

Reporte de Identificación taxonómica de Ectomicorrizas en puntas de raíz de *Pinus chiapensis* (Martínez) Andersen, mediante técnicas moleculares

¹*Rios Cortes Pedro*

²*Medel Ortiz Rosario*

³*Garibay Orijel Roberto*

Maestría en Ciencias Biológicas, Facultad de Biología. Universidad Veracruzana, Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n. Zona Universitaria, C.P. 91090. Xalapa, Veracruz, México. Instituto de Investigaciones Forestales, Universidad Veracruzana. Carr. Antigua a Coatepec (Parque Ecológico "El Haya") S/N Col. Benito Juárez C.P. 91070 Xalapa, Veracruz, México. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Tercer Circuito s/n, Ciudad Universitaria Delegación Coyoacán, A.P. 70-233 C.P. 04510 México, D.F., México.

Resumen

Las ectomicorrizas, son una asociación simbiótica mutualista que se da entre las raíces de las plantas leñosas y algunos grupos de hongos del suelo. Cuya principal función es el intercambio de nutrientes entre ambos individuos con una importancia ecológica considerable. El objetivo del trabajo es identificar taxonómicamente muestras de raíz micorrizadas utilizando regiones ITS. Para lograrlo se extrajo ADN de 5 puntas de raíz micorrizadas y después se amplificaron las regiones ITS 1F y ITS 4 que son el código de barras de hongos, posteriormente se limpiaron los productos de PCR y se realizó la secuenciación molecular por método Sanger. Las secuencias obtenidas como resultado fueron editadas en un software especializado y comparadas con la bases de datos reportados en la literatura y se obtuvieron del morfo 1: *Tomentella sp1*, *Tomentella sp2*, *Clavulina*.

Palabras clave: Ectomicorrizas, Secuenciación Molecular, Productos PCR.

Introducción

Las ectomicorrizas juegan un papel muy importante dentro de los ecosistemas forestales. ya que son los encargados de movilizar nutrientes en el suelo como lo son nitrógeno, fosforo y agua y transportarlo a las plantas (Smith y Read, 1997). También se sabe que estos hongos al asociarse a las plantas las protege contra patógenos del suelo y contaminantes ambientales, además que son muy importantes en el establecimiento y viabilidad de plántulas en condiciones naturales o de invernadero (Pérez-Moreno y Read, 2004). Por lo que pueden ser una excelente herramienta de reforestación para especies de árboles que se encuentren en peligro como lo es el caso de *Pinus chiapensis*. En estudios recientes, se ha reportado, que en muchos casos la morfología de un hongo no es suficiente para lograr su identificación, especialmente cuando solo se cuenta con

pequeños fragmentos de la muestra, hoy en día se utilizan herramientas como la amplificación y secuenciación del ADN, que, sumado a los datos morfológicos, nos proveen de una identificación más exacta, también las herramientas de secuenciación molecular de alto rendimiento permiten la identificación de genomas fúngicos(Schoch *et al.*, 2012).

Materiales y Métodos

Extracción de ADN por kit XNAP

Las muestras de raíz micorrizadas contenidas en microtubos con CTAB, fueron depositadas en cajas Petri con agua destilada estéril por separado y se lavaron un par de minutos hasta dejarlas libres de CTAB. Después se rotularon 5 microtubos estériles en los cuales se depositaron 20µL de buffer de extracción ES, seguido se depositaron con una pinza estéril y antes flameada cada una de las puntas en fondo de los tubos que contenían ES y se molieron en el fondo con ayuda de las pinzas. Una vez terminado ese paso los tubos fueron puestos en la centrifuga y después al termociclador a dos temperaturas una temperatura inicial de 65 °C durante 10 minutos y a 95 °C por 10 minutos. Posteriormente las muestras fueron retiradas del termociclador y se les agrego 20µL de buffer de disolución y se dejo reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de guardarse en el refrigerador a 4 °C, hasta utilizarse para la amplificación de PCR.

Amplificación de región ITS mediante técnica de PCR

Para lograr identificar taxonómicamente las muestras de puntas de raíz fue necesario amplificar la región ITS que es el código de barras de hongos. De las extracciones de ADN previamente realizadas en las muestras de punta de raíz.

Para ello se preparó una mezcla de ingredientes de PCR llamada Master Mix en un microtubo de 500 µL. La cual esta compuesta de Agua de uso molecular estéril 18.5 µL, 0.25 µL de primers ITS 1F y 0.25 µL del ITS 4 y 5 microlitros de la Taq Polimerasa Tad and load. Posteriormente se depositaron 24 µL de Master Mix en 5 microtubos nuevos estériles rotulados y se adiciono 1 µL de ADN puro tomado de las extracciones. Este procedimiento es muy importante que se realice en una campana de flujo laminar previamente limpiada con alcohol al 97%.

Después las muestras fueron depositadas en un termociclador, con el programa de PCR para ITS 1F, 95 °C de temperatura inicial por 4 minutos, después 33 ciclos a 94°C 1 minuto, 51°C por un minuto, 72°C por un minuto y una temperatura final de 72°C durante 10 minutos y fueron guardadas los productos de PCR a 4°C.

Figura 1. Amplificaciones de la región ITS de muestras de hongos, los carriles 11-15 corresponden a muestras de puntas de raíz micorrizadas de una plantación de *Pinus chiapensis*, ordenados del morfotipo 1 al 5, los morfos 1,4,5 muestran en los carriles 11,14 y 15 muestran bandas cuya amplificación fue exitosa. Mientras que el morfotipo 2 es una banda tenue y el morfotipo 3 no presento bandeos. Sin embargo, en la parte superior del gel se muestran los resultados mostrados en la figura 2, corresponden a amplificaciones de la región ITS de muestras de hongos, las muestras, que no amplificaron correctamente en el primer gel, figura 1. Fueron diluidas en una proporción 1:10 con agua estéril y amplificadas nuevamente con la técnica de PCR. Los carriles 8 y 9 de la parte superior del gel, corresponden a los morfos 2 y 5 que no amplificaron de manera correcta en la proporción 1:1 y se puede observar que en esta dilución las amplificaciones son exitosas.

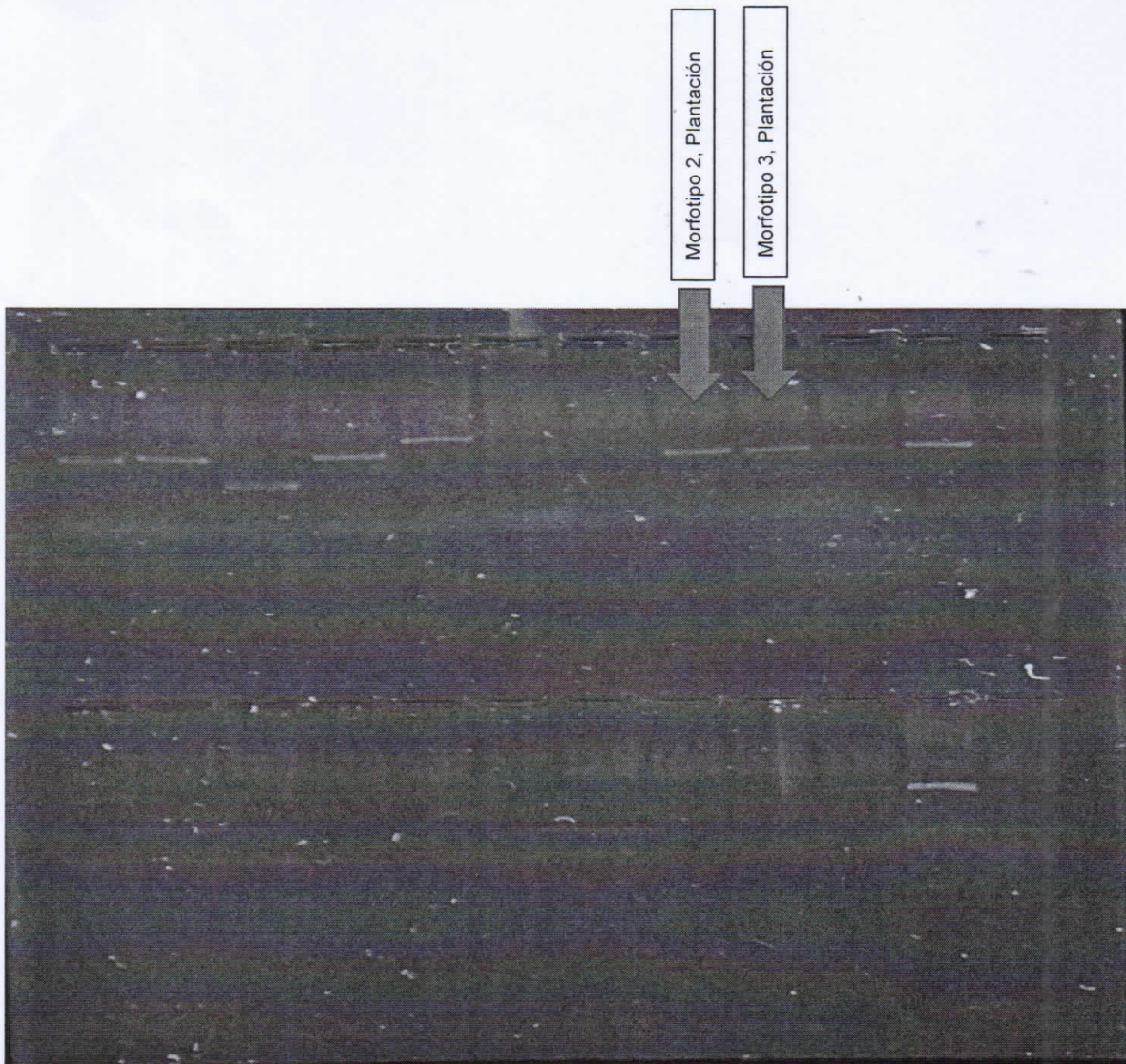


Figura 2. Amplificación de la región ITS de muestras de hongos. Los carriles 8 y 9 de la parte superior del gel, corresponden a los morfos 2 y 5 de la plantación en una proporción 1:10 en agua destilada y se puede observar que las muestras diluidas son capaces de amplificar mejor que en una proporción 1:1 solo para estas dos muestras.

Discusión

Descripción ecológica del género *Tomentella* correspondiente al morfotipo 1 de la plantación de *Pinus chiapensis*

Las bases de datos de secuencias reportadas en la literatura tanto de NCBI y UNITE, que es específica para ectomicorrizas. Nos dan un porcentaje de similitud del 96.53 % entre nuestra secuencia del morfotipo 1, con el género *Tomentella* sp. KX 358056 asociado al género *Pinus* y *Castanea* distribuidos al norte de América (Stephenson *et al.*, 2017). Y de 96.05% de similitud con la secuencia KT 275672 del género *Tomentella* sp. asociada al género *Salix* en Norteamérica (Erlandson *et al.*, 2015). En México secuencias parecidas han sido reportadas para *Alnus* y *Fagus* (Alvarez-Manjarrez *et al.*, 2016; Garay *et al.*, 2017), estos son arboles de bosque mesófilo de montaña, donde también se distribuye *Pinus chiapensis*.

Secuencia del morfotipo 1, del género *Tomentella* de la plantación de *Pinus chiapensis*

HQ ADN = 77.7%

```
GCTGGTCCCTGTACAGGGGCATGTGCACACTCTGTTTACACATCCACTCACA  
CCTGTGCACCCTCTGTACTTCTATGGCCTGGGTGGGCTCCGTCCTCCCGCTG  
TGGTTCTATGTCTTTACACACACACTACAACAAAGTCTCATGGAATGTATGTGCG  
CGTTTAACGCAATGAAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCAT  
CAATGAAAAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG  
AATCATCTAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTTGGCTATTCCGAAGGGCAT  
GCCTGTTTGAGTATCATGAACACCTCAACTCCTCATGGCTTGCCATGATGAGC
```

Morfotipo 1 de plantación: fotografía y descripción taxonómica

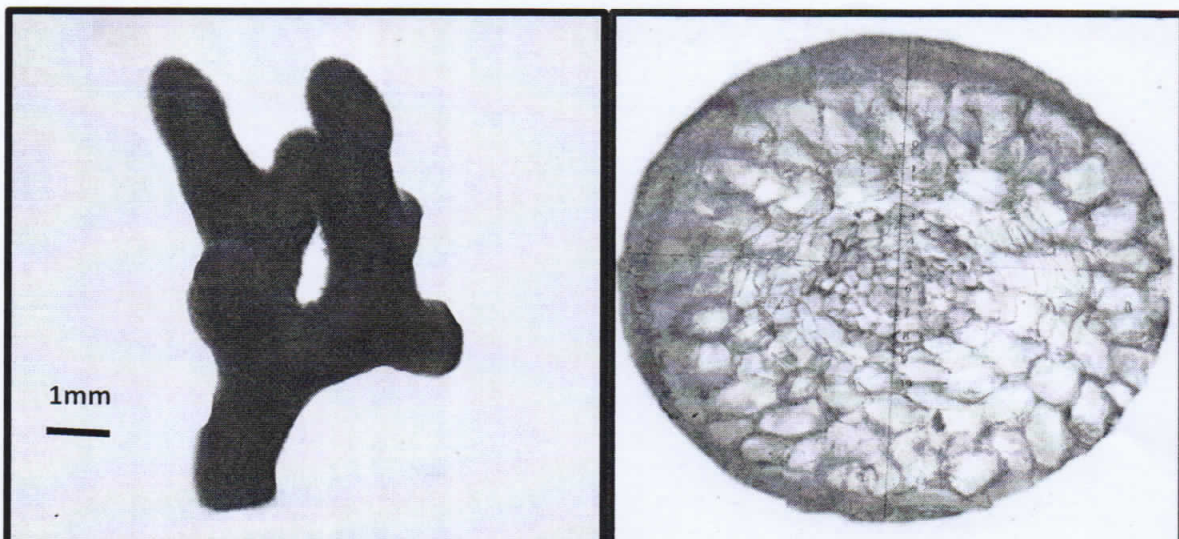


Figura 3. Fotografía de una raíz micorrizada asociada a *Pinus chiapensis*, correspondiente al morfotipo 1 de la plantación del género *Tomentella*. Presenta forma dicotómica a coralina de color café oscuro y manto de color negro. A la derecha un corte transversal del mismo morfotipo, se pueden observar la red de Hartig, penetrando entre las células corticales de la raíz.

Morfotipo 1 bosque: fotografía y descripción taxonómica

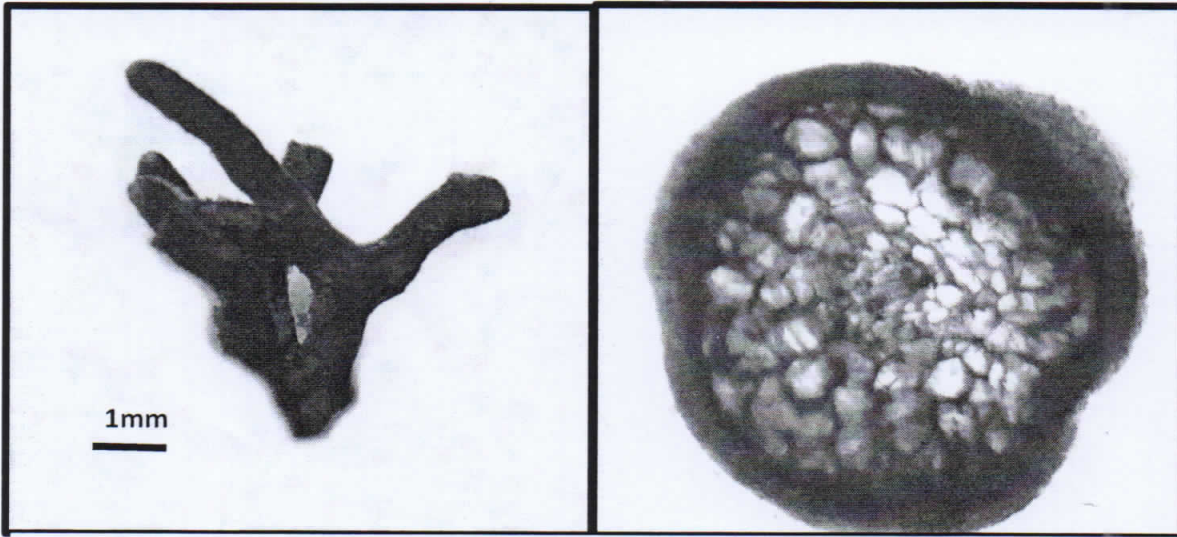


Figura 4. Fotografía de una raíz micorrizada asociada a *Pinus chiapensis*, correspondiente al morfotipo 1 del bosque perteneciente al género *Tomentella*. Presenta forma dicotómica color café oscuro con puntas amarillentas. A la derecha un corte transversal del mismo morfotipo, se pueden observar la red de Hartig, penetrando entre las células corticales de la raíz.

Tomentella sp2 + *Pinus chiapensis*. Micorriza dicotómica, delgada a regularmente pinnada. Longitud del eje principal de 8 mm de largo y diámetro del eje .5 mm. Estructura hidrofílica, con extremos derechos, la estructura presenta color negro con marrón oscuro en las ramificaciones las cuales son cilíndricas delgadas de 2 a 4 mm de longitud y .5 de diámetro, que se extienden irregularmente y presentan puntas de color naranja. El manto es negro y no permite ver las células de la superficie y no presenta regiones transparentes y presenta estructuras algodonosas de color café claro entre las ramificaciones. La estructura tiene de 4 a 8 puntas levemente hinchadas.

Capa interna del manto prectenquimatoso, presenta 5 capas de células corticales de forma radialmente oval a-elíptica algunas de forma cilíndricas orientadas oblicuamente. La red de Hartig penetra hasta la endodermis, células de la hifa alargadas y presencia de red de Hartig en todas las capas de células corticales.

Descripción ecológica del género *Clavulina* sp. correspondiente al morfotipo 4 de la plantación de *Pinus chiapensis*

Las bases de datos de secuencias reportadas en la literatura tanto de NCBI y UNITE, que es específica para ectomicorrizas. Nos dan un porcentaje de similitud del 99.68 % entre nuestra secuencia del morfotipo 4, con el género *Clavulina* sp. KX 389105 asociado al género *Pinus* y *Castanea* distribuido en Norteamérica dentro del bosque caducifolio de montaña (Ben *et al.*, 2017). Y un porcentaje de similitud del 99.84 % con el género *Clavulicium* sp. asociado al género *Castanea* distribuido en Norteamérica.

Cabe destacar que existe un reporte de una secuencia muy parecida con un 98% de similitud perteneciente al género *Clavulina* (Arguelles-Moyao y Garibay-Orijel, 2016)

Secuencia del morfotipo 4 de la plantación de *Pinus chiapensis*

HQ ADN= 99.8 %

```
AAACACCTGTGCACATTTAGAGAGGGTCTCCGAGTTCTCCTTGGAGTCCCTTC
CTCTCATTATACACTAGTTTTTAATATTGAACGTGATTGTGCCGTGAGGCCTTA
ATATTAATACAACTTTTAACACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC
GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT
TTTTGAACGCACCTTGCCTCCCTGGTATTCCGGGGAGCACGCCTGTTTCGAG
TGTCGTAAAATTCTCAAACCTGGGATGCTTTTTTGTTCCTCGGCTTGGTGTGG
GCTTTGCAGTTCCTTTGATTGGGATAGCTGGCCTCAAAGCATTAGCTGGCTT
```

Morfotipo 4 plantación: fotografía y descripción taxonómica

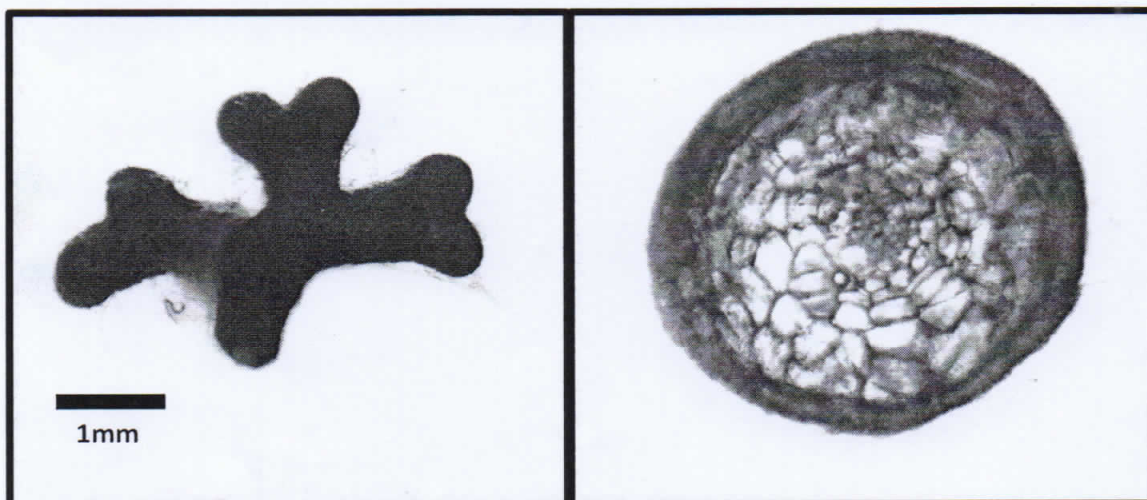


Figura 5. Fotografía de una raíz micorrizada asociada a *Pinus chiapensis*, correspondiente al morfotipo 4 de la plantación perteneciente al género *Tomentella*. Presenta forma dicotómica color negro oscuro con estructuras algodonosas. A la derecha un corte transversal del mismo morfotipo, se pueden observar la red de Hartig, penetrando entre las células corticales de la raíz.

Secuencia del morfotipo 2, 3, 5 de la plantación de *Pinus chiapensis*

La secuencia obtenida en el morfotipo 2 de la plantación de *Pinus chiapensis*, no tiene un porcentaje de calidad de ADN buena. Por lo que tratar de corregir toda la secuencia, agregando bases manualmente en el software de edición de secuencias de ADN. Nos podría dar resultados muy subjetivos y posiblemente erróneos al tratar de identificar nuestras secuencias comparándola con la base de datos. Las secuencias obtenidas para los morfotipos 3 y 5 tampoco tienen una calidad de secuencia buena los porcentajes de HQ para los tres morfotipos son .8%, .98% y 4.13% y el porcentaje mínimo requerido para tener certeza de nuestras especies es de 70% como mínimo, pero en algunos artículos la calidad de secuenciación debe ser más haya del 90% para poder identificar géneros de hongos correctamente utilizando ITS.

Curiosamente las secuencias de mala calidad, como lo es el caso de los morfotipos 2 y 3 de la plantación. Al realizar la amplificación de la región ITS mediante PCR amplificaron en concentraciones de ADN diluidas 1:10 como se muestra en la figura 2. A comparación de los morfotipos 1,4 de la plantación y morfotipo 1 del bosque que amplificaron con el ADN puro en concentración 1:1. Sin embargo las bandas obtenidas en esta diluciones 1:10 son muy parecidas a la banda del morfotipo 4, cuya secuencia es de alta calidad. Posiblemente el obtener la banda de ADN no garantiza una secuencia de buena calidad con el método de extracción de ADN utilizado en estos ensayos.

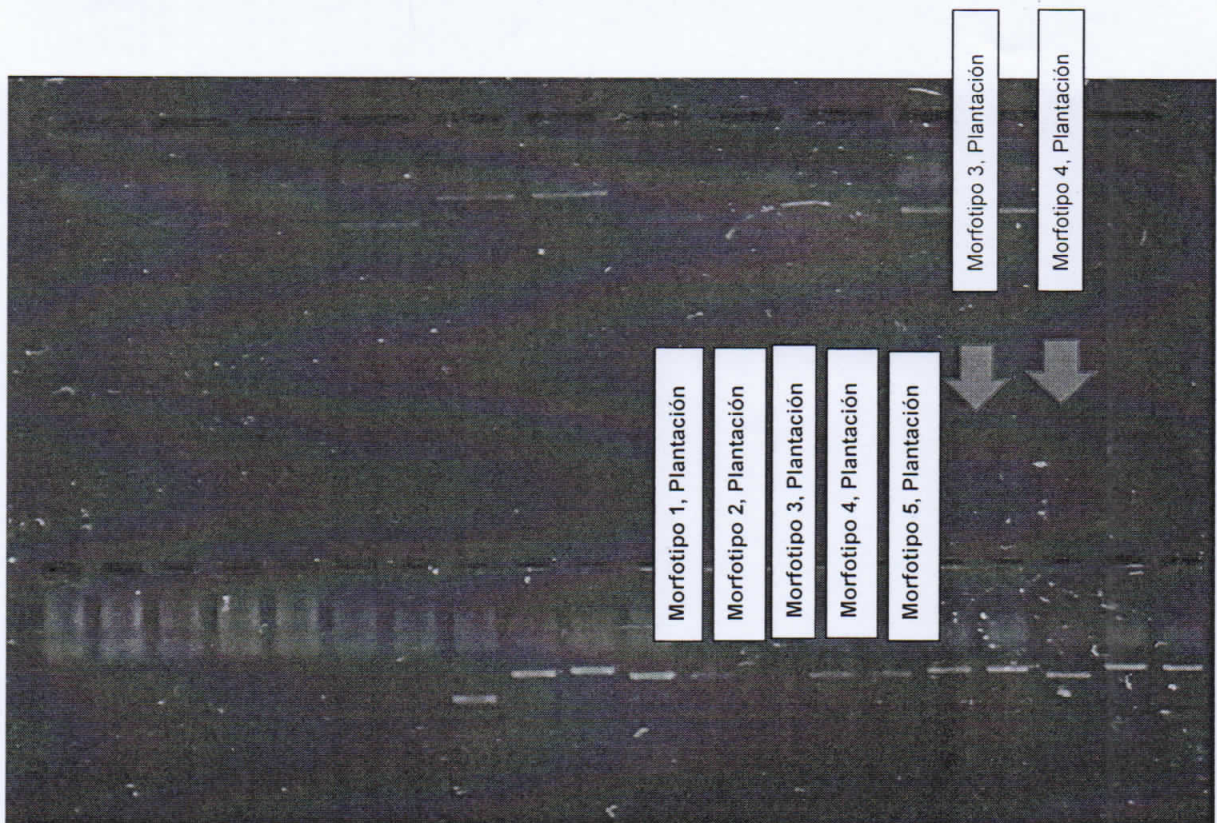
Revelado de productos de PCR mediante técnica de electroforesis

Para poder visualizar si las regiones ITS de nuestras muestras de ADN amplificaron, se realizó un gel de Agarosa al 10%, primero se pesaron .5g de agarosa y se diluyeron en 50mL de TBE 1X y se depositaron dentro del microondas 35 segundos para diluir completamente la agarosa, una vez que el líquido baja a una temperatura de 65°C, se depositan con una micropipeta .5 µL de Red Gel para revelar y se dejó polimerizar en una base para electroforesis con los peines puestos durante 35 minutos.

Una vez que el gel polimerizó, se depositó dentro de la cubeta electroforética la cual contenía buffer TBE 1X y se cargaron 5 µL de productos de PCR en cada pozo, hasta que se depositaron todas las muestras. Finalmente se corrieron las muestras a 85V durante 45 minutos y después se reveló el gen en un transiluminador para poder visualizar las bandas comparados con un control positivo de un hongo que ya conocíamos su peso molecular.

Resultados

Los resultados del primer gel muestran que las extracciones en concentración 1:1 son capaces de amplificar de manera exitosa, como se observa en la figura 1, las muestras de los carriles 11 al 15, representan los morfotipos del 1 al 5 de la plantación de *Pinus chiapensis*. Las muestras 1,4,5 de los carriles 11,14y15 presentan amplificación exitosa. Mientras que las muestras 2 y 3 de los carriles 12 y 13 no amplificaron de manera correcta. Sin embargo, en la parte superior del gel se repitieron dos muestras la 3 y 4 en los carriles 10 y 11 los cuales amplificaron de manera exitosa y fueron repetidos por falla técnica en los carriles inferiores.



Tomentella sp1 + *Pinus chiapensis*. Micorriza dicotómica a regularmente pinnada. Longitud del eje principal de 4 a 7 mm y diámetro del eje de 1.4 mm. Estructura hidrófoba, con extremos sinuosos. La estructura presenta color marrón oscuro con algunas regiones más claras. Las ramificaciones son cilíndricas con puntas color marrón oscuro, el manto cubre toda la estructura incluyendo las puntas, superficie manto brillante, verrugosa en la base de las ramificaciones. No hay presencia de rizomorfos ni cistidios. El manto no presenta septos, estructuras algodonosas blanquecinas en puntas de las ramificaciones y entre ellas. Presenta de 2 a 6 puntas micorrizadas.

Capa interna del manto pseudoparenquimatosa delgada, presencia de 5 capas de células corticales, de forma oval a-elíptica orientados oblicuamente, la red de Hartig penetra hasta la endodermis, células hifales casi redondas entre las células corticales, células de la calyptra ausentes y presencia de red Hartig en diferentes capas corticales.

Descripción ecológica género *Tomentella* sp2. correspondiente al morfotipo 1 del bosque de *Pinus chiapensis*

Las secuencias comparadas con la que más coincidía nuestra secuencia obtenida en las bases de datos de NCBI blast y UNITE, indican que nuestra secuencia tiene un porcentaje de similitud de 99.12% a la secuencia MF352803 perteneciente al género *Tomentella* sp. asociado con *Pinus sylvestris* y *Quercus robur* distribuidos en plantaciones mixtas en el Reino Unido (Suz *et al.*, 2017). Y un porcentaje de similitud de 98.26% con la secuencia KM576664 asociada a *Quercus robur* en Europa (Suz *et al.*, 2014). Estos géneros de hospederos también se distribuyen a nivel bosque mesófilo de montaña.

Secuencia del morfotipo 1 del bosque de *Pinus chiapensis*

HQ ADN= 96.41%

```
TGATTGAGGTCACCTTTCATAAGTGGAACGGATTCTGAATCGGCTCTACCAA  
CTTCCAATTGAGCCCAGATGAGAATTGGCCATCCCGAAAGATGGCCTCGGCG  
GTCAAATCATTATCGCGCTGAGTAGAACCCATGCCACATGAAAAGCCAGCTAA  
TGTTTTGAGGCCAGCTATCCCAGTCAAAGGAACTGCAAAGCCCAACACCAA  
GCCGAGAAACAAAAAGCGTCCCGTTTGATAATTTTACGACTCTAACGGG  
CGTGCTCCCGGATTACTAGGGAGCGCAACCTACGTTTCGAGCCTCAATGATT  
CAATGAATTCTGCAATTTTCTTACTTATCGCATTCTCTGCGTTCTTCATCTAT
```


Secuencia del morfotipo 2 de la plantación de *Pinus chiapensis*

HQ ADN= .81%

TGATTTCGAGGTCACCTTTCATAAGTGGAACGGATTTCGAATCGGCTCTACCAA
CTTCCAATTGAGCCCAGATGAGAATTGGCCATCCCGAAAGATGGCCTCGGCG
GTCAAATCATTATCGCGCTGAGTAGAACCCATGCCACATGAAAAGCCAGCTAA
TGTTTTTGAGGCCAGCTATCCCAGTCAAAGGAACTGCAAAGCCCAACACCAA
GCCGAGAAACAAAAAGCGTCCCCGTTTGATAATTTACGACACTCTAACGGG
CGTGCTCCCCGGATTACTAGGGAGCGCAACCTACGTTTCGAGCCTCAATGATT
CAATGAATTCTGCAATTTTCTTTACTTATCGCATTCTCTGCGTTCTTCATCTAT

Secuencia del morfotipo 3 de la plantación de *Pinus chiapensis*

HQ ADN= .98%

CTATCAAATTTTTTTTAAAATTCTCTTGATTCTCCGGCGGTTATTCTTTGCGCC
AAATTTTACAACCTGACAACCTTGAATTCGGAGAATCAAGAAATGTTTGAAATG
CAAACGCCCGGAAAATTGAAAATTTAGGGAAACAGCGAAATTTTGGAAGACC
CGTGGCCTCCCCGGGATTCCCGGGGGCCTCGCGTGTCCCGGGGGGTAAATT
CCCAAATGGGAAGGGTTTTTTGTTTCGGGGGGTAGGTTGGGGTTTGGGGGTC
CCTTGATTTGGATAACTGGGCCGCGACGCCTTAGAAGGCTTTTCCTGGGAATT
TGGCCTTCCAGCCGCGAGATAACCCCCCGCCGAGGAAAATTTTTCGGAAG

Secuencia del morfotipo 5 de la plantación de *Pinus chiapensis*

HQ ADN= 4.13%

TTCATCCAAACACCTGTGCACATTTAGAGAGGGTCTCCGAGTTCTCCTTGGAG
TCCCTTCCTCTCATTATACACTAGTTTTAATATTGAACGTGATTGTGCCGTGA
GGCTTAATATAACAACCTTTAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGAATCGATG
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGGGAATTGCAGAATTCAGTGAACC
ATCGAATTTTTGAACGCACCTGGCCCTCCCTGGAATTCGGGGAGCACGCCT
GTTTCGAGTGTGTAATAATTCTCAAACCTGGAATGCTTTTTTTGTTTCTCGGCTTGG
TGTTGGGCTTTGCAAGTCCCTTTGATTGGAATAGCTGGCCTCAAAGCATTAGC
TGGCTTTTCATGTGGCATTGGTCTACTCAGCGTAATAATGACCGGACCGCG
GAGGACATCTTTCGGGAGGGCCAATCCCCCATTGGCCTGCTTCTAATTTTGG

Clavulina sp. + *Pinus chiapensis*. Micorriza coraloide. Longitud del eje principal de 5 a 7 mm de largo y 2 mm de diámetro del eje. Estructura micorrízica hidrófoba con extremos doblados color negro. Las ramificaciones son dicotómicas y dobladas de forma cilíndrica, hinchada de longitud 4 mm y 2 mm de diámetro, las puntas son de color negro. El manto cubre toda la micorriza, con superficie arrugada y opaca. Presencia de rizomorfos de forma infrecuente, a distancia corta y suelto algodonoso de color café claro, presencia de hifas no distribuidas específicamente, rizomorfos de .2 a .5 mm y redondos de color negro, oblicuos. El manto presenta hifas dispuestas de manera irregular, opaca, sin septos y presenta de 6 a 12 puntas.

Capa interna del manto pseudoparenquimatoso, con 6 capas de células corticales de forma rectangular y oval elíptica, la red de Hartig penetra hasta la endodermis, las células de la hifa son apidermoide, presencia de células de calyptra y red de Hartig en todas las capas de las células corticales.

Conclusión

Las puntas de raíz micorrizadas de Pinos contienen gran cantidad de fenoles y taninos y el método el método XNAP para extraer ADN no elimina estas sustancias que son inhibidoras de la PCR, por lo que es muy difícil obtener la región ITS para identificar especies u géneros. Debido al gran porcentaje de endemismo de las ectomicorrizas. Cuando una secuencia esta por debajo del 100% de similitud y dos o más secuencias pertenecen a este género. Se pueden tomar datos de las secuencias mas similares como lo son de que país se reporta, el artículo donde se publicó la secuencia y los hospederos asociados a la secuencia.

Atentamente




Biol. Pedro Rios Cortes

Estudiante tercer semestre de la Maestría en Ciencias Biológicas



Vo. Bo. Dra. Rosario Medel Ortiz
Directora de tesis



Vo. Bo. Dr. Roberto Garbay
Asesor de la estancia