

# ¿CÓMO ESTUDIAR LAS COMUNIDADES DE HONGOS MICORRÍDICOS Y SEGUIR LAS CEPAS UTILIZADAS EN REFORESTACIÓN, MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES ?

DÍEZ J. & J.L. MANJÓN

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL. FACULTAD DE CIENCIAS. UNIVERSIDAD DE ALCALÁ. 28871. ALCALÁ DE HENARES (MADRID). ESPAÑA.

## RESUMEN

La inoculación micorrícica probablemente se convertirá en una práctica habitual en programas de reforestación. Por ello, un objetivo primordial es desarrollar un método que permita analizar: (a) la estructura espacio-temporal de comunidades y poblaciones de los hongos micorrícicos en la zona reforestada; (b) el comportamiento de las cepas empleadas en los años posteriores a su introducción (persistencia, competitividad respecto a la flora micorrícica indígena, etc.). El método propuesto consta de las siguientes etapas: (a) recogida de muestras (micorrizas y carpóforos) en los años anteriores y posteriores a la reforestación; (b) obtención de los *fingerprints*; (c) representación la disposición espacio-temporal, de las individuos y especies, sobre un mapa; (d) interpretación de los resultados. La identificación de los hongos se realiza mediante tres tipos de marcadores moleculares. (1) RFLP de regiones del rDNA nuclear (ITS e IGS), permite discriminar entre especies, (2) RAPD y (3) *microsatellite-primed* PCR, permite identificar los diferentes *genets* dentro cada especie.

P.C.: Reforestation, Ectomicorrizas, Ecología Molecular, PCR.

## SUMMARY

Mycorrhizal inoculation with selected mycorrhizal fungi will most likely become a common practice in reforestation programs. It is therefore, imperative to develop a suitable methodology that would analyze: (a) the spatial-temporal structure of mycorrhizal communities and populations of mycorrhizal fungi in the reforestation site; (b) the behavior of the selected strain over the years, following its inoculation (stamina, resistance, competition with indigenous fungi, etc.). The suggested method should include the following stages: (a) harvest of the samples (mycorrhizae and fruitbodies) before and after reforestation; (c) securing the fingerprints; (d) plotting the spatial-temporal distributions of individual and species on maps; (d) analysis and interpretation with conclusions. The identification of fungi is carried out by tree type of fingerprinting. (1) RFLP of ITS and IGS regions of the nuclear rDNA which permits discerning the particular species, (2) RAPD and microsatellite-primed PCR (3) that distinguishes among different *genets* within each species.

K. W.: Reforestación, Ectomicorrizas, Molecular Ecology, PCR.

## INTRODUCCIÓN

La inoculación artificial de plantones empleados en forestación, con cepas seleccionadas de hongos ectomicorrícicos, está siendo utilizada para aumentar su supervivencia y crecimiento postransplante. (GROBE y LE TACON, 1993, etc.). Uno de los principales factores que afecta la eficacia de la inoculación, es la supervivencia y la competitividad de la cepa utilizada frente a la flora micorrícica presente en la zona reforestada (LE TACON *et al.*, 1992). Por ello, resulta importante desarrollar un método que permita analizar: (a) la estructura espacio-temporal de la comunidad y las poblaciones de los hongos micorrícicos que existen en la zona; (b) el comportamiento (persistencia, competitividad frente a la flora micorrícica indígena, etc.) de las cepas empleadas en inoculaciones artificiales, en los años posteriores a la forestación.

El estudio de los carpóforos que fructifican, no refleja la estructura micorrícica existente en el suelo. Por este motivo, se desarrollaron criterios morfológicos para identificar las hongos a nivel de sus micorizas (AGERER, 1987-1996). Estos métodos resultan laboriosos, y no faltos de inconvenientes, debido a las variaciones morfológicas que las micorizas de una misma especie presentan en función de su edad, estación y huésped, y los frecuentes fenómenos de convergencia morfológica. Por otra parte, tampoco permiten identificar los diferentes *genets* (entidades genéticamente diferentes) que forman cada especie. Hoy en día, es sin embargo posible identificar especies y *genets* a nivel de carpóforos y micorizas mediante marcadores moleculares, que generan huellas dactilares moleculares (*fingerprints*). Estos representan un imagen del DNA de cada individuo. Con ellos, se pueden estudiar las comunidades de hongos micorrícicos y monitorizar la persistencia de las cepas introducidas. (SANDERS *et al.*, 1990, HENRION *et al.*, 1992, HENRION *et al.*, 1994).

En el presente trabajo, presentaremos el esquema del método propuesto. Comentamos algunas de las técnicas para obtener *fingerprints*, para lo que presentamos resultados originales obtenidos en un bosque mediterráneo de *Pinus pinaster* en el noroeste de la Península Ibérica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- *Recogida de muestras.* En el bosque a analizar, se realiza un muestreo, recogándose cuerpos fructíferos y raíces que son conservadas congeladas hasta su utilización. Las muestras de la Figura 2, corresponden a un bosque de *Pinus pinaster* en el noroeste de la Península Ibérica.

- *Obtención de los fingerprints.* Se extrajeron el DNA de las muestras según HENRION *et al.* (1992). Las regiones ITS (*internal transcribed spacer*) y IGS (*intragenic spacer*) de los rDNA son amplificadas mediante PCR (*polymerase chain reaction*), utilizando los pares de *primers* ITS1-ITS4 y CNL12-5SA respectivamente, según HENRION *et al.* (1992), y posteriormente fueron digeridos con endonucleasas para obtener el RFLP (*restriction fragment length polymorphism*). La amplificación RAPD (*restriction fragment length polymorphism*) se realizó según DI BATTISTA *et al.* (1996), y *microsatellite-primed* PCR según MARTIN *et al.* (1996). Los productos fueron amplificados separados por electroforesis en gel de poliacrilamida PAGE (8 %), o gel de agarosa (2 %). Se utilizó un marcador de peso molecular (DNA del fago  $\phi$ X 174 cortado con *Hae* III). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y fotografiados bajo luz ultravioleta.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

\* *El método propuesto.* La Figura 1, representa un esquema del método propuesto. Imaginemos un bosque en el que se realiza una plantación, en una zona deforestada del mismo. Se utiliza para ello plantones micorrizados con una cepa de un hongo que mejora el crecimiento y la supervivencia postrasplante, o/y que produce cuerpos fructíferos comestibles. Se desea analizar el comportamiento de la cepa introducida respecto a la comunidad de hongos micorrícicos presentes en la zona, en los años posteriores a ser introducida. Los pasos a realizar son los siguientes. (1) Se recogen muestras (carpóforos y micorrizas) en el bosque en los años de reforestación, anterior y posteriores. (2) Se obtienen los *fingerprints* para la identificación de especies y *genets*. (3) Se localizan las muestras ya identificadas sobre el mapa, con lo que se obtiene la estructura espacial de la comunidad y sus poblaciones. (4) La dinámica de estas se analiza a lo largo del tiempo, mediante la comparación de la estructura espacial de diferentes años. (5) Finalmente, se interpretan los datos.

En el ejemplo hipotético se identificaron los *fingerprints* *a1*, *a2*, *b1*, *b2*, y *c*. Los *fingerprints* *a1* y *a2* corresponden a dos *genets* diferentes de la especie *a*, los *fingerprints* *b1* y *b2* corresponden a dos *genets* diferentes de la especie *b*, el *fingerprint* *c* pertenece a la cepa con la que se realizó la forestación. Suponiendo, que el mapa representado en el esquema representase la estructura espacial varios años después de la reforestación, se podría concluir, que la cepa introducida resulta desplazada por las poblaciones presentes en la zona donde se realizó la reforestación, especialmente por el *genet* que posee el *fingerprint* *a2*.

### \* *Fingerprints.*

- *RFLP/PCR de regiones del rDNA nuclear.* Los RFLP de ITS del rDNA nuclear de las especies estudiadas nos han permitido diferenciar entre especies. GARDES *et al.* (1990) y HERNION *et al.* (1992) han utilizado este método para la identificación de especies. HERNION *et al.* (1994) han detectado cierto polimorfismo en los RFLP de la región IGS de poblaciones indígenas e introducidas de *Laccaria* spp., lo que utilizaron para monitorizar la persistencia de las cepas introducidas.

- *RAPD y microsatellite-primed PCR.* La Figura 2, muestra diversos *fingerprints* obtenidos por RAPD, con los *primers* 152 (a) y 174 (b), para varios hongos micorrícicos presentes en un bosque de *Pinus pinaster* en el noroeste de la Península Ibérica. Los *fingerprints* de los carriles 1 (*Lactarius deliciosus*) es diferente de los del carril 2 (*Amanita muscaria*), 3 (*Amanita gemmata*) o de los 4, 5 (que corresponden a un mismo *genet* de *Boletus pinophilus*). Los patrones de bandas resultan ser muy diferentes entre las especies, aunque son muy semejantes entre los *genets* pertenecientes a la misma especie, donde la presencia o ausencia de ciertas bandas permite discriminar entre ellos. Mediante *Microsatellite primed PCR*, se obtuvieron patrones de bandas más conservados que los RAPD, lo que permite usarlos a la vez para identificar especies como para diferenciar entre sus *genets*. DÍEZ *et al.* (1996), han mostrado que RAPD y *microsatellite-primed PCR*, permite identificar los diferentes *genets* dentro de cada especie, y son capaces incluso de identificar diversos *genets* en poblaciones de *Terfezia arenaria*, en estudios llevados a cabo en bosques tipo-dehesa del Centro-Oeste de la Península Ibérica. El *microsatellite primed-PCR* presenta ventajas sobre el RAPD, al producir *fingerprints* más reproducibles y eliminar bandas no constantes (MARTIN *et al.*, en prensa). Por estos motivos, puede convertirse en una técnica preferible a utilizar respecto a las técnicas de RAPD. Sin embargo, estas dos técnicas presentan sobre el ITS/RFLP la desventaja de no

ser utilizables a nivel de las raíces, ya que utilizan *primers* no específicos, por lo que se pueden producir interferencias con el DNA de la planta.

## CONCLUSIONES

1) El método se resume en las siguientes etapas. (a) Recogida de muestras (micorrizas y cuerpos fructíferos) en el año de la reforestación y posteriores. (b) Obtención de los *fingerprints*. (c) Representación sobre un mapa la disposición espacio-temporal de los individuos y especies. (d) Análisis e interpretación de los resultados.

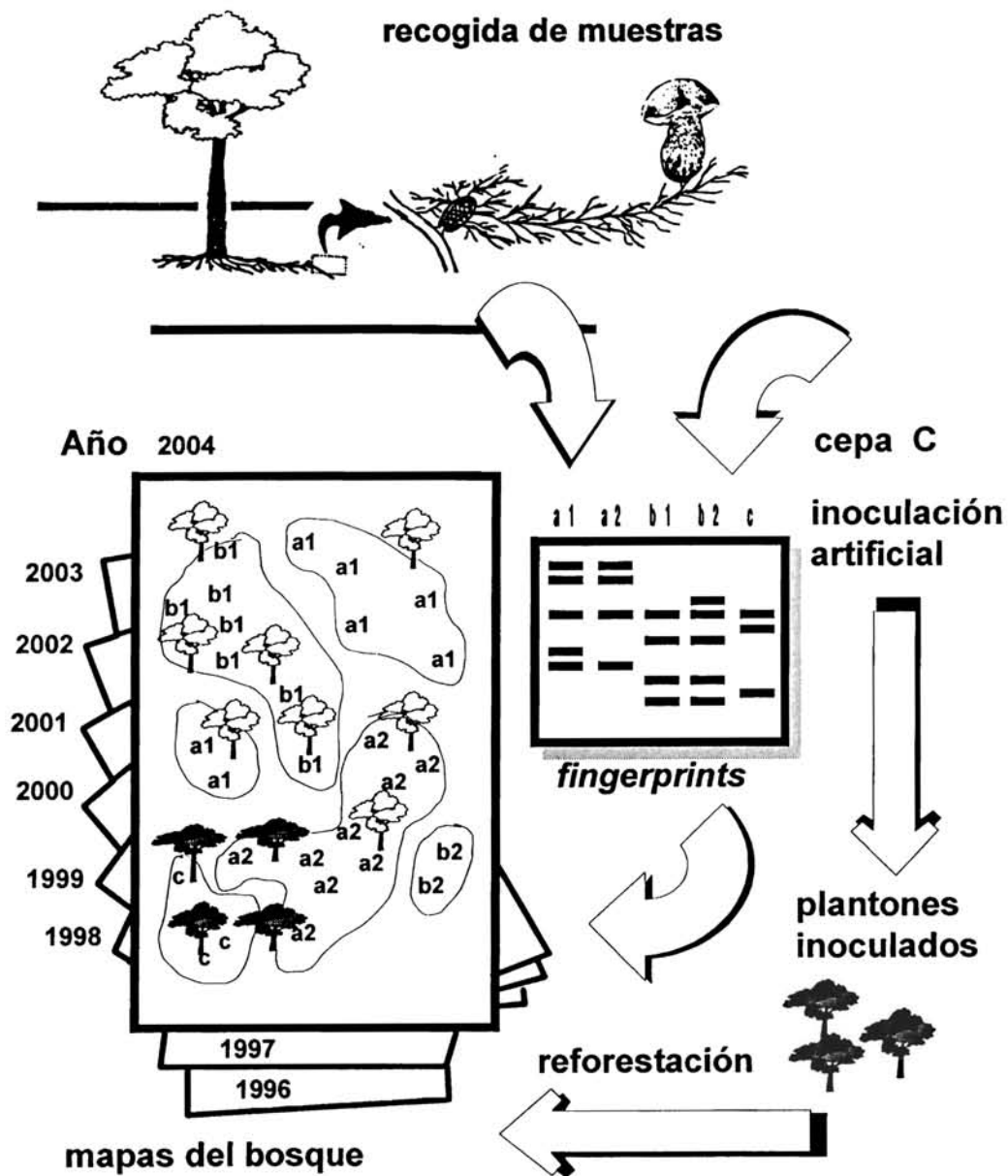
2) Tres tipos de *fingerprints* pueden ser utilizados. PCR/RFLP permite identificar las especies, RAPD y *microsatellite-primed* PCR generan *fingerprints* capaces de identificar *genets*. El primero es utilizable directamente tanto sobre carpóforos, aislados miceliares como micorrizas, los dos últimos sólo lo son para carpóforos y aislados miceliares.

## AGRADECIMIENTOS

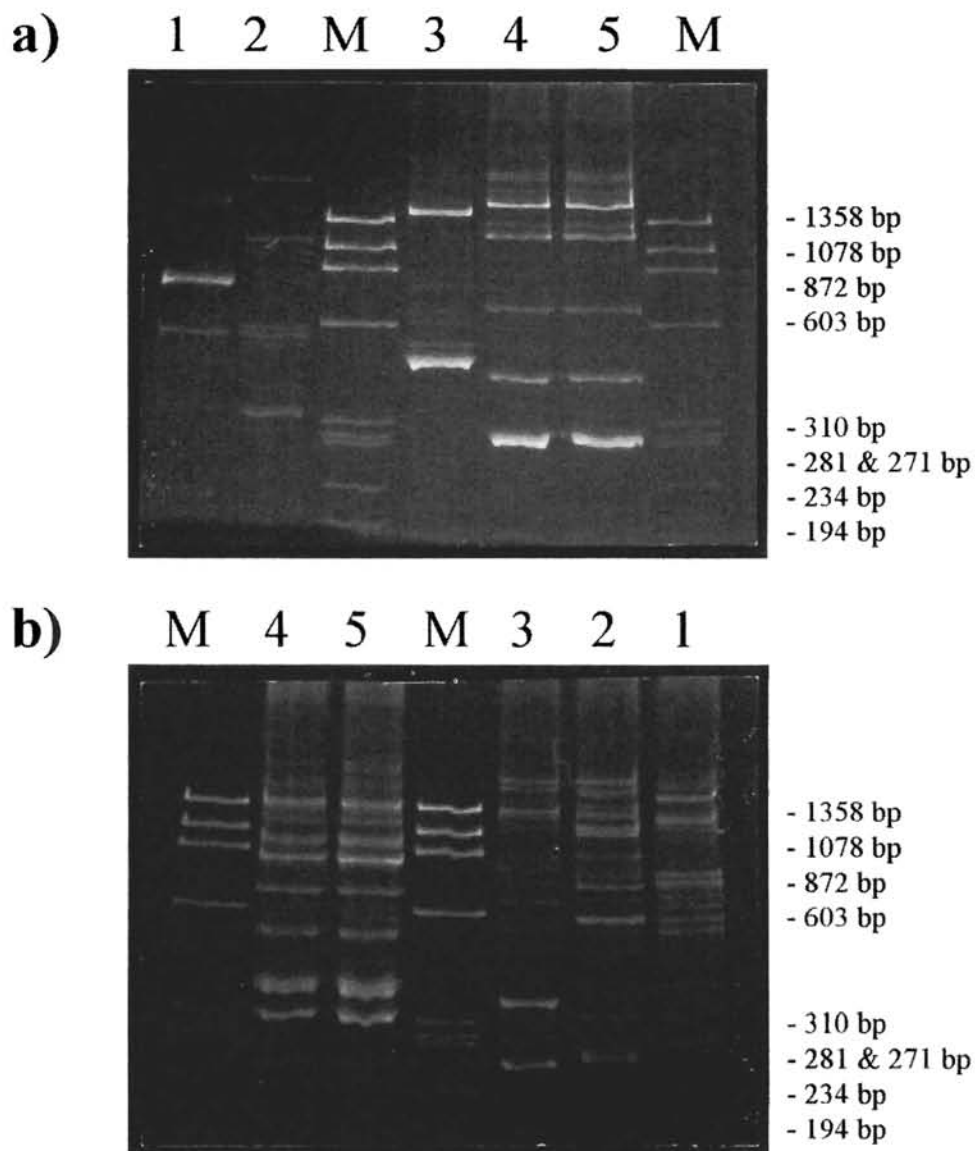
Los autores agradecen a F. Martin, M.A. Selosse, C. Delaruelle, y C. Di Battista del *Centre de Recherches Forestières* de INRA-Nancy (Francia), por su ayuda en las técnicas de biología molecular. También al INIA (SC94-129). J. Díez agradece al MEC y a la Fundación Caja de Madrid por el apoyo económico para la realización de este trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- AGERER, R. (1987-1996). *Colour atlas of mycorrhizae*. Einhorn, Schäbisch Gmund.
- DI BATTISTA, C.; SELOSSE, M.A.; BOUCHARD, D.; SENSTRÖN, E. & LE TACON, F. (1996). Variations in symbiotic efficiency, phenotypic characters and ploidy level among different isolates of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* strain S 238. *Mycol. Res.* 100 (11): 1315-1324.
- DÍEZ J.; MARTIN, F. & MANJÓN, J.L. (1996) Biodiversity of the desert truffles associated with *Tuberaria guttata* in the Mediterranean Spanish vegetation. *First International Conference on Mycorrhizas*. Berkeley, USA. Abstract Book. p. 43.
- GARDES, M.; WHITE, T.J.; FORTIN, J.A.; BRUNS, T.D. & TAYLOR, J. W. (1991). Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can. J. Bot.* 69:180-190.
- GROBE, T.S. & LE TACON, F. (1993). Mycorrhiza in plantation forestry. *Advances Pl. Pathol.* 23: 191-227.
- HENRION, B.; LE TACON F. & MARTIN, F. (1992). Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytol.* 122:289-298.
- HENRION, B.; DI BATTISTA, C.; BOUCHARD, D.; VAREILLES, D.; THOMPSON, D.; LE TACON, F & MARTIN, F. (1994). Monitoring the persistence of *Laccaria bicolor* as an ectomycorrhizal symbiont of nursery-grown Douglas fir by PCR of the intergenic spacer. *Molecular Ecology* 3:571-580.
- MARTIN, F.; COSTA, G.; DELARUELLE, C. & DÍEZ, J. (en prensa). Genomic fingerprinting of ectomycorrhizal fungi by microsatellited-primed PCR. *In: A. VARMA A. & B. HOCK (Eds.), Mycorrhizal Lab Manual*. Springer-Verlang. Berlin.



**Figura 1.** Esquema explicativo del análisis de comunidades y poblaciones micorrícicas, y monitorización de una cepa fúngica introducidas en programas de reforestación. Se refleja el desplazamiento de la cepa introducida (c) por el *genet* (a2). (Dibujo J. DÍEZ).



**Figura 2.** Fingerprints de varios hongos ectomicorrícicos, de un bosque de *Pinus pinaster* en el noroeste de la Península Ibérica, obtenidos por RAPD utilizando los primers 152 (a) y 174 (b). (M = DNA del fago  $\phi$ X 174 cortado con *Hae* III, 1 = *Lactarius deliciosus*, 2 = *Amanita muscaria*, 3 = *Amanita gemmata*, 4 = 5 = *Boletus pinophilus*).