



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## IDENTIFICACIÓN DE MicroARNs FUNCIONALES EN LA INTERACCIÓN TEMPRANA DEL SISTEMA SIMBIÓTICO MICORRIZA ARBUSCULAR

Luz Ángela Zárate Neira\*, Roberto Ruíz Medrano\*\*, María de los Ángeles Valdés\*, Beatriz Xoconostle Cázares\*\*.

\* ENCB – IPN Departamento de Microbiología, Laboratorio Microbiología Agrícola México D.F C.P 11340,

\*\*CINVESTAV Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería Laboratorio de Biología Molecular México D.F C.P 07360. [mvaldes@ipn.mx](mailto:mvaldes@ipn.mx) , [bxoconos@cinvestav.mx](mailto:bxoconos@cinvestav.mx)

*Palabras clave: Estrigolactona, microRNAs, Micorriza arbuscular, Precontacto.*

**Introducción.** La micorriza arbuscular (MA) es una asociación mutualista entre hongos del Phylum Glomeromycota y la mayoría de las plantas de interés agrícola. Los estudios realizados acerca de las señales moleculares que intervienen en el desarrollo de la MA reportan la presencia de estrigolactona (1) que actúa como un quimioatrayente percibido por el hongo en las primeras etapas de comunicación entre el hongo y la planta. Por otra parte, evidencias experimentales sugieren la participación de moléculas reguladoras de la transcripción como los microARNs involucrados en estas rutas de señalización (2). Por lo tanto, el presente estudio, tiene como objetivo conocer la participación de los microARNs expresados en la etapa temprana de la simbiosis de *Glomus intraradices* en respuesta a la molécula señal de la planta, estrigolactona.

**Metodología.** En la identificación de los microARNs se empleó el modelo *in vitro* establecido por Bécard y Fortin (3), utilizando *G. intraradices*. Se trataron esporas del hongo con el metabolito estrigolactona para identificar la respuesta molecular. La extracción de los microARNs se realizó utilizando el kit Ambion Inc. *mirVana*<sup>TM</sup> seguido de la transcripción a cDNA siguiendo las recomendaciones del kit de Expresión de ARNs pequeños de Ambion<sup>TM</sup>. Los amplificadores de 80 – 150 pb fueron clonados en pDrive y pCR4 TOPO TA y se transformaron en células *E. coli* Match1<sup>TM</sup>-T1. La confirmación por PCR de colonia permitió la selección de 960 clones que fueron enviadas a secuenciar. El análisis bioinformático de las secuencias y su comparación con las bases de datos en la web nos permitirá predecir microARNs funcionales de *G. intraradices*.

**Resultados.** Las esporas de *G. intraradices* tratadas con 15 ug de la fracción pura obtenida por HPLC muestran un ligero incremento en el crecimiento y ramificación de la hifa hacia el sitio tratado (Figura 1). La respuesta del hongo es evidente al ser comparada con el control (etanol al 70%). Estos resultados demuestran la presencia de un factor de ramificación, según lo descrito por Akiyama. (1) La estrigolactona es la principal molécula que estimula la respuesta fisiológica del hongo durante las etapas iniciales de comunicación química para el desarrollo de la MA. A partir de los microARNs extraídos a las 6 y 12 horas post-tratamiento con estrigolactona, se obtuvo la síntesis de polímeros de microARNs amplificados a cadenas de cDNA de tamaño

entre 50 y 180 pb (Figura 2) y clonados en pDrive, pCR4 TOPO

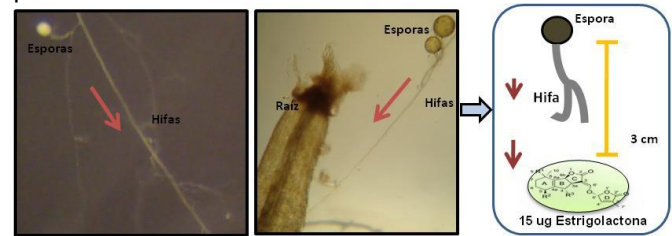


Fig. 1. Respuesta fisiológica de esporas de *G. intraradices* luego del tratamiento con estrigolactona.

Las transformantes se evaluaron por PCR de colonia y se obtuvo un 90% de transformación del inserto que fueron enviados a secuenciar a LanGebio Cinvestav – Irapuato.

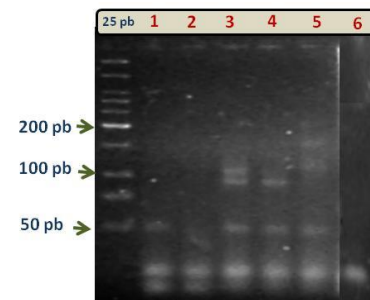


Fig. 2. Gel agarosa NuSieve 4%, productos de DNA obtenidos por RT-PCR a partir de microARNs de diferentes tratamientos.

**Conclusiones.** En el modelo *in vitro* utilizando esporas de *G. intraradices* tratadas con la fracción pura obtenida por HPLC se produce una respuesta del hongo al compuesto de ramificación (estrigolactona), observando cambios fenotípicos en el crecimiento del micelio. Adicionalmente, se obtuvo el aislamiento de diversos fragmentos sintetizados a cDNA que serán analizados para la predicción de microARNs.

**Agradecimientos.** ALZN es becaria de CONACyT, Proyecto financiado por ICyTDF (P08-147) y CONACyT 105985 a BXC.

### Bibliografía.

1. Akiyama K, Ogasawara S, Ito S, Hayashi H. 2010. *Plant cell Physiology* 51 (7) 1104-17.
2. Gu M, Xua K, Chena A, Zhua Y, Tangb G and Xua G. 2010. *Physiologia Plantarum* 138: 226–237.
3. Bécard G and FortinJ. 1988.. *New Phytologist* 108:211-218