

IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ARBUSCULARES EN CULTIVOS DE LIMÓN MEXICANO (*Citrus aurantifolia*) TRANSGÉNICO

IDENTIFICATION OF ARBUSCULAR FUNGI IN TRANSGENIC MEXICAN LIME (*Citrus aurantifolia*)

Cruz-Gutiérrez, E.J.^{1*}; Gutiérrez-Espinosa, M.A.²; González-Chávez M. C.³; Franco-Ramírez, A.³; Xoconostle-Cazares, B.⁴; Pérez-Molphe, B.E.⁵; Robles-Gonzalez, M.M.⁶

¹Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Tepatitlan, Jal. ²Programa de Fruticultura, Área de Biotecnología, ³Programa de Edafología. Área de Microbiología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Carr. Méx.-Tex., Km 36.5. Montecillo, 56230. Méx. ⁴Cinvestav, Zacatenco DF, ⁵Universidad Autónoma de Aguascalientes, ⁶INIFAP, Tecomán, Colima.

***Autor responsable:** esmeraldajudith@gmail.com ó alexge@colpos.mx

RESUMEN

En condiciones naturales, los árboles de cítricos son dependientes de los hongos micorrizicos arbusculares (HMA) para su crecimiento, desarrollo y nutrición, sin embargo, el efecto de éstos en plantas de cítricos transgénicos se desconoce. De igual manera no se ha analizado como el ambiente rizosférico de estas plantas transgénicas se afecta y su repercusión sobre la diversidad de los mismos. Se realizó un estudio sobre la diversidad de esporas de HMA desarrollados en un suelo nativo del estado de Colima, México, donde se ubican árboles de *Citrus aurantifolia* transgénicos. Se observó que las plantas transgénicas tuvieron mayor diversidad de HMA, que las plantas no transgénicas. Los hongos predominantes en plantas transgénicas fueron *Racocetra fulgida*, *Gigaspora margarita*, *Funneliformis geosporum*, *G. microaggregatum*, *Sclerocystis coremioides*, *Sclerocystis taiwanesis*, *Sclerocystis clavispora* y *Sclerocystis sinuosa*, mientras que los predominantes en no transgénicas fueron *G. microcarpum*, *Acaulospora* sp. y *Sclerocystis sinuosa*.

Palabras clave: Glomeromycota, taxonomía, plantas transgénicas, micorriza arbuscular.

ABSTRACT

Under natural conditions, citrus trees depend on arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for their growth, development and nutrition; however their effect on transgenic citrus plants is unknown. Likewise, the manner in which the rhizosphere environment in these transgenic plants is affected has not been analyzed, nor their repercussion on diversity. A study was performed regarding the diversity of AMF spores developed in a native soil in the state of Colima, México, where transgenic *Citrus aurantifolia* trees are planted. It was observed that transgenic plants had a greater diversity of AMF than non-transgenic plants. The predominant fungi in transgenic plants were *Racocetra fulgida*, *Gigaspora margarita*, *Funneliformis geosporum*, *G. microaggregatum*, *Sclerocystis coremioides*, *Sclerocystis taiwanesis*, *Sclerocystis clavispora* and *Sclerocystis sinuosa*, while the predominant fungi in non-transgenic were *G. microcarpum*, *Acaulospora* sp. and *Sclerocystis sinuosa*.

Keywords: Glomeromycota, taxonomy, transgenic plants, arbuscular mycorrhiza.



INTRODUCCIÓN

La mayoría de las raíces de las plantas herbáceas, arbustivas y árboles, se encuentran colonizadas por hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Algunas especies leñosas que presentan raíces gruesas y con muy pocos pelos absorbentes, tales como, los cítricos, son más dependientes de estos hongos, que otras plantas con un sistema radical más abundante (Baylis, 1975). Los HMA auxilian a que las raíces de las plantas incrementen el volumen de exploración del suelo, y mejoran la absorción de nutrientes (González-Chávez *et al.*, 1998; 2000; Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2002; Ortas *et al.*, 2002). El género *Citrus* spp., presenta dificultades para el mejoramiento genético convencional, debido a que muchas de sus especies son apomícticas y sus semillas producen embriones nucelares que limitan el desarrollo de embriones cigóticos. Por tanto, es difícil recuperar una población grande de progenie para seleccionar plantas con características deseables (Peña y Navarro, 1999). La limitación también puede ser por incompatibilidad o autoincompatibilidad entre genotipos (Moore *et al.*, 1992) y juvenilidad prolongada (Grosser y Gmitter, 1990; Moore *et al.*, 1993) entre otras razones. Una alternativa para el mejoramiento de los cítricos es la transformación genética. Con este sistema pueden insertarse genes específicos foráneos dentro de un tejido vegetal receptor y así obtener una planta con características de interés agronómico sin la recombinación genética propia de la hibridación de dos progenitores. Algunas propiedades modificables mediante transformación genética de cítricos son la resistencia a plagas (Pérez-Molphe Balch y Ochoa-Alejo, 1998; Olivares-Fuster *et al.*, 2000), a plaguicidas, hábito de crecimiento y calidad del fruto (Pérez-Molphe Balch y Ochoa-Alejo, 1998). La transformación genética permite mantener íntegras las características del cultivar original, mientras se inserta un gen o genes para conferir una nueva cualidad (Bond y Roose, 1998; Pérez-Molphe Balch y Ochoa-Alejo, 1998), es decir, que generalmente no alteran el fenotipo, ni el comportamiento fenológico de la planta modificada genéticamente (Wassenegger, 2002). Sin embargo, es importante evaluar posibles cambios fisiológicos por ejemplo su capacidad para asociarse con HMA. Las evidencias muestran que las plantas transgénicas pueden cambiar la expresión de los genes que se le integran cuando son colonizadas por HMA, ya sea evitando o aumentando la colonización del hongo en la raíz, dependiendo de los genes integrados en la planta y el objeto buscado en la transformación (Bonfan-

te *et al.*, 1996; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1995). Con base a lo anterior, se evaluó la diversidad de HMA en la rizosfera de árboles transgénicos [transformados con *Agrobacterium rhizogenes* con los genes rol, nptII, GUS y el gen de la capa proteica del virus tristeza de los cítricos (Pérez-Molphe Balch y Ochoa-Alejo, 1998)] y árboles no transgénicos, con el fin de evaluar la repercusión sobre la diversidad de los HMA.

MATERIALES Y MÉTODOS

En dos etapas se tomaron muestras de suelo rizosférico (0-20 cm de profundidad) de árboles de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) transgénicos y no transgénicos de cuatro años de edad bajo condiciones de invernadero en invernadero en el campo experimental INIFAP, Colima, México. La primera etapa se realizó en marzo de 2004, y la segunda en junio de 2005. Los árboles se encuentran en macetas de aproximadamente 20-40 kg de suelo, la cantidad de suelo colectada por cada árbol fue de 0.5 kg, a una profundidad de 15 a 30 cm desde el nivel del suelo. Para cada muestra se realizó un tamizado por el método de Gerdemann y Nicolson (1963). Para la identificación de organismos, se separaron del tamizado de 15 a 20 esporas con características morfológicas semejantes y con hifa sustentora. Posteriormente se realizaron preparaciones permanentes en forma duplicada en laminillas con PVLG (polivinil alcohol lactoglicerol) y PVLG-reactivo de Melzer, respectivamente (Schenck y Pérez, 1990). Las preparaciones se dejaron secar en posición horizontal por 24 horas a temperatura ambiente. Una vez secas, las preparaciones se sellaron con esmalte transparente



para uñas alrededor del cubreobjetos. Las preparaciones se observaron en un microscopio en campo claro. Se consideraron como características relevantes para su identificación: el color de las esporas, tamaño y estructura de la pared, y forma de la hifa sustentora. Para ello se utilizó la tabla de colores del INVAM (<http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/speciesID.htm>). En esta tabla se utilizan varias combinaciones de los colores azul, magenta, amarillo y negro para dar diversas tonalidades que al compararse con el color de las esporas permiten definir su color.

El color de las esporas se expresa con la fórmula que indica la concentración de cada uno de los colores antes mencionados. La determinación de la estructura de la pared de cada esporas se basó en la descripción realizada por Walker (1983) con base a murógrafos. La forma de la hifa sustentora se determinó con base en las claves de Schenck y Pérez (1990). De las esporas con rasgos más representativos de la especie se tomaron fotografías con un microscopio invertido y uno de contraste de Normaski (Olympus, Modelo BX51, objetivos planaplo-cromáticos) para observar con detalle la estructura de la pared celular de las esporas. La identificación de las esporas se realizó siguiendo el enfoque de la clasificación actual de HMA (Redecker *et al.*, 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las características físicas y químicas del suelo de donde se tomaron las muestras indicaron pH alcalino de 7.7, con conductividad eléctrica de 1.93 ds m^{-1} , donde el efecto de la salinidad es casi nulo. La materia orgánica fue pobre (0.87%), al igual que el nitrógeno total (0.04%). En el caso de fósforo (Olsen) el contenido en el suelo fue bajo (4 mg kg^{-1}), al igual que el potasio (0.28

cmol Kg^{-1}). La textura fue migajón arenoso, evidenciando que el suelo fue pobre en nutrimentos (Vázquez y Bautista, 1993).

La diversidad de HMA en la rizosfera de las plantas transgénicas fue registró ocho especies, en comparación con la rizosfera de las no transgénicas con tres especies, observando diferencias en las especies presentes de los dos muestreos realizados (Cuadro 1). Lo anterior puede deberse a variaciones estacionales entre el primer y segundo muestreo. En la rizosfera de plantas no transgénicas, *Sclerocystis sinuosa* fue el HMA con mayor frecuencia, y su presencia se registró en ambos muestreos y rizósferas, mientras que en la rizosfera de las transgénicas fue *G. microaggregatum*. El hongo *Sclerocystis sinuosa* estuvo presente en la rizosfera de ambas plantas, transgénicas y no transgénicas.

Es relevante mencionar que la diversidad morfológica que se observó en este estudio, no representa la totalidad de HMA que pueden estar presentes en la rizosfera de las plantas de *C. aurantifolia*, transgénicas o no. Los HMA podrían haber estado colonizando las raíces de estas plantas sin haber esporulado en el período que se realizaron los muestreos (Douds y Millner, 1999). Adicionalmente, los HMA poseen estrategias de colonización y esporulación diferentes, por lo que un estudio estacional en períodos más cortos puede dar mayor información sobre la diversidad total de estos hongos en la rizosfera de cítricos. Estudios realizados por Hijri *et al.* (2006) indican que la diversidad morfológica medida por presencia de esporas puede subestimarse en el sistema suelo, y que aunado al estudio morfológico, el análisis ecológico y análisis molecular (Morton y Bentivenga, 1994) considerando raíces colonizadas y posiblemente micelio (en caso de poder

Cuadro 1. Especies de hongos arbusculares que se encontraron en la rizosfera de árboles de cuatro años de *Citrus aurantifolium* transgénicos y no transgénicos en dos épocas de muestreo.

Primer muestreo (marzo 2004)		Segundo muestreo (junio 2005)	
No transgénicos	Transgénicos*	No transgénicos	Transgénicos
<i>Sclerocystis sinuosa</i>	<i>G. microaggregatum</i>	<i>Sclerocystis sinuosa</i>	<i>G. microaggregatum</i>
<i>Acaulospora</i> sp.	<i>Funneliformis geosporum</i>		<i>Sclerocystis sinuosa</i>
<i>Glomus microcarpum</i>	<i>Racocetra fulgida</i>		<i>Sclerocystis coremioides</i>
	<i>Gigaspora margarita</i>		<i>Sclerocystis taiwanensis</i>
			<i>Sclerocystis clavispora</i>

* plantas transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* con los genes de selección (rol, nptII y GUS) y el gen de la capa proteica del VTC.

separarlo del suelo) completaría la información sobre la diversidad de estos HMA. La diversidad de especies de HMA también puede deberse a las características de las plantas transgénicas; ya que algunas de ellas mostraron un fenotipo alterado, con entrenudos cortos, hojas arrugadas y sistema radical muy desarrollado al ser modificadas genéticamente mediante *Agrobacterium rhizogenes* (Chávez-Vela et al., 2003). Otro factor pudo ser por la baja capacidad nutrimental del suelo, así como, por la estacionalidad de muestreo. Los resultados mostrados parecen ser los primeros en su género que relacionen el efecto de plantas transgénicas sobre la diversidad de HMA que crecen en ambiente de la rizosfera. La mayor diversidad observada debe analizarse en futuros trabajos con respecto al efecto que los HMA

pueden tener en la producción de dichos árboles, además de conocer si existen diferencias en la funcionalidad de las especies similares tales como, *Sclerocystis sinuosa*, y *G. microaggregatum* encontradas en ambas rizosferas de cítricos transgénicos o no. Para ello sería necesario establecer cultivos monospóricos e incrementar la cantidad de inóculo. Las Figuras 1 a 15 muestran detalles de las esporas de cada especie, ubicando las hifas y las paredes de las esporas.

CONCLUSIONES

La diversidad de los HMA en las muestras de suelo del campo experimental INIFAP, Colima no fue alta. Las muestras de suelo de la rizosfera de plantas transgénicas con genes de selección y con el gen de la capa proteica presentaron mayor

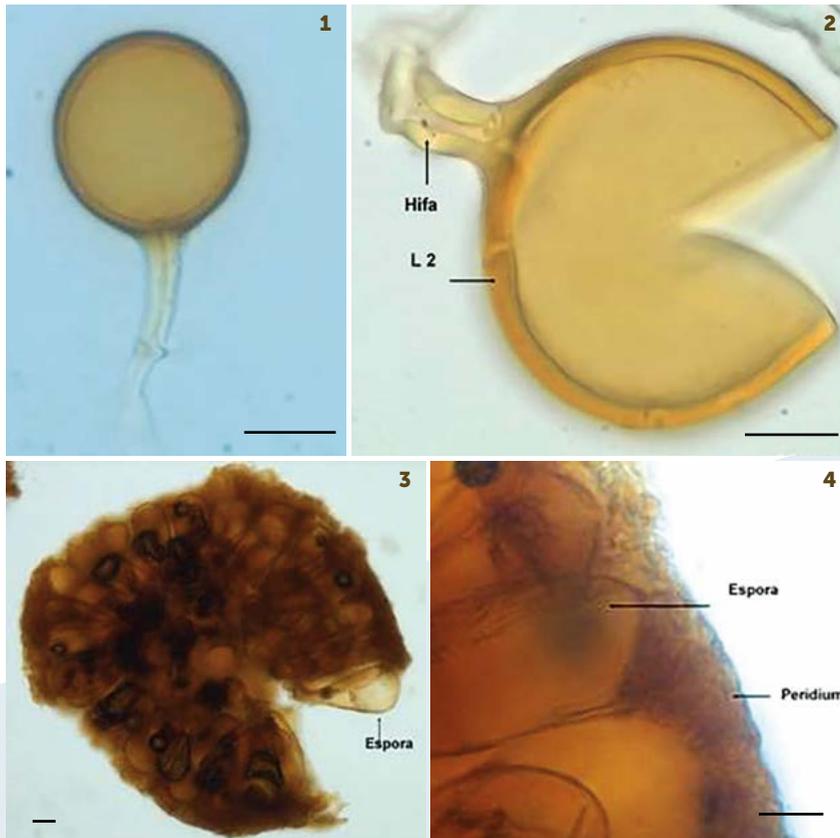


Figura 1. 1: *Glomus microcarpum* espora solitaria. 2: Espora rota, detallando la pared laminada (L2) y la hifa sustentadora. 3: *Sclerocystis sinuosa*, esporocarpio envuelto por el peridium de hifas. 4: Detalle de las esporas y peridium, Barra=30 μ m.

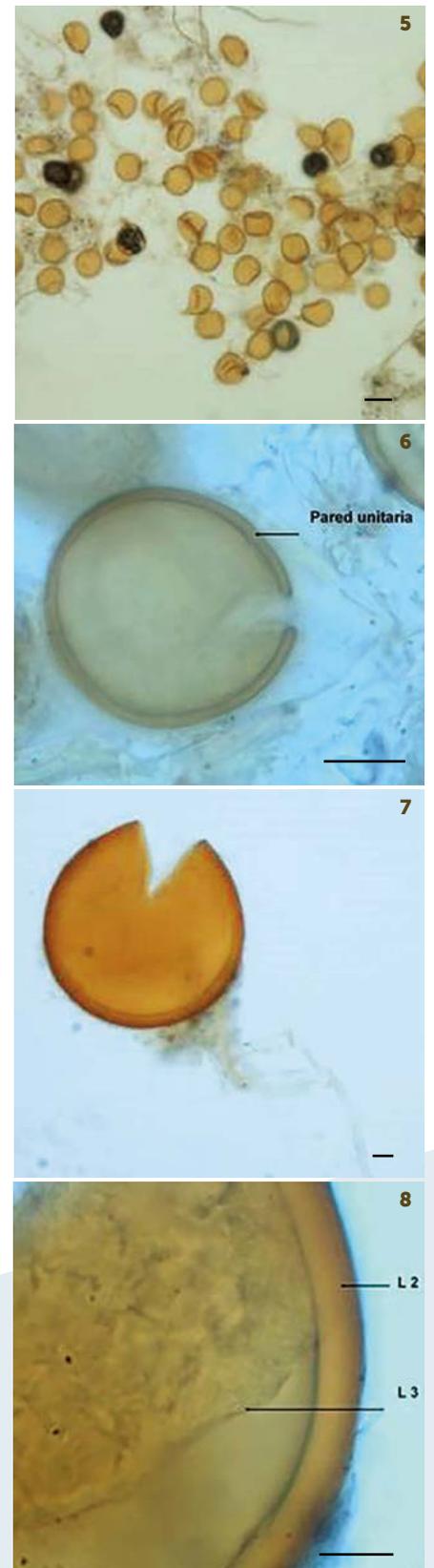


Figura 2. *Glomus microaggregatum* 5: Parte de un esporocarpio. 6: Detalle de una espora mostrando la pared unitaria. 7: *Funneliformis geosporum*, espora solitaria. 8: Acercamiento de una espora detallando las paredes, L2 pared rígida laminada, L3 pared membranosa Barra=30 μ m.



Figura 3. 9: *Racocetra fulgida* espora solitaria mostrando la forma de la hifa sustentora. 10: *Gigaspora margarita* espora solitaria. 11: Espora rota detallando la espora sustentora. Barra=30 μ m.

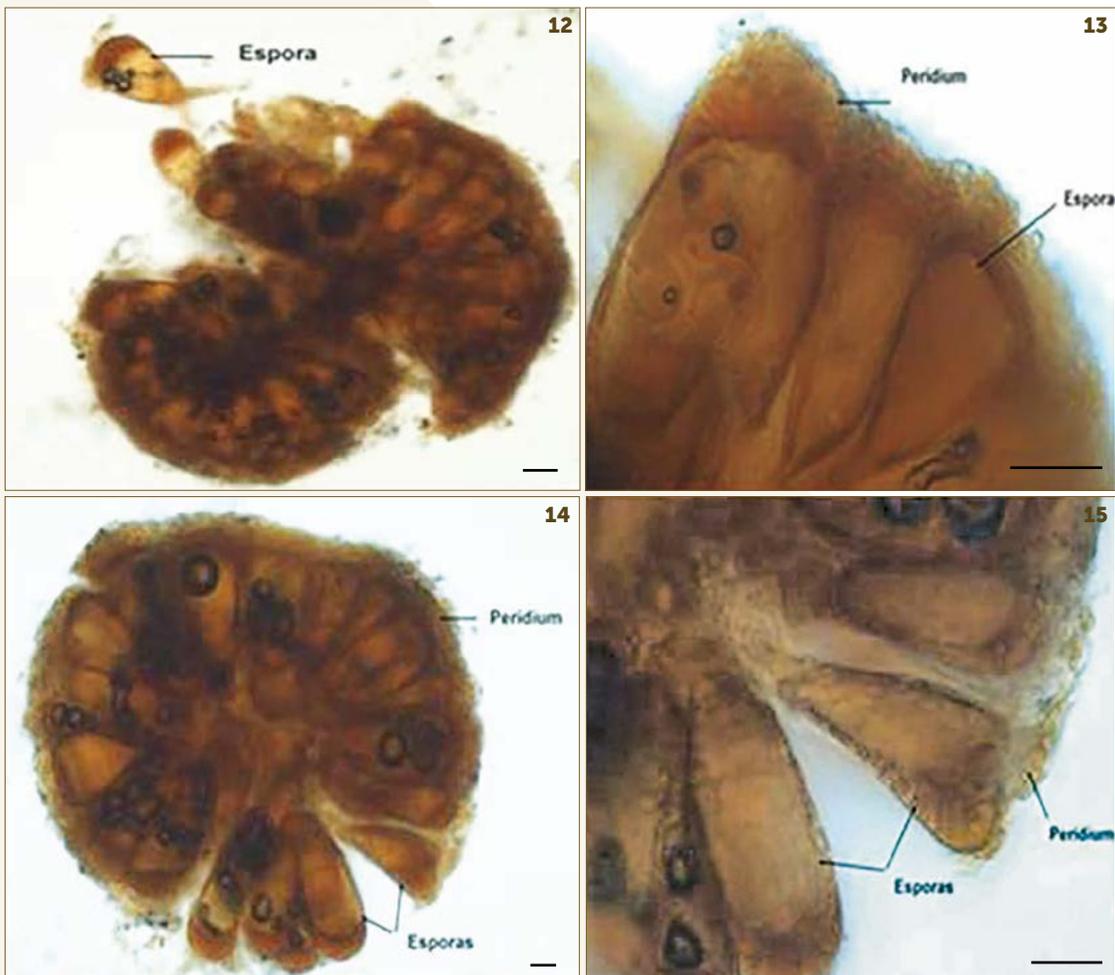


Figura 4. *Sclerocystis taiwanensis*. 12: Esporocarpio envuelto por el peridium de hifas. 13: Detalle de las esporas y del peridium. 14: *Glomus microcarpa*. 15: Esporocarpio mostrando el arreglo radial de las esporas. 15.- Detalle de las esporas y el peridium. Barra=30 μ m.

diversidad de esporas. La presencia de los HMA en los cítricos da pauta a un estudio ecológico más exhaustivo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Ronald Ferrera Cerrato por las facilidades brindadas en el laboratorio de Microbiología para la toma de las fotografías presentadas en este manuscrito.

LITERATURA CITADA

- Alarcón A., R. Ferrera-Cerrato. 2002. Aplicación de fósforo e inoculación de hongos micorrizicos arbusculares en el crecimiento y estado nutricional de *Citrus volkameriana* Tan and Pasq. Terra 21: 91-99.
- Baylis G.T.S. 1975. The magnoloid mycorrhiza and mycotrophy in root systems derived from it. In: Sanders F. E., B. Mosse y P. B. Tinker (eds.), Endomycorrhizas. Academic Press, London. 373-389.
- Bond J.E., Roose M.L. 1998. Agrobacterium-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington Navel Orange. Plant Cell Report 18: 229-234.
- Bonfante P., Bergero R., Uribe X., Romera C., Rigau J., Puigdomenech P. 1996. Transcriptional activation of a maize α -tubulin gene in mycorrhizal maize and transgenic tobacco plants. The Plant Journal 9: 737-743.
- Chávez-Vela N.A., Chávez-Ortiz L.I., Pérez-Molphe B.E. 2003. Transformación genética del naranjo agrio usando *Agrobacterium rhizogenes*. Agrociencia 37: 629-639.
- Douds D.D., Millner P.D. 1999. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. Agriculture, Ecosystems and Environment 74: 77-93.
- Gerdemann J.W., Nicolson T.H. 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Transactions of the British Mycological Society 46: 235-244.
- Gianinazzi-Pearson V., Gollotte A., Lhemnier J., Tisserant B., Franken P., Dumas- Gaudot E., Lemoine M.C., Van Tuinen D., Gianinazzi S. 1995. Cellular and molecular approaches in the characterization of symbiotic events in functional arbuscular mycorrhizal associations. Canadian Journal of Botany 73: 526-532.
- González-Chávez M.C., Ferrera-Cerrato R. 2000. Roca fosfórica y *Glomus* sp. en el crecimiento de naranjo agrio. Terra 18: 361-367.
- González-Chávez M.C., Ferrera-Cerrato R., Pérez-Moreno J. 1998. Biotecnología de la micorriza arbuscular en fruticultura. Universidad Autónoma de Tlaxcala y Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. 131 p.
- Grosser J.W., Gmitter F.G.Jr. 1990. Protoplast fusion and citrus improvement. Plant Breeding Reviews 8:339-374.
- Hijri I., Sýkorová Z., Ole F., Ineichen K., Madre P., Wiemken A., Redecker D. 2006. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. Molecular Ecology 15: 2277-2289.
- Moore G.A., Jacono C., Neidigh J.L., Lawrence S.D., Cline K. 1992. Agrobacterium-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Reports 11: 238-242.
- Moore G.A., Jacono C., Neidigh J.L., Lawrence S.D., Cline K. 1993. Transformation in *Citrus*. In: Bajaj Y. P. S. (eds.). Plant protoplasts and genetic engineering IV. Biotechnology in agriculture and forestry. Springer, Berlin Heidelberg New York 23: 194-208.
- Morton J.B., Bentivenga S.P. 1994. Levels of diversity in endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes) and their role in defining taxonomic and non-taxonomic groups. Plant Soil 159: 47-59.
- Olivares-Fuster O., Fleming G.H., Albiach-Marti M.R., Gowda S., Grosser J.W. 2000. Alternative citrus transformation with emphasis on disease resistance. In: Proceedings of the International Society of Citriculture. IX Congress. 2000. Florida. p. 88-90.
- Ortas I., Ortakçi D., Kaya Z., Çınar A., Önelge N. 2002. Mycorrhizal dependency of sour orange in relation to phosphorus and zinc nutrition. Journal of Plant nutrition 25: 1263-1279.
- Peña L., Navarro L. 1999. Transgenic citrus. In: Y. P. S. Bajaj (ad). Biotechnology in Agriculture and Forestry. 44. Springer – Verlag. Germany p.39-54.
- Pérez-Molphe B.E., Ochoa-Alejo N. 1998. Regeneration of transgenic plants of Mexican lime from *Agrobacterium rhizogenes*-transformed tissues. Plant Cell Reports 17: 591-596.
- Redecker D., Schüßler A., Stockinger H., Stürmer S.L., Morton J.B., Walker C. 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). Mycorrhiza 23: 515-531.
- Schenck N.C., Pérez Y. 1990. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. Published by Synergistic Publications Gainesville, USA. 286 p.
- Vázquez A.A., Bautista A.N. 1993. Guía para interpretar el análisis químico de suelo y agua. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de suelos. 29 p.
- Walker C. 1983. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: Spore wall characteristics in species descriptions. Mycotaxon 18: 443-455.
- Wassenegger M. 2002. Gene silencing – based disease resistance. Transgenic Research 11: 639-653.
- <http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/speciesID.htm>

