

La micorriza arbuscular activa la expresión de un gen vegetal codificador de una metalotioneína en *Pisum sativum* L.

Facundo Rivera-Becerril¹, Philipp Franken³, Silvio Gianinazzi²,
Vivienne Gianinazzi-Pearson²

¹Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calz. del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, 04960 México DF, México. ²UMR 1088 INRA/5184 CNRS/U. Bourgogne Plante-Microbe-Environnement, INRA-CMSE, Dijon, Francia. ³Institute for Vegetable and Ornamental Plants, Großbeeren, Alemania

Arbuscular mycorrhiza activates the expression of a metallothionein-encoding plant gene in *Pisum sativum* L.

Abstract. In order to analyze expression of a metallothionein (MT) encoding plant gene in the arbuscular mycorrhizal symbiosis, transcript quantification was carried out using wild-type *Pisum sativum* (cv. Finale) and a defective myc⁻ genotype mutated for the *sym36* gene (RisNod24), where the fungal partner is not able to form functional arbuscules. Roots of *G. intraradices*-inoculated cv. Finale were colonized by the mycorrhizal fungus but not nodulated and all stages of fungal development were present three to five weeks after inoculation. Only appressoria and hyphae were present in roots of the mutant RisNod24, but no arbuscules. After three and five week's development, the intensity of root cortex colonization in cv. Finale plants was 61% and 50%, respectively, while roots of the mutant RisNod24 exhibited 7% and 5%, respectively. The expression profile of the MT-encoding gene in roots of both pea genotypes was similar after one week development. However, in three and five week-old cv. Finale accumulation of the *PsMT_A* transcripts was ten and two-fold higher, respectively, than in the mutant RisNod24. The protein encoded by the *PsMT_A* gene could be involved in metal transport and/or homeostasis as well as in strategies of tolerance of heavy metal toxicity in the mycorrhizal symbiosis.

Key words: Arbuscular mycorrhiza, cadmium, metallothionein, *Pisum sativum*.

Resumen. Con el objetivo de analizar la expresión de un gen vegetal codificador de una metalotioneína (MT) en la micorriza arbuscular, la cuantificación de los transcritos fue llevada a cabo utilizando un genotipo silvestre de *Pisum sativum* (cv. Finale) y un genotipo defectivo myc⁻ mutado en el gen *sym36* (RisNod24), donde el micosimbionte no es capaz de formar arbusculos funcionales. Las raíces de cv. Finale inoculadas con *G. intraradices* fueron colonizadas por el hongo pero no noduladas y todos los estadios del desarrollo fúngico estuvieron presentes después de tres y cinco semanas de inoculación. Apresorios e hifas se observaron en las raíces del mutante RisNod24, pero ningún arbusculo. Después de tres y cinco semanas, la intensidad de colonización del córtex en cv. Finale fue 61% y 50%, respectivamente, mientras que las raíces del mutante RisNod24 exhibieron el 7% y 5%. El perfil de expresión del gen codificador de la MT en las raíces de ambos genotipos fue similar después de una semana de desarrollo. Sin embargo, a las tres y cinco semanas de inoculación de cv. Finale, la acumulación de los transcritos de *PsMT_A* fue diez y dos veces mayor, respectivamente, que en el mutante RisNod24. La proteína codificada por el gen *PsMT_A* pudiera estar involucrada en el transporte del metal y/o homeostasis, así como en estrategias de tolerancia contra la toxicidad por metales pesados en la simbiosis micorrízica.

Palabras clave: Cadmio, metalotioneína, micorriza arbuscular, *Pisum sativum*.

Received 28 April 2005; accepted 5 September 2005.

Recibido 28 de abril 2005; aceptado 5 de septiembre 2005.

Autor para correspondencia: Facundo Rivera-Becerril
frivera@correo.xoc.uam.mx

Introducción

Las plantas han desarrollado diferentes mecanismos para responder a deficiencias nutricionales, así como contra la presencia de agentes tóxicos. En particular, algunos de los metales pesados (MEP) pueden constituirse como elementos esenciales o perjudiciales (Fe, Mg, Mn, Zn), pero otros son solamente tóxicos para la célula (Hg, Cd) [2]. En las plantas las moléculas más importantes que se unen a los MEP son las fitoquelatinas y las metalotioneínas (MTs), lo cual facilita el transporte y/o homeostasis de esos iones metálicos, además de que intervienen en la detoxificación de esos elementos en el interior de las células. Las MTs son proteínas ricas en cisteína y de bajo peso molecular (<10 kDa) [2]. Cierta número de genes codificadores de MTs se han identificado en varios vegetales, incluyendo la leguminosa *Pisum sativum* [5, 12, 14].

La mayoría de las plantas viven en relación estrecha con microorganismos del suelo como en el caso de la micorriza arbuscular (MA), asociación mutualista que establecen el 80% de las plantas terrestres con hongos pertenecientes al phylum Glomeromycota. Esta asociación juega un papel clave en la adaptación al ambiente, contribuyendo a una mejor nutrición y a la protección vegetal contra diferentes tipos de estrés, incluyendo los nutricionales y los derivados de la presencia de MEP en el suelo [10]. Empero, poco se conoce acerca del funcionamiento de las MTs durante el proceso de micorrización. Recientemente fue reportado el aislamiento del primer gen codificador de una MT en un hongo micorrízico arbuscular, *Gigaspora margarita* [13], lo que sugiere que durante el establecimiento de la MA ambos simbiontes podrían estar produciendo tales moléculas, con una participación clave de las mismas en situaciones de estrés impuesto por elementos metálicos [16]. Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue analizar la expresión del gen codificador de una MT tipo I de

origen vegetal (*PsMT_A*) [5] durante el establecimiento de la MA entre *P. sativum* y *G. intraradices*. La cuantificación de los transcritos de *PsMT_A* fue llevada a cabo por RT-PCR en tiempo real, utilizando iniciadores específicos diseñados a partir de secuencias homólogas. Se compararon los niveles de expresión del gen en las raíces micorrizadas y no micorrizadas de un genotipo silvestre de *P. sativum* L. (cv. Finale), y de un genotipo defectivo *myc⁻* (RisNod24) mutado en el gen *sym36*, donde el micosimbionte no es capaz de formar arbusculos [7, 15].

Materiales y métodos

Condiciones de cultivo y muestreo de plantas

Las semillas de *Pisum sativum* L. cv. Finale y RisNod24, fueron desinfectadas y germinadas [18]. Después de cinco días, las plántulas fueron transplantadas individualmente en 400 g de una mezcla suelo:arena 1:1 (v/v) como sustrato. El suelo (arcillo arenoso, pH 8.1 en H₂O, 16.6 g C kg⁻¹, 1.8 g N kg⁻¹, 26 mg P Olsen kg⁻¹, 0.9 g Cd kg⁻¹), proveniente de la región agrícola de Époisses (Dijon, Francia), fue irradiado (10 kGy) y esterilizado por calor 4 h, 180°C. La arena (Special Aquarium, Quartz, Nr. 3, Zolux, Francia) fue lavada y enseguida esterilizada en autoclave en tres ocasiones 1 h a 121°C.

Las plantas fueron inoculadas con *Glomus intraradices* Schenck y Smith (BEG 141). Para ello, el suelo del sustrato de crecimiento fue reemplazado por el inóculo (raíces de cebolla micorrizadas de diez semanas de edad, esporas e hifas en el mismo suelo de crecimiento). Las plantas testigo permanecieron sin inocularse y sólo recibieron un filtrado (Whatman No. 2) del inóculo para reconstituir la microflora asociada del suelo, sin *G. intraradices*. Las macetas fueron colocadas al azar en una cámara de crecimiento (20-24°C noche-día, fotoperiodo 16 h, 330 mol m⁻² s⁻¹, 70% humedad relativa). El riego consistió en 20 ml de

una solución Long Ashton modificada sin fosfato y con dos veces nitrato para compensar la falta de *Rhizobium* [4] durante tres veces por semana, y los otros días sólo se aplicó agua Milli-Q.

Después de una, tres y cinco semanas de inoculación se llevó a cabo la cosecha de las plantas. El sistema radical fue lavado en agua corriente y enseguida en agua deionizada fría. Una porción de las raíces fue utilizada para determinar la intensidad de colonización del córtex por *G. intraradices* después de una tinción con azul de tripano [20] (<http://www.dijon.inra.fr/bbceipm/Mychintec/NewFiles/New.html>). La ausencia de nódulos se confirmó visualmente. El resto de raíces fue almacenado en nitrógeno líquido para los análisis moleculares ulteriores.

Extracción de RNA y tratamiento con DNasa

El RNA total fue extraído a partir de las raíces [6], y tratado con DNasa mediante una incubación de 50 μ g de RNA 30 min a 37°C con 40 U de inhibidor de RNasa (RNasine, Ribonuclease Inhibitor, Promega), 3 U DNasa libre de RNasa (RQ1 DNase, Promega), 6 μ l amortiguador 10x y agua DEPC a un volumen final de 60 μ l. La DNasa fue removida con un vol de una solución fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y el RNA fue precipitado una noche a 20°C en 0.1 vol de acetato de sodio (3 M) y 2.5 vol etanol (96%). Después de una centrifugación a 4°C, el RNA fue lavado con etanol (70%), centrifugado de nuevo, secado y resuspendido en 10 μ l de agua DEPC. La concentración del RNA libre de DNA fue estimada al espectrofotómetro y la calidad fue evaluada en geles desnaturizantes de agarosa.

Síntesis de cDNA y clonación

Un μ g de RNA libre de DNA fue desnaturizado 10 min a 65°C, y posteriormente incubado en hielo por 5 min y utilizado como molde para la síntesis de cDNA en una reacción con un volumen de 25 μ l durante 15 min a 25°C, seguido por una 1 h a 37°C, y 2 min a 95°C, en presencia de

200 U de transcriptasa inversa (Reverse Transcriptase M-MLV RNase H, Promega), 80 U de inhibidor de RNasa (RNasine, Ribonuclease Inhibitor, Promega), 2.5 mM dNTPs, 0.75 μ g del iniciador oligo(dT)₁₅ (Promega), con el amortiguador recomendado por el fabricante. El cDNA fue almacenado a 20°C hasta su uso.

Un μ l de cDNA fue utilizado como molde para las reacciones de PCR en un volumen final de 20 μ l conteniendo 100 μ M dNTPs, amortiguador 1x PCR (Gibco-BRL, USA), 2.5 mM MgCl₂, 0.25 U *Taq* DNA polimerasa (Gibco-BRL, USA) y 0.5 μ M de iniciadores específicos deducidos a partir de secuencias de genes disponibles de *P. sativum*, codificando una metalotioneína (*PsMT_a*, Z23097; iniciadores: *for* G T C T A G T G G A T T G A G C T A C T C , *rev* GGGTCACAAGTGCAGTTATC, tamaño del segmento amplificado 152 pb), así como una α -tubulina (*-tub*, X54845; iniciadores: *for* CAACGAAGCTAGCTGTGGTTCG, *rev* AGTAAGCATCATCCTATCAGG, tamaño del segmento amplificado 348 pb). La PCR fue realizada en un termociclador T3 (Biomtra) con los siguientes parámetros: desnaturización inicial a 95°C, 3 min, 30 ciclos de desnaturización a 95°C, 45 s, hibridación de los iniciadores a 62°C por 45 s, alargamiento por 72°C, 45 s, y un alargamiento final a 72°C, 5 min.

Los fragmentos amplificados de cDNA fueron separados en geles de agarosa 1.2%, las bandas sencillas fueron extraídas (Bio 101, Vista, USA), ligadas al vector pGEM-T (Promega) y utilizadas para transformar células competentes de *Escherichia coli* JM109 (Promega). Los clones recombinantes fueron seleccionados mediante PCR [8], cultivados y el DNA plasmídico fue aislado [19]. La secuenciación se realizó utilizando los iniciadores T7 y SP6 (Genome Express Company, Grenoble, Francia o MWG, Ebersberg, Alemania). La identidad de las secuencias se confirmó por búsqueda de similaridad en las bases de datos EMBL con el auxilio del programa BLASTN 2.2.4 [1] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

RT-PCR en tiempo real

Con el objetivo de establecer una curva patrón para cada gen, los plásmidos recombinantes extraídos de las células de *E. coli* fueron diluidos desde 10^7 hasta 10^1 copias. Una muestra de 2.5 μ l de cada dilución fue utilizada como molde en reacciones de PCR con un volumen final de 25 μ l utilizando 1.2 μ l del iniciador correspondiente a una concentración 10 μ M, enzima y amortiguador proporcionado en el Smart™ Kit para Sybr™ Green I (Eurogentec), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La PCR se llevó a cabo en un Smart Cycler (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA): el primer ciclo consistió en una desnaturalización a 95°C, 12 min, seguido de 40 ciclos a 95°C, 15 s, 62°C, 15 s y 72°C, 15 s, y finalmente por un ciclo con una polimerización extendida a 60°C por 95 s. Se realizaron las curvas de fusión incrementando la temperatura desde 60°C hasta 90°C en pasos de 0.2°C s⁻¹, con el objetivo de verificar la pureza de los productos obtenidos en la reacción [3]. Para cada uno de los genes se obtuvo la curva de calibración representando el logaritmo de la concentración del gen buscado en función del ciclo umbral.

Las reacciones RT-PCR en tiempo real fueron llevadas a cabo utilizando cDNA sintetizado a partir del RNA extraído de las raíces, en un volumen final de 25 μ l conteniendo como molde 1 μ l de cDNA diluido cuatro veces, bajo las mismas condiciones descritas previamente. El ciclo umbral fue transformado a números absolutos utilizando la ecuación de la curva de calibración respectiva.

Resultados y discusión

No se observaron nódulos fijadores de nitrógeno en ninguna de las plantas de *P. sativum*. En las raíces no inoculadas, la colonización micorrízica estuvo ausente. Las raíces de cv. Finale inoculadas exhibieron colonización por el hongo micorrízico arbuscular y todos los estadios del desarrollo

fungal (apresorios, hifas intercelulares, arbusculos) fueron identificados desde las tres semanas de inoculación. En contraste, las raíces del genotipo mutado RisNod24 presentaron algunas hifas intercelulares y una ausencia total de arbusculos (Fig. 1). Después de tres y cinco semanas de desarrollo, la intensidad de colonización del córtex en cv. Finale fue 61% y 50%, respectivamente, mientras que las raíces del mutante RisNod24 exhibieron el 7% y 5% solamente.

Con relación a los resultados moleculares, las ecuaciones de calibración establecidas para calcular el número de transcritos fueron como sigue: gen *PsMT_A*, $Y=0.291X+12.265$ ($r^2=0.998$); gen *-tub*, $Y=0.221X+12.025$ ($r^2=0.972$), donde X corresponde al valor del ciclo umbral (C_t) observado durante la RT-PCR en tiempo real [3]. Los valores absolutos de *PsMT_A* fueron normalizados tomando como base los obtenidos para la *-tub*, gen que ha sido utilizado como testigo durante el estudio de la expresión de genes codificadores de MTs en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* [17]. De esta forma, el perfil de expresión de *PsMT_A* en las raíces de cv. Finale y RisNod24 se presenta en la figura 2, y se expresa como la proporción raíces micorrizadas/raíces no micorrizadas. Los resultados muestran que una semana después de la inoculación, los niveles de expresión del gen *PsMT_A* fueron semejantes tanto en el genotipo silvestre como

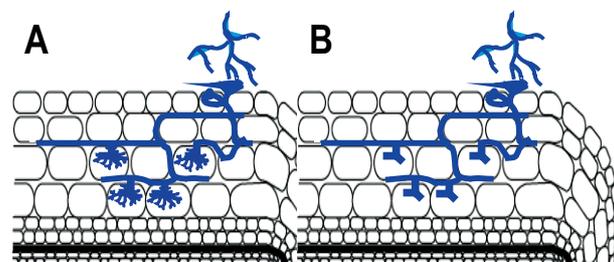


Figura 1. Colonización por *Glomus intraradices* en las raíces de dos genotipos de *Pisum sativum*. (A) Genotipo silvestre cv. Finale donde hay formación de arbusculos funcionales. (B) Genotipo defectivo *myc⁻* RisNod24, mutado en el gen *sym36*, donde el micosimbionte no es capaz de formar arbusculos.

en el mutado. En contraste, a la tercera semana de desarrollo de la MA, la acumulación de los transcritos de *PsMT_A* en cv. Finale fue 1000% superior que en RisNod24. Finalmente, cinco semanas posteriores a la inoculación, el genotipo silvestre exhibió una acumulación de transcritos 200% superior que en el mutado (Fig. 2). Estos resultados ponen en evidencia la activación de genes codificadores de MTs durante el establecimiento de la MA, función alterada en el mutante RisNod24 debido a la reducción en los niveles de colonización radical por el hongo micorrízico, incluyendo la ausencia de arbusculos.

Los resultados presentados aquí coinciden con el reporte previo de un análisis *in silico*, el cual predice la activación de genes vegetales codificadores de distintas MTs durante la interacción entre *Medicago truncatula* y *G. intraradices* [11]. En otra asociación mutualista, transcritos de una MT (*cgMT1*) se localizaron en células de *Casuarina glauca* colonizadas por el actinomiceto *Frankia*, donde la proteína correspondiente se presume pudiera estar involucrada en el transporte y/o homeostasis de ciertos metales [14]. Algo semejante podría estar ocurriendo en

células colonizadas por el hongo micorrízico, sin embargo, más esfuerzos son requeridos para incrementar el conocimiento del papel de las MTs durante el desarrollo de la MA.

La presente investigación ilustra, además, cómo las plantas mutantes se constituyen como una herramienta valiosa para el estudio del funcionamiento de la MA. En el mutante de *P. sativum* RisNod24, el hongo micorrízico se extiende intercelularmente a través del córtex radical, pero el crecimiento intracelular de las hifas se limita y sólo arbusculos truncados se podrían observar [7, 15]. La falta de arbusculos funcionales afecta al hongo micorrízico reduciendo grandemente su desarrollo intrarradical, lo cual influye directamente en la fisiología de la planta.

En conclusión, en este reporte se demuestra la activación de un gen vegetal codificador de una MT durante el establecimiento de la MA entre *P. sativum* y *G. intraradices*. La proteína correspondiente pudiera estar operando en forma muy localizada de tal manera que las funciones simbióticas podrían estar protegidas. Finalmente, dado que se ha demostrado que la MA incrementa la protección vegetal contra los MEP [9, 16, 18], el estudiar los niveles de MTs bajo estas condiciones de estrés, ayudará a comprender mejor el papel de la simbiosis mutualista en la tolerancia.

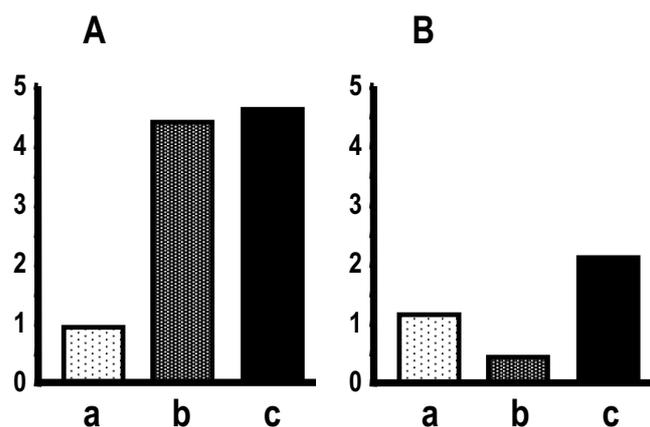


Figura 2. Perfil de expresión del gen *PsMT_A*, codificador de una MT, en las raíces de los genotipos cv. Finale (A) y RisNod24 (B) de *Pisum sativum*, después de una (a), tres (b) y cinco (c) semanas de inoculación con *Glomus intraradices* (BEG 141). La expresión de *PsMT_A* fue normalizada con relación a la del gen de referencia, *?-tub*, y expresada como la proporción raíces micorrizadas/raíces no micorrizadas

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. F. Martin-Laurent (INRA, Dijon) las facilidades otorgadas para el uso del equipo de RT-PCR en tiempo real.

Literatura citada

- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids*

Research 25:3389-3402.

2. Cobbett, C.S., P.B. Goldsbrough, 2000. Mechanisms of metal resistance: Phytochelatins and metallothioneins. *In*: Raskin, I., B.D. Ensley (eds.), *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. John Wiley & Sons, Londres. pp.247-269.
3. Devers, M., G. Soulas, F. Martin-Laurent, 2004. Real-time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil. *Journal of Microbiological Methods* 56:3-15.
4. Dumas-Gaudot, E., P. Guillaume, A. Tahiri-Alaoui, V. Gianinazzi-Pearson, S. Gianinazzi, 1994. Changes in polypeptide patterns in tobacco roots colonized by two *Glomus* species. *Mycorrhiza* 4:215-221.
5. Evans, I.M., L.N. Gatehouse, J.A. Gatehouse, N.J. Robinson, R.R.D. Croy, 1990. A gene from pea (*Pisum sativum* L.) with homology to metallothionein genes. *FEBS Letters* 262:29-32.
6. Franken, P., F. Gnädinger, 1994. Analysis of parsley arbuscular endomycorrhiza-infection development and messenger-RNA levels of defense-related genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7:612-620.
7. Gianinazzi-Pearson, V., 1996. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: Getting to the roots of the symbiosis. *Plant Cell* 8:1871-1883.
8. Güssov, D., T. Clackson, 1989. Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research* 17:4000.
9. Heggo, A., J.S. Angle, R.L. Chaney, 1990. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans. *Soil Biology and Biochemistry* 22:865-869.
10. Jeffries, P., S. Gianinazzi, S. Perotto, K. Turnau, J.-M. Barea, 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils* 37:1-16.
11. Journet, E.-P., D. van Tuinen, J. Gouzy, H. Crespeau, V. Carreau, M.-J. Farmer, A. Niebel, T. Schiex, O. Jaillon, O. Chatagnier, L. Godiard, F. Micheli, D. Kahn, V. Gianinazzi-Pearson, P. Gamas, 2002. Exploring root symbiotic programs in the model legume *Medicago truncatula* using EST analysis. *Nucleic Acids Research* 30:5579-5592.
12. Kohler, A., D. Blaudez, M. Chalot, F. Martin, 2004. Cloning and expression of multiple metallothioneins from hybrid poplar. *New Phytologist* 164:83-93.
13. Lanfranco, L., A. Bolchi, E.C. Ros, S. Ottonello, P. Bonfante, 2002. Differential expression of a metallothionein gene during the presymbiotic versus the symbiotic phase of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant Physiology* 130:58-67.
14. Laplaze, L., H. Gherbi, E. Duhoux, K. Pawlowski, F. Auguy, F. Guermache, C. Franche, D. Bogusz, 2002. Symbiotic and non-symbiotic expression of *cgMT1*, a metallothionein-like gene from the actinorhizal tree *Casuarina glauca*. *Plant Molecular Biology* 49:91-92.
15. Lapopin, L., V. Gianinazzi-Pearson, P. Franken, 1999. Comparative differential RNA display analysis of arbuscular mycorrhiza in *Pisum sativum* wild type and a mutant defective in late stage development. *Plant Molecular Biology* 41:669-677.
16. Leyval, C., K. Turnau, K. Haselwandter, 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: Physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7:139-153.
17. Murphy, A., L. Taiz, 1995. Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. Correlation with copper tolerance. *Plant Physiology* 109:945-954.
18. Rivera-Becerril, F., C. Calantzis, K. Turnau, J.-P. Caussanel, A.A. Belimov, S. Gianinazzi, R.J. Strasser, V. Gianinazzi-Pearson, 2002. Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. *Journal of Experimental Botany* 53:1177-1185.
19. Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis, 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.
20. Trouvelot, A., J.L. Kough, V. Gianinazzi-Pearson, 1986. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire ayant une signification fonctionnelle. *In*: Gianinazzi-Pearson, V., S. Gianinazzi (eds.), *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. INRA Presse, Paris. pp 217-221.