

# POLIMORFISMO BIOQUÍMICO DE SIETE ESPECIES DE HONGOS MICORRIZÓGENOS ARBUSCULARES INOCULADOS EN SORGO

Yakelín Rodríguez<sup>✉</sup>, E. Pérez, Regla M. Lara, F. Fernández, Blanca de la Noval e I. de la Providencia

**ABSTRACT.** The objective of the present work was to carry out a biochemical characterization of some arbuscular mycorrhizal species from the strain bank of the National Institute of Agricultural Sciences, for which inoculated *Sorghum bicolor* plants were studied and acid phosphatase and esterase isoenzymatic patterns were screened. Electrophoresis revealed the existence of only one polymorphic band in the acid phosphatase pattern, whereas esterase system showed a high frequency of polymorphic bands. The potential use of esterase isoenzymes, together with other enzymatic systems, was suggested to attempt an effective characterization of different arbuscular mycorrhizal fungi species.

**Key words:** esterases, acid phosphatase, isoenzymes, arbuscular mycorrhizae, sorghum, biochemical polymorphism, inoculation

**RESUMEN.** El presente trabajo tuvo como objetivo la caracterización bioquímica de algunas de las especies de micorrizas arbusculares del cepario del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), para lo cual se estudiaron en plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*) inoculadas los patrones isoenzimáticos de los sistemas fosfatasa ácida y esterasa. Las electroforesis revelaron la existencia de una sola banda polimórfica en el patrón de fosfatasas ácidas, mientras que el sistema esterasa mostró una elevada frecuencia de bandas polimórficas. Se resalta la utilización potencial de las isoenzimas estererasas, conjuntamente con otros sistemas enzimáticos, para efectuar una caracterización efectiva de las distintas especies de hongos micorrizógenos arbusculares.

**Palabras clave:** estererasas, fosfatasa ácida, isoenzimas, micorrizas arbusculares, sorgo, polimorfismo bioquímico, inoculación

## INTRODUCCIÓN

Las micorrizas del tipo arbuscular constituyen la simbiosis más extendida sobre el planeta, tanto por el número de hospederos como por su distribución. Más del 95 % de las especies vegetales existentes están micorrizadas de forma nativa y a su vez en un 95 % de los casos las micorrizas son del tipo arbuscular, pues constituyen las más apropiadas para desarrollar programas basados en agricultura de bajos insumos (1).

Durante el proceso de colonización radical por los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), se producen toda una serie de alteraciones fisiológicas y bioquímicas específicas, entre las cuales sobresalen la mejora en la absorción de nutrientes como el fósforo (P) y la inducción diferencial de sistemas enzimáticos.

Entre las distintas especies de HMA y aún en cepas o ecotipos pertenecientes a la misma especie exis-

ten marcadas diferencias funcionales, lo cual ha conllevado a que numerosos investigadores hayan dedicado su esfuerzo a la caracterización de estos hongos. Para ello se han empleado diversos métodos, siendo los más utilizados aquellos basados en las características morfológicas de las esporas y del micelio fúngico, tales como forma, tamaño, color, número de paredes, grosor, etc, los cuales requieren largos años de experiencia visual (2).

Tomando en consideración las dificultades en la identificación de estos hongos a partir de los métodos clásicos, en la actualidad se ha incrementado el uso de técnicas más avanzadas que incluyen tanto la detección inmunoquímica como el estudio de los marcadores bioquímicos, que constituyen alternativas más rápidas, sensibles y confiables (3, 4).

Las isoenzimas son formas moleculares de una misma enzima codificadas por diferentes alelos del mismo locus, que presentan la misma especificidad por un sustrato y que han sido ampliamente utilizadas en las investigaciones biológicas, producto de las ventajas que estas ofrecen sobre muchos marcadores morfológicos e incluso moleculares. Las técnicas electroforéticas nos permiten estudiar la inducción diferencial de las isoenzimas que caracterizan cada interacción planta-HMA, a nivel de especie, las cuales rigen las variaciones genéticas así como las similitudes y diferencias específicas de la simbiosis establecida.

Yakelín Rodríguez, E. Pérez e I. de la Providencia, Investigadores; Dr.C. F. Fernández, Investigador Auxiliar; Ms.C. Blanca de la Noval, Investigador Agregado del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas; Regla M. Lara, Especialista del Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP 32 700.

✉ yakelin@inca.edu.cu

Numerosas han sido las isoenzimas utilizadas por diferentes autores en los estudios de caracterización bioquímica, debido a su elevado nivel de polimorfismo y generalmente se obtienen buenos resultados; tal es el caso de las peroxidases, fosfatases ácidas, esterasas, superóxido dismutasas y proteínas totales, entre otras (5, 6, 7). Particularmente las esterasas están involucradas en el metabolismo del carbono, el cual es activo en raíces micorrizadas, dado el flujo de fotosintatos desde la parte aérea para satisfacer las demandas del microsimbionte.

Teniendo en cuenta todos estos aspectos, nuestro trabajo tuvo como objetivo estudiar el polimorfismo bioquímico de algunas especies de HMA pertenecientes al cepario del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), mediante la determinación de los patrones isoenzimáticos de fosfatases ácidas (EC 3.1.3.2) y esterasas (EC 3.1.1), con vistas a completar los estudios de caracterización de estos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

*Material fúngico y vegetal.* Se estudiaron siete especies de HMA del género *Glomus* pertenecientes al cepario del INCA, las cuales aparecen en la Tabla I.

**Tabla I. Relación de las especies de HMA estudiadas**

Tratamientos	Especies
Gf	<i>Glomus fasciculatum</i> (Gerd. & Trappe emend. Walker & Koske)
Gc	<i>Glomus clarum</i> (Nicolson & Schenck)
Gm	<i>Glomus mosseae</i> (Nicol. & Gerd.) Gerdeman & Trappe
Gcd	<i>Glomus claroideum</i> (Schenck & Smith)
Gs	<i>Glomus</i> sp2 (INCAM 3)
Ga	<i>Glomus</i> sp1(amarillo) (INCAM 1)
Gi	<i>Glomus intraradices</i> (Shenck & Smith)

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizaron como hospederos plantas de *Sorghum bicolor*. Se sembraron dos plantas por pote (5L) en un sustrato de arcilla caolinítica estéril (8) y se añadieron 75 g de inóculo de cada especie estudiada por pote, para un total de siete tratamientos. Los inoculantes micorrizógenos utilizados contenían 250 esporas/g (9).

*Condiciones de crecimiento y muestreo.* Las plantas de sorgo crecieron en condiciones protegidas, a humedad relativa y temperatura ambientes, así como fotoperíodo natural.

La toma de muestra se realizó a los cuatro meses después de la germinación. Los sistemas radicales fueron cuidadosamente lavados y pesados.

Se tomaron aproximadamente 200 mg de raíz por tratamiento para evaluar el porcentaje de colonización fúngica y la densidad visual mediante la metodología descrita (19).

*Extracción de proteínas.* Las raíces frescas fueron maceadas en mortero con nitrógeno líquido y el polvo resultante se homogeneizó en buffer de extracción Tris-HCl

50mM pH 7.2 (1:1, w/v), el cual contenía sacarosa 10 % y  $\beta$  mercaptoetanol 0.1 %. Los extractos crudos fueron agitados en zaranda durante 45 min. en baño de hielo. Al terminar se filtraron a través de malla de algodón doble y se centrifugaron a 14000 g por un período de 25 min a 4°C. El sobrenadante obtenido fue conservado a -20°C. Se procesaron tres réplicas en cada caso.

*Electroforesis.* Los análisis electroforéticos fueron efectuados en geles de poliacrilamida (PAGE) (reactivo calidad Fluka) en condiciones nativas utilizando 20 $\mu$ L de muestra en cada caso según el método descrito (11) con la siguiente modificación: gel concentrador (superior)-5 % y gel separador (inferior)-10 %.

Las electroforesis se realizaron en una cámara vertical *BIORAD miniprotean*, corridas a 25mA y 4°C por 90-120 min. Para ello se empleó *buffer* Tris-Glicina 19mM pH 8.3.

La actividad fosfatasa ácida en el gel se reveló en buffer citrato pH 5.5 conteniendo  $\beta$  naftil fosfato de sodio y *fast black K salt* (reactivos calidad Sigma) (12). Para la tinción de esterasas se incubó el gel en ácido bórico 3 % durante 30 min. y posteriormente se tiñó con una solución de  $\alpha$  y  $\beta$  naftil acetato 1 % (reactivos calidad Fluka) y *fast blue RR salt* (reactivo calidad BDH) (12). En ambos casos se incubó el gel en la oscuridad 4h a 37°C para el desarrollo del color.

*Análisis estadístico.* Los datos del porcentaje de colonización micorrízica transformados por  $\arcsen\sqrt{x}$  y los de densidad visual fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon según la prueba de rangos múltiples de Duncan con  $p \leq 0.05$  (Tabla II).

**Tabla II. Porcentaje de colonización micorrízica (% C) y densidad visual (% DV) en el tejido radical de las plantas de sorgo inoculadas con diferentes especies de HMA**

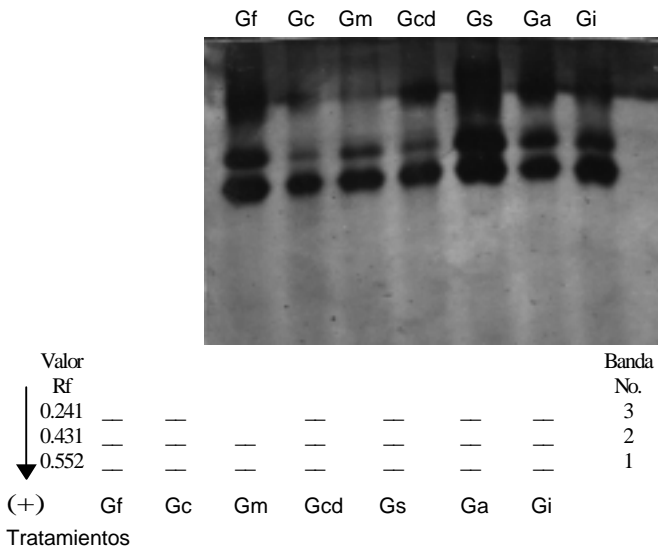
Tratamientos	% C	% DV
Gf	50c	6.32b
Gc	68a	10.87a
Gm	66a	10.02a
Gcd	55b	5.00bc
Gs	65a	11.83a
Ga	46c	4.30c
Gi	68a	11.97a
ES	0.27*	0.67*
CV (%)	3.03	3.59

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*Colonización fúngica.* En trabajos realizados por algunos autores (13, 14) se presentaron valores del porcentaje de colonización micorrízica entre 30-40 % en tomate y 19-60 % en cafeto, respectivamente, mientras que la densidad visual osciló entre 2 y 5 %. Los valores de los indicadores fúngicos evaluados en todos los tratamientos (Tabla II) resultaron elevados comparados con los in-

formas anteriores, lo cual está directamente relacionado con la buena calidad de los inóculos utilizados en el trabajo, así como con las óptimas condiciones empleadas para la producción exitosa de inóculo certificado en nuestro instituto. No obstante, obtuvimos diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos, destacándose las plantas inoculadas con *G. clarum*, *G. mosseae*, *G. sp2* y *G. intraradices*, probablemente debido a las diferencias en el nivel de infectividad entre las distintas especies así como al grado de compatibilidad entre ellas y el cultivo utilizado, a pesar de ser considerado el sorgo uno de los cultivos idóneos en la propagación y conservación de los inoculantes micorrizógenos (15).

**Análisis de las electroforesis.** La Figura 1 muestra el patrón isoenzimático de fosfatasas ácidas (Aps) y el zimograma correspondiente donde se aprecian tres bandas, de las cuales dos son monomórficas (no. 1 y 2), pues aparecen en todos los tratamientos y una es polimórfica (no. 3) al no estar presente en las plantas inoculadas con *G. mosseae*.



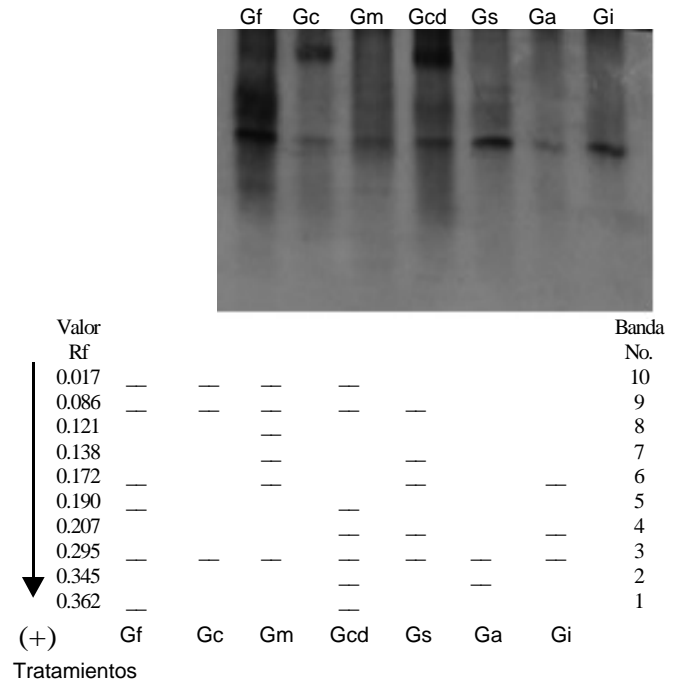
**Figura 1. Patrón isoenzimático y zimograma de fosfatasas ácidas de las siete especies de HMA inoculadas en sorgo a los cuatro meses**

Los HMA incrementan la eficiencia de la toma de P inorgánico del suelo por las plantas, lo cual se encuentra estrechamente relacionado con el aumento de la actividad enzimática radical de los sistemas involucrados directamente con el metabolismo de este elemento. Se ha detectado actividad polifosfato kinasa y polifosfato glucokinasa en extractos de hifas externas y raíces micorrizadas (16); además, se encontró mayor actividad exo y endopolifosfatasa, así como fosfatasa ácida no-específica en raíces colonizadas en comparación con las controles. Otros autores informan que una actividad fosfatasa alcalina específica de la micorriza está presente en hifas internas (17).

A pesar del notable incremento en la actividad Aps encontrado en raíces micorrizadas (18), los resultados obtenidos en este trabajo nos indican la existencia de una baja frecuencia de bandas polimórficas para esta

enzima en las especies estudiadas. Debemos tener en cuenta que todas las especies pertenecen a un género común. Estudios de caracterización realizados en otros microorganismos (19) revelaron resultados similares al no observar diferencias en el patrón isoenzimático de Aps.

La Figura 2 muestra el patrón isoenzimático y el zimograma de estererasas, en la cual se observa una elevada frecuencia de bandas polimórficas, pues de un total de 10 sólo una es monomórfica (no. 3) al aparecer en todos los tratamientos.



**Figura 2. Patrón isoenzimático y zimograma de estererasas de las siete especies de HMA inoculadas en sorgo a los cuatro meses**

El sistema esterasa es uno de los marcadores moleculares más utilizados en estudios de caracterización y variabilidad genética entre especies, variedades e individuos pertenecientes a una misma especie (20,21), obteniéndose generalmente buenos resultados dado su elevado nivel de polimorfismo. Un ejemplo lo constituye la caracterización de cepas de *Acetobacter diazotrophicus* (22) y *Haemophilus influenzae* (23), donde resultó ser una valiosa herramienta dado el elevado índice de diversidad genética encontrado, el cual fue mayor en el segundo caso. Además, se utilizó para caracterizar clones de plátano frutas y viandas (24), siendo la de mayor polimorfismo en sus patrones de bandas.

Esta isoenzima también ha sido estudiada para caracterizar la interacción planta-HMA. Se realizó la identificación de HMA en raíces de ajo y maíz mediante el empleo de electroforesis en geles de poliacrilamida que revelan la actividad de esta enzima (25). Por otra parte, se determinó el patrón isoenzimático de estererasas, con el fin de estudiar las variaciones en la expresión génica de estas en raíces de maíz inoculadas con *G. intraradices* y al aplicar formononetina, detectando incremento en la activi-

dad de cuatro isoenzimas causado por la micorrización a las dos semanas del crecimiento de las plantas.

Los resultados obtenidos en este trabajo apuntan hacia el uso potencial del monitoreo de isoenzimas específicas durante el establecimiento de la simbiosis, con el propósito de esclarecer y completar los estudios de caracterización morfológica de los HMA, que sugieren el uso de esterazas como marcador bioquímico en la interacción sorgo-micorriza arbuscular a los cuatro meses de germinadas las plantas, al menos para las especies estudiadas.

El estudio de un mayor número de sistemas isoenzimáticos podría dar una visión más amplia del metabolismo radical y la fisiología de los HMA. El desarrollo de nuevos marcadores moleculares y fisiológicos que definan la simbiosis micorrízica es esencial para comprender la interacción planta-microorganismo.

## REFERENCIAS

- Bonfante, P. y Perotto, S. Strategies of AM fungi when infecting host plants. *New Phytol.*, 1995, vol. 130, p. 3-21.
- Walker, C., Trappe, J. M. Names and epithets in the Glomales and Endogonales. *Mycol. Res.*, 1992, vol. 96.
- Sanders, I. R., Ravolarinirina, F., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. y Lemoine, M. C. Detection of specific antigens in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi using polyclonal antibodies to soluble spore fraction. *Mycol. Res.*, 1992, vol. 96, p. 477-480.
- Simon, L., Lolande, M. y Bruns, T. D. Specific amplification of 18S ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl. Environment Microbiol.* 1996, vol. 58, p. 291-295.
- Florida, M. Caracterización de variedades y especies silvestres de tomate atendiendo a características morfo-bioquímicas y tolerancia al calor. [Tesis de maestría]. Universidad de La Habana. Facultad de Biología, 1999.
- Jaaska, V. Isoenzyme differences between the wild diploid and tetraploid wheats. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1997, vol. 44, no. 2, p. 137-146.
- Fan, P. Cytological observation and isozyme detection on the abortion process of *cmst* and *cmSk* sterile lines in wheat. *Acta Agriculturae Boreali Cínica*, 1996, vol. 11, no. 1, p. 2-10.
- Fernández, F. Producto inoculante micorrizógeno. Oficina cubana de la propiedad industrial. Patente # 22641. 2001.
- Fernández, F.; Rodríguez, E. L. y Gómez, R. Caracterización de la efectividad de un nuevo inoculante micorrizógeno en Poaceas. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no. 2, p. 9-14.
- Herrera, P. A. /et al./ Estrategia de funcionamiento de la micorriza VA en un bosque tropical. Biodiversidad en Iberoamérica. Ecosistemas, evolución y procesos sociales. En: Programa Iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo. Subprograma XII, Diversidad Biológica, Mérida, 1995.
- Maribona, R. H.; Korneva, S.; Ruiz, A.; González, S. Obtention of sugar cane plants by tissue culture from different plant organs. Proceeding XVIII Cong. ISSCT, 1983, 2 610-621.
- Iglesias, L. Estudio de la variabilidad morfoagronómica y bioquímica en soya (*Glycine max* L. Merrill). [Tesis de Grado]. INCA, 1986.
- Terry, E., Pino, M. A. y Medina, N. Efectividad agronómica de Azofert y Ecomic en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Cultivos Tropicales*, 1998, vol. 19, no. 3, p. 33-37.
- Sánchez, C.; Rivera, R.; González, C.; Cupull, R.; Herrera, R. y Varela, M. Efecto de la inoculación de hongos micorrizógenos (HMA) sobre la producción de posturas de café en tres tipos de suelos del macizo montañoso Guamuhaya. *Cultivos Tropicales*, 2000, vol. 21, no. 3, p. 5-13.
- DeSouza, F. A.; Trufem, S. F. B.; DeAlmeida, D. L.; DaSilva, E. M. R. y Guerra, J. G. M. Effect of pre-crops on the inoculum potential of arbuscular mycorrhizal fungi and cassava yield. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 1999, vol. 34, no. 10, p. 1913-1923.
- Capaccio, L. C. M.; Callow, J. A. The enzymes of polyphosphate metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.*, 1982, vol. 91, p. 81-91.
- Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizae. II. Soluble alkaline phosphatase specific to mycorrhizal infection in onion roots. *Physiological Plant Pathology*, 1978, vol. 12, p. 45-53.
- Saito, M. Chapter 5: Symbiotic exchange of nutrients in arbuscular mycorrhizas: transport and transfer of phosphorus. (Y. Kapulnik and D. D. Douds, eds). In: *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. 85-86. 2000. Kluwer Academic publishers.
- Etebarian, H. R.; Wilcoxson, R. D.; Stewart, E. L. y Woodward, R. P. Some isozyme patterns of *Fusarium culmorum*. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 1996, vol. 32, no. 1-2, p. 9-21.
- Vladova, R. y Petkolicheva, K. Use of isozymes and seed storage proteins as chromosome markers in the study of tetraploid triticales. *Cereal Research Communications*, 1996, vol. 24, no. 4, p. 417-424.
- Celis, V. E. R. de; Brammer, S. P.; Gassen, D.; Valente, V. L. y Oliveira, A. K. Discrimination and comparison of three wheat aphid species based on isoenzyme patterns (Homoptera: Aphididae). *Brazilian Journal of Genetics*, 1996, vol. 19, no. 3, p. 399-404.
- Rojas, M. M.; Heydrich, M.; González, Y. Comparación de cepas de *Acetobacter diazotrophicus* mediante electroforesis de enzimas multilocus. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no. 1, p. 11-15.
- Blackall, P. J. /et al./ Analysis of *Haemophilus parasuis* by multilocus enzyme electrophoresis. *Veterinary Microbiol.*, 1997, vol. 56, p. 125-134.
- Román, M. I.; González, C.; Xiqués, X.; Alonso, M.; Acosta, R.; Sánchez, I.; Pérez, L. y Cazañas, J. Análisis genético-bioquímico de clones de plátano fruta y viandas (*Musa* spp). (Reporte corto). En: Taller Internacional de Biotecnología Vegetal. (ISBN: 959-16-0075-5), pp 39. Ciego de Avila, Cuba. 2001.
- Hepper, C. M.; Sen, R. y Maskal, C. S. Identification of vesicular-arbuscular fungi in roots of leek (*Allium porrum* L.) and maize (*Zea mays* L.) on the basis of enzyme movility during polyacrylamide gel electrophoresis. *New Phytologist.*, 1986, vol. 102, p. 529-539.
- Fries, L. L. M.; Pacovsky, R. S. y Safir, G. R. Expression of isoenzymes altered by both *Glomus intraradices* colonization and formononetin application in corn (*Zea mays* L.) roots. *Soil Biol. Biochem.*, 1996, vol. 28, no. 8, p. 981-988.

Recibido: 19 de junio del 2001

Aceptado: 29 de noviembre del 2001