

## Secretos de una planta albina *Arachnitis uniflora* (Corsiaceae): en búsqueda del simbionte fúngico.

N. Cofré<sup>(\*)</sup>, M. Renny, A. Sérsic y L. Domínguez  
Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, CONICET, UNC. <sup>(\*)</sup>noelcof@argentina.com

### RESUMEN

Las plantas micoheterotróficas son aclorófilas, por lo tanto incapaces de asimilar carbono por sí mismas por lo que dependen de la asociación con hongos micorrícicos para obtener sus nutrientes; quienes a su vez, los toman de las plantas autotróficas de la comunidad. *Arachnitis uniflora* Phil. (Corsiaceae) es una pequeña planta micoheterotrófica, asociada a un grupo específico de hongos micorrícicoarbusculares (HMA) (*Glomus* Grupo A) del Phylum Glomeromycota, pero se desconoce la identidad específica. El patrón de colonización de estos hongos en raíces de *A. uniflora* se caracteriza por la presencia de hifas inter e intracelulares, rulos, escasas vesículas y vesículas en racimos (estructura no encontrada en otras simbiosis). Si bien en estas raíces no se halló la formación de arbusculos, aún no se sabe qué estructuras forma en sus hospedadores fotosintéticos. El presente estudio se plantea determinar la/las especie/s de HMA presentes en plantas trampa inoculadas con raíz de *A. uniflora* y suelo rizosférico, además de determinar qué tipo de estructuras forma en las raíces del hospedador fotosintético trampa. Para esto se colectó suelo y raíces de *A. uniflora* de tres poblaciones de los bosques andino-patagónicos (dos argentinas y una chilena). Posteriormente, bajo condiciones controladas, se hicieron crecer plantas trampa (sorgo, amor seco y perejil) en suelos estériles, tratados con fragmentos de raíz de *A. uniflora* y suelo nativo como fuentes de inóculo. Parte de los sistemas radicales de cada planta trampa se tiñeron para analizar presencia/ausencia de colonización micorrícica arbuscular. En los sistemas radicales se hallaron las típicas estructuras que forman estos hongos dentro de la raíz (puntos de entrada, hifas, vesículas, rulos y arbusculos) en plantas inoculadas tanto con raíz como con suelo nativo. Los suelos de cada maceta se tamizaron con el fin de extraer las esporas de HMA e identificarlas. Se hallaron cinco morfoespecies: *A. scrobiculata*, *C. claroideum*, *G.aff.brohultii*, *E. infrequens*, *C.aff.luteum*. En las plantas inoculadas con raíz de *A. uniflora* sólo fueron halladas *A.scrobiculata* y *C.aff.luteum*. Si bien este estudio pretende ser complementado con análisis moleculares, el mismo permitió concluir en la multiespecificidad de simbiontes de *A. uniflora*. Además de hallarse estructuras del HMA específicas en su hospedador fotosintético, trampa que reflejan estrategias diferenciales de asociación con las plantas verdes y con *A. uniflora*.

**Palabras clave:** Plantas micoheterotróficas – Hongos micorrícico arbusculares – *Arachnitisuniflora*

### INTRODUCCIÓN

Las plantas micoheterotróficas han atraído el interés de numerosos botánicos y micólogos, mucho antes incluso de la designación de su nombre por Leake (1994). Se trata de plantas aclorófilas, por lo tanto incapaces de asimilar carbono por sí mismas; lo que las convierte en parásitas indirectas (epiparásitas) de otras plantas fotosintetizantes (árboles, arbustos, etc.) (Leake, 1994). Así, dependen de la asociación con hongos micorrícicos para obtener sus nutrientes; quienes a su vez, los toman de las plantas autotróficas de la comunidad.

Esta particular forma de vida ha evolucionado convergentemente numerosas veces y se presenta en once familias de Angiospermas (Maas *et al.*, 1986; Rübsamen, 1986; Mabblerly, 1987; Dressler, 1993; Leake, 1994; Ibsch *et al.*, 1996; Bidartondo *et al.*, 2002).

*Arachnitis uniflora* Phil. pertenece a Corsiaceae, una pequeña familia de plantas micoheterotróficas compuesta por tres géneros: *Corsia*, proveniente de Nueva Guinea, Australia e Islas Solomón; *Corsiopsis*, de China, y *Arachnitis*, creciendo en América del Sur, donde se desarrolla a lo largo de los bosques andino-patagónicos de Argentina y Chile, en

las Islas Malvinas y en el sur de Bolivia (Dimitri, 1972; Cribb *et al.*, 1995; Ibsch *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1999; Neyland & Hennigam, 2003). Esta distribución disyunta es poco común para una planta micoheterotrófica (Maas *et al.*, 1986; Graaf, 1992; Ibsch *et al.*, 1996).

Las plantas micoheterotróficas se asocian con especies pertenecientes a tres *phyla* de hongos (Glomeromycota, Ascomycota y Basidiomycota) para formar micorrizas arbusculares (MA), monotropoides, orquideoides y arbutoides. *A. uniflora*, particularmente, está asociada a los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) que pertenecen al Phylum Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001), siendo este tipo de asociación poco frecuente entre las plantas epiparásitas. Los HMA están asociadas a las raíces del 80% de las plantas terrestres (Smith & Read, 2008) y se caracterizan porque las hifas colonizan la raíz del hospedante formando, generalmente, estructuras particulares denominadas arbuscúlos y vesículas, existiendo además micelio y esporas en el suelo circundante (Smith & Read, 2008). Los HMA tienen diversos roles en los ecosistemas naturales. Entre los más importantes se pueden mencionar la facilitación del acceso al fósforo para las plantas, la protección frente a patógenos radicales y la participación en la agregación y estabilidad del suelo (Newsham *et al.* 1995, Smith & Read 2008).

Estudios moleculares realizados por Bidartondo *et al.* (2002) para tres poblaciones patagónicas de *A. uniflora*, revelaron su dependencia a un estrecho linaje de HMA (*Glomus* Grupo A *sensu* Schwarzott *et al.*, 2001; Glomeraceae *sensu* Schüßler & Walker, 2010). Al mismo tiempo, esos hongos fueron encontrados también en raíces de plantas verdes circundantes, como *Osmorhiza chilensis* (Apiaceae), *Austrocedrus chilensis* (Cupressaceae) y *Nothofagus dombeyi* (Nothofagaceae), las cuales podrían ser la fuente de carbono para *A. uniflora*. Además, fueron detectadas otras especies de HMA en el área estudiada, pero ninguno asociado a raíces de *A. uniflora*. El patrón de colonización del hongo micorrízico en raíces de *A. uniflora* fue estudiado por Domínguez & Sérsic (2004) y Domínguez *et al.* (2006, 2009) y se caracteriza por la presencia de hifas inter e intra celulares, rulos, escasas vesículas y vesículas en racimos (estructura no encontrada en otras simbiosis). Si bien no se hallaron arbuscúlos en las raíces de *A. uniflora*, no se sabe qué estructuras forma con sus hospedadores fotosintéticos.

El presente estudio se plantea determinar la o las especies fúngicas de HMA presentes en plantas trampa inoculadas con raíz de *A. uniflora* y suelo rizosférico, además determinar qué tipo de estructuras forma en las raíces del hospedador fotosintético trampa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron muestras de suelo y plantas de *A. uniflora* de tres sitios diferentes, dos de ellos en Argentina: - Lago Cholila, Dpto. Cushamen, Chubut (42° 27' 38"S, 71° 36' 35"W), - Cerro Perito Moreno, El Bolsón, Río Negro (41° 51' 25S, 71° 32' 14"W). El sitio chileno corresponde a Llancahuel, Región de la Araucanía (39° 14' 8"S, 71° 38' 9"W). Las mismas fueron tomadas en Diciembre de 2011.

### *Cultivos trampa:*

A partir de las muestras de suelo se realizó un ensayo en invernadero con el fin de recuperar esporas de HMA presentes en el suelo rizosférico donde crece *A. uniflora*, como así también de la/las morfoespecies presentes en las raíces de *A. uniflora*. Se utilizaron dos fuentes de inóculo: 1) suelo, conteniendo propágulos viables como esporas, micelio extraradical y fragmentos de raíces colonizados con micelio intraradical y vesículas, y 2) fragmentos de raíces de *A. uniflora*.

Como plantas trampa se eligieron "perejil" (*Petroselinum sativum*), "amor seco" (*Bidens pilosa* var. *pilosa*) y "sorgo" (*Sorghum vulgare* (Hack.) Haines), las que se hicieron germinar en arena estéril a partir de semillas esterilizadas. Las plántulas obtenidas se trasplantaron a macetas de 400 cm<sup>3</sup> conteniendo arena y suelo proveniente de los diferentes lugares de muestreo, en una proporción 3:1. Se prepararon 63 macetas siguiendo el siguiente esquema:

Plantas trampa	Fuentes de inóculo	Cholila	P. Moreno	Llancalil
Bidens	Control	n:1	n:1	n:1
	Raíz	n:3	n:3	n:3
	Suelo	n:3	n:3	n:3
Perejil	Control	n:1	n:1	n:1
	Raíz	n:3	n:3	n:3
	Suelo	n:3	n:3	n:3
Sorgo	Control	n:1	n:1	n:1
	Raíz	n:3	n:3	n:3
	Suelo	n:3	n:3	n:3
<b>Total de macetas</b>		21	21	21

donde:

- Control, arena autoclavada: suelo autoclavado
- Raíz, arena autoclavada: suelo autoclavado + fragmentos de raíz de *A. uniflora* utilizada como inóculo
- Suelo, arena autoclavada: suelo de cada lugar utilizado como inóculo

Las plantas se dejaron crecer por 6 meses en invernadero con temperatura, fotoperíodo y riego controlado. Luego, se sometieron a stress hídrico, regando las macetas una vez por semana, durante 45 días, para luego cosechar el experimento.

Los sistemas radicales de cada una de las plantas se dividieron en dos partes. Una parte se clarificó y tiñó siguiendo la técnica de Phillips & Hayman (1970) y Grace & Stribley (1991), para luego ser examinadas bajo microscopio óptico, analizando presencia/ausencia de colonización, e identificando: hifas, puntos de entrada, vesículas, rulos, presencia de arbusculos, etc. La otra parte del sistema radical se conservó en CTAB (esta parte del estudio no será analizada en este trabajo), con la finalidad de identificar la/las especie/s que colonizan a estas plantas desde el punto de vista molecular, como una forma de complementar lo realizado desde el punto de vista morfológico.

Las muestras de suelo se tamizaron y centrifugaron con el fin de extraer las esporas del suelo, empleando mallas de distinto tamaño de apertura (125 y 38  $\mu\text{m}$ ), según la metodología propuesta por Gerdemann & Nicolson (1963) y Walker *et al.*, 1982. Las esporas de HMA obtenidas fueron montadas en portaobjetos con Polivinil-alcohol (PVA) y PVA+Melzer como medios de montaje (Omar *et al.*, 1979; Morton, 1988) para cuantificarlas e identificarlas a nivel de morfoespecies. Los nombres fueron asignados acorde a Schüßler & Walker (2010).

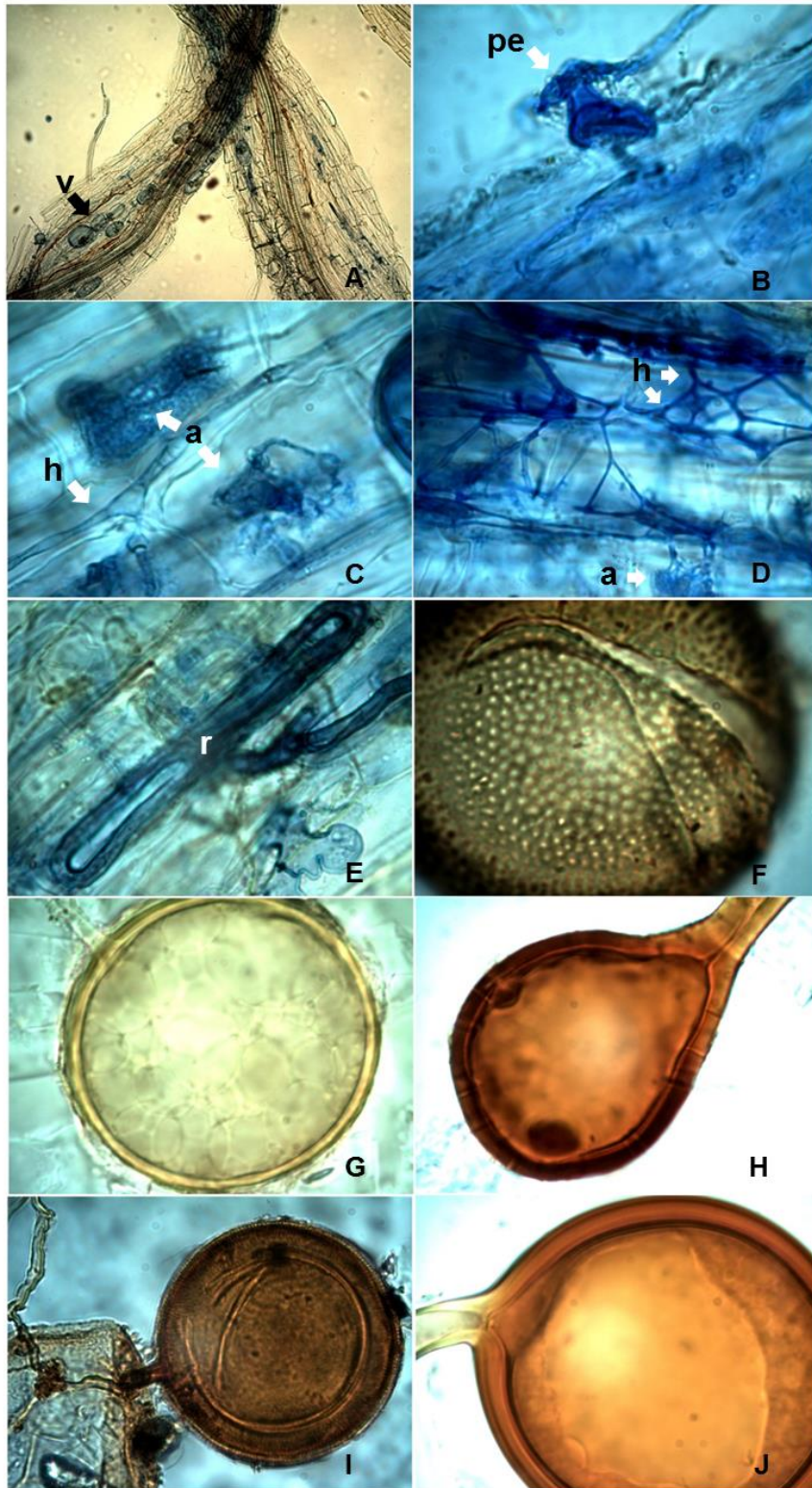
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Análisis de sistemas radicales:*

Se encontraron las típicas estructuras formadas por los hongos micorrízicoarbusculares (puntos de entrada (pe), hifas (h), vesículas (v), rulos (r) y arbusculos (a) (Fig. 1 A, B, C, D, E)) en plantas inoculadas con raíz de *A. uniflora* y suelo nativo. Cabe mencionar la presencia de hifas muy delgadas en raíces de sorgo, tanto inoculadas con suelo nativo como con raíz de *A. uniflora*, formando una red (Fig. 1 D), estructura no hallada anteriormente. En raíces de amor seco se hallaron arbusculos con estructuras globosas.

### *Análisis de suelo:*

Se encontraron 5 morfoespecies (*Acaulospora scrobiculata* (Fig. 1 F), *Claroideoglossum claroideum* (Fig. 1 G), *Glomus* aff. *brohultii* (Fig. 1 H), *Entrophospora infrequens* (Fig. 1 I), *Claroideoglossum* aff. *luteum* (Fig. 1 J)) de las cuales todas estuvieron presentes en el suelo de las 3 especies de plantas trampa inoculadas con suelo nativo. Sólo fueron halladas en suelo de plantas inoculadas con fragmentos de raíz de *A. uniflora*: *A. scrobiculata* y *Claroideoglossum* aff. *luteum*.



**Figura 1:** Hongos micorrízico arbusculares en raíces de plantas trampa y suelo rizosférico de perejil, amor seco y sorgo. A, B, C, D, E, estructuras encontradas dentro de las raíces v: vesículas, pe: punto de entrada, a: arbusculos, h: hifas. F, G, H, I, J, morfoespecies encontradas en las muestras de suelo de este ensayo: F) *A. scrobiculata*, G) *C. claroideum*, H) *G. aff. brohultii*, I) *E. infrequens*, J) *C. aff. luteum*.

## CONCLUSIÓN

Si bien este estudio pretende ser complementado con análisis moleculares, el mismo permitió concluir en la multiespecificidad de simbioses de *A. uniflora*. Además de hallarse estructuras de los HMA específicas en su hospedador fotosintético trampa, que reflejan estrategias diferenciales de asociación con las plantas verdes y con *A. uniflora*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bidartondo, M.I., D. Redecker, I. Hijri, A. Wiemken, T.D. Bruns, L.S. Domínguez, A. Sérsic, J.R. Leake & D.J. Read. 2002. Epiparasitic plant-specialized arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 41: 389–392.
- Cribb, P.J., P. Wilkin & M. Clements. 1995. Corsiaceae: a new family for the Falkland Islands. *Kew Bulletin* 50: 171–172.
- Dimitri, M.J. 1972. Una nueva especie del género 'Arachnitis' Phil. (Corsiaceae). *Revista Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de la Plata* 48: 37–45.
- Domínguez, L., A. Sérsic, L. Melville & R.L. Peterson. 2006. "Prepackaged symbioses" – propagules on roots of the epiparasitic plant *Arachnitis uniflora* Phil. *New Phytologist* 169: 191–198.
- Domínguez, L.S. & A. Sérsic. 2004. The southernmost myco-heterotrophic plant, *Arachnitis uniflora*: root morphology and anatomy. *Mycologia* 96 (5):1143–1151.
- Domínguez, L.S., L. Melville, A. Sérsic, A. Faccio & R.L. Peterson. 2009. The myco-heterotroph, *Arachnitis uniflora*, has a unique association with arbuscular mycorrhizal fungi. *Botany* 87: 1198–1208.
- Dressler, R.L. 1993. Phylogeny and classification of the Orchid Family. Editorial Dioscorides Press, Portland, Oregon. 314 pp.
- Gerdemann, J.W. & T.H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transaction British Mycological Society* 46: 235–244.
- Graaf, K. 1992. Pollendiagramme aus den Anden. Eine Synthese zur Klimageschichte und Vegetationsentwicklung seit der letzten Eiszeit. *Phis. Geograph.* 34: 1–138.
- Grace C. & D.P. Stribley DP. 1991. A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol Res* 95:1160–1162.
- Ibsch, P.L., C. Neinhuis & P.N. Rojas. 1996. On the biology, biogeography, and taxonomy of *Arachnitis* Phil. Nom. Cons. (Corsiaceae) in respect to a new record from Bolivia. *Willdenowia* 26: 321–332.
- Leake, J.R. 1994. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist* 127: 171–216.
- Maas P.J., H. Snelders, J. Benthem & K. Ruyters van der Mass. 1986. Burmanniaceae. *Flora Neotropica*. New York, Botanical Garden p: 42.
- Mabberly, D.J. 1987. The plant book. Editorial Cambridge University Press Cambridge. 706 pp.
- Morton, J.B. 1988. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon* 32: 267–324.
- Newsham, K.K., A.H. Fitter & A.R. Watkinson. 1995. Arbuscular mycorrhiza protect an annual grass from root pathogenic fungi in the field. *Journal of Ecology* 83, 991–1000.
- Neyland, R. & Hennigan. 2003. A phylogenetic analysis of large-subunit (26S) ribosome DNA sequences suggests that the Corsiaceae are polyphyletic. *N Z Jour Bot* 41:1–11.
- Omar, M.B., L. Bolland & W.A. Heather. 1979. P.V.A. (polyvinyl alcohol). A permanent mounting medium for fungi. *Bulletin British Mycological Society* 13:31–32.
- Phillips, J.M. & D.S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transaction British Mycology Society* 55:158–161.
- RübSamen, T. 1986. Morphologische, embryologische und systematische Untersuchungen an Burmanniaceae und Corsiaceae (mit Ausblick auf die Orchidaceae-Apostasioidae). *Diss Bot* 92. J. Cramer, Berlin. 310 p., 98 figures.
- Schüßler A. & C. Walker. 2010. The Glomeromycota: a species list with new families and new genera, Gloucester, in libraries at The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich and Oregon State University.
- Schüßler, A., D. Schwaarzott & C. Walker. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res* 105:1413–1421.



- Schwarzott D., C.Walker & Schüßler A. 2001. *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic Molecular Phylogenetics and Evolution 21 (2): 190-197.
- Smith, S.E. & D.J. Read. 2008. Mycorrhizal Symbiosis, 2nd ed. Academic Press Ltd, London.
- Walker, C., W. Mize & H.S. McNabb. 1982. Populations of endogonaceous fungi at two populations in central Iowa. Canadian Journal of Botany 60: 2518-2529.
- Zhang, D., R.M.K. Saunders & C.M. Hu. 1999. *Corsiopsis chinensis* gen. et sp. nov. (Corsiaceae): First Record of the Family in Asia. Systematic Botany 24:311–314.