

CARACTERIZACIÓN DE HONGOS DEGRADADORES DE CELULOSA OBTENIDOS DE UN ARGIUDOL TÍPICO BAJO SIEMBRA DIRECTA EN ARGENTINA

María Sol Rossi mrossi@cnia.inta.gov.ar

Roberto Raúl Casas rcasas@cnia.inta.gov.ar

Roberto Oscar Michelena rmichelena@cnia.inta.gov.ar

Instituto de Suelos, INTA-Castelar, ARGENTINA

Resumen

Los residuos de cultivos residentes sobre la superficie del suelo ofrecen protección contra la erosión edáfica, mejoran la retención hídrica e influyen sobre la porosidad y la estabilidad estructural del suelo. Entre otras de las bondades que imparten son altamente ricos en celulosa, polímero que se incorpora al suelo para ingresar naturalmente en el ciclo del carbono. La celulosa presente entre 15 y 60 % de la masa seca de los cultivos es un homopolisacárido lineal compuesto por subunidades de β -glucosa unidas mediante enlace β (1-4) y su degradación es compleja. La capacidad de algunos microorganismos para degradar esta molécula presenta relevancia tanto por su rol en el ciclado de nutrientes como por su valor comercial en la producción de enzimas a nivel industrial. El análisis de diversidad genética de las cepas fúngicas provenientes del suelo es importante entre otros aspectos para conocer su identificación taxonómica luego de comprobar su capacidad funcional.

El objetivo de nuestro trabajo fue realizar la búsqueda de hongos capaces de degradar celulosa y estudiar la diversidad genética de las diferentes cepas fúngicas aisladas de la rizósfera del cultivo de soja bajo residuos de avena. Para lograr este objetivo se utilizaron herramientas de microbiología clásica para la etapa de aislamientos enriquecimiento, selección y mantenimiento de las cepas obtenidas, y de microbiología molecular para acceder a la identificación de las cepas seleccionadas por su competencia en la función buscada.

Un total de 15 aislamientos presentaron elevada capacidad para metabolizar celulosa. El análisis de clusters jerárquico de los caracteres morfológicos y funcionales analizados indicó que las cepas pertenecían a cinco grupos diferentes con un coeficiente de similitud del 88%. Actualmente se está realizando la caracterización molecular de las cepas obtenidas mediante la amplificación de los espaciadores ITS-1, ITS-2 e IGS. Las zonas no codificantes del rDNA nuclear (ITS-1, ITS-2 e IGS) son más susceptibles de acumular mutaciones y por lo tanto tienen gran interés en el estudio de la identificación y tipificación de especies fúngicas.



Figura 1. Muestreo de suelo cultivado con soja (*Glycine max* L.) cubierto por residuos superficiales de avena (*Avena sativa* L.).



Figura 2a. Cultivo de hongos en medio sólido conteniendo papel como única fuente de carbono. 28 °C, 14 días.



Figura 3a. Estructura morfológica característica de *Aspergillus*, mótulas, filídes y conidios dispuestos sobre vesícula. 400X

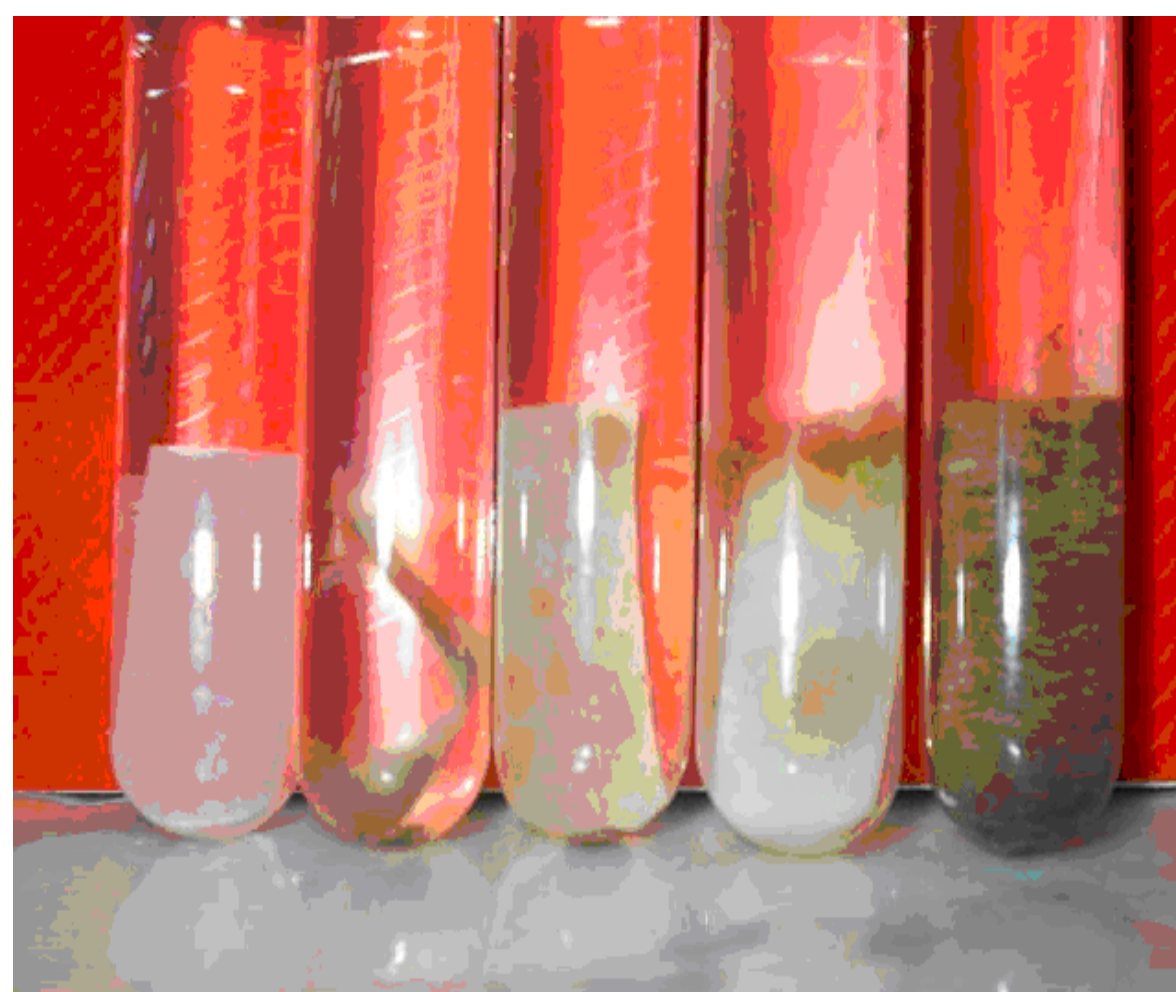


Figura 2b. Cultivo de hongos en medio líquido conteniendo papel como única fuente de carbono. 28 °C, 14 días, 180 rpm.



Figura 3b. Conidios característicos de *Aspergillus*. 1000X

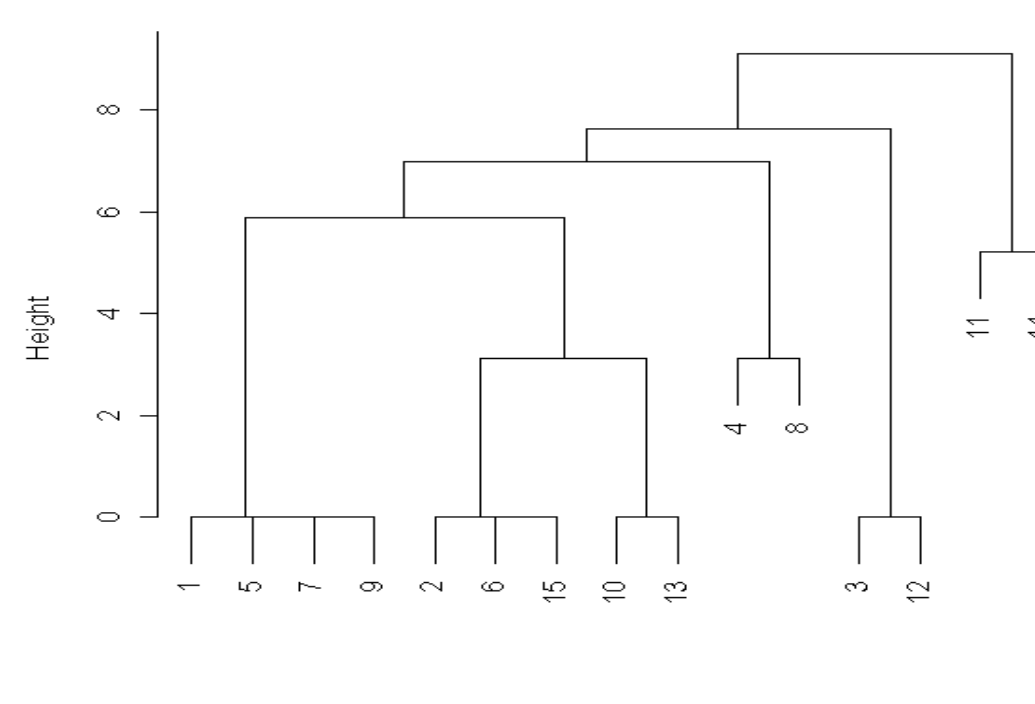


Figura 4. Los dendrogramas se generaron usando el método jerárquico y el algoritmo de agrupamiento de UPGMA.

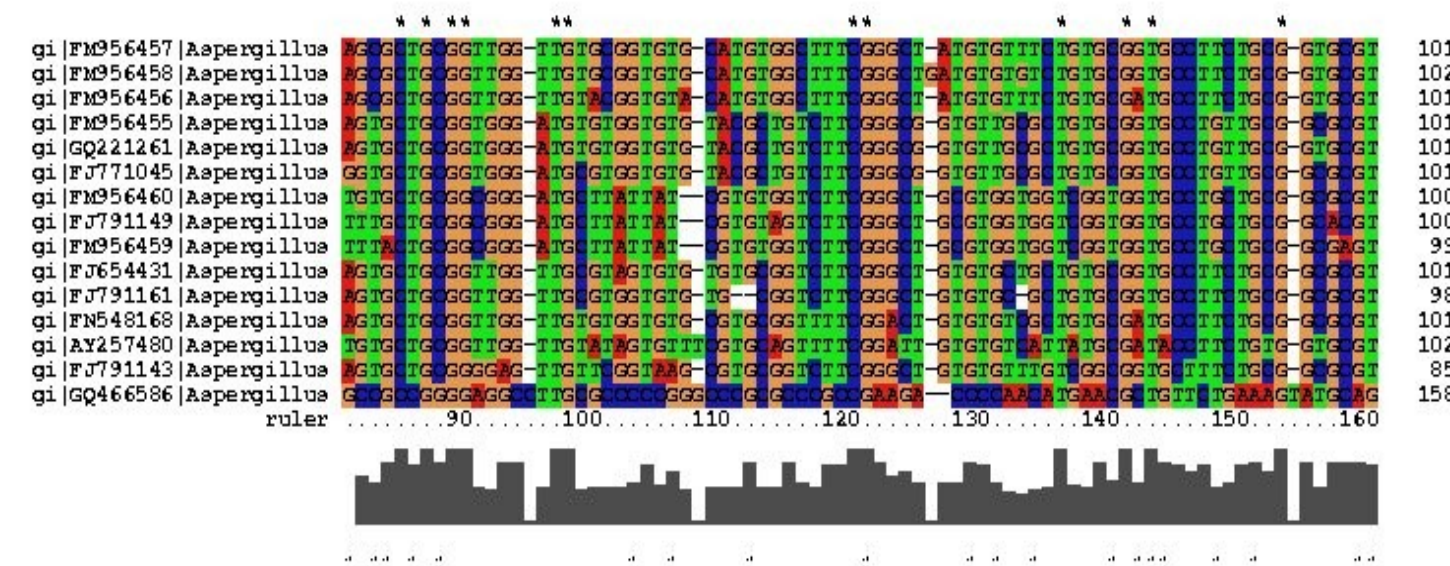


Figura 5. Los alineamientos de las secuencias de ADN mostraron similitud entre los *Aspergillus* observados.

- A partir de diluciones seriadas de muestras compuestas de suelo colectadas a 0 – 20 cm de profundidad (Fig. 1) se inocularon superficialmente placas con agar mínimo conteniendo papel de filtro de celulosa como única fuente de carbono (Fig. 2a), y caldo mínimo conteniendo papel como única fuente de carbono ambos medios suplementados con 30 mg.L⁻¹ de Sulfato de Estreptomicina (Fig. 2b).
- Diferentes aislamientos del género *Aspergillus* fueron clasificados sobre la base de los caracteres morfológicos observados (Fig. 3a y Fig. 3b).
- Para su caracterización molecular se extrajo ADN a partir de 0.8 g de micelio mediante el método Fast DNA (Qbiogene, CA).
- Para la amplificación de la región ITS del rDNA se utilizaron los primers ITS-1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS-2 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.* 1990).
- Se determinó la existencia de patrones de bandas específicos para la identificación de aislamientos.
- Caracteres morfológicos y moleculares se consideraron binarios y se evaluaron como "1" para referir presencia y "0" para referir ausencia.
- La matriz de similitud se analizó a través del "Sequential, agglomerative, hierarchical and nested clustering" (SAHN) (Sneath y Sokal, 1973). Los dendrogramas se generaron usando el método jerárquico y el algoritmo de agrupamiento de UPGMA (Fig. 4).
- El programa R se usó para calcular la matriz de correlación cofenética entre la matriz de similitud y la matriz original para determinar si los datos originales estaban bien representados en el análisis de agrupamiento, bajo 1000 permutaciones.
- Los alineamientos de las secuencias de ADN mostraron similitud entre los *Aspergillus* observados (Fig. 5). Un total de 15 aislamientos de *Aspergillus* presentaron elevada capacidad para metabolizar celulosa. El análisis de clusters jerárquico de los caracteres morfológicos y funcionales analizados indicó que las cepas pertenecían a cinco grupos diferentes con un coeficiente de similitud del 88%.

Referencias

- Barnett, O; B. Hunter.1998. Illustrated genera of imperfecti fungi. Burgless. Publishing Co. Minneapolis, USA. 218pp.
- Buscott, F. D., Di Battista, C., Munch, J.C., Botton, B. and Martin, F. 1996. DNA polymorphism in morels: PCR/RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite-primed-PCR. Mycol. Res. 100:63-71.
- Hobbs, P. H.; Sayre, K.; Gupta, R. 2008. The role of conservation agriculture in sustainable agriculture. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 12:543-55.
- Lobb D.A., Huffman, E. and Reicovsky, D. C. 2007. Importance of information on tillage practices in the modelling of environmental process and in the use of environmental indicators. Journal of Environmental Management, 82:377-387.
- Nelson, David L. ; Michael M. Cox: Lehninger Principles of Biochemistry.2008. 5th ed. New York : W. H. Freeman and Company, cop.
- Neuvéglise, C. and Brygoo, Y. 1994. Identification of group-I introns in the 28s rDNA of the entomopathogenic fungus *Beauveria brogniartii*. Curr. Genet. 27:38-45.
- R Development Core Team. 2009. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Sminsky, and T.J. White (eds.). PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, Inc., New York, USA.
- Sneath PHA; Sokal RR.1973. Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p. 315-322. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J.