

Avances en la transformación de raíces de kudzú (*Pueraria phaseoloides*) y zanahoria (*Daucus carota* var. Danvers 126) con diferentes cepas de *Agrobacterium rhizogenes* para multiplicación de hongos MA

Advances in transforming kudzu (*Pueraria phaseoloides*) and carrot (*Daucus carota* var. Danvers 126) roots with different *Agrobacterium rhizogenes* strains for increasing MA fungi growth

Marisol Medina Sierra*, Francisco Hernando Orozco P**, María Elena Márquez F.***

RESUMEN

En el presente trabajo se transformaron raíces de kudzú (*Pueraria phaseoloides*) y de zanahoria (*Daucus carota*) en diferentes medios de cultivo, mediante el empleo de cinco cepas diferentes de *Agrobacterium rhizogenes*; de comportamiento diferente tanto en la transformación de zanahoria por las cepas de *A. rhizogenes* A.r.15834, A.r.8196 y A.r.2659; como en la transformación de kudzú por las cepas A.r.15834 y A.r.1724.

Por otro lado, se logró la multiplicación en medio White modificado (WM) de las raíces transformadas de zanahoria, mientras que las de kudzú no se lograron multiplicar en ese medio ni tampoco en el medio MS modificado. Las raíces de zanahoria se emplearon para la multiplicación y esporulación del hongo micorrizógeno arbuscular (HMA) *Glomus intrarradices*, sin embargo las cepas nativas de HMA, aisladas de una de las zonas de minería del Bajo Cauca Antioqueño, no crecieron en las raíces transformadas de esta especie ni aún en las de kudzú, a pesar de ser una planta que presenta alta afinidad por las cepas nativas de HMA. Los resultados se muestran como un avance en el procedimiento para el aislamiento de ADN y el mantenimiento de colecciones de HMA, requeridos para otras investigaciones.

Palabras clave: kudzú (*Pueraria phaseoloides*), zanahoria (*Daucus carota*), *Agrobacterium rhizogenes*, hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), raíces transformadas.

ABSTRACT

Kudzu (*P. phaseoloides*) and carrot (*D. carota*) roots were transformed in this survey into different kinds of culture medium by using five different *A. rhizogenes* strains. These presented different behaviour both in carrot transformation by *A. rhizogenes* 15834, A.r.8196 and A.r.2659 strains as well as kudzu transformation by A.r.15834 and A.r.1724 strains. Transformed carrot root growth was increased in WM culture medium, whilst transformed kudzu root growth did not increase in either the same medium or in modified MS medium. Transformed carrot roots were used for *G. intrarradices* increase and sporulation; however, wild AMF strains, isolated from a mining area (the lower Cauca area of Antioquia), did not grow either in roots from this specie or those from kudzu, in spite of this plant having great affinity for wild AMF strains. The results represent an advance in the procedure for DNA isolation and keeping AMF collections, required for other research.

Key words: kudzu (*Pueraria phaseoloides*), carrot (*Daucus carota*), *Agrobacterium rhizogenes*, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), transformed roots.

*Profesora Asistente Universidad de Antioquia. E-mail: solmedina@agronica.udea.edu.co

**Profesor Asociado Universidad Nacional Sede Medellín. E-mail: horozco@perseus.unalmed.edu.co

***Profesora Asociada Universidad Nacional Sede Medellín. E-mail: memarque@perseus.unalmed.edu.co

Recibido: mayo 2 de 2002; aceptado: noviembre 5 de 2002

INTRODUCCIÓN

Las bacterias patogénicas, *Agrobacterium rhizogenes* y *Agrobacterium tumefaciens* pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae* viven en el suelo y de forma natural transforman genéticamente las células de las plantas que infectan.

Estas bacterias presentan genes patogénicos, localizados en plásmidos de 200-500 kpb los cuales se pueden transferir y expresar en las células de las plantas, genes para hormonas vegetales que pueden producir una proliferación no controlada de células lo mismo que síntesis de nuevos compuestos llamados opinas (Petit *et al.* 1970; Tepfer y Tempe, 1981). El estudio de esta transferencia natural del ADN plasmídico ha hecho posible la aplicación del mismo principio para la introducción de ADN foráneo en plantas con fines específicos.

La infección de *A. rhizogenes* en una planta hospedera produce una proliferación descontrolada de raíces, conocida como "raíces en cabellera" que pueden crecer independientemente de los demás órganos de la planta (Nester *et al.* 1984), por lo que se pueden cultivar *in vitro* y emplearse para multiplicar algunas especies de hongos endomicorizógenos, los cuales requieren de raíces para su multiplicación.

La cepa de *Agrobacterium* empleada juega un papel clave en la iniciación de la transformación (Mugnier y Mosse, 1987). La mayoría de los reportes sobre transformación de raíces para la multiplicación de HMA (hongos micorizógenos arbusculares) han utilizado raíces de zanahoria en sus experimentos y aunque el kudzú es una de las plantas más empleadas para multiplicación de estos hongos en condiciones naturales; hasta ahora, no se ha reportado su uso para multiplicación en condiciones axénicas y tampoco ha sido posible cultivar hongos MA en medios de cultivo; esto ha hecho que se avance poco en el conocimiento de la fisiología y la manipulación genética de los mismos (Lambrais, 1996; Berbara y Fonseca, 1996). Por esta razón, lograr avances en la investigación en este campo sigue siendo un reto, dada la dificultad de obtener infección adecuada.

Los primeros reportes demostraron establecimiento axénico de hongos MA, germinación de esporas de *Glomus mosseae* y un aparente inicio de colonización de órganos de raíces de plántulas de

Trifolium spp. germinadas *in vitro* (Mosse y Hepper, 1975). De otro lado, en raíces de *Convolvulus sepium* transformadas con *A. rhizogenes* cepa 8196, se logró infección de *G. mosseae* y de *GL margarita* (Mugnier y Mosse, 1987). También se estandarizó un medio de cultivo para crecimiento y esporulación de *GL margarita* en raíces de zanahoria transformadas con *A. rhizogenes* cepa A4 (Bécard y Fortín, 1988). Por otro lado en raíces transformadas de trébol se produjeron esporas después de nueve meses de cultivo (Fonseca, 1994; Berbara, 1995). También en raíces transformadas de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) se logró la multiplicación de *G. fistulosum* V128 (Nuutila *et al.* 1995); además se ha logrado multiplicación de *G. intraradices* en biorreactores (Jolicoeur *et al.* 1999).

A pesar de que la multiplicación de HMA en cultivo puro es clave para un mejor entendimiento de las características y la manipulación de estos simbiontes de plantas (Piché *et al.* 1994), solamente especies muy conocidas se han multiplicado en estas condiciones. Lograr esta multiplicación sería de mucha utilidad para el estudio de los hongos nativos.

En el presente trabajo se evaluaron diferentes cepas de *A. rhizogenes* y diferentes medios de cultivo para obtención y multiplicación *in vitro* de raíces transformadas de zanahoria y kudzú; con las cuales se ensayó la multiplicación de algunos hongos MA nativos de suelos de minería del Bajo Cauca Antioqueño.

METODOLOGÍA

Explantos y cepas de *A. rhizogenes*

Los explantes de zanahoria fueron rodajas obtenidas de un cultivo de siete semanas de edad procesados y desinfectados según los métodos propuestos por Ark y Thompson (1961) y Ryder *et al.* (1985). Los explantes de kudzú fueron plántulas de dos semanas de crecimiento cultivadas *in vitro* en medio PDA (para eliminar aquellas que presentaran contaminación).

Las cepas de *A. rhizogenes* 15834 (productora de manopina y agropina), 8196 (manopina), 2659 (cucomanopina), 1724 (mikinopina) fueron suministradas por el Dr. Jacques Tempe del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (Francia) y la cepa *A. rhizogenes* 6726 (opina no determinada) suministra-

da por el Dr. William Roca del Centro Internacional de Agricultura Tropical (Colombia). Estas cepas se cultivaron en medio AB modificado de Chilton *et al.* (1977) al cual se le adicionó acetosiringona (Aldrich) como inductor de virulencia y se incubaron a 28°C hasta obtener 1×10^9 células/ml (D.O_{660nm}).

Cocultivos (planta - *A. rhizogenes*)

Se emplearon 200 explantes que incluían cotiledones ó primer par de hojas de kudzú, a los cuales se les realizó punción e inoculación de bacterias de cada cepa, se colocaron 50 explantes por cada medio de cultivo. De la misma forma, se inocularon los explantes de zanahoria en la zona apical de las rodajas. Los cocultivos para la obtención de raíces transformadas se realizaron en medio WM sin hormonas (Bécard y Fortín, 1988), medio WM con 0,01 mg/l de ácido indol butírico (Hamel, 1996) y medio agar-agua al 0,45%; en los cuales se incubaron a 26°C durante 3 a 5 semanas hasta la aparición de raíces transformadas. La inhibición de *A. rhizogenes* empleado en la transformación, se realizó posteriormente en medio WM con los antibióticos carbenicilina y cefotaxina. El efecto de las diferentes cepas se analizó mediante un análisis de varianza de los porcentajes de transformación de las diferentes cepas en cada medio de cultivo.

Multiplicación de raíces transformadas en medios de cultivo

Las raíces transformadas de zanahoria se multiplicaron en medio WM sin hormonas y las de kudzú en medio MS con las siguientes modificaciones: Medio 1 (MS con MgSO₄.7H₂O al 0,07%), Medio 2 (MS más MgSO₄.7H₂O al 0,14%), Medio 3 (MS más 0,5ppm de ácido indolbutírico), Medio 4 (MS más 1,5ppm de ácido indolbutírico), Medio 5 (MS más extracto de cotiledones de kudzú) y Medio 6 (MS sin modificación adicional).

Cepas de hongos endomicorrizógenos

Se emplearon cuatro cepas nativas aisladas de suelos degradados por minería correspondientes al género *Glomus* con código MICUNMS16 (MICUNMS: Micorriza Colección Universidad Nacional Microbiología de Suelos), MICUNMS17, MICUNMS18 y MICUNMS19 y la especie *G. intraradices* suministrada por la Dra. Chantal Hamel (Universidad McGill, Canadá) como cepa de referencia.

Multiplicación de HMA en condiciones axénicas

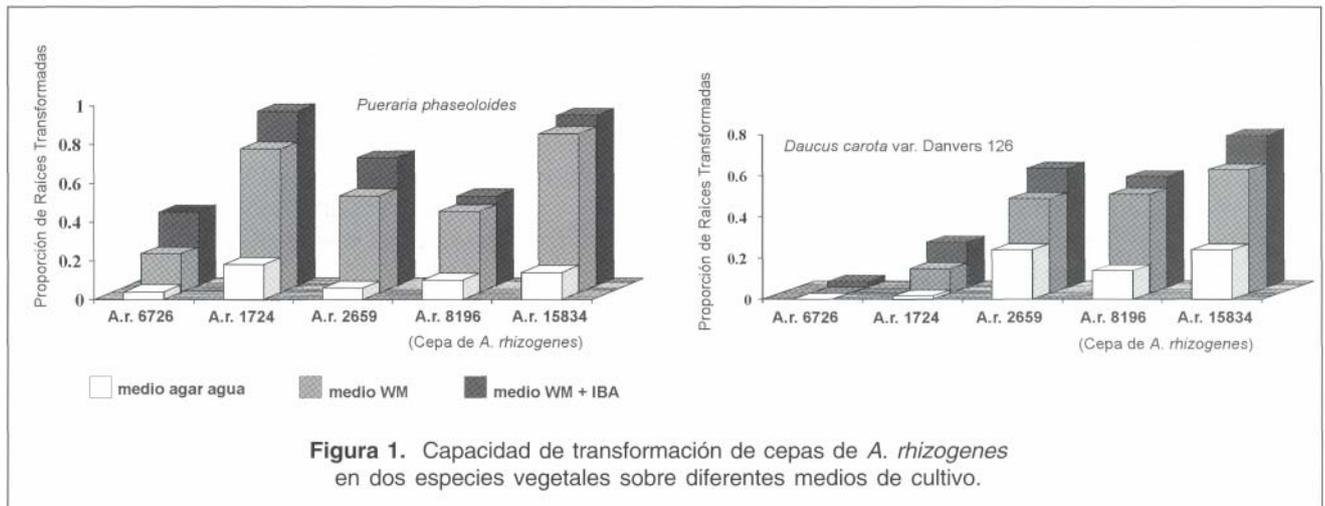
Se emplearon esporas como propágulos infectivos, se limpiaron con tween 20, cloramina T y antibióticos (estreptomocina y gentamicina) (Hamel, 1996); se sembraron en medio "M" (Bécard y Fortín, 1988) junto con segmentos apicales de 5-10mm de longitud de raíces transformadas. Posteriormente se incubaron en la oscuridad para la observación de la germinación de las esporas y la colonización de las mismas durante 4 a 20 semanas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de raíces transformadas

En la Figura 1 se muestra la capacidad de transformación de *Agrobacterium* y los medios de cultivo utilizados. Se encontró diferencia empleando intervalos de confianza a un nivel de 0,05 en la transformación de zanahoria por las cepas de *A. rhizogenes* 15834, 8196 y 2659 y en las raíces de kudzú con las cepas 15834 y 1724. En ambos casos se obtuvo alta proliferación de raíces adventicias y mayor tasa de crecimiento para aquellas raíces transformadas con la cepa 15834; la cual posiblemente se deba a que algunos genes de la región plasmídica están implicados en el control del balance hormonal de auxinas del tejido transformado (Akiyoshi, 1983). Estos resultados son similares a los encontrados con cepas 8196 y 9402 en la leguminosa *Psoralea* (Nguyen *et al.* 1992) y a los reportados con las cepas LBA9402, ATCC15834, R1601 y TR105 en la especie *Astragalus mongholicus*, en la cual además afectaron la tasa de crecimiento de las raíces obtenidas (Lonkova *et al.* 1997).

En este trabajo también se encontró que la producción de raíces transformadas en el medio WM no difiere significativamente ($P < 0,05$) de la obtenida en el medio WM con IBA, lo cual sugiere que la adición de hormona vegetal no es relevante para la obtención de las raíces en esta especie, ni en otras según lo reportado por Mano *et al.* (1986). En contraste, la transformación de raíces en medio WM difiere significativamente del medio agar-agua; aunque en este último también se transforma raíces convirtiéndose éste en una opción de bajo costo. Además del medio de cultivo, existen muchas otras condiciones físicas y químicas que afectan considerablemente la capacidad de transformación de las cepas de *A. rhizogenes* (Xu *et al.* 1997).



Multiplicación de raíces

A pesar de la transformación de los raíces de kudzú (figura 2a) no fue posible su multiplicación en los diferentes medios evaluados. Con los diferentes medios se buscaba evaluar condiciones más favorables al kudzú similares a las condiciones de crecimiento naturales en el suelo, tales como su exigencia en Mg (datos no mostrados) y evaluar el uso de extracto de cotiledones, ya que se observó que la transformación de la planta con la bacteria inducía formación abundante de raíces en dichos cotiledones. Las raíces de zanahoria se multiplicaron en el medio libre de hormonas, lo que permitió continuar con el ensayo en el cual se pretendía la colonización de las diversas cepas de HMA.

Multiplicación de HMA en condiciones axénicas

No se observó estimulación del crecimiento durante el contacto inicial espóra-raíz ni durante un período de 20 semanas, como lo demostraron Mosse y Hepper (1975) en otras especies de hongos debido al desarrollo acelerado del micelio poco después del contacto con la raíz de otras especies. Otros autores han sugerido que el estrés generado por el proceso de senescencia puede causar esporulación, la cual podría ser controlada por el hospedero, probablemente a través de modificaciones en el metabolismo o en el balance hormonal (Fonseca, 1994; Barbara, 1995). Además, se ha demostrado que hay una serie de señales moleculares implicadas en el reconocimiento e infección



Figura 2. (a) Obtención de raíces transformadas a partir de hojas y cotiledones de plántulas de kudzú (*P. phaseoloides*) mediante el empleo de *A. rhizogenes* en medio WM sin hormonas, (b) esporas y micelio extrarradicales de *G. intrarradices* producidos en raíces transformadas de zanahoria (*D. Carota*).

entre el hongo y la raíz (Vierheilig *et al.* 1988; Bécard *et al.* 1995; Fries, 1995; Lambrais, 1996).

En este trabajo se empleó *G. intraradices* como control del experimento y se obtuvo colonización y esporulación en raíces transformadas de zanahoria con la cepa de *A. rhizogenes* 15834 (Figura 2b), similar a lo encontrado por otros autores en ésta y otras especies como *Gi. margarita* y *G. Mosseae* en esas raíces; por otro lado, otros autores han obtenido solamente la formación de apresorios para el hongo *G. etunicatum* empleando igualmente raíces de zanahoria (Schreiner y Koide, 1993).

Los resultados permiten concluir que la actividad transformadora de *Agrobacterium* es diferente para las dos plantas evaluadas, lo cual posiblemente esté relacionado con las señales fitoquímicas reportadas en este tipo de asociaciones. La multiplicación de hongos micorrizógenos *in vitro* de especies diferentes a las ya reportadas sigue siendo un enigma; lo cual estimula la investigación en las cepas nativas con plantas como el kudzú u otras especies tropicales con el fin de conservar y utilizar nuestra diversidad de hongos requeridos en la sostenibilidad de los ecosistemas.

AGRADECIMIENTOS

CINDEC (Comité de investigación y desarrollo científico) U. Nacional-Sede Medellín. Proyecto Colciencias-BID 1118-07-002-92. Esperanza Torres, Bióloga./Ph.D.

BIBLIOGRAFÍA

- Akiyoshi, D; Morris, R; Hinz, R; Miksche, BS; Kosuge, T; Garfinkel, DJ; Gordon, MP and Nester, EW. 1983 Cytokinin/auxin balance in crown gall tumors is regulated by specific loci in the T-DNA. Proc. Nati. Acad. Sci. Vol. 80; p.407-411
- Ark, P. and Thompson, JP. 1961. Detection of hairy root pathogen *Agrobacterium rhizogenes*, by the use of fleshy roots. Phytopathology. Vol.51; p.69-71
- Bécard, G; Taylor, LP; Douds jr, DD; Pfeffer, PE and Doner, LW. 1995. Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses. Mol. Plant-Microbe Interact. Vol.8 ; p.252-258
- Bécard, G. and Fortín, JA. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. New Phytol. Vol.108; p.211-218
- Berbara, R.L.L e Fonseca, H.M.A.C. 1996. Colonização radicular e esporulação de fungos micorrízicos arbusculares *in vitro*. Capítulo 3. En : Siqueira, J.O. (ed.). Avances em fundamentos e aplicação de micorrizas. Lavras: Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciencia do solo e Departamento de ciencias florestais, p.39-66
- Berbara, R.L.L. 1996. Ionic fluxes in arbuscular mycorrhizal systems. Dundee, University of Dundee, 1995. 215p. Citado por: Berbara, R.L.L e Fonseca, H.M.A.C. Colonização radicular e esporulação de fungos micorrízicos arbusculares *in vitro*. Capítulo 3. En : Siqueira, J.O. (ed.). Avances em fundamentos e aplicação de micorrizas. Lavras: Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciencia do solo e Departamento de ciencias florestais, p.39-66
- Chilton, M-D; Drummond, MH; Merlo, DJ; Sciaky, D; Montoya, A; Gordon, MP and Nester, EW. 1977 Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. Cell. Vol. 11; p.263-271
- Fonseca, H.M.A.C. 1996. Some aspects of the physiology of endomycorrhizal plant with associated nitrogen fixation bacteria. Dundee, 1994, 187p. (Tese Ph D). University of Dundee. Citado por: Berbara, R.L.L e Fonseca, H.M.A.C. Colonização radicular e esporulação de fungos micorrízicos arbusculares *in vitro*. Capítulo 3. En : Siqueira, J.O. (ed.). Avances em fundamentos e aplicação de micorrizas. Lavras: Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciencia do solo e Depto. de ciencias florestais, p.39-66
- Fries, LLM. 1996. Physiological alteration in mycorrhizal plants as affected by phenolic compounds. Michigan, 1995, 135p. (Tese Ph D). Michigan State University. Citado por: Lambrais, MR. Aspectos bioquímicos e moleculares da relação fungo-planta em micorrizas arbusculares. Capítulo 2. En: Siqueira, J.O. (ed.). Avances em fundamentos e aplicação de micorrizas. Lavras: Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciencia do solo e Departamento de ciencias florestais, p.5-38

- Hamel, C. 1996. Curso-Taller manejo básico de la micorriza arbuscular-MA- con énfasis en suelos degradados. Educación continuada en biotecnología. Proyecto de investigación, Universidad Nacional-Colciencias-BID. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, ICNE, 250 p.
- Jolicoeur, M; Williams, RD; Chavarle, C; Fortín, JA and Archambault, J.1999. Production of *Glomus intraradices* propagules, an arbuscular mycorrhizal fungus, in an airlif bioreactor. *Biotechnology and bioengineering*. Vol.63, No.2; p.224-232
- Lambrais, MR.1996. Aspectos bioquímicos e moleculares da relação fungo-planta em micorrizas arbusculares. Capítulo 2. En: Siqueira, J.O. (ed.). *Avancos em fundamentos e aplicação de micorrizas*. Lavras: Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciencia do solo e Departamento de ciencias florestais, p.5-38
- Lonkova, L; Kartnig, T and Alfermann, W.1997 Cycloartane saponin production in hairy root of *Astragalus mongholicus*. *Phytochemistry*. Vol.45, No.8; p. 1597-1600
- Mano, Y; Nabeshima, S; Matsui, C and Ohkawa, H. 1986. Production of trepane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica*. *Agrie. Biol. Chem*. Vol. 50; p.2715-2722
- Mosse, B; and Hepper, C. 1975. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. *Physiological Plant Pathology*. Vol.5; p.215-223
- Mugnier, J and Mosse, B.1987. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed root-inducing T-DNA roots grown axenically. *Phytopathology*. Vol.77; p.1045-1050
- Nester, EW; Gordon, MP; Amasino, RM and Yanofsky, MF. 1984. Crow gall: a molecular and physiological analysis. *Annual reviews of plant physiology*. Vol.35; p.387-413
- Nguyen, C; Bourgaud, F; Forlot, P and Guckert, A. 1992. Establishment of hairy root cultures of *Psorelea* species. *Plant. Cell. Reports*. Vol.11, No.8; p.424-427
- Nuutila, AM; Vestberg, M and Kauppinen, V. 1995. Infection of hairy roots of strawberry (*Fraaria x ananassa* Duch.) with arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant Cell Reports*. Vol.14, No.8; p.505-509
- Petit, A; Delhay, S; Tempe, J and Morel, G. 1970. Recherches sur les guanidines des tissus de crown gall. Mise en évidence d'une relation biochimique spécifique entre les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* et les tumeurs qu'elles induisent. En : *Physiol vég*. Vol.8; p.205-213. citado por: Dessaux, Y and Petit, A. Opines as screenable markers for plant transformation. *Plant Molecular Biology Manual C3*. 1994; p.1-12
- Piché, Y; Simón, L and Séguin, A. 1994. Genetic manipulation in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*. Vol.159; p.171-17
- Ryder, MH; Max, ET and Kerr, A. 1985. Virulence properties of strains of *Agrobacterium* on the apical and basal surfaces of carrot root discs. *Plant physiology*. Vol.77; p.215-221
- Schereiner, RP and Koide, RT. 1993 Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi by mycotrophic and nonmycotrophic plant root systems. *Appl. Environ. Microbiol*. Vol.59, No.8; p.2750-2752
- Tepfer, DA and Tempe, J. Production d'agropine par des racines formées sous l'action d'*Agrobacterium rhizogenes*. 1983. Paris : CR Acad. Sci., ser III,. Vol.292 1981; p.153-156. citado por : Petit, A; David, CH; Dahl, GA; Ellis, JG; Guyon, P; Casse-Delbart, F and Tempe, J. Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol. Gen. Genet*. Vol.190; p.204-214
- Vierheilig, H; Alt-Hug, M; Engel-Streiwolf, R; Máder, P and Wiemken, A. 1988. Studies on the attractational effect of root exudates on hyphal growth of an arbuscular mycorrhizal fungus in a soil compartment-membrane system. *Plant and soil*. Vol.203; p.137-144
- Xu,Z-Q; Jia, J-F and Hu, Z-D.1997. Enhancement by osmotic treatment of hairy root transformation of alfalfa suspension cultures, and chromosomal variation in the transformed tissues. *Australian Journal Physiology*. Vol.24, No.3; p.345-351