



EVALUACIÓN DE UN MÉTODO SENCILLO, RÁPIDO Y ECONÓMICO PARA LA OBTENCIÓN DE DNA DE MICORRIZAS A PARTIR DE MUESTRAS DE SUELO PARA SU USO EN PCR

Judith Lua-Aldama, Ana Elizabeth Bárcenas-Ortega, Fernando Ángeles-Torres, Héctor Guillén-Andrade y Ana Tztzqui Chávez-Bárcenas.

Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" UMSNH, Paseo Lázaro Cárdenas esq Berlin, Uruapan, Mich., 60190, fax (452) 5236474, tztzquichavez@yahoo.com.mx

Palabras clave: hongos micorrizógenos arbusculares, PCR, ITSs

Introducción. Los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) son una simbiosis mutualista establecida entre las raíces de la mayoría de las plantas herbáceas y árboles tropicales y un pequeño grupo de hongos de la raíz del phylum Glomeromycota. En este trabajo se reporta la estandarización de técnicas para la obtención de DNA de HMA obtenido de esporas de distintas especies de muestras de suelo de huertos de aguacate en Michoacán.

Metodología. El suelo rizosférico se colectó en los primeros 30 cm de profundidad en huertos de aguacate de Michoacán. Las esporas fueron obtenidas a partir de 100 g de suelo por medio del protocolo de tamizado húmedo y decantación [1], (evaluando el uso de Percoll al 50, 75 y 100 %). Los protocolos de extracción evaluados fueron: 1) el de CTAB [2], 2) el de Urea [3] y 3) un choque térmico (no descrito anteriormente, hasta donde los autores tienen conocimiento). Para los tres protocolos se manejó un volumen final de 50 μ l. El protocolo 3 consistió en macerar 50 esporas en un tubo Eppendorf de 1.5 ml utilizando un pistilo de vidrio con punta esmerilada, agregar 50 μ l de agua desionizada estéril y colocar a 100°C/10 min, posteriormente en hielo/5 min, repetir el choque y centrifugar por 30 segundos para empaquetar. Para la amplificación se usó el juego de oligonucleótidos universales ITS1 e ITS4, para la amplificación de las regiones espaciadoras hipervariables asociadas a nrDNA. Las reacciones fueron de 25 μ l con 1, 2 y 5 μ l de DNA (aprox 10 a 100ng), oligonucleotidos 10 pmol c/u, dNTPs 0.8 y 0.2 mM, MgCl₂ 2 mM, Taq polimerasa recombinante (Invitrogen) 2U y amortiguador comercial. Se realizaron 30 y 40 ciclos de 94°C/1min, 45 a 60°C/1min y 72°C/1min. Separando los productos por electroforesis en geles de agarosa al 1 y 1.2 %.

Resultados y discusión. Durante el proceso de precipitación diferencial, se obtuvo una mayor densidad de esporas libres de impurezas al utilizar Percoll al 50%.

La amplificación fue más abundante al utilizar 45°C de alineamiento, 5 μ l de DNA del protocolo

2 y 3 al usar dNTPs 0.8 mM, así como con 1, 2 y 5 μ l de DNA al usar dNTPs 0.2 mM (Fig 1).

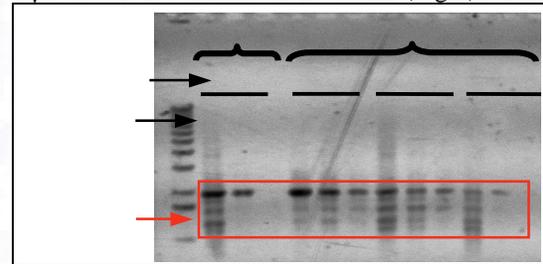


Fig 1. Amplificación por PCR utilizando 45°C de alineamiento.

El DNA obtenido por el protocolo 3 permitió obtener una mayor cantidad de productos de amplificación de distintos tamaños (0.3 a 1.8 kb), correspondientes a los tamaños esperado de las secuencias amplificadas de distintas especies de HMA al utilizar los oligonucleótidos ITS1 e ITS4. El protocolo 2 muestra una abundancia menor a la observada por el protocolo 3, sin embargo superior a la obtenida por el protocolo 1.

Conclusiones. Durante la obtención de esporas por tamizado húmedo y centrifugación diferencial es recomendable utilizar Percoll al 50%, lo cual ofrece un medio inocuo, ideal para realizar PCR, que separa adecuadamente la fracción de esporas de una gran cantidad de material de desecho. El protocolo de extracción por choque térmico ofrece un rápido, sencillo y económico método para obtener DNA de buena calidad para amplificar por PCR bajo las condiciones ensayadas.

Bibliografía

- (1) Gerdeman JW y Nicolson TH. (1963). Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Brit Mycol Soc* 46:235-244.
- (2) Doyle, J. J. y Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15
- (3) Liu, Y-G, Mitsukawa N, Oosumi T. y Whittier RF. (1995). Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.* 8(3):457-463.