

MICROBIOTA ASOCIADA A ESTRUCTURAS MORFOLÓGICAS EN HELECHOS DE LA SIERRA DE PÉNJAMO, GUANAJUATO

César Eduardo Vargas Pérez ¹, Juan Gualberto Colli Mull ²

RESUMEN

En el presente trabajo se llevó a cabo el aislamiento y la caracterización de la microbiota asociada a estructuras morfológicas y a nivel rizósfera en tres especies de helechos. Se colectaron muestras de suelo, hoja, esporangios, raíz y rizósfera de *Dryopteris rossii*, *Osmunda regalis* y *Woodwardia spinulosa* las cuales difieren en el tipo de hábitat donde se desarrollan cada una de ellas. Se obtuvieron tanto aislados bacterianos como fúngicos, identificando de estos últimos seis géneros. Los aislados bacterianos se sometieron a análisis tipo ARDRA el cual muestra que las tres especies de helechos tienen una diversidad diferente de microorganismos pero grupos bacterianos relacionados filogenéticamente. Estos resultados plantean que las tres especies de helechos tienen una alta diversidad propia de microorganismos y algunas son comunes para las tres especies.

PALABRAS CLAVE

Diversidad, bacterias, hongos, pteridofitas, microbiología.

¹ Licenciatura en Biología, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato. Km 12.5 carretera Irapuato-Silao. Col. El Copal. C.P. 36821, Irapuato, Guanajuato, México. cesar.e.vargas15@gmail.com

² Profesor-Investigador Titular C. Biología, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato. Km 12.5 carretera Irapuato-Silao. Col. El Copal. C.P. 36821, Irapuato, Guanajuato, México. jcolli@itesi.edu.mx

INTRODUCCIÓN

El suelo integra una compleja red de asociaciones, en las cuales se incluyen animales, plantas e inclusive microorganismos (Jaramillo, 2002). Estos últimos se consideran los más numerosos debido a que su capacidad de establecerse, adaptarse y sobrevivir en diversos ambientes permite su existencia en diferentes regiones. Peculiarmente los microorganismos han establecido ciertas asociaciones con las plantas categorizándose tanto neutros como benéficos además de perjudiciales (Toro, 2004). Dichas relaciones han sido estudiadas en la mayoría de las plantas, singularmente en las pteridofitas se ha hecho tal mención por las relaciones micorrícicas que existen (Hernández y Albornoz, 2008) incluso se ha mencionado el estudio de microorganismos eucariotas a nivel rizósferico (Anderson, 2009). Sin embargo la caracterización de otras estructuras propias de la planta podía complementar el entendimiento de las asociaciones entre microorganismos y plantas, particularmente de estas cormofitas. En relación a lo anterior en el presente trabajo se caracterizó la microbiota asociada a estructuras morfológicas de tres especies de helechos, e incluso a nivel rizósfera, enfatizándose en la diversidad de hongos y bacterias de estas plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras

Las especies colectadas fueron *Dryopteris rossii*, *Osmunda regalis* y *Woodwardia spinulosa*, en la Sierra de Pénjamo, Gto., los muestreos se hicieron a 1943 m.s.n.m. entre los 20° 32' 34.2" N y 101°40' 0.47"O, siendo de diferentes ambientes, tanto templados como húmedos, respectivamente. Se colectaron muestras de suelo, rizósfera, esporangios, muestras de raíz y de hoja por helechos. Las muestras se conservaron a una temperatura de 5°C hasta su posterior análisis en laboratorio.

Aislamiento de bacterias y hongos.

Se pesaron 1 gr de muestras vegetales (frondas/esporangios) y de suelo (rizósfera/suelo) de cada especie. Se colocaron en buffer salino (buffer PBS) y posteriormente por diluciones seriales se sembraron en medio LB y PDA y se incubaron a temperatura ambiente (26 °C) durante 48 hrs. Para los aislados endófitos las muestras de raíz y hoja se esterilizaron y trataron de acuerdo a lo planteado por Compant y colaboradores (2011). Consecutivamente se procedió al aislamiento tanto en medio LB (bacterias) y PDA (hongos), en el caso de bacterias se inocularon en glicerol 50% para su conservación a -80° C (Parra *et al.*, 2006).

Microcultivos

Para la identificación de los aislados fúngicos se llevó a cabo microcultivos de acuerdo a la técnica planteada por Rojas y Monroy (2010). Al observar crecimiento de micelio, se procede a retirar la laminilla y se coloca una gota de azul de lactofenol y se observa a microscopio. De esta forma se determinaron en base a las características morfológicas de sus estructuras reproductivas como ha sido reportado por Barnett y Hunter (1998), Wooward (2001) y Geep (2009).

Extracción de ADN y Análisis de Restricción de ADN Ribosomal Amplificado (ARDRA)

La extracción de ADN de los aislados bacterianos se llevó a cabo por medio del método de lisis alcalina (Atashpaz *et al.*, 2010; Eguiarte *et al.*, 2007). Posteriormente se amplificaron los genes 16S rRNA por medio

de la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR), usando los primers Rd1 y Fd1. Los productos de PCR se sometieron al análisis tipo ARDRA por medio de enzimas de restricción (RsaI y HindIII) dejando incubar por tres horas a una temperatura de 37°C. Por último los grupos resultantes se agrupan dependiendo del número y del tamaño de sus fragmentos (kb); (Vanechoutte *et al.*, 1992).

RESULTADOS

Se obtuvieron alrededor de 1.0 log 8 UFC/g en todas las muestras analizadas. En total se obtuvieron 123 aislados bacterianos diferentes (Cuadro 1), en los cuales se puede observar que el número de diversidad difiere en cada muestra comparando, por ejemplo el total de aislados bacterianos de las muestras de *Dryopteris rossii* y de *Osmunda regalis* es diferente posiblemente a los tipos de hábitat de cada uno, es decir, mientras que *D. rossii* es de ambientes más templados, *O. regalis* habita en zonas más húmedas lo cual podría ser causa de tal diferencia. En el caso de *Woodwardia spinulosa* se observa que el mayor número de aislados corresponde a las muestras de esporangios. En cuanto al análisis tipo ARDRA de los aislados bacterianos, se obtuvieron 5 grupos en base al número y tamaño de los fragmentos (kb), como se observa en la Figura 1. El análisis realizado muestra que las tres especies de helechos tienen grupos de aislados bacterianos cercanos y propios.

Por otra parte el número de bacterias cultivables por Unidades Formadoras de Colonia (UFC) fueron diferentes entre muestras endófitas y de aquellas asociadas a estructuras morfológicas por especie. De acuerdo a Compant *et al.*, (2011) las poblaciones de endófitos son menores en las partes subterráneas de la planta, en relación a los resultados obtenidos. Sumado a ello los aislados obtenidos de cada muestra por especie de helecho sugiere que la microbiota existe en una variedad de microhábitats las cuales pueden estar dispuestas a fluctuaciones ambientales independientes (Grant y Long, 1990) lo cual es notorio en la proporción variante de aislados bacterianos (Figura 2).

Cuadro 1. Unidades Formadoras de Colonia de las diferentes muestras obtenidas de cada especie de helecho. Las muestras de hoja y raíz son endófitas.

Especie	Suelo	Rizósfera	Esporangios	Hoja	Raíz
<i>Dryopteris rossii</i>	6.7 Log 8 UFC/g	2.3 Log 8 UFC/g	1.0 Log 9 UFC/g	1.0 Log 7 UFC/g	2.0 Log 6 UFC/g
<i>Osmunda regalis</i>	1.0 Log 9 UFC/g	9.8 Log 8 UFC/g	2.0 Log 9 UFC/g	4.0 Log 6 UFC/g	5.0 Log 6 UFC/g
<i>Woodwardia spinulosa</i>	3.2 Log 8 UFC/g	8.4 Log 8 UFC/g	6.1 Log 8 UFC/g	1.5 Log 6 UFC/g	3.0 Log 6 UFC/g

Por su parte la escala en los recuentos bacterianos de las muestras de esporangios son menores en comparación con sus similares en plantas angiospermas, Compant *et al.*, (2011); Mundt y Hinkle (1976) reportan un aumento logarítmico en recuentos bacterianos de semilla de uva (Log 10 UFC/g). Así mismo tales valores coinciden en los aislados endofíticos (Log 6 UFC/g), en cuanto a los rangos logarítmicos para los aislados rizósfericos, estos son similares de acuerdo a lo presentado por Compant *et al.*, (2011) y Compant *et al.*, (2010), sin embargo muestran ser mayores cuando la planta se encuentra en estado maduro.

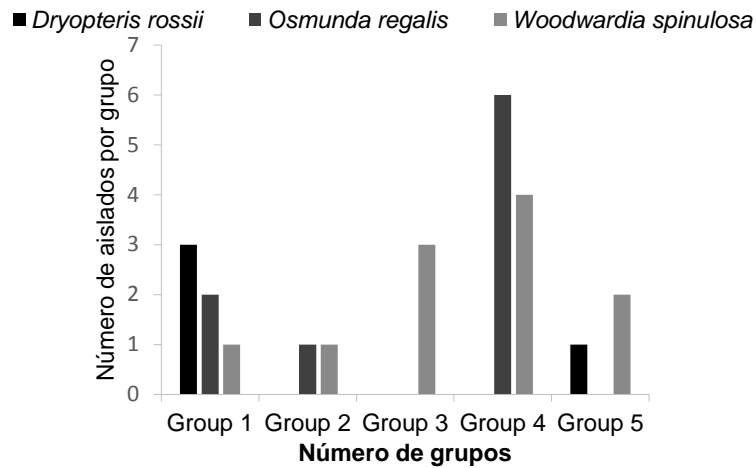


Figura 1. Grupos generados por análisis tipo ARDRA así como el correspondiente número de aislados bacterianos.

Por otra parte se identificaron 6 géneros de hongos en total para las tres especies de helechos (Cuadro 2). La mayoría de estos géneros corresponde a hongos comunes aislados de suelo, y en su parte con actividad saprófita. Peculiarmente algunos taxones tienen reportada cierta actividad que puede ser favorable para el establecimiento de las especies de helechos. Por ejemplo el caso de *Paecilomyces* tiene actividad nematocida, en particular la especie *P. lilacinus* (Liu *et al.*, 1998). Al igual que *Cladosporium* en la cual su mayor parte suelen ser parásitos de otros hongos, además de ser saprófitos (Ogórek *et al.*, 2012).

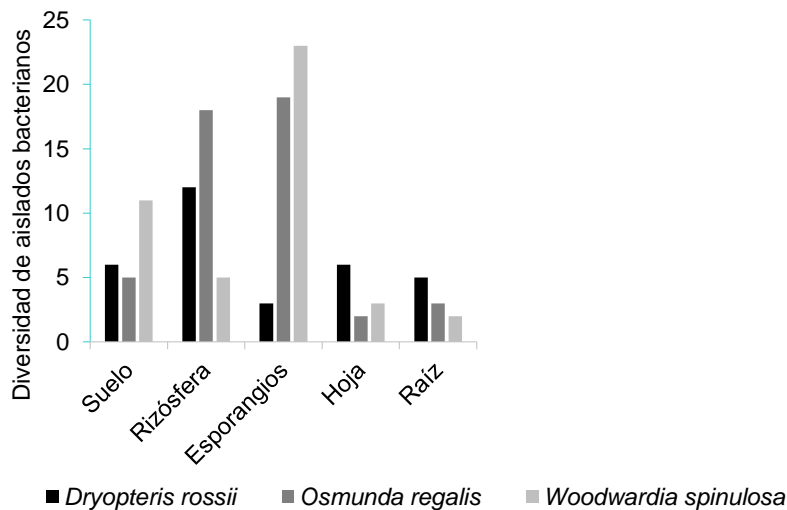


Figura 2. Número de aislados bacterianos obtenidos de cada muestra por especie helecho.

Cuadro 2. Hongos identificados a nivel de género por muestra para cada especie de helecho

Especie	Suelo	Rizósfera	Esporangios	Raíz	Hoja
<i>Dryopteris rossii</i>	<i>Mucor</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Alternaria</i> <i>Cladosporium</i> <i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Alternaria</i>
<i>Osmunda regalis</i>	<i>Alternaria</i> <i>Cladosporium</i>	<i>Mucor</i>	<i>Alternaria</i> <i>Cladosporium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Alternaria</i> <i>Penicillium</i>
<i>Woodwardia spinulosa</i>	<i>Mucor</i> <i>Penicillium</i> <i>Cladosporium</i>	<i>Mucor</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Paecilomyces</i>

CONCLUSIONES

Las diferentes pruebas y análisis muestran que hay una gran diversidad de microorganismos, respectivamente a hongos y bacterias asociados a las tres especies de helechos. En cuanto a los géneros fúngicos identificados sugieren que juegan un rol esencial en el establecimiento y desarrollo de los helechos. Por su parte los análisis de las muestras bacterianas plantean que además de su gran diversidad en estas plantas, demuestran tener cierta relación con algunas de las especies de helecho. Sin embargo se requiere llevar a cabo pruebas más específicas para obtener una determinación taxonómica así como la consecuente relación que mantienen con estas plantas.

BIBLIOGRAFÍA

- ATASHPAZ S., KHANI S., BARZEGARI A., BARAR J., ZUNUNI S., AZARBAIJANI R., OMIDI Y. 2010. A Robust Universal Method for Extraction of Genomic DNA from Bacterial Species. МИКРОБИОЛОГИЯ. N° 4. Pp. 562-566.
- ANDERSON R. 2009. Eukaryotic Microbial Communities Associated with the Rhizosphere of the Temperate Fern *Thelypteris noveboracensis* (L.) Nieuwl. American Fern Journal. 99 (3) [pp. 176-181]
- BARNETT H.L., HUNTER B.B. 1972. *Illustred genera of imperfect fungi*. 3rd Edition.
- COMPANT S., CLÉMENT C., SESSITSCH A. 2010. Plant growth promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants. Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. Soil. Biol. Biochem 42 [pp. 669-678]
- COMPANT S., MITTER B., COLLI-MULL J., GANGL H., SESSITSCH A. 2011. *Endophytes of Grapevine Flowers, Berries, and Seeds: Identification of Cultivable Bacteria, Comparasion with Other Plant Parts, and Visualization of Niches of Colonization*. Microb Ecol. [pp. 1-10].
- EGUIARTE L., SOUZA V., AGUIRRE X. FALCÓN L., VALERA A. 2007. *Las Herramientas Moleculares. Introducción a la Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología. Pp. 499-516.
- GRANT W., LONG P. 1990. *Microbiología ambiental*. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- GEPP V. 2009. *Clave para identificar hongos y pseudohongos fitopatógenos comunes*. Curso de Fitopatología. [pp. 1-5].
- JARAMILLO D.F. 2002. *Introducción a la Ciencia del Suelo*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Medellín. [pp. 40-56].
- LIU K., HOWELL D., PERFECT J., SCHELL W. 1998. *Morphologic criteria for the preliminary identification of Fusarium, Paecilomyces and Acremonium species by histopathology*. American Journal of Clinical Pathology. [pp 45-54].
- MUND J., HINKLE N. 1976. Bacteria within ovules and seeds. Appl. Environ Microbiol 32. [pp. 694-698]
- OGÓREK R., LEJMAN A., PUSZ W., MILUCH A., MIODYNSKA. 2012. *Characteristics and taxonomy of Cladosporium fungi*. Mikologia Lekarska. [pp. 80-85]
- PARRA S., PÉREZ M., BERNAL M., SUÁREZ Z., MONTOYA D. 2006. *Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN)*. Bogotá, Colombia.
- ROJAS A., MONROY A. 2010. *Microcultivo*. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores. [pp. 1-5].
- STONE J.K., POLISHOOK J.D., WHITE J.F. 2004. *Endophytic Fungi. Biodiversity of Fungi*. Elsevier Academic Press, Burlington. [pp. 214-270].
- TORO D. R. 2004. *La diversidad Microbiana del Suelo, un Mundo por descubrir*. Universidad de Caldas. [pp. 1-7].
- VANECHOUTTE, M., ROSSAU, R., DE VOS, P., GILLIS, M., JANSSENS, D., PAEPE, KERSTERS, K. (1992). *Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA)*. FEMS Microbiology Letters, 93(3), [pp. 227-233].
- WOODWARD J. 2001. *Simplified Fungi Identification Key*. University of Georgia. College of Agricultural & Environmental Sciences. [pp. 1-12].