

DINÁMICA ESPACIO-TEMPORAL DE COMUNIDADES DE HONGOS ENDÓFITOS EN RAÍCES DE PASTOS DE LAS PRADERAS CANADIENSES

Juan Carlos Perez¹, Michael P. Schellenberg², James J. Germida³, Chantal Hamel²

1 Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. AA 3840, Medellín Colombia, Teléfono: 574 430 9304, e-mail: jcgperez@unal.edu.co

2 Semiarid Prairie Agricultural Research Centre, Box 1030, 1 Airport Rd. Swift Current, SK, S9H 3X1 Canada, Phone: +1 306-778-7264, e-mail: chantal.hamel@agr.gc.ca

3 Department of Soil Science University of Saskatchewan, 51 Campus Drive, Saskatoon, SK, S7N 5A8 Canada, Phone: +1 306 966-8487, e-mail: jim.germida@usask.ca

Introducción

Las simbiosis entre hongos endófitos y raíces de plantas son comunes en los ecosistemas terrestres y confieren tolerancia a múltiples condiciones adversas para las plantas. Las simbiosis con hongos micorrízico arbusculares (MA) son importantes para muchas plantas por mejorar la absorción de elementos como P y Zn, de difusión lenta en el suelo (Brundrett 2004). Los hongos comúnmente llamados hongos septados melanizados (HSM o DSE) parecen ser más importantes en la tolerancia de plantas a condiciones ambientales extremas (Jumpponen & Trappe 1998).

En las raíces de muchas plantas la simbiosis con ambos grupos de hongos ocurre simultáneamente (Mandyam & Jumpponen 2008). Sin embargo, las investigaciones se han concentrado en el estudio individual de cada grupo de hongos, lo que ha resultado en un conocimiento desbalanceado acerca de su ecología e importancia en ecosistemas agrícolas. Un gran número de publicaciones resalta la importancia de los hongos MA en el desempeño vegetal, aunque los HSM también podrían jugar un papel muy importante en ecosistemas secos o con variaciones extremas de temperatura, como las que se presentan en las praderas Canadienses. Las interacciones entre esos grupos de organismos también pueden ser muy importantes, ya que ambos obtienen carbono orgánico de las plantas (Brundrett 2004; Usuki & Narisawa 2007). Pero según teorías ecológicas clásicas (Gause 1934), al competir por recursos comunes es poco probable que hongos HSM y MA convivan en las raíces en forma estable.

El estudio simultáneo de hongos MA y HSM generalmente emplea técnicas microscópicas para analizar hifas teñidas en raíces. Pero la resolución de esos estudios es limitada ya que estos hongos muestran alta variabilidad genética y funcional (Corradi *et al.* 2007; Kageyama *et al.* 2008; Koch *et al.* 2006; Zijlstra *et al.* 2005). Por lo tanto en estudios de biodiversidad es deseable usar métodos con mayor resolución. En la presente investigación desarrollamos marcadores específicos para hongos MA o HSM con base en secuencias parciales del ADN ribosomal. Esos marcadores se usaron para identificar en el campo: 1) los cambios en la composición de esas comunidades de hongos en las raíces de cuatro especies de pastos, en diferentes tiempos de muestreo y horizontes del suelo y 2) como podrían interactuar las comunidades de hongos MA y HSM.

Materiales y Métodos

Este trabajo se realizó en el centro de investigaciones agrícolas para las praderas semiáridas (SPARC), en la ciudad de Swift Current, provincia de Saskatchewan, Canadá. Para ello se utilizaron parcelas en monocultivo de los pastos switchgrass (*Panicum virgatum* L.), crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* (L.) Gaertn.), green needlegrass (*Nassella viridula* Trin.) y western wheatgrass (*Pascopyrum smithii* (Rydb.) A. Löve), sembradas en el año 2001. las

parcelas se establecieron en un diseño en bloques completos al azar y con cuatro repeticiones cada una.

Para el muestreo de raíces durante los meses de Mayo, Agosto y Octubre, en cada parcela se tomaron dos muestras de suelo en los horizontes A y B. Las raíces de un mismo horizonte en cada parcela se extrajeron a mano y se combinaron. Luego se lavaron y se extrajo el ADN, que se amplificó utilizando la reacción en cadena de la polimerasa y “primers” específicos para hongos (Perez *et al.* 2009). Luego se utilizó la técnica basada en variación en longitud de fragmentos terminales de restricción o TRFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) para diseñar fragmentos de referencia en cultivos puros de hongos HSM o DNA clonado de hongos MA. Posteriormente se analizaron las muestras de raíces del campo con la misma técnica de TRFLP, y se compararon los fragmentos de ADN obtenidos de las raíces, con los fragmentos obtenidos de cultivos puros de HSM y hongos MA. Los métodos moleculares empleados aquí pueden consultarse libremente en internet (<http://library2.usask.ca/theses/available/etd-12222009-170513/>)

Los fragmentos de TRFLP para cada grupo de hongos se analizaron utilizando un modelo de efectos principales aditivos e interacciones multiplicativas (AMMI) utilizando el programa libre T-REX (Culman *et al.* 2008).

Para analizar las interacciones entre hongos MA y HSM se utilizaron pruebas de Mantel que correlacionaron matrices de similaridad calculadas para cada grupo de hongos, con base en índices de Bray Curtis (Legendre & Legendre 1998). Para la prueba de Mantel se utilizaron 100.000 permutaciones en el programa libre zt (Bonnet & Van de Peer 2002).

Resultados y Discusión

Los resultados indicaron cambios en la composición de las comunidades de ambos grupos de hongos entre Mayo y Octubre, y según el horizonte de muestreo.

Por ejemplo, en ambos horizontes los hongos HSM mas abundantes en Mayo y Agosto, fueron menos frecuentes en Octubre (IPCA1 $P = 0.00000$). Esos cambios sugieren una transformación gradual de las comunidades de hongos HSM a medida que avanza la estación de crecimiento y el desarrollo de diferentes tipos de plantas. En general la composición de hongos HSM en el horizonte A y B de los pastos *N. viridula*, *A. cristatum* and *P. virginatum* no fue significativamente diferente, pero la composición si cambió en *P. smithii*.

La cambios en la distribución de hongos MA a través del tiempo y en cada horizonte fueron diferentes a los observados para los hongos HSM, y esos cambios dependieron también de la planta analizada (IPCA1 $P = 0.0000187$). En el horizonte A, en *N. viridula* la composición de hongos MA no cambió en los tres muestreos, pero en *P. smithii* la composición cambio entre Mayo y Agosto. Sorprendentemente, en el horizonte B, Los hongos MA no se detectaron en Agosto en las raíces de esos dos pastos, sugiriendo una alta especialización ambiental en los hongos MA.

Para todos los pastos, la composición de hongos MA en raíces fué similar en Mayo y Octubre, pero la composición de hongos HSM fué diferente. Este comportamiento sugiere un comportamiento mas dinámico durante el año para las comunidades de hongos HSM, comparado en el comportamiento de los hongos MA.

Finalmente se encontró correlación significativa de la estructura de la comunidad de hongos HSM y MA. Es decir, cuando aumenta la complejidad de una ellas, aumenta también la

complejidad de la otra. Los resultados indican que tanto los hongos MA como HSM en raíces se adaptan a condiciones ambientales específicas y que su presencia es altamente dinámica. Proponemos que durante la estación de crecimiento esos cambios espacio-temporales en la composición de comunidades de hongos HSM y MA en las raíces, afecta en diferentes tiempos el funcionamiento de las plantas y los ecosistemas de pradera.

Referencias

- Bonnet E, Van de Peer Y. zt: a software tool for simple and partial Mantel tests. *Journal of Statistical software* **7**, 1-12. (2002)
- Brundrett M. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews* **79**, 473-495. (2004)
- Corradi N, Croll D, Colard A, et al. Gene Copy Number Polymorphisms in an Arbuscular Mycorrhizal Fungal Population? *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 366-369. (2007)
- Culman S, Gauch H, Blackwood C, Thies J. Analysis of T-RFLP data using analysis of variance and ordination methods: A comparative study. *Journal of Microbiological Methods* **75**, 55-63. (2008)
- Gause G. *The struggle for existence* Williams and Wilkins, Baltimore. (1934)
- Jumpponen A, Trappe J. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist* **140**, 295-310. (1998)
- Kageyama S, Mandyam K, Jumpponen. A Diversity, function and potential applications of the root-associated endophytes. In: *Mycorrhiza* (ed. Varma A). Springer, Berlin Heidelberg. (2008)
- Koch AM, Croll D, Sanders IR. Genetic variability in a population of arbuscular mycorrhizal fungi causes variation in plant growth. *Ecology Letters* **9**, 103-110. (2006)
- Legendre P, Legendre L. *Numerical Ecology*. Elsevier, Amsterdam; New York. (1998)
- Mandyam K, Jumpponen. A Seasonal and temporal dynamics of arbuscular mycorrhizal and dark septate endophytic fungi in a tallgrass prairie ecosystem are minimally affected by nitrogen enrichment. *Mycorrhiza* **18**, 145-155. (2008)
- Perez J, Hamel C, Germida JJ, Schellenberg MP. Evaluation of primer pairs for the analysis of fungal root endophytic biodiversity. In: *A textbook of molecular biotechnology* (eds. Chauhan A, Varma A), pp. 1255-1263. I.K. International Publishing House Pvt Limited, New Delhi. (2009)
- Usuki F, Narisawa K A. mutualistic symbiosis between a dark septate endophytic fungus, *Heteroconium chaetospira*, and a nonmycorrhizal plant, Chinese cabbage. *Mycologia* **99**, 175. (2007)
- Zijlstra J, Van't Hof P, Braakhekke W, et al. Diversity of symbiotic root endophytes of the Heliotiales in ericaceous plants and the grass, *Deschampsia flexuosa*. *Studies in Mycology* **53**, 147-162. (2005)