

Genética de la simbiosis micorrícica

Estudio de Laccaria bicolor mediante silenciamiento por ARN

La simbiosis micorrícica corresponde a una asociación mutualista antigua entre hongos y raíces de la mayoría de las plantas terrestres. En los ecosistemas naturales, la adquisición de los nutrientes por la planta desde el suelo se produce a través del micelio extrarradical de los hongos simbióticos, los cuales obtienen de la planta hidratos de carbono derivados de la fotosíntesis. Dicha asociación también incrementa la eficacia biológica de la planta al aumentar la disponibilidad de agua, la tolerancia a metales pesados y la resistencia a patógenos.

La mayoría de plantas herbáceas y árboles tropicales se hallan asociados en interacciones endomicorrícicas, es decir, mediante hifas fúngicas que penetran las paredes celulares de la planta huésped. Los árboles de las zonas boreales y templadas, en cambio, suelen formar ectomicorrizas (ECM), simbiosis en las que las hifas crecen sólo a nivel intercelular, sin penetrar las paredes celulares del huésped. En este último grupo se incluyen la mayoría de árboles de importancia económica: pinos, piceas, abedules, álamos y robles, entre otros. Por su parte, los hongos ectomicorrícicos pertenecen sobre todo a los basidiomicetes filamentosos.

A pesar de su gran importancia ecológica y económica, la comprensión actual sobre el reconocimiento entre el huésped y el micosimbionte, y sobre la formación y funcionamiento de los órganos simbióticos, es limitada.

Dificultades técnicas

Durante el último decenio, el uso de técnicas moleculares avanzadas ha permitido ahondar en la genética de la interacción ectomicorrícica. En 2004, el Instituto de genómica del Departamento de energía estadounidense (JGI, de Joint Genome Institute) decidió secuenciar el genoma de los micobiontes de álamo, el primer árbol con su genoma resuelto. La investigación micorrícica entraba así en la era genómica. Fruto de la colaboración entre el JGI y el Consorcio para el Genoma de *Laccaria* (*Laccaria* Genome Consortium), se determinó el genoma del hongo basidiomicete ectomicorrícico *Laccaria bicolor*, en concreto la cepa S238N-H82.

El de *Laccaria* es el primer genoma simbiótico fúngico secuenciado. El mismo ha facilitado el estudio de los perfiles de expresión génica durante los estadios de desarrollo de la simbiosis ECM,

trabajos que han arrojado nueva luz sobre la interacción entre la planta y el hongo. Sin embargo, la investigación actual sobre la interacción ectomicorrícica topa con un obstáculo técnico importante. Para conocer la relevancia biológica de los genes fúngicos regulados en la simbiosis (para la mayoría de los cuales se desconoce su función) se requieren métodos de genética inversa. Dichas herramientas deben permitir, por un lado, una transformación genética reproducible y de alta eficiencia; por otro, alterar el nivel de expresión de los genes de una forma dirigida en el micelio dicariótico, la fase simbiótica del ciclo biológico del hongo.

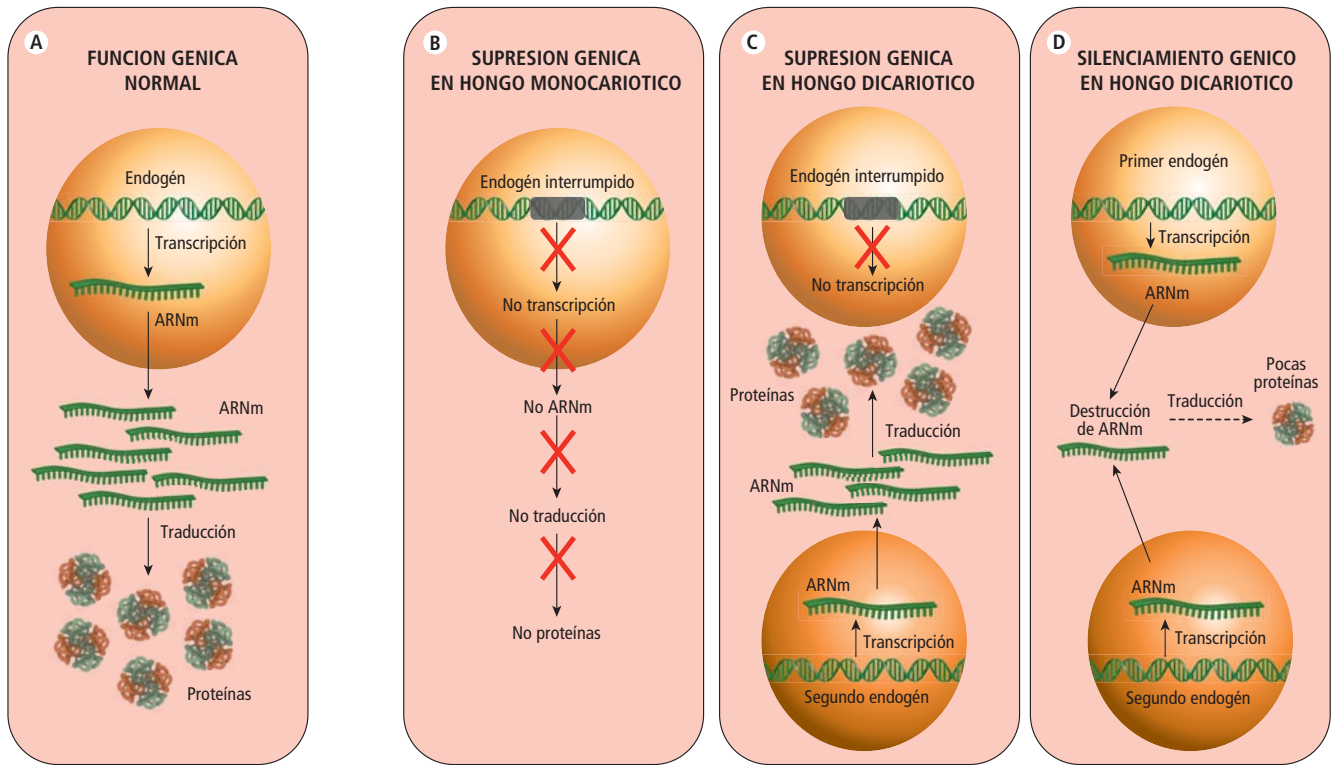
La modificación genética de los basidiomicetes filamentosos no es tarea fácil. Ello se debe, por una parte, a que los métodos tradicionales utilizados para transformar hongos se basan en la obtención y regeneración de protoplastos (células cuyas paredes han sido eliminadas), la cual es sumamente engorrosa en hongos de este grupo. Por otra parte, la manipulación dirigida de los genes es difícil de llevar a cabo debido a la baja tasa de recombinación homóloga que presentan estos organismos. Asimismo, la naturaleza dicariótica del micelio simbiótico dificulta la generación de mutantes nulos en hongos basidiomicetes ectomicorrícicos, dado que deben inactivarse, por recombinación homóloga, dos copias del gen en cuestión.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado una técnica de transformación genética de alto rendimiento para *Laccaria*. Esta técnica, denominada TMA (transformación mediada por *Agrobacterium*), explota la capacidad de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* de transferir genes a otros organismos, un hongo en este caso, para la obtención de organismos transgénicos; se basa en la introducción de resistencia al antibiótico higromicina B.

Esa transferencia de genes permite la manipulación directa de micelio vegetativo intacto, evitando la necesidad de la preparación de protoplastos. La integración del transgén mediante TMA presenta un patrón sencillo; genera sobre



1. *Laccaria bicolor*



2. EN LA FUNCION GENICA normal (A) existe un flujo de información entre el gen y su producto final, una proteína. Este flujo implica primero la transcripción génica en moléculas de ARN mensajero (ARNm) dentro del núcleo de la célula eucariótica (naranja) y la posterior traducción de éstas en el citoplasma celular (rosa). Para interrumpir dicho flujo, podemos recurrir a la supresión génica (*knock-out*) o al silenciamiento génico (*knock-down*). En la supresión génica (B) se

produce una recombinación homóloga del endógen con un transgén no funcional; ello impide la transcripción en ARN y, por tanto, la obtención de proteínas. En los organismos dicarióticos (C), esta técnica no basta para impedir la expresión de un gen, puesto que éstos cuentan con dos núcleos en cada célula (naranja). Se recurre entonces al silenciamiento por ARN (d), que interfiere en la síntesis proteica mediante la destrucción específica de las moléculas de ARNm.

todo integraciones simples. Los genes introducidos suelen integrarse sin preferencias hacia ninguna secuencia nucleotídica. Sin embargo, las cepas transgénicas dicarióticas recuperadas bajo la presión selectiva muestran un desvío notable hacia la integración en secuencias génicas.

Silenciar, mejor que suprimir

Debido a que la tasa de recombinación homóloga de *Laccaria* es extremadamente baja, se descartó el uso de la técnica de supresión génica (*knock-out*). Para la modificación dirigida del nivel de expresión génica en el micelio dicariótico se evaluó un método alternativo: el silenciamiento por ARN.

El silenciamiento por ARN consiste en la degradación de ARN mensajero (ARNm) de una forma dependiente de secuencias homólogas. Se basa en un mecanismo celular antiguo de las células eucariotas, que habría sido seleccionado evolutivamente como un mecanismo de protección contra la invasión de ácidos

nucleicos víricos. En distintos organismos eucarióticos, incluidos los hongos, la vía de silenciamiento por ARN puede activarse de forma artificial, mediante la introducción de ARN de doble cadena en forma de horquilla (ARNh) con homología de secuencia a un ARNm blanco, lo que causa la degradación específica de este último (*knock-down*).

El silenciamiento por ARN puede actuar también a nivel del citosol celular, degradando ARNm originados incluso a partir de varias copias génicas presentes en un mismo o en distintos núcleos. Nos referimos al silenciamiento génico post-transcripcional. Ofrece una manera rápida y eficiente de alterar la expresión génica en organismos multicelulares poliploides, diploides y dicarióticos.

Se usó el gen de la nitrato reductasa (*Lbnr*) a modo de gen de prueba. Se silenció con éxito mediante la expresión transgénica de ARNh vía TMA. El silenciamiento por ARN causó modificaciones epigenéticas, lo que sugiere una conexión entre el silenciamiento por ARN

y la metilación de ADN en *Laccaria*. La variación en la fuerza de silenciamiento génico mostró correlación con los sitios genómicos de integración, pero no con el número de transgenes integrados: las integraciones en las secuencias de los genes altamente activos generó la respuesta de silenciamiento más intensa. Por tanto, el desvío en la integración de los transgenes hacia regiones codificantes producido por la metodología de transformación utilizada sugiere que TMA es altamente compatible con el uso del silenciamiento por ARN en *Laccaria*.

El silenciamiento de *Lbnr* también produjo un fenotipo fúngico no micorrizante con álamo utilizando nitrato como fuente de nitrógeno. Sin embargo, la capacidad simbiótica del hongo fue restaurada por amonio o una fuente de nitrógeno orgánico.

Nuestros resultados constituyen la primera prueba genética de que la eficacia del metabolismo del nitrógeno del hongo desempeña una función crucial en el establecimiento de la simbiosis ectomi-

corríca. Además, sugieren que es la planta quien controla la interacción, de modo que no permite al hongo consumir fotosintatos sin ofrecer cierta cantidad compuestos nitrogenados al huésped (evita el parasitismo). Asimismo, la investigación demuestra que el silenciamiento de genes por ARN en *Laccaria* constituye una herramienta poderosa para el estudio de la interacción ectomicorríca.

Minna J. Kemppainen

Alejandro G. Pardo

*Laboratorio de micología molecular
Departamento de ciencia y tecnología
CONICET-Universidad Nacional de
Quilmes, Argentina*

NOTA A LOS AUTORES:

Hemos intentado simplificar la ilustración 2.

Por favor, revisenla.