de manejo agrícolas y ambientales mucho más limpios y efectivos para mejorar la producción (de Souza *et al.*, 2004).

En el caso de la agricultura, una vez que una población de MA establece la simbiosis con un cultivo de plantas, comienzan a aparecer múltiples beneficios (Ruiz-Lozano, Collados, Porcel, Azcón & Barea, 2002). Se obtiene una mayor tasa fotosintética y de absorción de nutrientes propios del suelo como el fósforo, así como un mejor aprovechamiento de las sustancias minerales (nitrógeno, potasio, magnesio, hierro, manganeso) que se encuentran en la fase sólido acuosa del suelo. Los metabolitos producidos por el hongo, provocan que componentes generalmente poco móviles (fósforo, zinc, azufre, calcio molibdeno, boro) puedan ser captados por la raíz micorrizada (Molina *et al.*, 2005) favoreciendo entonces, el crecimiento del vegetal aun en suelos de baja fertilidad (Ramos y Guadarrama, 2004; Carlile, Watkinson & Goodway, 2005).

Las MA, además, proveen a sus huéspedes una mayor resistencia a estrés como el hídrico (Ramos y Guadarrama, 2004), las bajas temperaturas (Rosendahl & Stukenbrock, 2004; Rodríguez, 1989), o a los ataques por plagas de protozoarios, nemátodos, insectos y artrópodos (Herrera y Ulloa, 1998; Hijri, Niculita & Sanders, 2007).

Todas estas ventajas son las que disminuyen la necesidad de adicionar grandes proporciones de abonos y pesticidas químicos (van Tuinen *et al.*, 1998), que acaban siendo nocivos para el ambiente (Blanco y Salas, 1997). La implementación de MA como parte de un manejo agrícola optimizado, en base a la microbiota propia del suelo (van der Heijden & Sanders, 2002), garantiza resultados más limpios y consistentes a lo largo del tiempo (de Souza *et al.*, 2004).

Se conoce que las MA tienen un potencial especialmente importante en la recuperación de suelos degradados por la acumulación de metales pesados producidos por algunas actividades industriales (Turnau *et al.*, 2001). En estos casos la micorrización favorece la revegetación de las zonas afectadas (Ramos y Guadarrama, 2004) al aumentar la probabilidad de germinación de las semillas, inducir el crecimiento de las raíces y aumentar la tasa de fotosíntesis de la planta (Killham, 1994).

Las MA son partícipes de procesos de bioacumulación, en que los metales pesados que se encuentran en el suelo pasan a ser absorbidos por la raíz, y se

transportan hasta los órganos subterráneos y aéreos de la planta en donde son retenidos. Favorece la disminución de la concentración del contaminante en el suelo y su probabilidad de migración. Esto permite que se reduzca el impacto negativo que pudo generar el metal en el ambiente y facilitar que se reestablezca el equilibrio del ecosistema afectado (González-Chávez, 2004; González-Chávez, Carrillo, Wright & Nichols, 2004).

De todo lo mencionado anteriormente, podemos ver que se deriva la necesidad de incurrir en la taxonomía e identificación de este tipo de hongos (de la Providencia y Fernández, 2004). Resulta vital, determinar, clasificar y nombrar sistemáticamente a las especies, géneros, variedades e incluso cepas de micorrizas que puedan cumplir mejor con objetivos agrícolas o de bioremediación (Ruiz-Lozano, 2002; Wainwright, 1995).

Un conocimiento más profundo, de la variedad de especies de hongos micorrícicos que existen, garantizará no sólo el mantenimiento y explotación de su biodiversidad; sino que también facilitará relacionar el efecto metabólico que induce la simbiosis en la planta para mejorar su salud, productividad y estabilidad. El obtener información de las MA permitirá la comprensión de su rol dentro de un nicho ecológico y su influencia dentro del medio ambiente (Blanco y Salas, 1997; Ramos y Guadarrama, 2004; Vandenkoornhuys *et al.*, 2001; van Tuinen *et al.*, 1998).

Actualmente, a pesar de la importancia que tienen las MA en la gran mayoría de ecosistemas terrestres su ecología, genética y evolución es poco conocida (de Souza *et al.*, 2004; Vandenkoornhuys *et al.*, 2001). En parte debido a las dificultades asociadas con la detección, caracterización e identificación de las especies micorrícicas mediante análisis morfológico, a la poca disponibilidad de grandes cantidades de MA, la variación en sus patrones estructurales y los problemas en la tinción (de la Providencia y Fernández, 2004; Molina *et al.*, 2005).

A nivel internacional se ha trabajado en la identificación de especies de MA no sólo a nivel morfológico, sino en lo molecular, lo que ha despertado gran interés en la comunidad científica.

Se han propuesto nuevas alternativas biotecnológicas para la identificación de MA, especialmente basadas en métodos genético-moleculares útiles para la clasificación taxonómica. Las cuales detectan analogías o divergencias del código genético de las MA, específicamente de la región del DNA que contiene los genes ribosomales (DNAr) (Burnett, 2003; van Tuinen *et al.*, 1998).

Existen varias ventajas que se obtienen al emplear técnicas moleculares: son sumamente sensibles (van der Heidjen & Sanders, 2002), no requieren grandes cantidades de material fúngico para realizarlas (Molina *et al.*, 2005; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2001) y generan resultados con mayor rapidez y fidelidad. La observación y apreciación de las diferencias morfológicas no depende de la subjetividad del observador, sino que están determinadas por la amplificación diferencial de regiones de interés en los ácidos nucleicos del DNA de las micorrizas (van Tuinen *et al.*, 1998; Turnau *et al.*, 2001; Jacquot *et al.*, 2000; Rosendahl & Stuckenbrock, 2004), permitiendo precisar definitivamente las relaciones de proximidad genética entre especies.

En nuestro país, a pesar de las necesidades agrícolas que tenemos, el campo de la investigación en MA se encuentra comenzando. Lamentablemente no se dispone de información generada internamente, por lo que es necesario plantear y desarrollar una amplia gama de soluciones biotecnológicas en las que se incluya el manejo de micorrizas para mejorar la eficiencia de su explotación en la agricultura moderna, sin la necesidad de incursionar en tecnificación costosa, a la que la mayoría de nuestros agricultores no tienen acceso.

Es necesario, entonces, comenzar a conocer la identidad de la diversidad individual y grupal de poblaciones de micorrizas arbusculares de que disponemos, especialmente de grupos como los Glomales, a los que pertenece *Glomus mosseae*, una de las especies más ampliamente distribuidas a nivel mundial y de varios ecosistemas (Jacquot *et al.*, 2000; Turnau *et al.*, 2001). El punto de partida puede precisamente constituirlo la identificación de las cepas BEG 25 y BEG132 de *Glomus mosseae*.

El presente trabajo dará paso a las primeras pautas que nos permitan dilucidar la identidad genética de MA a nivel molecular. Para obtener una técnica estandarizada y

optimizada de acuerdo a las condiciones y características de un laboratorio local, como es el de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, en Sangolquí-Ecuador. A futuro se podrá relacionar los aspectos del presente estudio molecular, con las características propias de la diversidad funcional de fenotipos y genotipos de este tipo de hongos simbióticos.

### **1.3 Objetivos de la Investigación**

#### **1.3.1 Objetivo General**

Estandarizar la técnica molecular de la Nested PCR, para identificar las micorrizas arbusculares de la especie *Glomus mosseae*, cepas: BEG 25 y BEG132 en los laboratorios de Ingeniería en Biotecnología, Sangolquí-Ecuador.

#### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- Realizar cultivos monospóricos de *Glomus mosseae*, cepas BEG 25 y BEG 132, en plantas de: arroz, cebolla, avena y alpiste.
- Propagar los hongos micorrícicos de los cultivos monospóricos, mediante cultivos trampa para obtener plantas colonizadas por MA con una población suficiente de esporas del hongo como para su utilización en técnicas de extracción de DNA.
- 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 en el laboratorio de Biología Molecular Vegetal de Biotecnología, para la identificación molecular de micorrizas arbusculares (*Glomus mosseae* BEG 25 y BEG 132).
- Identificar las cepas BEG132 y BEG25 de *Glomus mosseae*, mediante Nested PCR.

## 1.4 Marco Teórico

### 1.4.1 Los Hongos Micorrícicos

El término micorriza fue propuesto por Frank en 1885, basándose en dos términos, rhiza-raíz y mykes-hongo (Sieverding, 1991). El término se refiere a una simbiosis endofítica, biotrófica y mutualista entre el hongo micorrícico y la planta hospedera; formando una integración morfológica perfecta en la que el órgano de absorción pasa a ser la micorriza y no la raíz de la planta (Siqueira y Franco, 1988; Atlas y Bartha, 2002; Molina *et al.*, 2005).

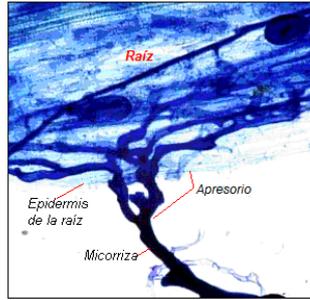
La simbiosis micorrícica parece iniciarse como un impulso de parasitismo de parte del hongo, pudiéndose establecer en cualquier período de la vida de las plantas, especialmente cuando las condiciones del medio no le son favorables y cuando las semillas tienen poco endospermo como en el caso de las orquídeas (Herrera y Ulloa, 1998).

Se establece un verdadero equilibrio biológico con el inicio de una simbiosis mutualista (Bonfante & Perotto, 1995; Herrera y Ulloa, 1998) cuando las hifas procedentes de una espora en germinación (Figura 1.1) forman el apresorio sobre la superficie de la raíz de la planta, e ingresan en los tejidos epidérmicos corticales (van Burren, Maldonado-Mendoza, Tribu, Blaylock & Harrison, 1999; Molina *et al.*, 2005), como se puede apreciar en la Figura 1.2.



Fotografía autoría de Gabriela Castillo, 2007. (Barra: 0,5 mm)

Figura 1.1 Fotografía de la espora de una MA (*Glomus claroideum*) en germinación.



Fuente: Wolfe, 2006.(Disponible en: [www.soilhealth.segs.uwa.edu.au/components/fungi](http://www.soilhealth.segs.uwa.edu.au/components/fungi)), modificado por Gabriela Castillo, 2008

Figura 1.2. Fotografía de la hifa de una micorriza formando el apresorio para ingresar a la raíz de una planta.

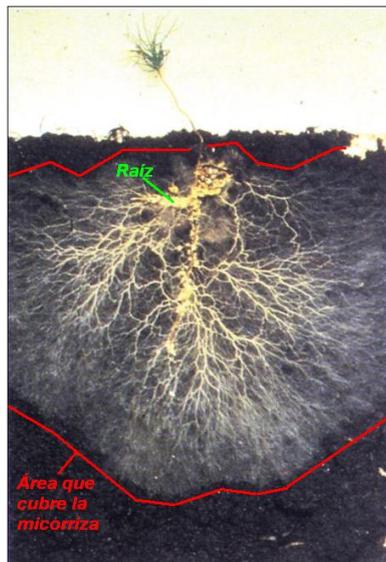
Ambas especies a pesar de ser poblaciones taxonómicamente diferentes, llegan a un beneficio común como resultado de su interacción y coexistencia (McNaughton & Wolf, 1984; Molina *et al.*, 2005).

La simbiosis permite que se de un movimiento bilateral, simultáneo, selectivo y polar de metabolitos entre el hongo y la planta. Las micorrizas reciben de la planta del 10 a 20% de la fotosíntesis neta y sus compuestos carbonados para la formación, mantenimiento y función de sus estructuras (Bonfante & Perotto, 1995; Herrera y Ulloa, 1998).

El hongo micorrícico influye positivamente en el “fitness” tanto de la planta, como de sí mismo (Varma & Hock, 1999), y aporta de manera determinante en la ecología de la rizósfera (Hatfield & Stewart, 1994), ya que son los únicos microorganismos que interactúan simultáneamente al interior y exterior de la misma (Atlas y Bartha, 2002).

La planta, gracias a la micorriza incrementa la absorción de nutrientes minerales e iones inorgánicos poco o nada móviles desde el suelo, que serían inaccesibles para ella de no ser por la acción del micelio del hongo (van Tuinen *et al.*, 1998) que forma agregados de suelo, permitiendo así que el área superficial efectiva de absorción de la raíz sea mayor (Sanders, Mosse & Tinker, 1975; Smith & Read, 1997; Ramos y Guadarrama, 2004; Molina *et al.*, 2005) tal como se puede observar en la Figura 1.3.

a)



Fuente: [www.nativeplantsalliance.net/](http://www.nativeplantsalliance.net/)

b)



Fotografía autoría de Gabriela Castillo, 2007. (Barra: 1 mm)

Figura 1.3. a) Raíz micorrizada de una planta, en la que se evidencia el incremento del área superficial efectiva de absorción; b) Agregados de suelo formados por la acción del micelio del hongo (Barra: 1mm).

Las micorrizas protegen a las plantas de diversos patógenos (Molina *et al.*, 2005) ya que tienen un comportamiento antagonista y/o competitivo con numerosos tipos de hongos, bacterias, protozoarios, nemátodos, insectos y otros artrópodos (Herrera y Ulloa, 1998).

También pueden incrementar el crecimiento de las raíces de la planta infectada, aumentar la tasa de fotosíntesis (Jakobsen & Rosendahl, 1990), la probabilidad de germinación de semillas (Killham, 1994), promover la absorción nutrientes del suelo como el fósforo y nitrógeno y proteger a la planta de varios tipos de estrés (Rodríguez, 1989; Rosendahl & Stukenbrock, 2004; Molina *et al.*, 2005), favoreciendo el crecimiento de la planta aun en suelo de baja fertilidad (Carlile *et al.*, 2005).

Se estima que las MA se encuentran aproximadamente en al menos el 95 a 97% de los ecosistemas y vegetales (Killham, 1994; Smith & Read, 1997; Rosendahl & Stukenbrock, 2004), y a pesar de que sólo se ha examinado aproximadamente el 3% de las raíces de las plantas terrestres, se cree que deben estar formando simbiosis en al menos el 80% de las especies de plantas vasculares (Smith & Read, 1997).

Hasta el momento, se conoce que más de 600 especies de hongos son capaces de establecer asociación micorrícica con casi 240000 especies de plantas incluyendo hierbas, arbustos, árboles y algunas briofitas y pteridofitas (Jakobsen & Rosendahl, 1990; Salisbury & Ross, 1994; Atlas y Bartha, 2002; Molina *et al.*, 2005). Aunque sólo aproximadamente 150 especies de MA han sido totalmente descritas (van der Heijden & Sanders, 2002).

Las micorrizas se han dividido en dos grandes grupos según la disposición de las hifas respecto a las células corticales de la planta (Sieverding, 1991):

***Micorrizas ectotróficas.***- el hongo forma un manto entorno a la raíz y generalmente no penetra en sus células, sino que se desarrolla entre las células corticales de la raíz (Harley & Smith, 1983).

***Micorrizas endotróficas.***- el hongo penetra en las células corticales de la planta hospedadora y no producen modificaciones morfológicas en ellas (Harley & Smith, 1983; Siqueira y Franco, 1988).

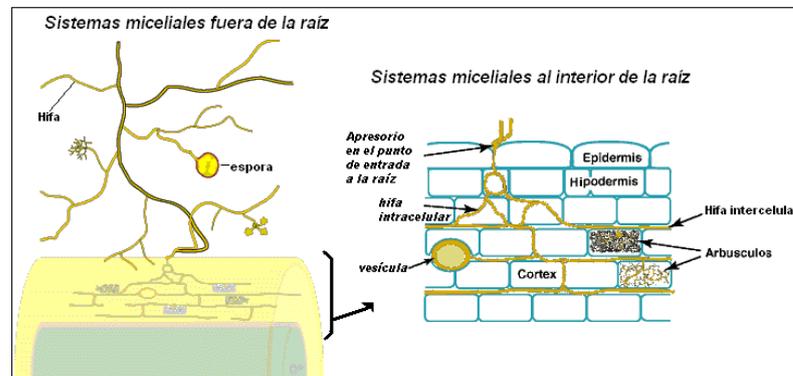
#### **1.4.2. Micorrizas vesículo arbusculares**

Las micorrizas vesículo arbusculares (MA) se encuentran dentro del grupo de las micorrizas endotróficas. Estas MA corresponden a asociaciones mutualistas (Atlas y Bartha, 2002) entre hongos del filum *Glomeromycota* (Hans, Hause, Strack & Walter, 2004; INVAM, 2008) y plantas de muy diversos grupos (Siqueira y Franco, 1988) como briofitas (musgos), pteridofitas (helechos), gimnospermas y angiospermas (Herrera y Ulloa, 1998; Atlas y Bartha, 2002).

Paleontólogos, mediante evidencias del registro fósil confirman además, que los MA generaron simbiosis con las plantas desde su apareamiento en el devónico para colonizar el medio terrestre (Simon *et al.*, 1993; Redecker *et al.*, 2000b; Rosendahl & Stukenbrock, 2004), y que participaron con ellas en su proceso de adaptación, incluso antes de que formaran raíces verdaderamente capaces de tomar los nutrientes del suelo (Atlas y Bartha, 2002)

Las MA son simbiontes obligados de las plantas y su crecimiento se produce en el interior de la raíz (Jacquot *et al.*, 2001). Se caracterizan porque durante su crecimiento no forman vaina y su cuerpo vegetativo se diferencia en largas hifas aseptadas permanentes o ramificadas. Se pueden encontrar vesículas inter e intracelulares en los tejidos de las raíces, mientras que los arbusculos se encuentran solamente al interior de la célula.

En una asociación MA existen dos sistemas miceliales, los externos en el suelo y los internos en la raíz (Figura 1.4.).

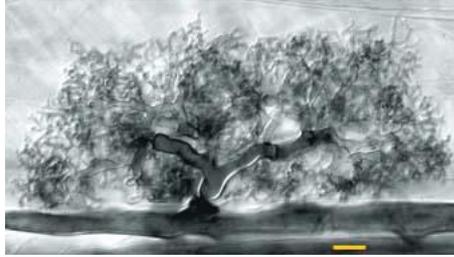


Fuente: Mark Brundrett, 1999; disponible en: <http://www.ffp.csiro.au/research/mycorrhiza-roles-value.gif>

Figura 1.4 Esquema de las estructuras propias de las micorrizas vesículo arbusculares, al interior y exterior de la raíz.

En conjunto el micelio, las hifas, vesículas y arbusculos permiten la transferencia de nutrientes entre el hongo y la planta (Harley & Smith, 1983; Herrera y Ulloa, 1998).

Las hifas toman diferentes denominaciones de acuerdo con las estructuras que originan. Así, cuando proliferan en las capas corticales intracelulares y forman haustorios ramificados dicotómicamente (Figura 1.5), se las llama arbusculos (Hans *et al.*, 2004; Molina *et al.*, 2005).



Fuente: Mark Brundrett, 1999; disponible en: [http://www.ffp\\_csiro.au/research-mycorrhiza-roles-value\\_gif.mht](http://www.ffp_csiro.au/research-mycorrhiza-roles-value_gif.mht)

Figura 1.5 Fotografía del arbúsculo de *Glomus mosseae* (barra: 10  $\mu\text{m}$ )

En cambio, si presentan hinchamientos terminales ya sea dentro o entre las células de la raíz de la planta, se denominan vesículas (Hans *et al.*, 2004; Molina *et al.*, 2005).

El conjunto de hifas externo constituye del 80 al 90% del hongo en el suelo (Friese & Allen, 1991) y toma el nombre de micelio. Es aparentemente más resistente incluso que la propia raíz de la planta a situaciones de estrés abiótico como sequía, bajas o altas temperaturas (Rodríguez, 1989; Jakobsen & Rosendahl, 1990), toxicidad por metales pesados y acidez del suelo (Turnau *et al.*, 2001; Atlas y Bartha, 2002).

Los arbúsculos funcionan como una interfase crucial (Hans *et al.*, 2004) para el intercambio de nutrientes minerales entre el hongo y la planta (Molina *et al.*, 2005). Son estructuras dinámicas que se desarrollan, maduran y degeneran en una sola célula de la raíz en un período de tiempo corto (7 a 10 días en algunos cereales), luego de lo cual sufren una desintegración total por digestión o lisis (Hans *et al.*, 2004). Las vesículas, son básicamente estructuras de almacenamiento que adquieren una pared celular gruesa y muchos glóbulos de grasa (Herrera y Ulloa, 1998).

Las esporas de los MA son estructuras multinucleadas (Redecker *et al.*, 2000a, Vandenkoornhuyse *et al.*, 2001) con variaciones entre los núcleos (Lanfranco *et al.*, 1995) y con diámetros de de aproximadamente 20 a 400  $\mu\text{m}$ . Son siempre asexuales y pueden organizarse en esporocarpos compactos (Burnett, 2003). Se caracterizan por su resistencia, capacidad de almacenar sustancias (Smith & Read, 1997) y porque, dependiendo de la familia o la especie a la que pertenezcan, sus motivos estructurales subcelulares de la pared superficial o interna son característicos (Atlas y Bartha, 2002).

Tanto las vesículas y esporas, como los arbusculos, son características muy especiales e importantes que han determinado la caracterización morfológica de este tipo de hongo. El estudio de las MA ha generado un interés en la comunidad científica a lo largo del tiempo, es por ello que se intenta definir con mayor precisión las relaciones entre grupos y poblaciones de individuos de las micorrizas.

Existen dos tendencias taxonómicas que se usan para identificar y agrupar a las micorrizas arbusculares. La primera se basa en la morfología, es decir, en las características físicas observables del hongo, ya sean estas cualitativas y/o cuantificables. Mientras que la segunda, la molecular, está basada en el análisis de secuencias nucleotídicas del DNA, que al amplificarse de manera discriminativa, permiten obtener información muy confiable con respecto a la relación parental que exista entre grupos o poblaciones micorrícicas.

#### **1.4.2.1 Taxonomía Morfológica de las Micorrizas Arbusculares**

Las características morfológicas, con sus respectivas variantes, se han usado tradicionalmente para describir la taxonomía de las MA. Los estudios poblacionales generalmente comparan estadísticamente entre sí a los caracteres cuantificables y descriptivos tales como la dimensión, color o estructura de esporas, hifas y micelio (Ruiz-Lozano *et al.*, 2002) para reconocer las diferentes especies de MA (Walker, 1986; Burnett, 2003).

La taxonomía morfológica en este tipo de hongo es complicada, ya que depende de la apreciación del investigador con respecto a sus características fenotípicas. Los factores como el pleomorfismo y la plasticidad fenotípica actúan sobre la diferenciación de la estructura del micelio, dificultando el reconocimiento del taxón fúngico y el comportamiento del hongo. Estas complicaciones se incrementan al momento de identificar las distintas fases de desarrollo de la micorriza en los diferentes entornos en los que habitan (Burnett, 2003; Duchicela, 2003).

Generalmente se emplean como referencia taxonómica a las estructuras reproductoras (esporas) debido a que su morfología y dimensiones se mantienen

relativamente constantes (Burnett, 2003; de la Providencia y Fernández, 2004). La tendencia taxonómica ha clasificado a las MA, como indica el Cuadro 1.1.

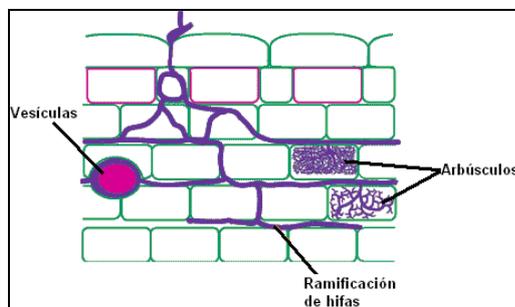
Cuadro 1.1 Clasificación de los hongos micorrízicos arbusculares de acuerdo a la taxonomía morfológica de sus esporas.

<i>Phylum</i>	<i>Clase</i>	<i>Orden</i>	<i>Familia</i>	<i>Género</i>
Glomeromycota	Glomeromycetes	Glomerales	Glomeraceae	Glomus Pacispora*
		Paraglomerales	Paraglomeraceae	Paraglomus
		Archaeosporales	Archaeosporaceae Geosiphonaceae	Archeospora Geosiphon
		Diversisporales	Acaulosporaceae Diversisporaceae Gigasporaceae	Acaulospora Entrophospora <i>G. spurcum</i> <i>G. versiforme</i> Gigaspora Scutellospora

Fuente: Schubler *et al.*, 2001, modificado Por Ohel *et al.*, 2004.

\* De acuerdo a Ohel *et al.*, 2004, el Género Pacispora se describe dentro de la Familia Glomeraceae, Orden Glomerales y clase Glomeromycetes.

El presente trabajo de investigación trabajó con la especie de micorriza arbuscular: *Glomus mosseae*. Algunas de las características que describen a su género como las hifas ramificadas a lo largo del córtex de la raíz con formaciones “H” de crecimiento bidireccional simultáneo. Arbúsculos intracelulares densos y compactos. Vesículas en o entre las células corticales de la raíz, ovales y de pared gruesa con varias capas, se encuentran esquematizadas en la Figura 1.6.



Fuente: Mark Brundrett, 1999; disponible en: [http://www.ffp\\_csiro\\_au-research-mycorrhiza-roles-value\\_gif.mht](http://www.ffp_csiro_au-research-mycorrhiza-roles-value_gif.mht)

Figura 1.6. Características morfológicas típicas de las especies *Glomus*.

#### 1.4.2.2 Taxonomía Molecular de las Micorrizas Arbusculares

Hasta el momento, mucha de la información genética disponible de MA y de sus características no son fáciles de detectar en campo y los marcadores naturales que se utilizaban para describirlas, se han ido sustituyendo paulatinamente por marcadores moleculares de varios tipos.

Se han desarrollado varias técnicas para estudios poblacionales de MA como:

Las moléculas específicas que se han empleado para caracterizar a géneros y familias de MA (García-Garrido *et al.*, 2000). Aunque su desventaja es que varios de los metabolitos producidos por MA se generan sólo bajo determinadas condiciones y aparecen esporádicamente, lo que impide su uso como marcadores poblacionales (Burnett, 2003).

Existe también un amplio rango de marcadores genéticos para MA que permitirán analizar la herencia a nivel molecular en los genes, sus productos y el efecto de sus mutaciones (Burnett, 2003) como los: RAPD (Random amplified polymorphic DNA) (Lanfranco *et al.*, 1995), SCARs (Sequence-characterized amplified regions) (Weber *et al.*, 2004), SSRs (Simple sequence repeats or microsatellites) y AFLP (Amplified fragment-length polymorphism) (Hollick *et al.*, 2004), que están basados en el manejo del DNA de MA mediante la técnica de la PCR (Polymerase Chain Reaction) y sus variantes. Tecnología que ha generado una mayor expectativa a nivel científico (van der Heidjen & Sanders, 2002), ya que permiten mediante la realización de ensayos rápidos y fáciles, obtener resultados confiables con alta reproducibilidad.

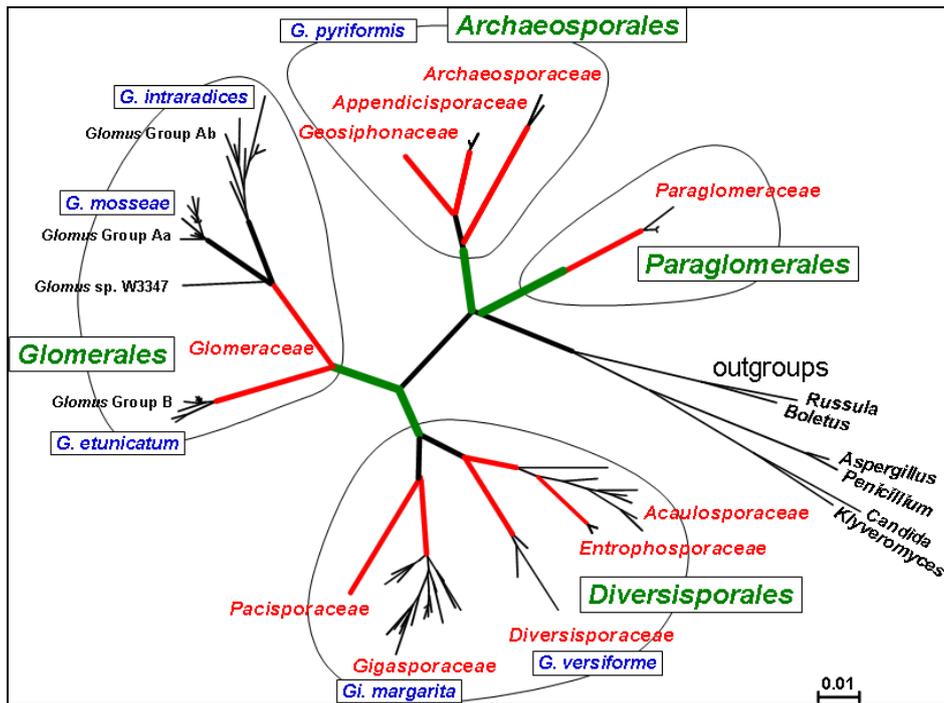
Es evidente entonces, que las evaluaciones poblacionales de MA que se lleven a cabo en un futuro estarán determinadas mayormente por marcadores genético-moleculares basados en la PCR. Ya que la información que se deriva de prácticas moleculares permite identificar las diferencias en el DNA de los individuos, sin la subjetividad de los criterios personales que se aplican en taxonomía morfológica (van der Heidjen & Sanders, 2002).

La PCR es una técnica muy versátil que mediante variaciones en la secuencia de los primers empleados, permite obtener la amplificación de diferentes secciones de un mismo DNA (van der Heidjen & Sanders, 2002). Por tanto, su especificidad se puede adaptar conforme a la naturaleza de la secuencia de DNA y al tipo de datos que se quiera obtener de los individuos en estudio (van Tuinen *et al.*, 1998; Burnett, 2003).

En MA los estudios taxonómicos de tipo molecular se encuentran en investigación, así como la redefinición del filum llevado a cabo por Schubler *et al.*, (2001) y Alarcón (2001). Dichos autores contrastan las evidencias morfológicas con los estudios moleculares de las secuencias nucleotídicas del DNA ribosomal de las MA, confirmando su pertenencia al filum *Glomeromycota*, y no al filum *Zygomycota* (Morton & Benny, 1990). Hipótesis que ha sido ratificada por estudios ecológicos para MA, como los realizados por González-Chávez (2003). Berbee y Taylor (2000), al igual que Redecker (2005) mencionan además que la familia Glomales es un grupo monofilético y que sus parientes más cercanos de acuerdo a estudios evolutivos son los Basidiomycota y Ascomycota.

Los datos obtenidos se han basado en las comparaciones de secuencias nucleotídicas del DNAr de MA (van Tuinen *et al.*, 1998; Jacquot *et al.*, 2001; de Souza *et al.*, 2004); evidenciando los índices que reflejan la cercanía o lejanía evolutiva, y la relación de parentesco entre una y otra especie MA. Por lo tanto es una de las tendencias más aceptadas y explotadas a nivel investigativo en las últimas décadas (Newton, 1995; Burnett, 2003).

En base a estas investigaciones y aunque todavía no se encuentran descritas, ni secuenciadas la totalidad de especies que abarca el filum *Glomeromycota*, se ha planteado su árbol filogenético (susceptible a actualizaciones) con base a 1762 estudios, 4796 árboles y 83151 taxas, como se muestra en la Figura 1.7.



Fuente: disponible en: [http://www.lrz-muenchen.de/~schuessler/amphylo/amphylo\\_taxonomy.html](http://www.lrz-muenchen.de/~schuessler/amphylo/amphylo_taxonomy.html)

Figura 1.7 Árbol filogenético de la taxonomía de los *Glomerycota*, basado en el análisis de secuencias SSU de DNAr; contiene los taxos recientemente incluidos (2007) y la nueva clasificación del orden de los Diversisporales (2004) (última revisión 15 de Julio de 2007)

En el esquema anterior, en contraste con el Cuadro 1.1. se puede observar que existe una discrepancia en cuanto a la ubicación taxonómica de *Pacispora*, ya que aquí la encontramos como una Familia (*Pacisporaceae*) dentro del orden *Diversisporales*, mientras en la descripción taxonómica realizada por Schüßler *et al.*, (2001), que está basada en morfología y que ha sido modificada por Ohel *et al.*, (2004), *Pacispora* constituye un género dentro en la Familia *Glomeraceae*. Varias controversias se van generando conforme se obtienen resultados con técnicas moleculares, por lo que ambas tendencias deberían contraponerse y discutir a nivel científico para llegar a un consenso.

En la presente investigación, el trabajo se centró en *Glomus mosseae* y sus cepas BEG 25 y 132, una especie dentro del orden *Glomerales* y de la Familia *Glomeraceae*, y que molecularmente, además, se la ha ubicado en el grupo “Aa” de los *Glomus*.

### 1.4.3 Caracterización molecular de las Micorrizas Vesículo Arbusculares

#### 1.4.3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para Micorrizas Vesículo Arbusculares

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, más conocida por sus siglas en inglés “PCR”, es una técnica molecular capaz de replicar *in vitro* DNA (Surzycki, 2000). Esta técnica, sumamente sensible (Van der Heidjen & Sanders, 2002), emplea primers o iniciadores (secuencias de oligonucleótidos complementarios al DNA molde) para copiar en pocas horas, específica y exponencialmente el material genético inicial (Newton, 1995; Burnett, 2003).

La PCR genera nuevas copias del DNA molde sometiéndolo a repetidos ciclos de incubación en una mezcla compuesta básicamente por la enzima DNA Polimerasa, nucleótidos y reactivos estabilizantes (Newton, 1995; Surzycki, 2000). Sin embargo, el desarrollo de la técnica es mucho más complejo, y cada uno de los componentes de la mezcla y de las fases de incubación tienen una función específica que cumplir:

Taq DNA polimerasa.- es la enzima más comúnmente usada para copiar DNA. Es capaz de procesar 60 nucleótidos/segundo a 70°C (Innis *et al.*, 1988) en un tiempo de vida media de 40 minutos a 95°C (Lawyer *et al.*, 1993). Su rendimiento y fidelidad se ve influenciada por pH, concentración de magnesio y de dNTPs (Eckert & Kunkel, 1991). Cantidades excesivas de dicha enzima provocan acción exonucleasa intrínseca del DNA (en sentido 5'→3'), mientras que sus bajos niveles disminuyen la eficiencia de amplificación (Longley *et al.*, 1990).

Cloruro de Magnesio (MgCl<sub>2</sub>).- es un cofactor de la enzima Taq DNA polimerasa. Su concentración en forma libre determina la capacidad de acción de la enzima, de modo que, su ausencia la inactiva y su exceso reduce la fidelidad de copiado (Eckert & Kunkel, 1991). La disponibilidad de MgCl<sub>2</sub> para la enzima varía dependiendo de los agentes quelantes, concentración de dNTPs y proteínas (Newton, 1995), provocando que se incremente la amplificación no específica (Williams, 1989).

dNTPs.- son los oligonucleótidos adenina, guanina, citosina y timina dispuestos en formas trifosfatadas y desoxidadas que la DNA polimerasa emplea como materia prima para replicar las secuencias del DNA molde (Newton, 1995).

Buffers para PCR.- son agentes tampón muy importantes que se emplean para regular el pH de la reacción en un rango entre 8.3-8.8, sin afectar la actividad y fidelidad de la DNA polimerasa. La base de la mayoría de buffers son Tris y Cloruro de Potasio (KCl). Este último componente permite aún en concentraciones modestas, incrementar en un 50 a 60% la actividad de la enzima polimerasa. Su concentración óptima es de 50mM (Gelfand & White, 1989; Newton, 1995).

Primers o iniciadores.- son secuencias cortas de oligonucleótidos (de 15 a 30 pares de bases) complementarios a la cadena del DNA molde. Los primers se unen al DNA para dar la señal de inicio de amplificación a la DNA polimerasa. Generalmente se los usa en pares, uno “forward” (que va en sentido 5'→3') y otro “reverse” (sentido 3'→5'). Las posiciones donde los primers se adhieran determinarán el tamaño del amplicón (producto de la amplificación). Los primers se deben diseñar para que tengan una proporción GC del 40 al 60% y especialmente sin regiones complementarias entre sí o estructuras secundarias que pudieran entorpecer su alineamiento con el DNA molde (Newton, 1995).

DNA molde.- es el DNA que servirá como plantilla para la amplificación durante la PCR, su calidad y cantidad determinan el éxito de la técnica de PCR (Newton, 1995). Su calidad está sujeta básicamente al método de extracción y purificación empleado (a más pureza mayor calidad), mientras que la cantidad de DNA inicial necesaria para una amplificación exitosa de PCR dependerá de la complejidad del DNA muestra. Generalmente reacciones con muy poco DNA molde pueden tener bajo rendimiento y las que lo contienen en exceso, en cambio, provoca amplificaciones no específicas (Burnett, 2003).

Otra parte fundamental de la técnica de la PCR la constituyen los ciclos de incubación empleados, los cuales disocian los productos del ciclo térmico previo para que todos los componentes reactivos queden disponibles para comenzar nuevamente una fase de síntesis de DNA (Surzycki, 2002).

Newton (2000) menciona que el número de ciclos que generalmente se aplica en una PCR va desde los 30 a los 60, y dentro de cada uno de ellos se presentan diferentes etapas:

- *Denaturación del DNA*, su función es la de separar la doble hélice de DNA mediante calentamiento a 94°C (entre 15 segundos y 2 minutos). Lo cual permite que las cadenas de nucleótidos estén disponibles para usarse como nuevo molde de replicación.
- *Annealing*, permite que los primers se asocien establemente con el DNA molde y entonces, se estimule la acción de la enzima Taq DNA polimerasa. Se obtiene reduciendo la temperatura en un rango entre los 30 y 60 °C (dependiendo de la temperatura de annealing calculada).
- *Extensión*, en esta etapa se genera la síntesis del nuevo DNA hacia el extremo 3' de cada primer al incrementar la temperatura alrededor de los 70 y 74°C.

Las tres etapas forman un solo ciclo de amplificación y pueden optimizarse de acuerdo a la combinación de DNA molde y a cada par de primers empleado. Generalmente luego de 20 a 40 ciclos de amplificación se puede analizar el tamaño de la sección de DNA amplificado y cuantificarlo (Promega Protocols and Applications Guide, 2006).

Los resultados de la técnica de la PCR pueden ser analizados en geles de agarosa por electroforesis, lo cual permite detectar fragmentos de DNA de distinto peso molecular. Los fragmentos se ubicarán en diferentes posiciones del gel formando bandas de un tamaño y peso molecular específico y característico (Newton, 2000), de modo que el patrón visual obtenido constituiría una guía base para identificar a las especies de MA en estudio.

La PCR y sus variantes han llegado a ser una de las herramientas disponibles más poderosas y predilectas para el análisis genético de MA (Burnett, 2003).

### 1.4.3.2 Nested PCR

La Nested PCR es una variante de la técnica molecular de la PCR, en la que se emplean primers anidados para amplificar una secuencia específica de DNA (Newton, 1995).

Es el método de mayor eficiencia de optimización en los casos donde el DNA molde se encuentra en números de copias extremadamente bajos y/o se requiere una absoluta especificidad de copia (Newton, 1995).

La versatilidad de la técnica ha permitido analizar, inclusive, secciones particulares del genoma nuclear de los MA, como los genes del RNA ribosomal (DNAr) (Rodríguez, 2004). La identificación basada en las secuencias del DNAr se debe a que éste se encuentra distribuido en el genoma en múltiples copias, las cuales contienen regiones génicas bastante conservadas y regiones intergénicas polimórficas, de las que es bastante factible diseñar primers que las amplifiquen (van Tuinen *et al.*, 1998; Burnett, 2003).

Durante la técnica de Nested PCR se realizan varias amplificaciones consecutivas del DNA. En una primera fase se amplifica una región bastante amplia del individuo en prueba, mientras que en las subsiguientes fases se utiliza el resultado de la amplificación previa como si fuera el DNA molde. Las parejas de primers utilizadas en las siguientes etapas de amplificación (su número depende de las necesidades de la investigación), se hibridan internamente en la secuencia del DNA obtenida inicialmente, generando un amplicón de menor tamaño. Por ello a la técnica y a sus primers se les denomina “Nested”, que en español quiere decir “anidada” (Newton, 2000).

Debido a que las parejas de primers nested tienen bastante homología entre sí, se incrementa considerablemente su sensibilidad y afinidad evitando que se reconozcan y amplifiquen otras secuencias diferentes a las de interés (Newton, 2000).

La presencia de metabolitos o DNA contaminantes en las muestras puede interferir degradando o fragmentando el DNA micorrízico, reduciendo su concentración y calidad final (van der Heidjen & Sanders, 2002; Burnett, 2003). La extracción de DNAr de micorrizas que se realiza de hifas y esporas del hongo recuperadas desde el

suelo o de las raíces de plantas colonizadas, impide que se obtengan ejemplares completamente estériles (Burnett, 2003).

Por este motivo la Nested PCR es la técnica molecular de mayor aplicación en MA (Rodríguez, 2004), ya que permite minimizar el efecto de contaminación en la muestra inicial y optimizar las pequeñas cantidades de DNAr inicial que se obtienen al emplear esporas o raíces colonizadas por estos hongos. Además, la repetición de la PCR con primers anidados restringe su selectividad hacia partes específicas del DNAr micorrícico, permitiendo generar resultados cien por ciento confiables y amplicones susceptibles de análisis.

Cualidades que han permitido que las aplicaciones de la Nested PCR sean muy amplias, que vayan desde investigaciones básicas hasta la identificación de especies, estudios genéticos, análisis taxonómicos o filogenéticos, clonaje de genes y estimaciones de diversidad genética (van Tunien *et al.*, 1998; Jacquot *et al.*, 2000; Redecker, 2000; Turnau *et al.*, 2001; Burnett, 2003; Rosendahl & Stukenbrock, 2004). Por lo cual la técnica molecular Nested PCR se podrá usar como una prueba para identificar a las micorrizas *Glomus mosseae* BEG 25 y BEG 132 objetivo de esta investigación.

#### **1.4.3.3 DNA ribosomal (DNAr) de Micorrizas Arbusculares**

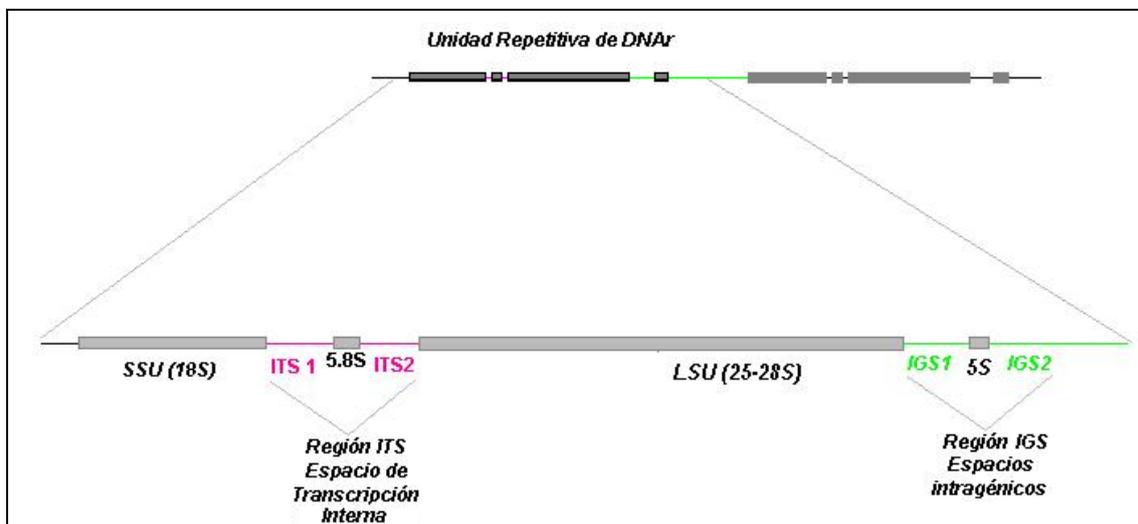
De acuerdo con Burnett (2002) y Rodríguez (2004) los genes codificantes para el RNA ribosomal (DNAr) y sus espacios intergénicos han sido ampliamente estudiados en MA debido a que son organismos haploides de esporas asexuales multinucleadas (entre 1000 y 5000 núcleos por espora) y multigenómicas, con diferentes genomas coexistiendo en un citoplasma común (Redecker *et al.*, 2000a; Hijri *et al.*, 2007).

La importancia de estudiar el DNAr viene dada por la organización conservada en el genoma de estos genes en todos los eucariotas, donde se encuentran en unidades repetidas una junta a la otra en el genoma (van der Heidjen & Sanders, 2002; Rodríguez *et al.*, 2004). El gran número de copias, (aproximadamente 90) de 8-12 Kb cada una, facilita la amplificación del DNAr (van Tuinen *et al.*, 1999) ya que al poseer regiones

muy conservadas (18S, 5.8S, 25-28S), el diseño de primers se facilita bastante (Bruns & Gardes, 1993).

Estudios con los genes del DNAr son muy informativos y representan una huella genómica para cada hongo ya que estas regiones conservadas están separadas por secuencias divergentes, muy variables, polimórficas en longitud y en secuencias, debido a deleciones e inserciones (Bruns & Gardes, 1993).

La estructura de cada unidad repetitiva del DNAr (Figura 1.8) la conforman espacios internos de transcripción ITS1 e ITS2, espacios intragénicos IGS y los genes de 18S, 5.8S, 25-28S y 5S (van Tuinen *et al.*, 1998; Burnett, 2003; Rodríguez, 2004).



Fuente: Esquema realizado por Gabriela Castillo, 2008. Basado en Jacquot *et al.*, 2000 y Rodríguez-Tovar *et al.*, 2004.

Figura 1.8 Esquema de una unidad repetitiva de DNAr de MA, constituida por : Subunidad Menor 18S (SSU), Región ITS, Subunidad mayor 25-28S (LSU) y Espacios Intragénicos (IGS).

La unidad repetitiva del DNAr tiene regiones codificantes para la transcripción de la subunidad ribosomal grande y pequeña, pero la posición de sus genes y su dirección de transcripción pueden variar de acuerdo al grupo de MA (Rodríguez, 2004).

Las variaciones de la secuencia del DNAr en MA son mucho más marcadas que en el resto de eucariotas, ya que las divergencias se presentan incluso entre individuos que se han originado a partir de un mismo cultivo o de una misma espora. Este

fenómeno ha despertado bastante inquietud en los científicos con respecto a la evolución molecular de MA y han planteado dos alternativas para explicarlo: el polimorfismo intranuclear o el polimorfismo inter nuclear (Burnett, 2002). Sin embargo, no existen estudios que aporten evidencia definitiva en el tema (van der Heidjen & Sanders, 2002).

Las regiones con secuencias más divergentes en los genes ribosomales son los espacios intergénicos IGS (IGS 1 y 2) e ITS (ITS1 e ITS2). El más frecuentemente empleado para la identificación de MA, es el ITS el cual tiene un tamaño entre 650 a 900pb (Rodríguez, 2004).

Simon y sus colaboradores (1993) han utilizado al gen ribosomal 18S del genoma de los Glomeromycota para estudios de filogenia y de paleontología. Con lo cual se fechó el origen de las MA hacia el período de las primeras plantas primitivas que colonizaron los continentes, hacia los 352 a 462 millones de años (Simon *et al.*, 1993; Redecker *et al.*, 2000b; Rosendahl & Stukenbrock, 2004).

Los primers diseñados para el gen 18S son efectivos para detectar hongos en las raíces de las plantas, pero su sensibilidad y especificidad se incrementa sólo cuando se los combinan con una técnica de enriquecimiento selectivo del DNA amplificado denominado SEAD, por sus siglas en inglés (Rodríguez, 2004).

Por otro lado, el gen ribosomal 25-28S se ha convertido en la región predilecta para estudios de identificación de MA, por ser una región polimórfica y porque su extremo 5' es bastante variable, lo que ha permitido obtener nuevas secuencias de MA más informativas (Rodríguez *et al.*, 2004). Es gracias a estas secuencias de MA que se pueden generar primers Nested con diferentes niveles de especificidad para distinguir entre especies de Glomales (van Tuinen *et al.*, 1998), como es el caso de los primers empleados durante la presente investigación.

### **1.5. Sistema de hipótesis**

Es posible estandarizar la técnica molecular de la Nested PCR para identificar micorrizas arbusculares de la especie *Glomus mosseae*, cepas BEG 25 y 132, en los laboratorios de Ingeniería en Biotecnología, Sangolquí-Ecuador.

## **CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS**

## **2.1. Participantes**

El presente trabajo está inmerso en las diferentes líneas de investigación sobre biología molecular que se desarrolla en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Escuela Politécnica del Ejército, a cargo de la Dra. Karina Proaño. Adicionalmente, se inserta en la línea de investigación de Diversidad Ecológica y Comportamiento Funcional de la Micorriza Arbuscular desarrollada en el Centro de Investigaciones Científicas – CEINCI, por la Ingeniera Jessica Duchicela.

## **2.2 Lugar de desarrollo de la Investigación y procedencia de las muestras**

El trabajo de investigación se desarrolló en los laboratorios de la Carrera de ingeniería en Biotecnología y en las instalaciones del Centro de Investigaciones Científicas CEINCI de la Escuela Politécnica del Ejército, localizados en Sangolquí, Av el Progreso s/n.

La micorriza *Glomus mosseae* BEG 132 proviene de suelos contaminados con arsénico y cobre, mientras que *Glomus mosseae* BEG 25 se originó de suelos no contaminados. Estas especies fueron aisladas en México y enviadas con fines de investigación por el Dept. Microbiología Ambiental del Colegio de Posgraduados, México (González-Chávez *et al.*, 2002).

## **2.3 Período de tiempo de investigación**

El presente proyecto de investigación realizó durante nueve meses, se inició en Mayo de 2007 y se finalizó en febrero de 2008.

## **2.4 Análisis de datos**

Los resultados de la estandarización de la Nested PCR se manejaron mediante una estadística descriptiva ensayo-error para las pruebas realizadas durante la segunda amplificación. Asumiéndose como resultado positivo la aparición de amplicones de 367

bp y como resultado negativo a la ausencia de amplicón. Se clasificó como “óptimas” a aquellas bandas de amplificación en las que la dupleta del mismo ensayo mostraba nitidez, intensidad y uniformidad.

## **2.5 Métodos**

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

#### **2.5.1.1 Extracción de esporas de *Glomus mosseae* a partir de sustrato micorrizado**

La extracción de esporas de MA se basó en la técnica de tamizado húmedo y decantación de Gerdermann y Nicholson (1963) citado por Herrera *et. al*, (2002). Para realizarla se recuperó con la ayuda de una cucharilla el equivalente a 3 gr. de sustrato del área cercana a las raíces de las plantas trampa, se lo colocó en un vaso de precipitación de 2000 ml lleno de agua destilada y se agitó con una varilla de vidrio para homogenizarlo. Luego se lo dejó reposar para que las partículas más pesadas cayeran al fondo del vaso. El sobrenadante, se trasvasó por tamices de 150 y 45 micrómetros montados el uno enseguida del otro para su filtración.

Las partículas recuperadas de los tamices se depositaron en cajas petri de 90 mm de diámetro con guía cuadrículada en la base, llenas de agua destilada. Se observó las muestras bajo el estereoscopio (Leica ZOOM 2000) y se extrajo con la ayuda de una micropipeta, las esporas de los hongos micorrícicos. Las esporas encontradas se limpiaron y se aislaron en cajas petri de 60 mm de diámetro con agua destilada y se almacenaron a 4°C hasta su posterior uso.

#### **2.5.1.2 Propagación de *Glomus mosseae* en Cultivos Monospóricos y Cultivos Trampa.**

### **Preparación del sustrato**

El sustrato utilizado para el crecimiento de las plantas trampa fue arena de río lavada repetidas veces con agua potable. Se ajustó su pH entre 5 y 6 manteniéndola en HCl 3N durante 1 hora y luego se la escurrió para autoclavarla en sacos de tela durante tres ciclos de una hora a 121°C y 15 PSI cada uno. Finalmente, el sustrato se secó a temperatura ambiente al interior del laboratorio en el saco sellado hasta su utilización.

### **Montaje de cultivos monospóricos**

El sustrato estéril fue distribuido en cajas petri, preparadas con anterioridad, conteniendo pequeños agujeros rectangulares a un lado de la tapa y en la base, para que por ellos salgan las partes aéreas de las plantas empleadas para el cultivo monospórico. Posteriormente, se colocó en cada caja petri de 1 a 3 semillas de la planta trampa elegida: cebolla (*Allium cepa*), alpiste (*Phalaris canariensis*), avena (*Avena sativa*) o arroz (*Oriza sativa*) y se la selló con cinta adhesiva por los extremos laterales.

Las cajas se dispusieron al azar en posición vertical sobre planchas de espuma flex en cámaras de crecimiento. Finalmente, cuando las semillas germinaron y la plántula desarrolló las primeras hojas verdaderas, se procedió a escoger las mejores plantas de cada tipo, para usar por lo menos 6 de ellas por cada cepa de *Glomus mosseae* en los cultivos monospóricos.

La inoculación de las plantas con cada una de las esporas de *Glomus mosseae*, se realizó bajo el estereoscopio. Se retiró la arena que cubría el sector medio de la raíz y se depositó, con la ayuda de una micropipeta (Labnet, BioPette autoclavable), una sola espora entre los pelos radiculares. La raíz fue cubierta nuevamente con arena y los datos correspondientes al tipo de espora, especie de planta trampa y fecha de realización se registraron en cada una de las cajas petri.

Las cajas recibieron riego con agua destilada (por el borde de la caja, sin topar la zona de inoculación) pasando un día, durante un mes. Transcurrido este tiempo, se disminuyó el riego a dos veces por semana y se podó las hojas secundarias de todas las

plantas, dejándolas con un alto de 9 cm desde su base (excepto para las cebollas que no se podaron). Esto con el objetivo de crear un estrés en las plantas que pudiera favorecer una micorrización más agresiva durante el mes siguiente en que se conservaron los cultivos monospóricos.

### **Montaje de cultivos trampa**

Para desarrollar los cultivos trampa se esperó aproximadamente dos meses para que las plantas de los cultivos monospóricos sean colonizadas por el hongo y formen una simbiosis micorrícica. Luego se las traspasó a macetas (15 cm de alto) completando su volumen con sustrato estéril, además se añadió nuevas semillas del mismo tipo de planta a la usada para seguir propagando al hongo.

Las macetas fueron rotuladas con la fecha de realización del cultivo monospórico (CM), la fecha del paso a maceta (PM), la especie y cepa de micorriza al que pertenecía, el nombre común de la planta trampa usada y la fecha de resiembra (FR).

El riego de las macetas se realizó con agua destilada pasando un día durante un mes. Luego, se podó la parte aérea de las plantas trampa a los 9 cm de su base y el riego se redujo a dos veces por semana. Estas condiciones se mantuvieron con el objetivo de provocar un estrés mecánico e hídrico que estimule la micorrización de los hospederos las siguientes cinco semanas.

#### **2.5.1.3 Tinción de raíces**

Para evaluar la colonización radicular de las plantas con *Glomus mosseae*, se empleó el procedimiento de tinción de raíces de Philips & Hayman (1960). Fragmentos de raíces de 1 cm de largo (previamente lavadas con agua) se sumergieron en una solución de hidróxido de potasio (KOH 10%,) durante 20 minutos en baño maría a 90°C. Se adicionó una solución de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%) durante 20 minutos si las raíces se mantenían todavía pigmentadas.

Posteriormente, a temperatura ambiente, se agregó una solución de ácido clorhídrico (HCl 1N) por 15 minutos. Se escurrió y añadió azul de tripano 0.05% en lactoglicerol (1:1 ácido láctico-glicerol) por 10 minutos en baño maría a 90°C. El excedente de colorante de las raicillas se retiró colocando las raíces en lactoglicerol durante una noche entera.

Finalmente, para visualizar las estructuras del hongo en el interior de la planta, se extendieron las raicillas teñidas sobre un portaobjetos y se las revisó bajo el microscopio (Labnet, BioPette autoclavable) en un aumento de 100X.

## **2.5.2 Análisis molecular de *Glomus mosseae***

### **2.5.2.1 Extracción y Cuantificación de DNA de esporas de *Glomus mosseae***

En primer lugar se escogió, bajo el estereoscopio, a las esporas de *Glomus mosseae* que estaban en mejor estado (completas y sin fisuras) para luego utilizarlas en la extracción de DNA. Se ensayó con 1, 3, 6 y 10 esporas para determinar el número mínimo con el que se podía obtener una buena amplificación en la técnica de la Nested PCR empleada posteriormente. Se consideró como límite superior a diez esporas, debido a que el incremento de tiempo empleado en aislar un mayor número de esporas podría perjudicar el procedimiento seguido.

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).

En un microtubo de 1,5 ml con 10 µl agua destilada se molió las esporas con la ayuda de un micropistilo o una pipeta Pasteur de vidrio. Se añadió 30 µl de TrisHCl 100 mM (pH 8) y 10 µl de Chelex-100 (BioRad) al 20% y se vorteo la suspensión. Se calentó el microtubo a 95°C durante 5 minutos y luego se enfrió en hielo. La suspensión se centrifugó durante 1 minuto y se desechó el pellet. El sobrenadante obtenido, con los ácidos nucleicos de las esporas se utilizó en la amplificación de Nested PCR o se almacenó a -20°C.

A este procedimiento se le realizaron ciertas modificaciones, como la temperatura a la cual se añadían las soluciones de TrisHCl (100mM) y Chelex-100 (20%), las cuales se ensayaron a 4°C y a temperatura ambiente. Se varió además, el tiempo de incubación de la suspensión en el calor entre 10, 9, 8, 7, 6 y 5 minutos; el tiempo de sometimiento al frío entre 1, 2, 3 y 4 minutos y la centrifugación se realizó a 10000 rpm durante 1, 2 y 3 minutos.

La cuantificación del DNA obtenido se realizó especialmente mediante fluorometría, aunque también se probó con *low DNA mass ladder* y espectroscopía.

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

Con el objeto de comprobar el grado de polimorfismo existente entre las regiones que codifican para la subunidad grande del ribosoma de *Glomus mosseae* BEG25(GM25) y *Glomus mosseae* BEG132 (GM132), cepas empleadas en esta investigación, se realizó la comparación entre las secuencias nucleotídicas de catorce clones de esta especie, mediante el programa Clustawl del Biology Work Bench, de San Diego Supercomputer Center (SDSC) en línea (<http://workbench.sdsc.edu/>). Los números de acceso de los clones comparados están detallados en la Tabla 2.1 y se encuentran disponibles en internet en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Tabla 2.1 Secuencias nucleotídicas de *Glomus mosseae*, por autor, año y número de acceso de la secuencia en NCBI (Internet).

<i>Número de acceso NCBI</i>	<i>Autor, año</i>
AF304983	Clapp <i>et al.</i> , 2001
AF304985	Clapp <i>et al.</i> , 2001
AF304986	Clapp <i>et al.</i> , 2001
AF304987	Clapp <i>et al.</i> , 2001
AF304988	Clapp <i>et al.</i> , 2001
AF304989	Clapp <i>et al.</i> , 2001
AF304990	Clapp <i>et al.</i> , 2001
AF304991	Clapp <i>et al.</i> , 2001
AF304993	Clapp <i>et al.</i> , 2001
AF304994	Clapp <i>et al.</i> , 2001
Y07656	Van Tuinen <i>et al.</i> , 1998
AF145735	Kjoller & Rosendahl, 2000
AJ271924	Turnau <i>et al.</i> , 2001
DQ273793	James & Vilgalys, 2005

En las secuencias nucleotídicas de *Glomus mosseae* comparadas, se realizó además la búsqueda de los sitios en que los primers diseñados por van Tuinen *et al.*, (1998) NDL22, LR1 y 5.21, se hibridaban. Para lo cual se empleó el programa Fast PCR, disponible en la red (<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/download.htm>).

Una vez que se comprobó que los primers eran complementarios a todas las secuencias nucleotídicas analizadas, se dispuso su síntesis para utilizarlos en el desarrollo de la presente investigación.

### **2.5.2.3 Nested PCR para *Glomus mosseae* BEG 25 y BEG 132.**

La Nested PCR se realizó empleando como metodología de referencia a van Tuinen *et al.*, 1998, tanto en las concentraciones de reactivos usadas como para las condiciones del programa de amplificación. Este protocolo de la técnica se optimizó y estandarizó en base a las condiciones del laboratorio de Ingeniería en Biotecnología y a las características de GM25 y GM132 de la presente tesis, tal como se describe a continuación.

#### *Etapas de la Nested PCR*

Algunos trabajos de investigación (Jacquot *et al.*, 2001; van Tuinen *et al.*, 1998; Turnau *et al.*, 2001) consideraron tres fases consecutivas de amplificación, cada una con parejas de primers diferentes con distintos grados de especificidad. Sin embargo, la primera variación que se realizó para optimizar la Nested PCR fue reducir el número de etapas de amplificación a sólo dos, con el objeto de reducir el costo y el tiempo que demanda esta técnica.

### Primers empleados

Para identificar a GM 25 y GM 132 se realizó la Nested PCR en dos etapas de amplificación y se emplearon dos parejas distintas de primers. Durante la primera amplificación se usaron los primers: NDL22 y LR1 (van Tuinen *et al.*, 1998) los cuales son primers universales para eucariotas. Mientras que para la segunda etapa se aplicó la combinación de NDL22 con 5.21 (van Tuinen *et al.*, 1998), siendo éste último el que determina la especificidad para la especie de *Glomus mosseae*. Todos estos primers fueron sintetizados por la casa comercial Invitrogen. La secuencia y características de los primers se encuentran detalladas en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Primers utilizados durante la amplificación con Nested PCR para GM 25 y GM 132. Se indica la etapa de la Nested PCR, nombre, tamaño, secuencia, autores, característica y tamaño del amplicón (en pares de bases, pb).

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

### Programa de amplificación

Las condiciones del programa de amplificación de Nested PCR de van Tuinen *et al.*, (1998) fueron: un ciclo de denaturación inicial a 95°C (3 min), annealing de 58°C (1 min), extensión a 72°C (1 min), seguido de 35 ciclos de denaturación a 93°C (1 min), annealing a 58°C (1 min) y extensión a 72°C (1 min). El último ciclo lo compuso una extensión final de 5 minutos.

El programa inicial de amplificación de Nested PCR para GM25 y GM132 aplicado en el termociclador (Techne TC-512) en la presente investigación, se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita previamente. Aunque se varió la temperatura de annealing a 60°C y se redujo el número de ciclos de amplificación a 30. Todas estas especificaciones del programa de la Nested PCR se encuentran descritas en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3 Programa de amplificación aplicado en el termociclador (Techne TC-512) para la Nested PCR.

<i>Ciclo</i>	<i>Proceso</i>	<i>(°C)/(min)</i>
<i>1er Ciclo</i>	Denaturación inicial	95/3
	Annealing	60/1
	Extensión	72/1
<i>30 Ciclos</i>	Denaturación	93/1
	Annealing	60/1
	Extensión	72/1
<i>Ultimo ciclo</i>	Extensión final	72/5

### *Gradientes de Temperatura de Annealing*

Para conocer el rango de temperatura en que los primers se podían hibridar con el DNAr de *Glomus mosseae*, se determinó la temperatura de Annealing. Se utilizó el programa Fast PCR para calcular este rango de temperaturas en cada pareja de primers (Tabla 2.4) las cuales se encontraron entre los 58 hasta aproximadamente 64°C.

Tabla 2.4 Rango de temperaturas de annealing ( $T_a$ ) calculadas en Fast PCR para cada pareja de primers.

<i>Primer</i>	<i>Ta (°C)</i>
NDL22-LR1	58-63
NDL22-5.21	58,9-63,9

En base a los valores obtenidos para la *Ta*, se realizó en el termociclador una programación con gradientes de temperatura de annealing, los cuales fueron desde los 58 hasta los 62°C, con intervalos de un grado centígrado, tanto para la primera como la segunda etapa de la Nested PCR.

### Concentración de reactivos

La concentración de los reactivos que se usaron para la amplificación fueron las descritas por van Tuinen *et al.*, 1998 con ciertas modificaciones (Tabla 2.5), que fueron adecuadas desde a las condiciones económicas del proyecto y a las características de amplificación aplicadas generalmente en el Laboratorio de Ingeniería en Biotecnología .

Tabla 2.5 Concentración inicial de los reactivos empleados en la amplificación de *Glomus mosseae* por Nested PCR.

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

Así por ejemplo, la concentración de TrisHCl (pH 9) y de primers que este autor recomienda en 10 mM y 500nM, se redujeron a 20mM y 30 pM, respectivamente. Mientras que las 2 U/100 μl de Taq polimerasa del mencionado protocolo se disminuyeron a 1 U/100 μl.

Las concentraciones de KCl, MgCl<sub>2</sub> y dNTP se mantuvieron en el mismo valor que lo sugerido por van Tuinen *et al.*, (1998), es decir a 50 mM; 1,5 mM y 200 mM, respectivamente. Al igual que el volumen de DNA añadido para la primera amplificación, que fue de 5 μl.

En la metodología de referencia se menciona que se empleó 0,1 % de Triton X-100 y 0,2 mg/ ml BSA; sin embargo, durante este trabajo investigativo no se empleó en la reacción de amplificación ninguno de estos coadyuvantes de PCR. Tampoco se cubrió a cada reacción con aceite mineral, puesto que la tecnología del termociclador (Techne TC-512) y los tubos de PCR que se usaron durante la presente tesis garantizaban que no existiera evaporación de la muestra.

Cabe recalcar que en todos los casos, durante la primera etapa de la Nested PCR se usaron 5 µl de DNA molde, mientras que en la segunda, se usaron 5 µl de una dilución 1:500 de la primera PCR. El volumen final de la reacción se completó siempre a 25 µl.

#### Concentración de Cloruro de Magnesio

En la presente investigación se trabajó con ensayos variando la concentración de Cloruro de Magnesio, entre los 1,5 y 3 mM, para cada cepa de GM con intervalos de 0,5 mM. Debido que este reactivo es un cofactor de la enzima Taq DNA polimerasa, que influye directamente sobre su especificidad de amplificación.

Además se ensayó con las diferentes concentraciones de Cloruro de Magnesio a diferentes temperaturas, entre 58 y 62°C con intervalos de un grado centígrado.

#### **2.5.2.4 Visualización de los productos de amplificación de DNA por electroforesis**

Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (Invitrogen) al 2% con 0,5 µl de bromuro de etidio/10 ml de buffer TBE 1X (Tris Base 0.45M, EDTA 10mM). En cada ensayo se cargó y corrió las muestras con un control negativo y un marcador molecular de 100bp y/o 1 Kb. Para visualizar el resultado se empleó un transiluminador de cámara fotográfica (BioDoc-It System, UVP) con luz ultravioleta a 498nm.

### **CAPÍTULO 3: RESULTADOS**

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

#### **3.1.1 Cultivos monospóricos y Cultivos Trampa**

Para propagar cada cepa de GM se realizaron seis cultivos monospóricos por cada especie de planta huésped. Las plantas usadas para establecer la simbiosis micorrícica fueron: avena, arroz, cebolla y alpiste.

Los cultivos monospóricos se mantuvieron por dos meses. Durante este tiempo algunos de ellos fueron víctimas de varias plagas, así que las plantas infectadas se aislaron y luego se desecharon.

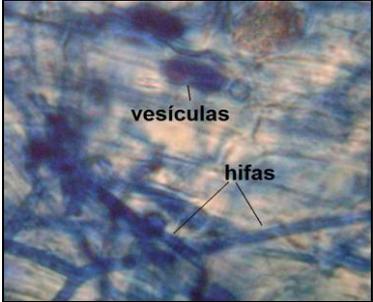
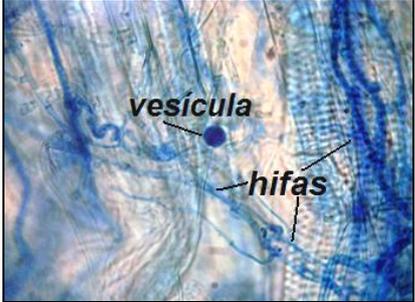
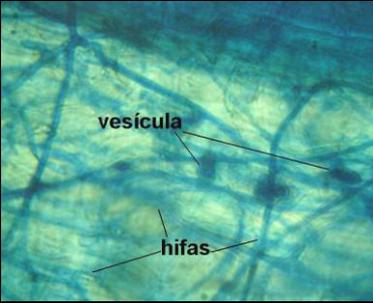
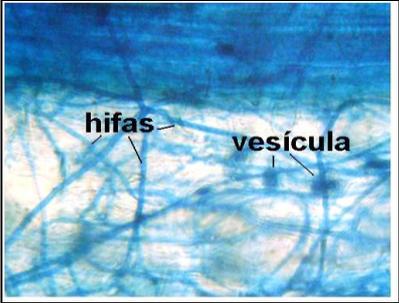
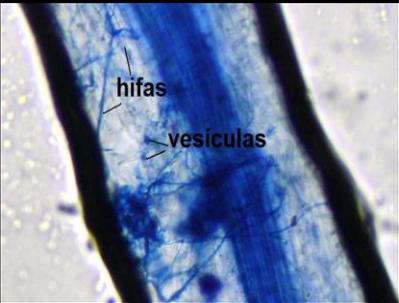
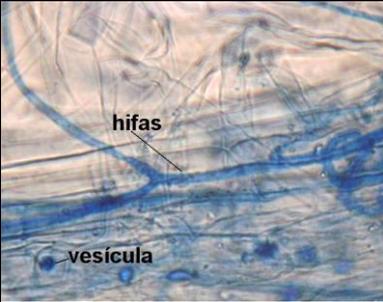
Sólo los cultivos monospóricos que sobrevivieron a cualquier infección se convirtieron en cultivos trampa. Situación que determinó que el número de cultivos trampa obtenido disminuya en relación al número de cultivos monospóricos del que se partió.

Las diferentes cepas de GM tuvieron un comportamiento diferente con respecto a los tipos de plantas. En GM 132, la planta con un mejor resultado fue la avena con 6 cultivos trampa, seguida muy de cerca por la cebolla y el alpiste con 5 cultivos trampa cada una. Mientras que para GM 25 los resultados fueron heterogéneos obteniéndose en cebolla 6 cultivos trampa, en avena 5 plantas, en alpiste 3 y en arroz 1 cultivo trampa. Las plantas de arroz no sobrevivieron debido a problemas con hongos de humedad.

#### **3.1.2 Tinción de raíces colonizadas con *Glomus mosseae***

Luego de realizar un muestreo de las raíces de los cultivos trampa de GM25 y GM132 y de teñirlas, se comprobó que existió la colonización de las plantas con el hongo ya que se pudo observar estructuras típicas de la simbiosis como hifas y vesículas al interior de las raíces. Lo cual se puede apreciar en la Figura 3.1.

Figura 3.1 Fotografías de las raíces colonizadas por GM25 y GM132 en plantas trampa de avena, alpiste, cebolla y arroz (aumento: 40X).

Cepa de <i>Glomus mosseae</i>		
<i>Especie de Planta Trampa</i>	<i>GM25</i>	<i>GM132</i>
<i>Avena</i>	 <p>vesículas</p> <p>hifas</p>	 <p>vesícula</p> <p>hifas</p>
<i>Alpiste</i>	 <p>vesícula</p> <p>hifas</p>	 <p>hifas</p> <p>vesícula</p>
<i>Cebolla</i>	 <p>vesículas</p> <p>hifas</p>	 <p>hifas</p> <p>vesículas</p>
<i>Arroz</i>	 <p>hifas</p> <p>vesícula</p>	No existieron supervivientes

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

La micorrización de las raíces fue evidente, ya que se observaron en las diferentes plantas trampa numerosas redes de hifas y cantidades apreciables de vesículas. Excepto para la única planta de arroz sobreviviente, la cual presentó una colonización con GM25 tenue en relación a los resultados obtenidos en las otras especies de plantas empleadas.

Vale la pena aclarar que no se evaluó el índice de colonización total del hongo en cada raíz, ya que mediante la tinción de raíces la presente investigación sólo pretendió comprobar si el manejo proporcionado a las plantas trampa provocó el efecto de micorrización deseado. Se comprobó únicamente si la simbiosis MA-planta se había establecido, puesto que sólo así el hongo podía formar esporas; mismas que fueron de gran interés, ya que conformaron la materia prima de la cual se extrajo el DNAr.

### **3.4 Análisis molecular de *Glomus mosseae***

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

En la extracción de DNA a partir de GM25 y GM132 se llegó a determinar que el número mínimo de esporas necesario para ser usado en la extracción de DNA fue diez. Se verificó que con cantidades inferiores de esporas no se podía evidenciar amplificación alguna.

Se consiguieron mejores resultados en la extracción de DNA cuando se limpiaron las esporas mediante un raspado superficial con agujas de insulina, se lavaron por dos ocasiones con agua destilada estéril y luego se las dispuso dentro de un microtubo de 1,5 ml con 10 µl agua PCR (GIBCO) estéril.

Si bien las concentraciones y volúmenes de TrisHCl (Invitrogen) y Chelex100 (Biorad) se mantuvieron iguales a las propuestas inicialmente, se advirtió que cuando se las agregaba a 4°C y se vorteaban (Labnet VX100) durante 1 minuto a alta velocidad, el DNA extraído tenía una mayor calidad. De igual modo ocurrió cuando el “shock térmico” se realizó a 92,5°C en baño maría por 7 minutos y el enfriamiento se realizaba en hielo por 2 minutos.

Se observó además que luego de centrifugar (Mini Spin Plus, Eppendorf) la suspensión por 2 minutos a 10000rpm, se obtuvo un pellet más compacto que permitía recuperar con mayor facilidad el sobrenadante que contenía el DNAr de GM25 y GM132.

Una condición crucial para que el DNA recuperado tuviera luego un mayor éxito durante la amplificación con Nested PCR, fue usarlo inmediatamente después de su extracción, ya que el material genético tendía a degradarse a medida que transcurría el tiempo aún almacenado a -20°C. Esta condición se volvía incluso más crítica cuando el DNA se congelaba y descongelaba más de una vez.

### **3.2.2 Comparación de secuencias de DNA de *Glomus mosseae***

Luego de realizar mediante el programa Fast PCR el análisis de complementariedad entre los primers: NDL22, LR1 y 5.21 (van Tuinen *et al.*, 1998) con la secuencia nucleotídica de la subunidad mayor del ribosoma (LSU) de *Glomus mosseae* (DQ273793, Anexo 1), se pudo distinguir claramente cómo es que los primers actuaron de forma “anidada” para amplificar el DNA.

La pareja de primers NDL22 y LR1 que se empleó en la primera PCR, hibrida y amplifica una región extensa de la secuencia nucleotídica del DNAr, dentro de la cual luego se hibrida la pareja de primers NDL22 y 5.21 (Figura 3.2). Esta última pareja determina la amplificación de 367bp específica para la especie *Glomus mosseae*, que es la que permitió identificar molecularmente a GM25 y GM132.

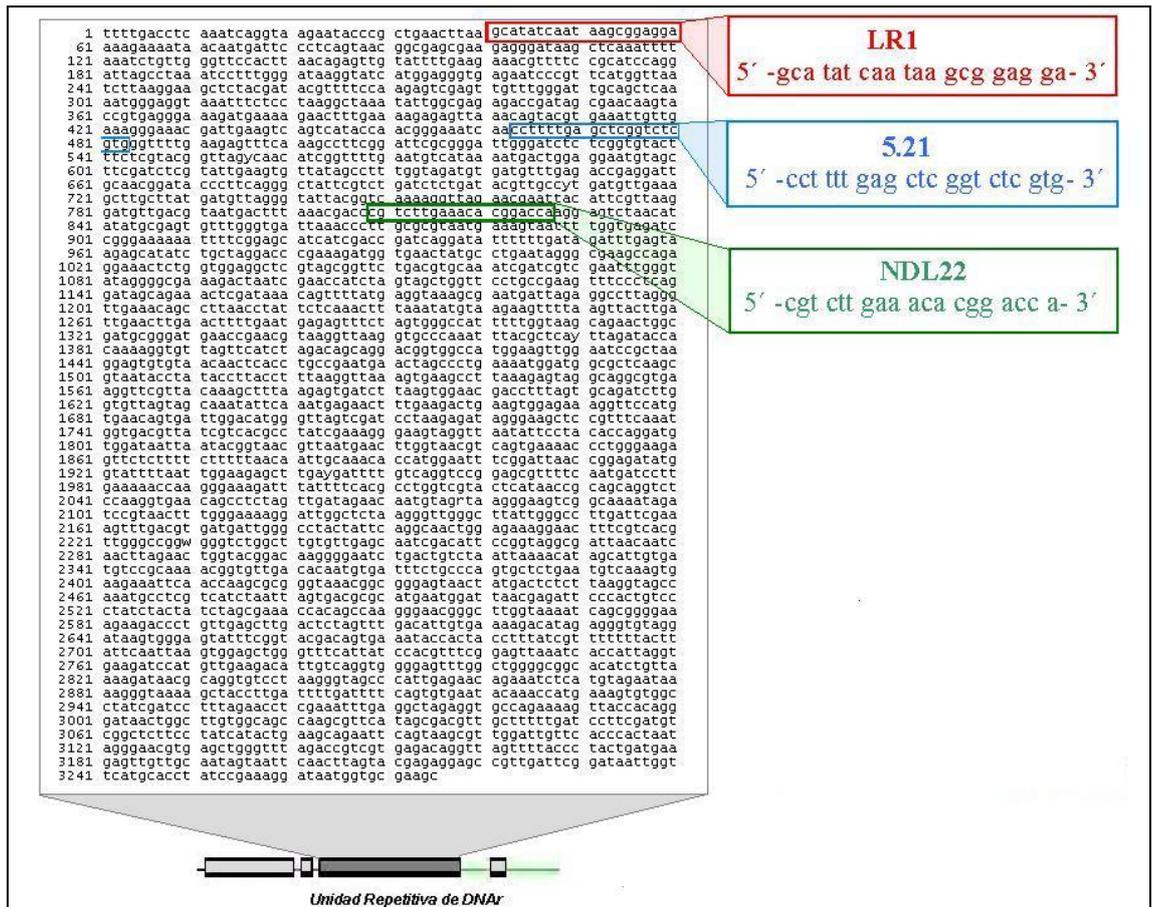


Diagrama realizado por Gabriela Castillo, 2008. En base a la secuencia nucleotídica del LSU para GM en DQ273793 y a los primers diseñados para GM por van Tuinen *et al.*, (1998).

Figura 3.2 Secuencia del DNAr de LSU de *Glomus mosseae* y regiones a las que los primers NDL22, LR1 y 5.21 se hibridan.

Finalmente se realizó una comparación entre algunas de las secuencias de DNAr del LSU disponibles en la red (en NCBI) de varios clones de *Glomus mosseae* (AF304985, AF304986, AF304987, AF304988, AF304989, AF304990, AF304991, AF304993, AF304994, Y07656, AF145735, AJ271924, DQ273793) mediante el programa Clustalw (de SDSC) (Figura 3.3), el cual permitió comprobar que el primer 5.21 hibridaba con todas las secuencias usadas como referencia, y que por tanto existía una probabilidad bastante alta de que este primer también se hibridara con el DNA de GM 25 y GM132.



Diagrama realizado por Gabriela Castillo, 2008. En base a la secuencia de clones de GM y a la secuencia del primer 5.21 (van Tuinen *et al.*, 1998).

Figura 3.3 Comparación entre las secuencias de diferentes clones (NCBI) de *Glomus mosseae*.

Dentro del recuadro de la figura se puede encontrar resaltada a la región en que el primer 5.21, específico de la especie *Glomus mosseae* se hibrida. Los nucleótidos en azul muestran las regiones en que las bases nucleotídicas están conservadas, es decir donde son iguales para todas las secuencias. Mientras que las bases de color negro indican las posiciones donde hay algún tipo de polimorfismo. En este caso en concreto, se puede apreciar que cerca de la mitad de la región en que el primer hibrida para las secuencias de los clones de GM comparados, existen dos posiciones en las que se presentan sustituciones de bases nucleotídicas.

### 3.2.3 Optimización de la técnica molecular Nested PCR para amplificación de DNAr de *Glomus mosseae*

#### *Optimización de las etapas de Nested PCR*

Se optimizó la Nested PCR a sólo dos etapas de amplificación, usando dos parejas de primers seleccionados específicamente para que pudieran identificar a GM25

y GM132. Generando mediante la presente investigación, un diseño propio de la técnica que permitió reducir el costo y el tiempo necesario para realizarla.

La pareja de primers empleados durante el desarrollo de la Nested PCR fue la propuesta en materiales y métodos, es decir que para la primera etapa de amplificación se usó a NDL22 en combinación con LR1; y en la segunda etapa a NDL22 con 5.21. A este último se lo escogió de entre tres candidatos, por ser el que se hibridaba en todas las secuencias de DNA de los clones de GM comparados.

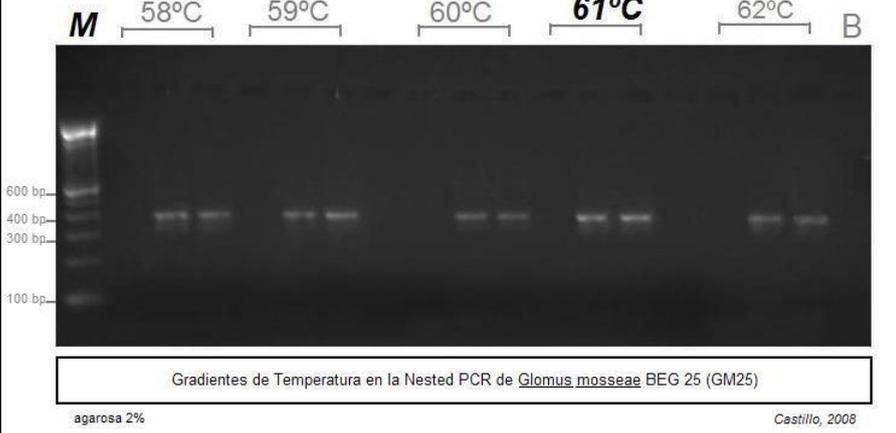
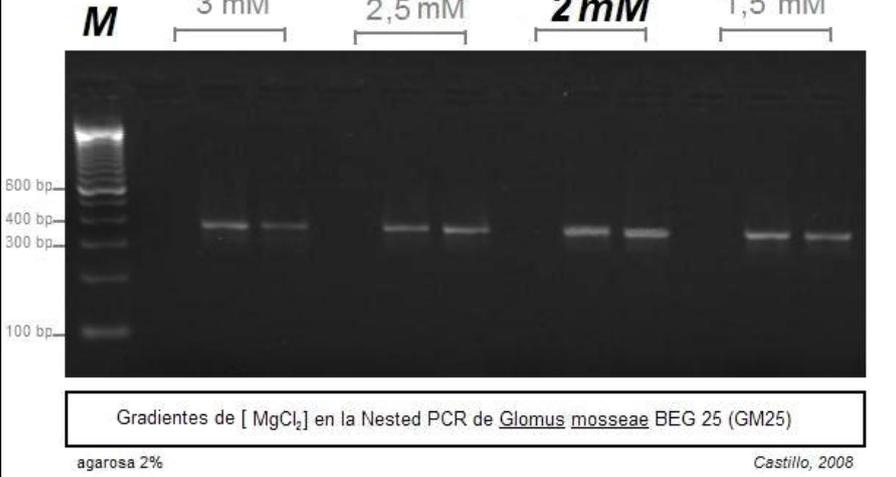
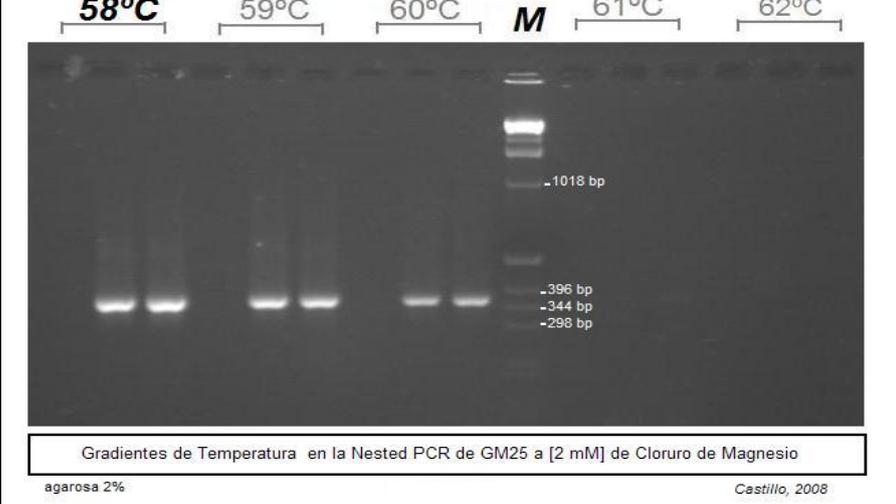
### ***Gradientes de Temperatura de Annealing y Concentración de Cloruro de Magnesio***

Para la estandarización de la técnica de Nested PCR en cada cepa de *Glomus mosseae*, fue necesario realizar ensayos de gradientes de temperatura de annealing, de concentración de cloruro de magnesio y de ambos parámetros simultáneamente.

En el caso de GM25, de los rangos ensayados para temperatura de annealing entre 58 y 62 °C con intervalos de un grado centígrado, los mejores resultados obtenidos se evidenciaron a 61 °C. A esta temperatura se visualizó bandas de amplificación bastante claras.

En los gradientes de concentración de cloruro de magnesio, donde este parámetro se varió entre 1,5 y 3 mM con intervalos de 0,5 mM se comprobó que con 2 mM la amplificación daba buenos resultados. Mientras que al analizar simultáneamente la concentración de cloruro de magnesio con temperaturas de annealing, ya que sus resultados se ven afectados en conjunto, las bandas de amplificación de 367 bp de mejor calidad, intensidad, uniformidad y nitidez se obtuvieron a 58 °C y 2 mM de cloruro de magnesio. Todos estos resultados se pueden observar en la Figura 3.4, donde los valores resaltados en color negro corresponden a la condición en que se observó una mejor calidad en el producto de amplificación.

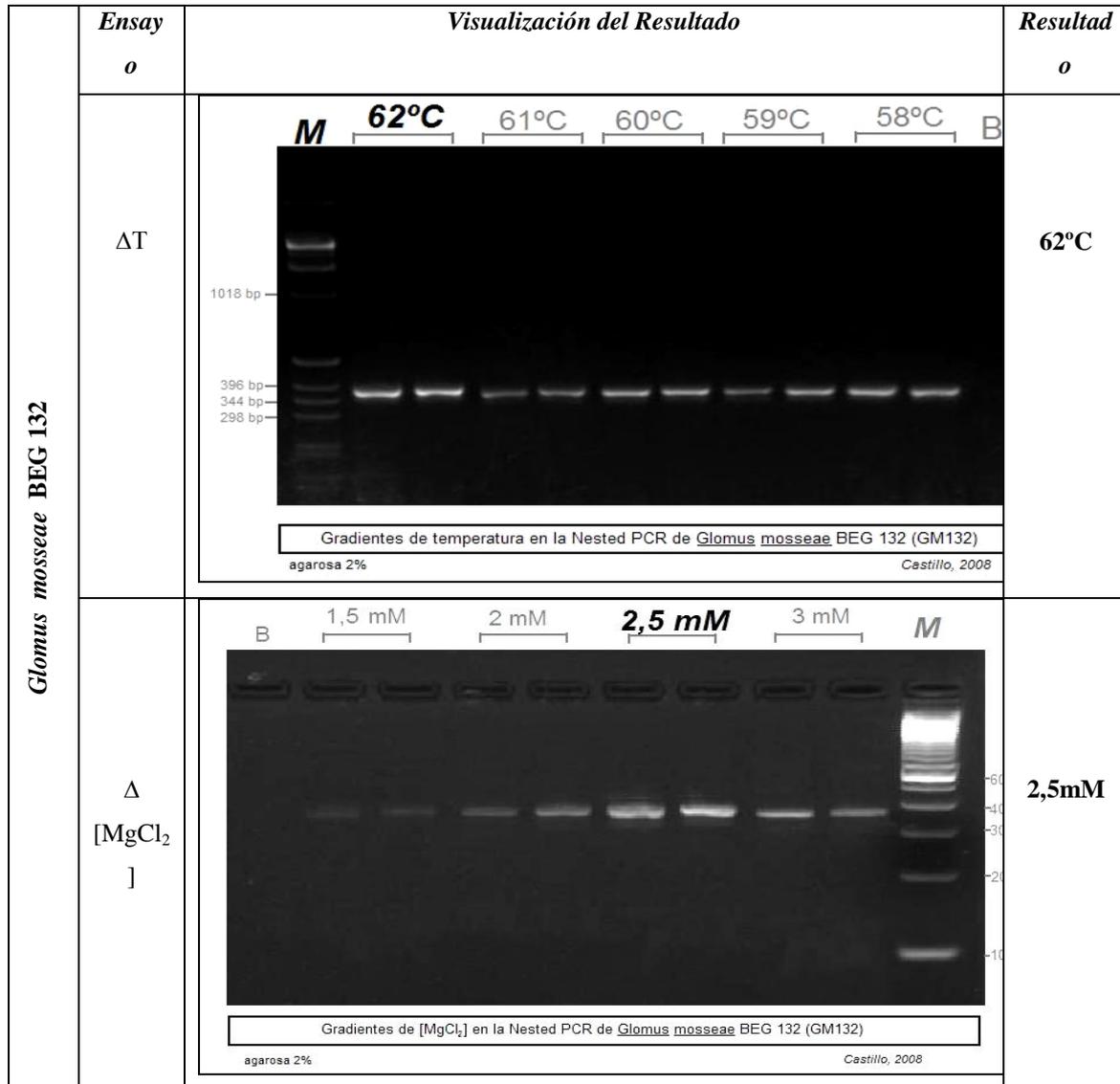
Figura 3.4 Ensayos de estandarización de Temperatura de annealing y Concentración de  $MgCl_2$  en la Nested PCR para GM25.  $\Delta T$  = variación de temperatura de annealing;  $\Delta [MgCl_2]$  = variación de la concentración de Cloruro de magnesio,  $\Delta [MgCl_2] + \Delta T$  = variación simultánea de concentración de cloruro de magnesio y de temperatura de annealing.

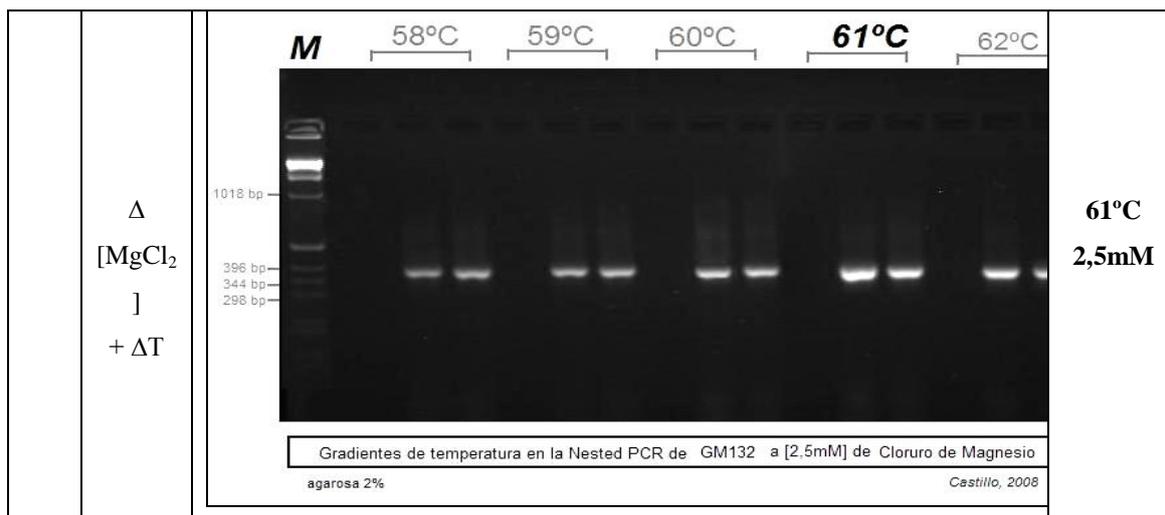
	<i>Ensayo</i>	<i>Visualización del Resultado</i>	<i>Resultado</i>
<i>Glomus mosseae</i> BEG 25	$\Delta T$		<b>61°C</b>
	$\Delta [MgCl_2]$		<b>2mM</b>
	$\Delta [MgCl_2] + \Delta T$		<b>58°C 2mM</b>

En GM132 se usaron los mismos rangos en los gradientes de temperatura de annealing, concentración de cloruro de magnesio y de ambas condiciones juntas, que los descritos para GM25. Aunque los resultados variaron sustancialmente.

Para el ensayo en temperatura de annealing se advirtió una banda de amplificación bastante clara a los 62°C. En las variaciones de concentración de Cloruro de magnesio en cambio se observó que el amplicón a los 2,5mM era el más intenso. Mientras que en la prueba simultánea de ambas condiciones, temperatura de annealing y concentración de cloruro de magnesio, se observó la amplificación de mayor calidad a los 61°C y 2,5 mM de cloruro de magnesio (Figura 3.5).

Figura 3.5 Ensayos de estandarización de Temperatura de annealing y Concentración de  $MgCl_2$  en la Nested PCR para GM132.  $\Delta T$  = variación de temperatura de annealing;  $\Delta [MgCl_2]$  = variación de la concentración de Cloruro de magnesio,  $\Delta [MgCl_2] + \Delta T$  = variación simultánea de concentración de cloruro de magnesio y de temperatura de annealing





***Condiciones optimizadas de la Técnica de Nested PCR para GM 25 y GM132***

A partir de lo establecido originalmente en materiales y métodos se trabajó en varios ensayos, lo cuales permitieron optimizar las condiciones necesarias para conseguir una mejor amplificación del DNA de GM25 y GM132, mediante la técnica de Nested PCR. Los resultados obtenidos para la concentración de cada reactivo en la mezcla reactiva (Master Mix) de este trabajo, son los que se detallan a continuación (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Concentraciones de reactivos optimizadas para la Nested PCR de GM25 y GM132.

<b><i>Reactivo</i></b>	<b><i>GM25</i></b>	<b><i>GM132</i></b>
Buffer para 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

Durante la presente investigación, inicialmente se trabajó con una concentración de cloruro de magnesio de 1,5 mM para ambas cepas de GM. Sin embargo se observó que para amplificar mejor su DNA, cada una de ellas tuvo una exigencia diferente, siendo la de concentración de MgCl<sub>2</sub> de 2mM de MgCl<sub>2</sub> la óptima para GM25 y 2,5 mM para GM132.

Las concentraciones de primers (30 pM) y de Taq polimerasa (1U) se mantuvieron para ambas micorrizas en lo propuesto para materiales y métodos, constituyendo piezas clave para la optimización y reducción de costos de esta técnica.

Es necesario aclarar que dentro de la Tabla 3.1 “Primer 1” corresponde a NDL22 y “Primer 2” a LR1 durante la primera etapa de amplificación. Mientras que en la segunda amplificación “Primer 1” corresponde a NDL22 y “Primer 2” al primer 5.21, específico para *Glomus mosseae*.

En la Tabla 3.2 se especifica la cantidad de cada uno de los componentes que se agregaron en cada tubo de reacción de PCR, los que completan un volumen final de 25 µl.

Tabla 3.2 Volúmenes (µl) estandarizados de los componentes usados para la amplificación de GM 25 y GM132.

<i>Volumen (µl)</i>	<i>GM25</i>		<i>GM132</i>	
<i>Master Mix</i>	4,8	4,8	5,05	5,05
<i>Agua</i>	15,2	20,2	14,95	19,95
<i>DNA</i>	5	0	5	0

El DNA plantilla para la primera etapa de la Nested PCR fue 5 µl de la suspensión obtenida durante la extracción de DNA de diez esporas de GM25 y GM132. Para la segunda amplificación en cambio se usó 5 µl de una dilución 1:500 de la primera amplificación.

El programa de PCR también fue objeto de prueba, variándose las temperaturas de annealing de acuerdo con la cepa de micorriza y la concentración de cloruro de magnesio empleada. En la Tabla 3.3 se presentan las condiciones resultantes de la investigación para el programa de amplificación en el termociclador.

Tabla 3.3 Programa de amplificación de DNA empleado para la Nested PCR de GM 25 y GM132.

<i>Ciclo</i>	<i>Proceso</i>	<i>GM25</i>	<i>GM132</i>
--------------	----------------	-------------	--------------

		(°C)/(min)	(°C)/(min)
<i>1er Ciclo</i>	Denaturación inicial	95/3	95/3
	Annealing	58/1	61/1
	Extensión	72/1	72/1
<i>30 Ciclos</i>	Denaturación	93/1	93/1
	Annealing	58/1	61/1
	Extensión	72/1	72/1
<i>Ultimo ciclo</i>	Extensión final	72/5	72/5

Como se puede apreciar, no fue necesario aplicar condiciones diferentes en la programación del termociclador o de la concentración de los reactivos entre las dos etapas de amplificación, sino que estas se mantuvieron constantes a pesar de que las parejas de primers cambiaron.

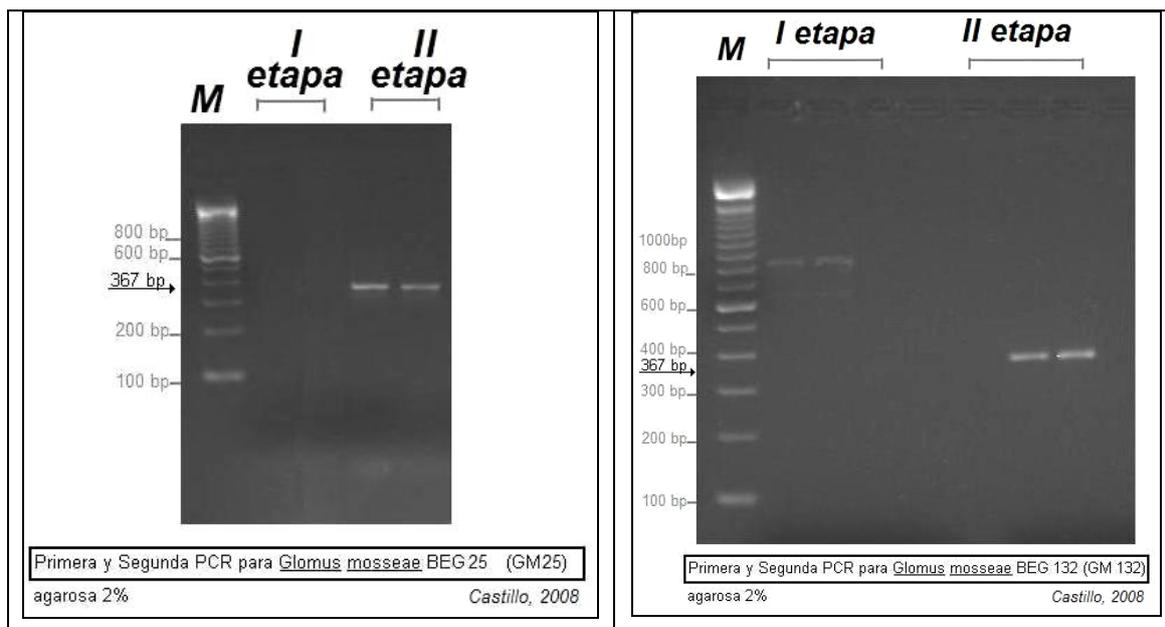
Esta programación se determinó en base a los resultados que se pudieron observar en las Figuras 3.6 y 3.7, en donde las temperaturas de 58°C (para GM25) y 61°C (para GM132) durante ambas etapas de la Nested PCR permitieron obtener los amplicones de mejor calidad.

#### ***Amplificación estandarizada del DNA de GM25 y GM132***

Los amplicones producto de la primera y segunda etapa de la técnica de Nested PCR estandarizada, luego de una corrida electroforética en gel de agarosa al 2%, se pueden observar en la Figura 3.6.

Figura 3.6 Amplicones de GM25 y GM132 obtenidos por Nested PCR (optimizada).

<i>Cepa de Micorriza</i>	
<i>GM25</i>	<i>GM132</i>



Los tamaños de los productos de amplificación de ambas etapas de Nested PCR están detallados en la Tabla 3.4, sus dimensiones se encuentran en pares de bases.

Tabla 3.4 Tamaño de amplicón obtenido luego de las diferentes etapas de la Nested PCR.

Etapa de Nested PCR	Pareja de primers empleada	Tamaño de amplicón (pb, pares de bases)	
		GM25	GM132
I	LR1	No se pudo visualizar amplicón	Dos amplicones, uno de 650bp y otro de 900bp aproximadamente
	NDL22		
II	5.21	367	367
	NDL22		

Para GM25, no se pudo observar ningún amplicón durante la primera etapa de la Nested PCR, aún cuando las esporas empleadas en la extracción de DNA fueron jóvenes. Sin embargo, siempre se pudo apreciar un producto de 367 bp durante la segunda amplificación, el cual permitió identificar a las muestras en prueba como pertenecientes a la especie *Glomus mosseae*. De modo que aunque el DNA obtenido en

la primera etapa de la Nested PCR no se encontrara en cantidades abundantes como para visualizarse en el gel de agarosa 2%, si fue la suficiente como para promover su amplificación durante la segunda etapa.

En la primera etapa de amplificación de GM132 si bien se observó amplificación, esta no se relacionó con lo esperado de acuerdo a la bibliografía. Ya que en ésta se mencionaba la formación de un solo amplicón de 750 bp, y en vez de ello se obtuvo dos amplicones bastante ténues, uno de aproximadamente 650 bp y otro de 900 bp. Incluso estas bandas de amplificación se volvían más débiles a medida que se empleaba esporas más maduras para la extracción de DNA.

Pese a esta situación, los resultados de la segunda etapa de amplificación de Nested PCR si coincidieron con lo esperado, es decir con los 367 pb, por lo cual también se identificó a esta micorriza como perteneciente a la especie *Glomus mosseae*.

## **CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN**

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 DNAr, una de las regiones de organización más conservada dentro del genoma de los eucariotas (Rodríguez *et al.*, 2004; van der Heidjen & Sanders, 2002), 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.

### **4.3 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.

El manejo de los cultivos monospórico y trampa en base a la generación de estrés hídrico se tomó como referencia de varios trabajos de investigación sobre el efecto de la sequía, aridez y gradientes de humedad en el comportamiento de diferentes especies de micorrizas (Duchicela y González-Chávez, 2003; van der Heidjen & Sanders, 2002) y de *Glomus mosseae* (Augé, 2001). Estos trabajos demuestran que las micorrizas generan en diferentes especies de plantas hospederas un incremento del rango total de colonización radicular y una mayor producción de esporas, situación que luego se refleja en ventajas adaptativas para las plantas. Durante la presente investigación se pudo observar que existió una formación intensiva de estructuras de colonización del hongo en las raíces teñidas de los cultivos trampa, de tal manera que el tratamiento aplicado durante el proceso de cultivos monospóricos y trampa no solamente resultó óptimo para las necesidades de investigación propuestas, sino que ratificó los resultados obtenidos en otras investigaciones.

Con respecto a la relación agua-suelo-simbiosis micorrícica, Augé (2001) menciona que existen dos tendencias reconocidas: las que apoyan la hipótesis de que la micorriza aporta en los efectos nutricionales del agua en el hospedero y las que sugieren que esta relación no existe.

Aunque dentro de los objetivos de esta investigación no se encontraba el comprobar la influencia del agua ni de la poda en la formación de micorriza, el hecho de haber obtenido plantas bien adaptadas a estas condiciones nos permitiría sospechar que la micorriza favorece la existencia de un aporte nutricional del agua hacia el hospedero y que además, la poda promueve su desarrollo. Por ende la colonización extendida en raíces influye positivamente sobre la planta infectada.

Varios investigadores (Burnett, 2003; van der Heidjen & Sanders, 2002) han planteado el hecho de que la simbiosis micorrícica y su comportamiento varía de

acuerdo a las condiciones del ensayo y de los especímenes empleados, además Hatfield & Stewart (1994) mencionan que el comportamiento reflejado durante una investigación no puede generalizarse hacia el de la población total ni de micorrizas ni de plantas huésped

A pesar de que las condiciones de mantenimiento para todas las plantas fueron las mismas, no se observó ningún patrón de comportamiento capaz de definir ni a las especies de plantas, ni a las de micorrizas, por lo que es necesario que en un futuro se realicen ensayos en los que se monitoree esta situación y que permitan conocer hasta que punto el comportamiento de una planta huésped puede cambiar bajo condiciones de laboratorio y de campo.

#### **4.4 Análisis molecular de *Glomus mosseae***

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

Distintos investigadores han empleado de acuerdo a las condiciones de su investigación, diferentes cantidades de esporas y métodos para extraer su DNA. Van Tuinen *et al.*, (1998) y Turnau *et al.*, (2001) por ejemplo, emplearon hasta cinco esporas de cada hongo para extraer su DNA mediante shock térmico en TE (10 mM) y Chelex-100 (20%), realizando finalmente tres etapas de Nested PCR. De Souza *et al.*, (2004) usó 60 esporas para una extracción de DNA con Tris-HCl y Chelex-100(20%) y aplicó PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel electrophoresis) para amplificarlo. Manian *et al.*, (2001) emplea de 20 a 100 esporas para una extracción con nitrógeno líquido, buffers de lisis, columnas de purificación de DNA (QIAquick, Qiagen) y finalmente disuelve el DNA obtenido en TrisHCl. Mientras que en INVAM se sugiere emplear entre 1000 a 1500 esporas con el [Qiagen](#) DNeasy plant kit de extracción de DNA.

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 el número de esporas óptimo para la extracción del DNA. El primero fue que su número sea el menor posible, pero el suficiente para favorecer la amplificación de DNA en dos etapas de Nested PCR. El segundo, que la proporción de esporas necesaria para que se cumpla el primer requisito fuera fácil de obtener, para que no se incurriera en un gasto de tiempo demasiado extenso durante su aislamiento. Ambos criterios fueron respetados, comprobándose que diez esporas de cada una de las cepas de *Glomus mosseae* fueron suficientes para obtener una amplificación óptima en la segunda amplificación de la Nested PCR. Además, dicha cantidad de esporas no requería una inversión de tiempo excesiva para su aislamiento.

En cuanto a la metodología empleada durante la extracción de DNA, 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). El cual permitió obtener material genético en cantidades suficientes como para su amplificación por Nested PCR, pero durante el desarrollo del proceso de extracción de DNA se encontraron algunas dificultades de tipo logístico, que no se han mencionado en otros estudios moleculares de micorrizas.

Es necesario tomar en cuenta que el lugar en que se encuentran los Laboratorios de Ingeniería en Biotecnología de la Escuela Politécnica del Ejército, están a aproximadamente 2550 msm. Razón por la cual durante la extracción de DNA no se pudo alcanzar los 100°C o 95°C que la bibliografía recomendaba, volviéndose necesario acoplar la técnica a la temperatura máxima de 92,5°C.

Otro factor que se debió tomar en cuenta para la extracción de DNA es la limpieza de las esporas, ya que estas al encontrarse en constante contacto con microflora del suelo, corrían el riesgo de contaminarse con material genético extraño o de degradarse por la presencia de DNAsas. Para superar este inconveniente se escogieron a las mejores esporas de micorrizas bajo el estereoscopio, mismas que se limpiaron mediante un raspado superficial con agujas de disección y varios lavados con agua estéril, obteniéndose resultados bastante buenos. Existen métodos para eliminar este tipo de impurezas, como la ultra sonicación (de Souza *et al.*, 2004), o sistemas de

vorteado y centrifugación (Manian *et al.*, 2001), pero al aplicarlos se pierde parte representativa de la muestra.

Un problema bastante importante que se observó en el desarrollo de este trabajo, fue la corta durabilidad del DNAr extraído, ya que éste se degradaba rápidamente con el pasar del tiempo, aún conservándolo alicuotado a temperaturas de -20 o -80°C. Este comportamiento puede atribuirse a que el Chelex-100 que elimina por quelatación a las enzimas y constituyentes celulares liberados al romper las esporas de las micorrizas, no purifica totalmente el DNA extraído. Probablemente el Chelex100 deja libres metabolitos como polisacáridos o polifenoles, que se mantienen contaminando e interfiriendo en la muestra inicial de DNA y posiblemente sean estos los responsables de su fragmentación, degradación y bajos rendimientos, limitando así su estabilidad y durabilidad (Burnett, 2003). La metodología de extracción de material genético con este reactivo 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 (Manian *et al.*, 2001).

De Souza *et al.*, (2004) menciona un tratamiento con RNAsa después de extraer con Chelex el DNA de varias esporas de micorriza, para así almacenarlo a -20°C; o en el caso de que las esporas aisladas no se fueran a usar inmediatamente para la extracción de DNA, almacenarlas dentro de un microtubo con agua estéril a -80°C. De estas dos posibilidades se aplicó solamente la segunda durante la presente investigación, observándose resultados bastante favorables en la conservación de las muestras. Probablemente monitorear y comprobar el efecto de estos y otros tratamientos para favorecer la conservación y viabilidad de las muestras almacenadas de esporas y de su DNA, constituiría una de las alternativas más importantes de estudio para futuras investigaciones, que serían vitales para un mayor estudio de las micorrizas en el área molecular.

La concentración de DNA que se consiguió luego de la extracción fue muy baja como para ser cuantificada por métodos de fluorimetría como Qubit (Invitrogen) que incluso detecta un rango de 0,2 a 100 ng/µl. Tampoco se lo pudo cuantificar en referencia al *Low DNA mass ladder (Invitrogen)* porque el DNA obtenido no se podía visualizar en geles de agarosa (a menos que se haya realizado previamente la segunda

amplificación), situación que también se reporta en el trabajo investigativo de van Tuinen *et al.*, (1998), en que el producto de amplificación no necesariamente se visualiza en la primera amplificación. El volumen de DNA recuperado, en cambio, era muy pequeño como para usar espectrofotometría y realizar diluciones del DNA como para aplicar esta tecnología, además de que se habría podido generar contaminación de la muestra o reducir su concentración a niveles que luego no hubieran permitido una amplificación óptima en PCR.

### ***Comparación de secuencias de DNA de Glomus mosseae***

Dentro de las secuencias de DNAr de *Glomus mosseae* que se compararon con el programa en línea Clustalw, de San Diego Supercomputer Center y que se evaluaron mediante el programa FastPCR se encontró que de entre tres candidatos, el primer 5.21 diseñado por van Tuinen *et al.*, (1998) fue el primer específico de especie que tenía mayor probabilidad de complementariedad con el DNAr. Sin embargo, dentro de la región en que este primer se adhería se encontraron dos sitios (correspondientes a las posiciones 13 y 14 del primer) en que existían diferencias nucleotídicas de sustitución. En ambos casos se pudo diferenciar claramente dos grupos. En la posición 13 fue igualmente probable encontrar una citosina (7 ejemplares) que una timina (7 ejemplares); mientras que en la posición 14 era mucho más probable encontrar una guanina (10 ejemplares) que timina (4 ejemplares). Ventajosamente ambas posiciones se encuentran lejos de los extremos de la secuencia del primer, y aunque se podía generar interferencia en el alineamiento con el DNAr del hongo, no lo impedía de forma determinante.

La posible sustitución de bases nucleotídicas en el DNAr evidenció no ser un limitante para la amplificación mediante Nested PCR de las muestras de GM 25 y GM132 de que se disponía, ya que el tamaño de amplicón obtenido luego de la segunda etapa de Nested PCR correspondió con el esperado de acuerdo a la bibliografía (van Tuinen *et al.*, 1998). No obstante, el secuenciamiento de la región amplificada de este tipo de cepas hubiera aportado de manera importante a obtener un criterio más amplio de las diferencias y similitudes de las micorrizas con que se trabajó, en referencia a las de otros estudios.

Con respecto a los dos grupos que se pudieron distinguir al comparar las secuencias nucleotídicas de los clones de GM25, tenemos que se podría atribuir su comportamiento al hecho de que las muestras empleadas en la investigación de Clapp *et al.*, (2001), con secuencias más polimórficas, provenían de cultivos que se aislaron y reprodujeron a partir de una sola espora por Dodd J.C. desde 1982, en Inglaterra. Es importante considerar que en micorrizas la colonización de plantas hospederas exhibe una heterogeneidad espacial y temporal significativa (van der Heidjen & Sanders, 2002) y que a pesar de que una población se genere de una misma espora, sus individuos pueden ser molecularmente diferentes (Burnett, 2002). Probablemente este fenómeno también hubiera podido apreciarse al secuenciar el DNAr de las micorrizas empleadas en la presente investigación, ya que las muestras han estado sometidas a lo largo del tiempo a diferentes sistemas de manejo, que pudieron influir para que la presión selectiva y evolutiva provocara cambios del material genético, y que probablemente esto hubiera sido la razón por la que en la primera amplificación los resultados obtenidos fueron tan variables para ambas cepas.

#### ***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*. Se han reportado también en otros trabajos de investigación con la región 25S del DNAr de micorrizas, que sólo dos etapas de amplificación son lo suficientemente eficientes como para identificar a la micorriza. Como en Jacquot *et al.*, (2000), en que se utilizó en primera instancia un primer universal para eucariotas combinado con un primer específico para hongos y para la segunda amplificación usó el primer específico de hongos junto a 5.23, específico para *Glomus mosseae*. Aunque éste último primer demostró no tener una complementariedad tan amplia (dentro de las secuencias nucleotídicas que se comparó) como el primer 5.21 diseñado por van Tuinen *et al.*, (1998).

Existen además estudios en que se realizan amplificaciones Nested de dos fases, empleando la región 18S del DNAr de MA, como en Redecker *et al.*, (2000) y de Souza *et al.*, (2004).

En todos estos casos se ha optimizado las condiciones en que se realizó la Nested PCR y se ha aprovechado también la capacidad de la técnica para obtener una amplificación sumamente específica y discriminativa, demostrándose así que no es indispensable una reamplificación anidada con un número mayor a dos fases para estos casos.

En cuanto a las parejas de primers empleadas durante el desarrollo de la presente tesis podemos indicar que la primera etapa se realizó con NDL22 y LR1, primers propuestos originalmente por van Tuinen *et al.*, (1998) para una segunda etapa de amplificación. Además, para la segunda etapa de amplificación, en el presente trabajo investigativo se empleó a NDL22 en combinación con 5.21. Este último el que determinó la especificidad de amplificación a nivel de especie. A esta pareja de primers su autor la utilizó durante una tercera etapa de la Nested PCR. Por lo que se puede mencionar que el diseño de la Nested PCR ha sido optimizado disminuyendo la necesidad de incurrir en un número mayor a dos ciclos de amplificación para identificar a *Glomus mosseae*.

### ***Gradientes de Temperatura de Annealing y Concentración de Cloruro de Magnesio***

En una reacción de Nested PCR la temperatura de annealing de los primers y la concentración de cloruro de magnesio son parámetros que influyen directamente sobre la capacidad y fidelidad de amplificación del material genético. Temperaturas de annealing por encima o por debajo de la óptima, provocan que la afinidad de los primers a la secuencia complementaria en el DNA molde no sea la adecuada (Surzycki, 2000).

Muchas muestras de DNA requieren, además de la optimización de concentraciones de cloruro de magnesio, de la optimización de la temperatura de annealing para mejorar la eficiencia de amplificación, ya que la deficiencia o exceso de este tipo de iones limita o promueve la actividad replicativa de la enzima Taq DNA polimerasa (Surzycki, 2000) y si además, los primers no se han hibridado correctamente en el DNA, es bastante probable que la amplificación resulte bastante defectuosa.

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.

Van Tuinen *et al.*, (1998) en la metodología que propone para la amplificación de DNAr mediante Nested PCR, además de los reactivos involucrados en la amplificación del DNA, adiciona el coadyuvante BSA y el surfactante iónico Triton-X, para eliminar sustancias que puedan interferir en la reacción. Inclusive para evitar su evaporación, las recubre con aceite mineral. Durante la presente investigación se comprobó que los ensayos realizados sin estos coadyuvantes podían llevarse a cabo sin tener un efecto negativo en los resultados obtenidos y que tampoco era necesario aplicar ningún tipo de aditivo para evitar la evaporación de la reacción de amplificación, ya que el diseño del termociclador y de los tubos de PCR empleados evitaron que este fenómeno apareciera. Por lo que aun sin emplear estos reactivos para la Nested PCR, la técnica diseñada no sólo fue eficiente, sino que además de este modo se abarató los costos que implicaba realizarla.

La concentración de varios de los reactivos constituyentes de la reacción de amplificación. Por ejemplo los primers que van Tuinen *et al.*, (1998) aplica en una concentración de 500 nM, generaron buenos amplicones a los 0,03 nM. Las 2U de Taq DNA polimerasa que dicho autor sugiere, se redujeron a 1U.

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.

Van Tuinen *et al.*, (1998) afirma que como resultado de la combinación de los primers NDL22 y LR1 se obtiene un amplicón de 750 bp, situación que se confirma con los trabajos de Jacquot *et al.*, (2001). Además se confirmó esta situación mediante la comparación de las secuencias nucleotídicas de *Glomus mosseae* realizada por la presente investigación. Sin embargo, cuando se empleó esta pareja de primers para amplificar DNAr durante la primera fase de la Nested PCR en GM132, se observó la formación de dos diferentes productos de amplificación, uno ubicado aproximadamente a 650 bp y otro a los 900bp. Estos resultados no se han reportado previamente en otras investigaciones, por lo que podríamos sospechar que fuerzas selectivas influenciadas por las condiciones del lugar de origen y manejo de las micorrizas pudieron haber inducido esta peculiaridad a nivel nucleotídico. La mejor manera de comprobar esta hipótesis es comparando secuencias de DNA de GM132 entre los ejemplares de otras micorrizas de la misma especie, pero la secuenciación no fue una alternativa al alcance de este estudio y tampoco se encontró disponible en la red ninguna secuencia de esta cepa de *Glomus mosseae*.

Se observó, además, que a medida que se empleaban esporas maduras para las amplificaciones de Nested PCR, los amplicones obtenidos durante la primera fase para GM132 se volvían más tenues o no se los podía observar luego de la electroforesis en agarosa (2%); sin embargo al emplear parte de estas muestra en la segunda etapa de la Nested PCR se obtuvo los amplicones de *Glomus mosseae* de 367 bp que se esperaban.

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 los casos en que la técnica se emplea 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).

Por ello la taxonomía morfológica 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).

## **CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES**

1. El sistema de manejo de cultivos monospóricos y cultivos trampa de *Glomus mosseae* BEG 25 y BEG 132 en base de sometimiento a estrés hídrico y de poda de las partes aéreas en las plantas, dio un efecto positivo para la formación de la simbiosis micorrícica y para multiplicar MA en cantidades suficientes como para emplearlas en la extracción de su DNA.
2. Aunque se mantengan las mismas condiciones de manejo en las plantas trampa, existe un comportamiento diferente entre las especies de plantas huésped empleadas y las micorrizas de *Glomus mosseae* que las colonizaron, aún cuando estas pertenecían a diferentes cepas de una misma especie.

3. El DNA ribosomal extraído a partir de diez esporas de *Glomus mosseae* BEG 25 y 132 mediante calentamiento a 92,5 °C durante 7 minutos, enfriamiento en hielo por 2 minutos y centrifugación a 10000 rpm dos minutos, permitió obtener suficiente material genético como para su amplificación durante la Nested PCR.
4. La metodología estandarizada de la técnica de Nested PCR capaz de identificar micorrizas arbusculares de la especie *Glomus mosseae*, cepa BEG 25 fue a una concentración de 2 mM de cloruro de magnesio y a una temperatura de annealing de 58 °C. Mientras que para *Glomus mosseae*, cepa BEG 132 la concentración óptima de cloruro de magnesio fue 2,5 mM y 61 °C de temperatura de annealing.
5. Una Nested PCR con dos etapas de amplificación es suficiente para obtener amplicones claros, intensos y definidos como para identificar las cepas BEG 25 y BEG132 de *Glomus mosseae*.

## **CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES**

Es necesario investigar y monitorear la efectividad de la colonización con micorriza durante los diferentes estadios de desarrollo de las plantas. La información generada permitiría potenciar el diseño de sistemas de producción de cultivos monospóricos y cultivos trampa para la propagación a gran escala de muestras de campo, con asilados nativos de este tipo de hongos.

Futuras investigaciones serían necesarias para esclarecer el efecto cuantitativo y cualitativo que puede tener la poda y situaciones de sequía sobre plantas colonizadas con micorrizas y sobre su influencia en la reproducción mediante esporas.

El secuenciamiento de las regiones amplificadas mediante Nested PCR de *Glomus mosseae* BEG 25 y 132 que se usaron durante esta investigación, aportaría al conocimiento científico de los cambios en el DNAr de estas micorrizas frente a los diferentes tipos de manejos que estas han sufrido. Además la comparación a nivel molecular de estas micorrizas con otras secuencias de la misma especie, permitiría avanzar en el conocimiento de esta especie y cepa, aportando al conocimiento de cómo y por qué se dan las similitudes y diferencias genéticas en micorrizas.

Hasta el momento no existe secuenciada la totalidad del genoma de ningún hongo micorrícico y las secuencias disponibles en línea (en NCBI) corresponden a clones de DNAr que han sido secuenciados parcialmente. Esta situación restringe un tanto la posibilidad de diseñar primers para diferentes especies de micorrizas y especialmente para las que se encuentran en campo (micorrizas nativas). Por lo que sería sumamente provechoso que en un futuro se impulsara la secuenciación de este tipo de hongos y más todavía que en nuestro país se diera apertura a esta línea de investigación, ya que al poseer una biodiversidad bastante alta de especies vegetales es bastante probable que la biodiversidad de micorrizas también sea sumamente amplia.

El obtener un mayor conocimiento de la forma en que las micorrizas influyen sobre los ecosistemas garantizaría no sólo su mantenimiento y explotación, sino que también facilitará que se relacione las características de las secuencias nucleotídicas con cualidades inherentes a la simbiosis que forman y con el efecto metabólico que inducen en las poblaciones de plantas para mejorar su salud, productividad y estabilidad. Permitiendo aportar a una mayor comprensión del rol que las MA tienen dentro de un nicho ecológico y su influencia dentro del medio ambiente.

## **CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

American society of Agronomy and The Crop Science Society of America in Fort

Collins. (1984) Microbial Plant Interactions. *Proceedings of a symposium sponsored by division 5-3 of the Soil Science Society of America, EUA. 47: 29-50.*

Alarcón A. (2001) Actualización de la Taxonomía de los *Glomales*. *Terra. 19: 103-104.*

- Atlas R. y Bartha R. (2002) Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Primera edición en español. Paerson Educación S.A. Madrid. Pp: 97-105.
- Bentivenga S., Bever J. & Morton J. (1997) Genetic variation of morphological characters within a single isolate of the endomycorrhizal fungus *Glomus clarum* (Glomaceae). *Am. J. Bot.* 84(9): 1211-1216.
- Berbee M. & Taylor J. (2000) Fungal Molecular Evolution: Gene Trees and Geologic Time. Pp: 229-246. In: The Mycota Vol. VIIB, Systematics and Evolution. D. J. McLaughlin, E. McLaughlin and P. A. Lemke, eds. Springer: 229-246.
- Berch S. & Kendrik B. (1982) Vesicular arbuscular mycorrhizae of southern Ontario ferns and fern allies. *Mycologia*.74: 769-776.
- Bethlenfalvay G. & Franson R. (1989) Manganese toxicity alleviated by mycorrhizae in soybean. *Journal of Plant Nutrition*. 12: 953-970.
- Bhardwaj S., Dudeja S. & Khurana A. (1997) Distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the natural ecosystem. *Folia Microbiol.* 42(6): 589-594.
- Blanco F. y Salas E. (1997) Micorrizas en la agricultura: Contexto mundial e investigación realizada en Costa Rica. *Agronomía costarricense* 21(1): 55-67.
- Bonfante P. & Perotto S. (1995) Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytologist* 130: 3-21.

- Bruns, T. & Gardes, M. (1993) Molecular tools for the identification of ectomycorrhizal fungi: taxon-specific oligonucleotide probes for the suilloid fungi. *Molecular Ecology*. 2:233-242.
- Burnett J. (2003) Fungal Populations & Species. First published. OXFORD University press. Great Britain. Pp:19-100, 239-262
- Carlile M., Watkinson S. & Goodway G. (2005) The Fungi. 2th edition. ELSEVIER Ltd Academic press. Great Britain. Pp: 246-291, 531-538, 551-561.
- Clapp J., Rodriguez A. & Dodd J. (2001) Inter- and intra-isolate rRNA large subunit variation in *Glomus coronatum* Spores. *New Phytologist*. 149: 539–554.
- De la providencia I. y Fernández F. (2004) Factibilidad del uso de un ELISA indirecto para la detección de *Glomus clarum*. *Cultivos Tropicales*, 23: 17-22.
- De Souza F., Kowalchuk G., Leeflang P., van Veen J. & Smit E. (2004) PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiling of Inter- and Intraspecies 18S rRNA Gene Sequence Heterogeneity Is an Accurate and Sensitive Method To Asses Species Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi of Genis *Gigaspora*. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(3): 1413-1424.
- Diouf D., Diop T. & Ndoye. (2003) Actinorhizal, mycorrhizal and rhizobial symbioses: how much do we know?. *African J. of Biotechnology*. 2(1): 1-7.

- Duchicela J. & González -Chávez M. (2003) La micorriza arbuscular en el contexto de la agricultura sustentable, Monografía, CEINCI, Sangolquí. Editorial.
- Eckert K. & Kunkel A. (1991) DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *PCR Methods Appl.1*: 17–24.
- Friese C. & Allen M. (1991) The spread of VA mycorrhizal fungal hyphae in the soil: inoculum types and external hyphal architecture. *Mycologia*. 83: 409-418.
- García-Garrido J., Tribak M., Rejon-Palomares A., Ocampo J. & García –Romera I. (2000) Hydrolytic enzymes and ability of arbuscular mycorrhizal fungi to colonize roots.
- Gelfand D. & White T.(1990) PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press inc. pp: 129-141.
- González-Chávez MC. (2000) Biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. In: la edafología y sus perspectivas al siglo XXI. Tomo II. México. Colegio de Postgraduados, Universidad Nacional Autónoma de México, Universidad Autónoma Chapingo, Pp 821.
- González-Chávez MC. (2004) Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *Terra Latinoamericana*. 23: 29-37.

- González-Chávez MC., Carrillo R., Wright S. & Nichols K. (2004) The role of glomalin, a protein by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution*. 130: 317-323.
- Hans J., Hause B., Strack D. & Walter M. (2004) Cloning, Characterization, and Immunolocalization of a Mycorrhiza-Inducible 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase in Arbuscular-Containing Cells of Maize. *Plant Physiology*. 134: 614-624.
- Harley J. & Smith S. (1983) Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London.
- Harrier L. (2001) The arbuscular mycorrhizal symbiosis: a molecular review of the fungal dimension. *Journal of experimental botany*. 52: 469-478.
- Hatfield J. & Stewart B. (1994) Soil Biology: Effects on soil quality, Advances in soil science. Lewis Publishers. EUA. Pp: 30-51.
- Herrera T. & Ulloa M. (1998) El Reino de los Hongos: Micología básica y aplicada. Universidad Nacional Autónoma de México-Fondo de Cultura económica. México DF. Pp: 364-371.
- Hijri M., Niculita H. and Sanders I. (2007) Molecular characterization of chromosome termini of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intradices* (Glomeromycota). *Fungal Genet. Biol.* 10: 1016.

Hollick P., Taylor R., McComb J., Dixon K., and Krauss S. (2004) Optimisation of DNA Extraction for AFLP Analysis of Mycorrhizal Fungi of Terrestrial Orchids Caladeniinae and Drakaeinae. *Plant Molecular Biology Reporter*. 22: 307a–307h.

Innis M., Myambo K., Gelfand D. & Brow M. (1988) DNA Sequencing with *Thermus aquaticus* DNA Polymerase and Direct Sequencing of Polymerase Chain Reaction-Amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85(24): 9436-9440.

INVAM. (2006) Micorriza Information Exchange Web Site clearinghouse for information on research, teaching, business of mycorrhizal symbiosis. [en línea]. Disponible en: [http://invam.caf.wvu.edu/methods/spores/clean\\_spores.htm](http://invam.caf.wvu.edu/methods/spores/clean_spores.htm)  
Consulta 12 Abril 2006.

Jacquot-Plumey E., van Tuinen D., Gianinazzi S. & Gianinazzi-Pearson V. (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.

Jacquot-Plumey E., van Tuinen D., Chatagnier O., Gianinazzi S. & Gianinazzi-Pearson V. (2001) 25S rDNA-based molecular monitoring of glomalean fungi in sewage sludge-treated field plots. *Environmental Microbiology*. 3(8): 525-531

Jakobsen I. & Rosendahl L. (1990). Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytologist*. 115: 77–83.

Killham K. (1994) Soil Ecology. Cambridge University Press.

Klironomos J. & Kendrick W. (1993) Research on mycorrhizas: trends in the past 40 years as expressed in the 'MYCOLIT' database. *New Phytol*. 125: 595-600.

Hijri M., Niculita H. & Sanders I. (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.

Lanfranco L., Wyss P., Marzachi C. & Bonfante P.(1995) Generation of RAPD-PCR primers for the identification of isolates of *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol Ecol*. 4(1):8-61.

Lawyer F., Stoffel S., Saiki R., Chang S., Landre P., Abramson R. & Gelfand D. (1993) High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl*. 2: 275-287.

Longley M., Bennett S. & Mosbaugh D. (1990) Characterization of the 5' to 3' exonuclease associated with *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucl. Acids Res*. 18: 7317–7322.

McNaughton S. & Wolf L. (1984) Ecología general. Omega, Barcelona.

- Molina M., Mahecha L. y Medina M. (2005) Importancia del manejo de hongos micorrizógenos en sistemas silvopastoriles. *Revista Colombiana de Ciencias pecuarias*. 18 (2): 162-175.
- Morton J. & Benny G. (1990) Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon*.37: 471-491.
- Morton J. & Redecker D. (2001) Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia*. 93(1): 181-195.
- Newman E. & Reddel P. (1987) The distribution of mycorrhizas among families of vascular plants. *New Phytol*. 106: 745-751
- Newton C.(1995) PCR Essencial data. John Wiley and Sons Ltd published in association with BIOS Scientific Publishers Ltd, Ucrania. Pp: 72-86; 99-120.
- Ohel F. & Sieverding E. (2004) Pacispora a new vesicular arbuscular mycorrhizal fangal genus in the Glomeromycetes. *Journal of Applied Botany* 78:72-82.
- Pritsch K., Boyle H., Munch J. & Buscot F. (1997) Characterization and identification of black alder ectomycorrhizas by PCR/RFLP analyses of the rDNA internal transcribed spacer (ITS). *New Phytol*. 137(2): 357-369.

Ramos J. y Guadarrama P. (2004) Los hongos micorrizógenos arbusculares en la restauración de comunidades tropicales. *Universidad y ciencia(I)*: 59-65.[en línea] Disponible en: <http://www.ujat.mx/publicaciones/uciencia>. Consulta 7 de diciembre 2006.

Red Nacional de Análisis Genético Poblacional, Sistemática Molecular y Biología Integrativa (2006). [en línea]. Disponible en: <http://www.cecalc.ula.ve/BIOINFO/proyectos/proyect3.html> Consulta 2 de Junio 2006.

Redecker D., Thierfelder H., Walker C. & Werner D. (1997) Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers (ITS) of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the Glomales. *Applied and Environmental Microbiology*.63: 1756-1761.

Redecker D., Hijri M., Duhieu H. & Sanders I. (1999) Phylogenetic Analysis of a Dataset of Fungal 5.8S rDNA Sequences Shows That Highly Divergent Copies of Internal Transcribed Spacers Reported from *Scutellospora castanea* Are of Ascomycete Origin. *Fungal Genetics and Biology*. 28: 238–244.

Redecker D. (2000c) Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza*. 10 :73–80.

Redecker D., Morton J. & Bruns T. (2000a) Molecular phylogeny of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus sinuosum* and *Sclerocystis coremioides*. *Mycologia*. 92: 282-285.

Redecker, D., Morton, J. & Bruns, T. (2000b). Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 14: 276-284.

Redecker D. (2001) Molecular identification and phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi. Institute of Botany, University of Basel, Switzerland. [en línea]. Disponible en: [http://www.waite.adelaide.edu.au/Soil\\_Water/3ICOM\\_ABSTs/Abstracts/R/D.%20Redecker.html](http://www.waite.adelaide.edu.au/Soil_Water/3ICOM_ABSTs/Abstracts/R/D.%20Redecker.html). Consulta 20 de Junio 2006.

Redecker D. (2005) Glomeromycota. Arbuscular mycorrhizal fungi and their relative(s). Version 01 July 2005. [en línea]. Disponible en: <http://tolweb.org/Glomeromycota/28715/2005.07.01>. Consulta 20 de Junio 2006.

Rodriguez J. (1989) Importancia de la micorrización artificial de diversas especies forestales españolas. *Bol. San. Veg. Plagas*. 15: 33-41. [en línea]. Disponible en: <http://www.mapa.es/ministerio/pags/biblioteca/plagas/BSVP-15-01-033-041.pdf>. Consulta 22 Enero 2008.

Rodriguez A., Xoconostle B. y Valdés M. (2004) Ecología molecular de los hongos ectomicorrícicos. *Rev. Fitotec. Mex.* 27(3): 267-278.

Rosendahl S. & Stukenbrock E. (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., Collados C., Porcel R., Azcón R. and Barea J. (2002) Identification of a cDNA from the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices* that is Expressed During Mycorrhizal Symbiosis and Up-Regulated by N Fertilization. *MPMI*.15(4): 360–367

Salisbury F. & Ross C. (1994) Difusión, termodinámica y potencial hídrico, *In: Fisiología Vegetal*. Grupo editorial Iberoamérica, S.A de C.V. México, D.F. Pp: 29-46 [en línea]. Disponible en: <http://www.bi.ku.dk/staff/soerenr/community-ME.pdf> . Consulta 16 Junio 2006.

Sanders F., Mosse B. & Tinker P. (1975) Endomycorrhizas. Academic Press, Inc., London

Schüßler A., Schwarzott D. & Walker C. (2001) A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research*. 105:1413-1421.

Sieverding E. (1991), Vesicular-arbuscular Mycorrhiza Management. Gesellschaft für technische Zusammenarbeit, Eschborn, Germany.

Siqueira J. & Franco A. (1988) Micorrizas. Biotecnología do solo: Fundamentos y perspectivas. MEC-ESAL-FAEPE-ABEAS, Brasilia, DF: 125-177.

Simon L., Bousquet J., Lévesque R. & Lalonde, M. (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*. 363: 67-69.

Surzycki S. (2000) Basic Techniques in Molecular Biology. Department of Biology Indiana University. Springer lab manual. . Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp:406-420.

Smith, S. & Read, D. (1997) Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press Ltd, London.

Turnau K., Ryszka P., Gianinazzi-Pearson V. & van Tuinen D. (2001) Identification of arbuscular mycorrhizal fungi in soils and roots of plants colonizing zinc wastes in southern Poland. *Mycorrhiza*. 10: 169-174.

Van Burren M., Maldonado-Mendoza I., Tribu A., Blaylock L. & Harrison M. (1999) Novel Genes Induced During an Arbuscular Mycorrhizal (AM) Symbiosis Formed Between *Medicago trunculata* and *Glomus versiforme*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 12(3): 171-181.

- Van der Heijden M., Klironomos J., Ursic M., Moutoglis P., Streitwolf-Engel R. & Boller T *et al.*,. (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*. 396: 69-72.
- Van der Heijden M. & Sanders I. (2002) Mycorrhizal ecology. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. Pp: 135-153.
- Van Tuinen D., Jacquot E., Zhao B., Gollote A. & Gianinazzi-Pearson V. (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.
- Vandenkoornhuysen P., Leyval C. and Bonnin I. (2001) High genetic diversity in arbuscular mycorrhizal fungi: evidence for recombination events. *Nature*. 86 (2): 243-253. en línea. disponible en: <http://www.nature.com/hdy/journal/v87/n2/full/6889410a.html>. Consulta 18 de enero de 2008.
- Varma A. and Hock B. (1999) Mycorrhiza Structure, function, Molecular biology and Biotechnology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp: 3-34.
- 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 .
- Walker C. (1986) Taxonomic concepts in the Endogonaceae. II A fifth morphological wall type in endogonaceous spores. *Mycotaxon*. 18: 443-455.

Weber J., Díez J., Selosse MA., Tagu D. and Tacon F. (2004) SCAR markers to detect mycorrhizas of an American *Laccaria bicolor* strain inoculated in European Douglas-fir plantations. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. 12(1): 19-27.

Werner D. (1992) Symbiosis of plants and microbes. Chapman and Hall London.

Williams, J. (1989) Optimization strategies for the polymerase chain reaction. *Biotechniques*. 7: 762–769.

Wright L. (1994) Production technology status of woody and herbaceous crops. *Biomass and Bioenergy*. 6:191-209.

Zhang Y., Guo L. & Liu R. (2004) Arbuscular mycorrhizal fungi associated with common pteridophytes in Dujiangyan, southwest China. *Mycorrhiza*. 14: 25-30.

Zhao Z. (2000) The arbuscular mycorrhizas of pteridophytes in Yunnan, southwest China: evolutionary interpretations. *Mycorrhiza*. 10: 145-149.

## GLOSARIO

- **Heterocariosis:** es la mutación de un micelio a uno multinucleado.
- **Hifa dicariótica:** (con dos núcleos) es un caso especial de la heterocariosis y provee al micelio algunas propiedades de las células diploides, como la complementación genética o fisiológica entre los diferentes núcleos, mismos que pueden migrar en forma unilateral, bilateral o limitada.
- **Heteroplasmosis:** es la recombinación génica (anastomosis) entre dos micelios con diferente material genético nuclear.
- **Fitness:** palabra en inglés que Fisher (1958) propuso para definir en términos evolutivos a la capacidad de que padres aporten descendientes a generaciones subsecuentes, lo cual influye directamente en que la selección natural se mantenga.