



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Anàlisi molecular de la diversitat genètica en micorrizes arbusculars associades a la vinya baix cultiu ecològic

Marina Llabrés Tugores

Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2018-19

DNI de l'alumne: 78220086F

Treball tutelat per José Antonio Jurado Rivera

Departament de Biologia

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:

Fongs formadors de micorrizes, vinya, Glomeromycota, identificació molecular d'espècies, *SSU*, *LSU*, *ITS*

ÍNDEX

1	RESUM.....	1
1.1	Abstract.....	1
2	INTRODUCCIÓ	2
3	OBJECTIU.....	6
4	MATERIALS I MÈTODES	7
4.1	Mostreig	7
4.2	Extracció i quantificació d'ADN.....	8
4.3	Marcadors moleculars utilitzats.....	8
4.4	Amplificació mitjançant PCR	9
4.5	Electroforesi dels productes de PCR.....	10
4.6	Clonació dels productes de PCR	10
4.7	Selecció de clons i amplificació per PCR	11
4.8	Purificació dels productes de PCR.....	12
4.9	Seqüenciació dels productes de PCR.....	13
4.10	Precipitació de la reacció de seqüenciació	13
4.11	Edició d'electroferogrames	14
4.12	Anàlisi bioinformàtic de les seqüències	14
5	RESULTATS	15
5.1	Extracció i quantificació d'ADN.....	15
5.2	PCR.....	16
5.3	Clonació i purificació dels productes de PCR	17
5.4	Edició d'electroferogrames	19
5.5	Anàlisi bioinformàtic de les seqüències	19
6	DISCUSIÓ	21
6.1	Qualitat de les mostres.....	21
6.2	Precisió de les identificacions taxonòmiques	22
6.3	Fongs identificats.....	24
7	CONCLUSIÓ.....	26
8	AGRAÏMENTS.....	26
9	BIBLIOGRAFIA	27

1 RESUM

Les micorrizes són associacions simbiòtiques entre determinats fongs del sòl i les arrels de les plantes. Els fongs formadors de micorrizes aporten un gran nombre de beneficis a la planta hoste, ja que augmenten la superfície d'absorció de la planta facilitant l'absorció de nutrients i aigua. A més, també augmenten la tolerància de la planta hoste a l'atac de patògens, i protegeixen contra el canvi climàtic. Concretament en la vinya s'ha demostrat que la formació de micorrizes afavoreix l'acumulació de composts antioxidants propis del raïm, augmentant l'activitat antioxidant de la vinya. Donada la importància de les micorrizes en els cultius agrícoles, una correcta identificació de les espècies de fongs formadores de micorrizes és important per garantir l'èxit dels cultius. Els primers estudis taxonòmics i sistemàtics foren duts a terme per Tuslane (1845) i Thaxer (1922), que identificaren que el major nombre de fongs formadors de micorrizes pertanyien a la Divisió Glomeromycota. L'estudi morfològic ha anat acompanyat de l'ús de característiques bioquímiques permetent la separació dels taxons en distints nivells. La identificació a partir de les característiques morfològiques de les espores té una sèrie de limitacions, com el fet de distingir entre espores viables i les no viables. Per aquest motiu, l'aplicació de tècniques moleculars per a la correcta identificació i classificació és important de cara a conèixer més a fons aquest grup de fongs. En el present estudi s'ha extret ADN de 32 mostres d'arrels de vinya amb l'objectiu d'establir si són susceptibles a ser amplificades i seqüenciades amb marcadors moleculars específics de fongs formadors de micorrizes. De les identifications realitzades, aquelles relatives al gènere *Glomus* es corresponen amb fongs formadors de micorrizes. Per a la majoria de mostres es va poder arribar al nivell de gènere del fong al qual pertanyien les seqüències obtingudes i, en menor mesura, al nivell d'espècie.

1.1 Abstract

Mycorrhizae are symbiotic associations between some soil fungi and plant roots. Mycorrhizal fungi provide a large number of benefits to the host plant by increasing the absorption surface of the plant, facilitating the absorption of nutrients and water. In addition, they also increase the host plant's tolerance to pathogen attack and protect against climate change. Specifically, in the vineyard it has been demonstrated that the formation of mycorrhizae stimulates the accumulation of antioxidant compounds typical of the grape, increasing the antioxidant activity of the vineyard. Given the importance of mycorrhizae in agricultural crops, a correct identification of

the species of fungi that form mycorrhizae is essential to ensure crop success. The first taxonomic and systematic studies were carried out by Tuslane (1845) and Thaxer (1922), who identified that the largest number of mycorrhizal fungi belonged to the Glomeromycota Division. The morphological study has been accompanied using biochemical characteristics allowing the separation of taxa at different levels. Identification from the morphological characteristics of spores has several limitations, such as having to distinguish between viable and non-viable spores. For this reason, the implementation of molecular approaches for the correct identification and classification is important in order to know more about this group of fungi. Here, we extract DNA from 32 vine root samples in order to establish whether they are susceptible to amplification and sequencing using mycorrhizal fungi specific molecular markers. Of the sequences obtained, those relating to the genus *Glomus* correspond to mycorrhizal fungi. For most samples it was possible to reach the genus level of the fungus to which the sequences obtained belong and, to a lesser extent, to the species level.

2 INTRODUCCIÓ

Les micorrizes són associacions simbiòtiques entre les arrels de les plantes i alguns fongs del sòl, coneguts com a fongs formadors de micorrizes. Es formen en una zona d'interacció dinàmica anomenada rizosfera. S'estima que entre el 80 i el 90% de les espècies de plantes terrestres existents tenen la capacitat de formar micorrizes (Vigneron, Radhakrishnan, i Delaux, 2018).

Es poden fer dues classificacions generals de les micorrizes: depenent de l'estructura simbiòtica i de la vascularitat de la planta hoste. En funció de l'estructura simbiòtica es troben 3 tipus de micorrizes: ectomicorrizes, que es desenvolupen intercel·lularment sense que es produeixi penetració intracel·lular; endomicorrizes o micorrizes arbusculars on el fong penetra dins les cèl·lules del còrtex produint-se un intercanvi de nutrients i les ectendomicorrizes, una combinació de les dues anteriors. Depenent de la vascularitat de la planta hoste, es poden formar micorrizes estrictes o estructures similars a les micorrizes. Les estructures similars a les micorrizes es formen en plantes no vasculares, és a dir, sense arrels amb estructures fúngiques intracel·lulars similars als arbúsculs (Hoysted et al., 2018; Nogales, 2006).

Les endomicorrizes o micorrizes arbusculars es troben presents en la majoria de plantes hortícoles, així com arbres fruiters o la vinya. Els fongs formadors de micorrizes són simbionts obligats, és a dir, no són capaços de completar el seu cicle

biològic sense la planta hoste i necessiten estar associats a l'arrel de la planta per obtenir els hidrats de carboni procedents de la fotosíntesis. La simbiosi s'aconsegueix mitjançant la comunicació química entre microorganismes en la rizosfera. Aquests alliberen factors de transcripció que són reconeguts pels receptors potencials de la planta i activen una sèrie de vies de senyalització de simbiosi comú compartida. Així mateix, les arrels de la planta hoste alliberen fitohormones estrigolactones, una funció de les quals és induir la germinació de les espores del fong i el creixement de les hifes cap a l'arrel de la planta. Una vegada entren en contacte amb la superfície de l'arrel, les hifes poden formar uns apèndix anomenats hifopodis, la funció del qual és subjectar l'arrel en el conjunt del miceli del fong. Posteriorment, les cèl·lules epidèrmiques de l'arrel de la planta experimenten una sèrie d'esdeveniments de reprogramació, que inclouen moviment dels nuclis i canvis en els microtúbuls i el reticle endoplasmàtic per formar un aparell de prepenetració que guia a les hifes per rompre les cèl·lules epidèrmiques de l'arrel. Aleshores, el fong creix intracel·lularment formant estructures altament ramificades anomenades arbúsculs. Els arbúsculs estan envoltats per la membrana periarbuscular que separa l'arbúscul del citoplasma de la planta (Nogales, 2006; Wang et al., 2017).

Son molts els efectes beneficiosos de la simbiosi micorrízica. Els fongs formadors de micorrizes augmenten la superfície d'absorció de la planta hoste facilitant l'absorció de nutrients minerals com calci, sofre, zinc i ferro, entre altres (Nogales, 2006). Aquest fet és especialment important en el cas dels elements immòbils com el fòsfor ja que la disponibilitat per a la planta és limitada. Gràcies a les micorrizes, les plantes absorbeixen fins a un 80% del nitrogen i el 100% del fòsfor necessari per al seu creixement i proliferació, així com l'augment de la capacitat d'absorció d'aigua i nutrients (Hoysted et al., 2018). A la vegada, la planta hoste subministra als fongs una font de carboni essencial (20%) per al creixement d'aquests (Ambrosini et al., 2015; Wang et al., 2017).

Una altra funció important de les micorrizes és augmentar la tolerància de la planta hoste a l'atac de patògens mitjançant el creixement de les hifes ajudant a la conservació de la biomassa de les arrels (Camprubí et al., 2008; Nogales, 2006).

A més, s'ha vist que els fongs formadors de micorrizes indueixen relacions hormonals que provoquen que les arrels romanguin fisiològicament actives durant més temps que les arrels no micorrizades (Hoysted et al., 2018).

Aquesta naturalesa beneficiosa de la simbiosi micorrízica i el seu impacte positiu en l'aptitud de la planta ha estat documentat en moltes espècies vegetals (Vigneron et al., 2018), incloent-hi la vinya. Aquest tipus de cultiu presenta micorrizes que

s'estableixen de forma natural sempre i quan en el sòl es trobin els propàguls del fong formador de micorrizes en quantitats suficients per a colonitzar les arrels (Schreiner, 2003). Els fongs formadors de micorrizes tenen una funció cada vegada més important en els sistemes de producció vitícola ja que una bona micorrització suposa una menor pèrdua de plantes i un desenvolupament més ràpid per entrar abans en producció. Aquest efecte pot esser encara més significatiu en les vinyes replantades, on la planta creix més lentament mostrant símptomes de clorosis i un desenvolupament pobre del sistema radicular (Camprubí et al., 2008).

A més, s'ha demostrat que la formació de micorrizes afavoreix l'acumulació dels composts antioxidants presents de manera natural en el raïm – com els flavonols i les antocianines – augmentant l'activitat antioxidant de les fulles de la vinya (Torres, Goicoechea, Zamarreño, i Carmen Antolín, 2018).

En moltes regions de la Mediterrània, la viticultura es veu sotmesa a estrès per elevades temperatures des del final de la primavera fins a la collita del raïm per setembre. La viticultura és un dels sectors més sensibles als canvis climàtics (Torres et al., 2018) i s'ha vist que l'impacte de les elevades temperatures és un dels factors ambientals que més influeix en el metabolisme primari i secundari i, com a conseqüència, disminueix la qualitat del raïm i les fulles. S'ha demostrat com la formació de micorrizes confereix a la planta hoste tolerància front als esdeveniments climàtics propis del sud de la Mediterrània, com l'elevada temperatura i alteracions de la pluja provocant estrès hídric (Schreiner, 2003; Torres et al., 2018). Pel que fa a la captació de nutrients a les vinyes, s'ha demostrat que la formació de micorrizes és una estratègia de supervivència de la planta front a les deficiències de nutrients minerals en regions amb una geologia molt similar a la de l'Arxipèlag de les Illes Balears (Likar, Hančević, Radić, i Regvar, 2013).

Donada la importància de les micorrizes en els cultius agrícoles, és important una correcta identificació taxonòmica de les espècies de fongs formadors de micorrizes per a garantir l'èxit dels cultius. Els primers estudis taxonòmics i sistemàtics dels fongs formadors de micorrizes foren realitzats pels germans Tulasne (1845) i la revisió de Thaxter (1922). En els últims 40 anys, la classificació d'aquest grup de fongs ha sofert transformacions considerables, des d'una classificació merament descriptiva i basada únicament en la morfologia de les espores als anàlisis de caràcters genètics i fenotípics (Stürmer, 2012). L'estudi morfològic s'ha ajudat de l'ús de característiques bioquímiques com els isoenzims que permeten la separació dels taxons en distints nivells (Dodd et al., 1996; HEPPEL, SEN, i MASKALL, 1986).

La classificació taxonòmica dels fongs micorrízics és complicada però actualment es considera que pertanyen a la Divisió Glomeromycota, estructurada en 4 ordres amb més de 150 espècies descrites i classificades en 10 gèneres (Figura 1). Els fongs de la divisió Glomeromycota es distribueixen globalment i la majoria dels taxons es troben en diversos continents. Els fongs que pertanyen a aquesta divisió es caracteritzen per no presentar una reproducció sexual coneguda i per ser simbiotes obligats de moltes plantes terrestres. Cal destacar que es diferencien d'altres tipus de fongs per el gran tamany de les seves espores, així com per presentar hifes no septades. Antigament, les classificacions es feien exclusivament en funció de la morfologia de les glomospores (Nogales, 2006; Sieverding i Oehl, 2006), les quals romanen latents en absència de la planta hoste i poden sobreviure a condicions desfavorables (Sun, Hu, Tang, i Chen, 2016).

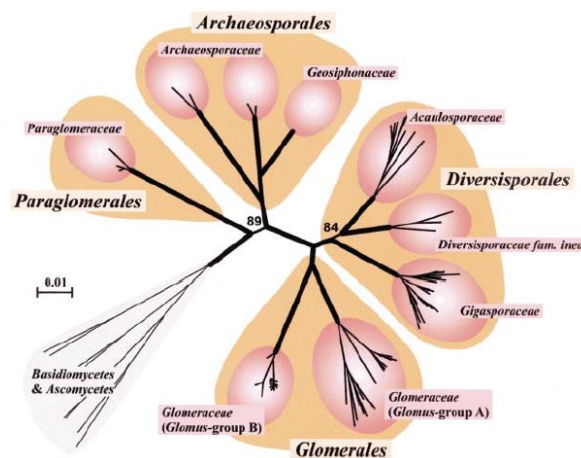


Figura 1: Proposta de classificació taxonòmica dels fongs formadors de micorrizes y fongs relacionats (*Glomeromycota*), basada en les seqüències del gen *SUU* rRNA (Schwarzott, Walker, i Schubler, 2001)

La identificació dels fongs formadors de micorrizes a través de les característiques morfològiques de les espores té una sèrie de limitacions. En primer lloc, s'hauria de diferenciar entre les espores viables i les espores no viables o mortes; així com també fer una classificació en funció de les diferents etapes de creixement – en espores joves, madures o velles –. Les espores no viables romanen en el sòl per períodes de temps llargs i és difícil discriminar-les de les espores viables. Per una altra banda, les espores que es troben en diferents etapes del desenvolupament podrien dificultar també la identificació morfològica de les espores ja que generalment tenen característiques morfològiques distintes – com el tamany i el color – (Sun et al., 2016).

La principal problemàtica de l'estudi de la identificació i classificació de fongs formadors de micorrizes es limita a l'estudi de comunitats naturals. Per aquest fet, l'aparició d'anàlisis i tècniques moleculars proporciona una manera d'evitar-ho ja que té el potencial d'identificar fongs amb mostres d'arrels independentment dels criteris morfològics. Aquests mètodes no requereixen l'estudi d'espores i es poden implementar fàcilment per analitzar mostres ambientals de sòl o d'arrels (Řezáčová et al., 2016). El desenvolupament d'encebadors específics i tècniques moleculars de PCR, juntament amb seqüenciacions de fragments de DNA, ha contribuït a la identificació i a la classificació de fongs formadors de micorrizes i s'ha vist que els resultats són molt semblants a la classificació feta per la morfologia de les espores (J. Lee, Lee, i Young, 2008; Nogales, 2006). Els gens de ARN ribosòmic *SSU*, *LSU* i les regions intergèniques *ITS* s'han utilitzat en la majoria d'estudis d'ecologia molecular de fongs d'aquest tipus i s'ha proposat com una eina adequada per a la seva identificació i el seu estudi filogenètic (Dighton i White, 2017).

En aquest sentit, alguns estudis realitzats recentment amb l'objectiu d'identificar i de caracteritzar les comunitats de fongs micorrízics mitjançant tècniques moleculars són, per exemple els estudis duts a terme en plantacions de cafè agroecològic (Prates Júnior et al., 2019), en plantacions de *Carya illinoensis* (Bidondo et al., 2018) o en plantes llenyoses de Corea (Lee et al., 2018), entre altres.

S'han dut a terme distints intents per a dissenyar encebadors específics per a determinar grups de fongs micorrízics (Davison et al., 2015; J. Lee et al., 2008; Voříšková et al., 2017) . Així i tot, els estudis a gran escala de la sistemàtica dels fongs formadors de micorrizes i la seva biodiversitat requereixen d'encebadors universals que puguin amplificar tots els llinatges d'aquest grup i que fins ara encara no s'han descrit (J. Lee et al., 2008).

3 OBJECTIU

El principal objectiu d'aquest Treball Final de Grau és posar a punt una metodologia molecular per a la identificació d'espècies de fongs formadores de micorrizes en vinya de Mallorca. Concretament es pretén validar una sèrie de mostres d'ADN obtingudes a partir d'arrels de vinya per tal d'establir si són susceptibles a ser amplificades i seqüenciades amb marcadors moleculars de fongs formadors de micorrizes. La finalitat de la validació és obtenir garanties d'èxit de cara a una futura seqüenciació massiva de les mostres.

4 MATERIALS I MÈTODES

4.1 Mostreig

Les mostres d'arrels de vinya de cultiu ecològic es van extreure amb una retroexcavadora a 30cm de profunditat en juliol de 2018 d'una finca de Pollença (Mallorca). Les mostres es van agafar sempre del lloc més proper al tronc de la planta focal.

A continuació es van portar al laboratori, on es van conservar a 4°C fins que es van extreure un major nombre d'arrels fines – d'uns 2mm de diàmetre –. Les arrels es van rentar amb aigua diverses vegades fins a retirar totes les restes del sòl. Es van assecar amb un paper absorbent, es van trossejar i es van distribuir 200mg de mostra a tubs de tipus *ependorf* i, posteriorment, es van congelar a -80°C. Es van processar un total de 32 mostres; 16 corresponen a la varietat Callet i les 16 restants a la varietat Merlot amb dos tipus de tractament distint – reg i sequera – (Taula 1).

Taula 1.

Nom, varietat i tractament aplicat a cada una de les mostres

NOM	VARIETAT	TRACTAMENT	
CR1.1*	Callet	Reg	
CR1.2			
CR2.1*			
CR2.2			
CR4.1			
CR4.2			
CR5.1		Sequera	
CR5.2			
CS1.1*			
CS1.2			
CS2.1*			
CS2.2			
CS4.1	Reg		
CS4.2			
CS6.1			
CS6.2			
MR2.1*		Merlot	Reg
MR2.2			
MR3.1*			
MR3.2			
MR5.1			
MR5.2			
MR6.1	Sequera		
MR6.2			
MS1.1*			
MS1.2			
MS2.1*			
MS2.2			
MS3.1			
MS3.2			
MS4.1			
MS4.2			

Les mostres marcades amb asterisc corresponen a les mostres utilitzades per a la PCR

4.2 Extracció i quantificació d'ADN

L'extracció d'ADN es va dur a terme pels tècnics de l'àrea de fisiologia vegetal de la UIB seguint les instruccions marcades pel fabricant del kit *DNeasy Plant mini kit* (QIAGEN®), utilitzat per aïllar ADN de cèl·lules i teixits vegetals o fongs. Es van trossejar 100mg de la mostra. A continuació, es van agregar 400µL de tampó AP1 i 4µL de RNAsa A i es va agitar energèticament. A continuació, es va procedir a incubar les mostres durant 10 minuts a 65°C invertint les mostres 2-3 vegades durant la incubació.

Una vegada acabada la incubació, es varen agregar 130µL de tampó P3, mesclar i incubar en gel durant 5 min per després centrifugar a 20.000 xG durant 5 minuts. A continuació s'introduí l'homogenat a una columna giratòria *QIAshredder™* en un tub de recol·lecció de 2mL i es va centrifugar a 20.000 xG durant 2 minuts. Es va transferir el sobrenedant a un nou tub, al qual es va afegir 1,5 vegades el volum de tampó AW1 i es va pipetejar. Immediatament es varen transferir 650µL de la mescla en una columna *spin DNeasy Mini* situada en un tub de recollida de 2mL i es va centrifugar durant 1 minut a 6.000 xG. Es descarta el sobrenedant i es torna a repetir el procediment amb la quantitat de mostra restant. A continuació es va col·locar la columna en un nou tub de recollida de 2mL i es varen afegir 500µL de tampó AW2 centrifugant 1 minut a 6.000 xG, descartant el sobrenedant. Seguidament s'afegiren 500µL de tampó AW2 i es va centrifugar 2 minuts a 20.000 xG. Es va eliminar la columna amb cura i es va transferir a un altre tub de microcentrífuga de 1,5-2mL. Finalment, es varen afegir 100µL de tampó AE per a l'elució de la mostra. Es va incubar a temperatura ambient (15-25°C) durant 5 minuts i llavors es va centrifugar 1 minut a 6.000 xG. Aquest darrer pas es va repetir dues vegades. A continuació, es va procedir a la quantificació de les mostres mitjançant fluorimetria amb la plataforma Qubit HighSensitivity (ThermoFisher Scientific®).

4.3 Marcadors moleculars utilitzats

En el present estudi s'han analitzat 3 marcadors moleculars d'ARN ribosomal pertanyents als gens *LSU*, *SSU* i *ITS2*. Per a la amplificació i seqüenciació de la regió *SSU* es varen utilitzar 3 parells d'encebadors: la parella formada per NS31-F i AML2-R, la parella formada per AMV4.5NF-F i AMDGR-R i la parella AML1-F i AML2-R (Van Geel, Busschaert, Honnay, & Lievens, 2014). En segon lloc, es va usar la parella d'encebadors formada per Glo454 i NDL22 (Van Geel et al., 2014) per a la amplificació i seqüenciació de la regió ribosomal *LSU*.

Finalment, per a l'estudi de la regió intergènica *ITS2* es va utilitzar la parella d'encebadors *ITS7o* (White, Burns, Lee, i Taylo, 1990) i *ITS4* (Kohout et al., 2014) (Taula 2 i Figura 2).

Taula 2

Marcadors moleculars i encebadors utilitzats als processos d'amplificació i seqüenciació

Marcador molecular	Parelles d'encebadors	Seqüència dels encebadors (5'→3')	Longitud (pb)
SSU	NS31-F	TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC	21
	AML2-R	GAACCCAAACACTTTGGTTTCC	21
	AMV4.5NF-F	AAGCTCGTAGTTGAATTTTCG	20
	AMDGR-R	CCCAACTATCCCTATTAATCAT	22
LSU	AML1-F	ATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGA	24
	AML2-R	GAACCCAAACACTTTGGTTTCC	22
ITS2	Glo454	TGAAAGGGAAACGATTGAAGT	21
	NDL22	TGGTCCGTGTTTCAAGACG	19
ITS2	<i>ITS7o</i>	GTGAATCATCRAATYTTTG	19
	<i>ITS4</i>	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20

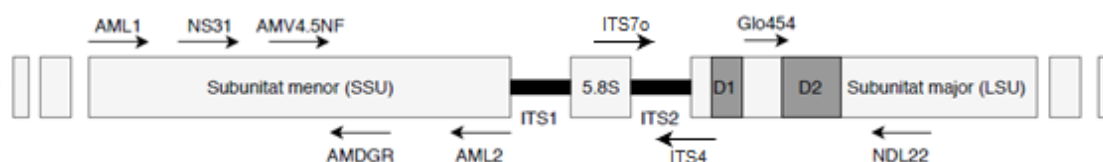


Figura 2. Representació esquemàtica del clúster nuclear d'ARN ribosòmic i la localització dels encebadors.

4.4 Amplificació mitjançant PCR

Per a l'amplificació dels marcadors moleculars *SSU*, *LSU* i *ITS2* es van utilitzar els següents reactius: *Reaction Buffer* BIOLINE® 10xNH₄, MgCl₂ (50mM), dNTPs (10mM), Taq polimerasa BIOTAQ® 5u/μL, encebador *forward* (10μM), encebador *reverse* (10μM), BSA (20mg/mL) i H₂O MilliQ®. En la taula 3 es poden observar les quantitats de cada reactiu per a la preparació de la mescla de reacció. S'utilitzaren 24μL de la mescla i 1μL de mostra. També es va afegir un tub com a control negatiu - 24 μL de mescla i 1 μL d'H₂O MilliQ®-.

Taula 3

Reactius i quantitats necessàries per a la reacció de PCR

Reactius	μL (x1)
<i>Reaction Buffer</i> ®	2.5
MgCl ₂	1.75
dNTPs	1
Taq polimerasa	0.05
Encebador <i>forward</i>	0.5
Encebador <i>reverse</i>	0.5
BSA	0.5
H ₂ O MilliQ®	17.2

Es realitzaren distintes reaccions d'amplificació de prova per determinar la temperatura d'hibridació més eficaç. Es van seleccionar les mostres marcades en la Taula 1 per analitzar-les mitjançant PCR. Les condicions de cicles, temps i temperatures de la reacció es mostren en la Figura 3.

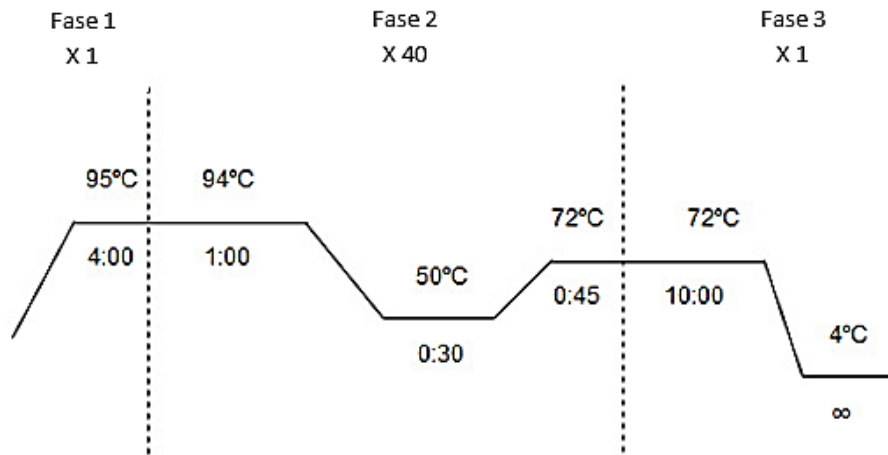


Figura 3. Cicles, temps i temperatures de les reaccions d'amplificació per PCR

4.5 Electroforesi dels productes de PCR

Una vegada realitzades les reaccions d'amplificació per PCR, i per tal de comprovar que aquestes s'havien realitzat correctament, es varen fer electroforesi en gel d'agarosa al 1.5% amb bromur d'etidi (BrEt) 0.07% (*PanReac AppliChem*[®]). Per fer el gel es van pesar 0.75g d'agarosa i es mesclaren amb 50mL d'aigua destil·lada. Posteriorment, es va encalentir la mescla fins a obtenir una dissolució transparent. Es va refredar la solució i es van afegir 50µL de BrEt. Finalment, es va introduir la mescla dins un motlle adequat i es va esperar fins que la mescla es va gelificar.

Una vegada el gel es va solidificar, es van carregar les mostres – 4µL de la mostra i 1µL de tampó de càrrega – en els pouets corresponents. A més, en el primer pouet es van carregar 2µL de *HyperLadder*TM 100pb (*BIOLINE*[®]). A continuació, es va aplicar una corrent de 96V (0.096A) durant 30 minuts amb la finalitat de separar els fragments en base al seu tamany. Una vegada els fragments s'han separat, es va examinar i fotografiar el gel amb llum ultraviolada.

4.6 Clonació dels productes de PCR

En els productes de PCR obtinguts hi havia una mescla de ADN que podien pertànyer a distintes espècies de fongs. Per tal d'analitzar individualment els amplicons, es va dur a terme un protocol de clonació dels productes de PCR mitjançant el kit *TOPO*[®] *TA Cloning*[®] (*Thermofisher*). Atès al cost del protocol de clonació, solament es van seleccionar 2 mostres per a ser clonades: la mostra MR3-1 i la mostra MS1-1.

En primer lloc es va dur a terme una reacció de lligació entre el producte de la PCR i el vector pCR™2.1-TOPO®. Es van mesclar 3µL de producte de PCR, 1µL de vector, 1µL de solució salina i 1µL d'H₂O. La mescla es va incubar durant 20 min. a 22.5°C. Una vegada passat el temps d'incubació, es va procedir a la reacció de transformació mitjançant la qual podem introduir els plasmidis recombinants dins els bacteris. Es van mesclar 2.5µL de la reacció de lligació amb 25µL de cèl·lules *Escherichia coli* competents i es van deixar reposar durant 20 min en un bany d'aigua-gel. A continuació, es va induir la transformació mitjançant un xoc tèrmic de 42°C durant 30 segons a un bany d'aigua circulat. Posteriorment, es van afegir 500µL de medi S.O.C a temperatura ambient, mesclant lentament amb la pipeta. El medi S.O.C és un medi enriquit especial per a la transformació de les cèl·lules competents ja que és un medi isotònic que cobreix les necessitats de la cèl·lula posterior al xoc tèrmic. Llavors es va incubar la mescla a 37°C durant 1 hora amb agitació orbital a 200 r.p.m.

Una vegada incubat, es procedí al sembrat de les plaques de cultiu. Per a la preparació del medi de cultiu es va mesclar 133.3mL d'H₂O destil·lada amb 4.37gr de *S-Gal*®/LB agar Blend de la casa comercial *Sigma-Aldrich*. A continuació es va esterilitzar amb autoclau i una vegada temperat, s'afegiren 133µL d'ampicil·lina (50mg/mL) i 53.32µL d'IPTG (10mM).

Es va repartir la dissolució entre 8 plaques de Petri, quatre de les quals es van sembrar amb 100µL de la reacció de transformació i les quatre restants amb 200µL. Finalment, es varen incubar les plaques en una estufa a 37°C durant 24 hores per afavorir el creixement de les colònies bacterianes.

4.7 Selecció de clons i amplificació per PCR

Una vegada ja han crescut els bacteris es seleccionen les colònies. Per cada producte de PCR sotmès a clonació, es van picar 96 colònies, les quals es van introduir en una placa de 96 pouets amb 50µL d'H₂O Milli-Q®, i es van lisar a 96°C durant 10 min.

A continuació, per comprovar que els clons porten el plasmidi recombinant es va realitzar una amplificació per PCR. En aquesta ocasió es van utilitzar els encebadors universals pUC-F (5' - CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC - 3') i pUC-R (5' - CAGGAAACAGCTATGAC - 3') (Messing & Vieira, 1982) desenvolupats per hibridar a les regions del vector que flanquegen el lloc d'inserció del fragment de PCR .

A cada tub de PCR es van mesclar 21µL de la mescla de PCR preparada tal com mostra la Taula 2 – canviant els encebadors per pUC-F i pUC-R – i 4µL de la dissolució dels clons desnaturalitzats, prèviament centrifugats durant 1 minut a 20.000 xG. Les condicions de cicles, temps i temperatures es mostren en la Figura 4.

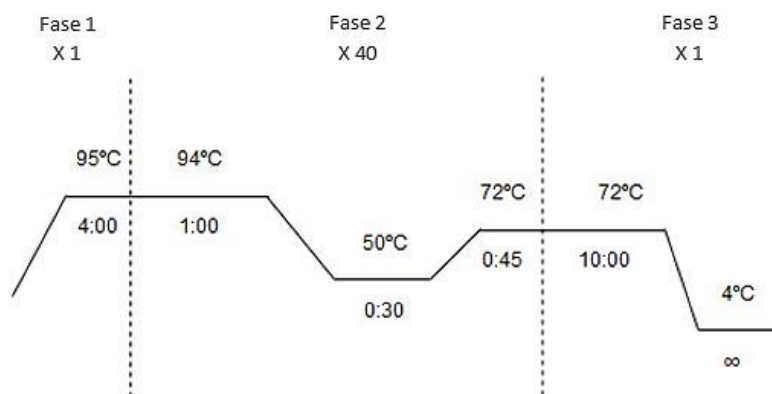


Figura 4. Cicles, temps i temperatures de les reaccions d'amplificació per PCR a partir dels clons seleccionats

Una vegada amplificats els clons, es va procedir a realitzar una electroforesis per visualitzar les bandes resultants. El protocol a seguir fou el mateix que l'explicat en l'apartat 4.6.

4.8 Purificació dels productes de PCR

Per al procés de purificació des productes de PCR es va utilitzar el kit Kit PCRapace INVITEK™ (Stratec®). Es va introduir el volum restant de les mostres en un nou tub eppendorf i es van afegir 250µL de binding buffer. Mesclen bé i es transfereix la mescla dins un nou tub eppendorf que conté una membrana. A continuació es va procedir a la centrifugació dels tubs a 8.100 XG durant 3 min per a separar l'ADN – que queda retingut en la membrana – i la resta de components de la mostra – que es depositarien a la part inferior del tub. Es va col·locar la membrana en un nou tub eppendorf on hi vam afegir 20µL de tampó d'elució per purificar l'ADN. Es va deixar reposar la mostra durant 5 min a temperatura ambient i, posteriorment, es va centrifugar 1 min a 5.600 xG. Es va descartar la membrana i es va guardar el tub amb el precipitat que correspon al producte purificat de la PCR.

Una vegada es van tenir les mostres purificades, es va passar a la quantificació mitjançant un espectrofotòmetre específic per a mostres d'àcids nucleics i proteïnes (NanoVue plus, GE Helthcare). Amb aquest aparell es va poder conèixer la concentració d'ADN del producte purificat de la PCR per a poder realitzar les dilucions correctes per al següent pas de seqüenciació.

4.9 Seqüenciació dels productes de PCR

Per a la reacció de seqüenciació mitjançant el kit BigDye® Terminator, es va preparar una mescla de reactius que estava formada per el *Sequencing buffer BigDye 5X*, encebador *forward* (10µM), reactiu Cycle Sequencing RR-100 BigDye™ y H₂O Milli-Q® (Taula 4). A cada tub de PCR es van posar 9µL de mescla i 1µL de mostra.

Taula 4. Reactius i quantitats necessàries per a la reacció de seqüenciació

Reactius	µL (x1)
<i>Sequencing buffer</i>	1.2
Encebador "Forward"	0.2
BigDye Terminator	0.6
H ₂ O Milli-Q®	7

En la Figura 5 es mostra el programa de cicles, temperatures i temps utilitzats per dur a terme la reacció de seqüenciació.

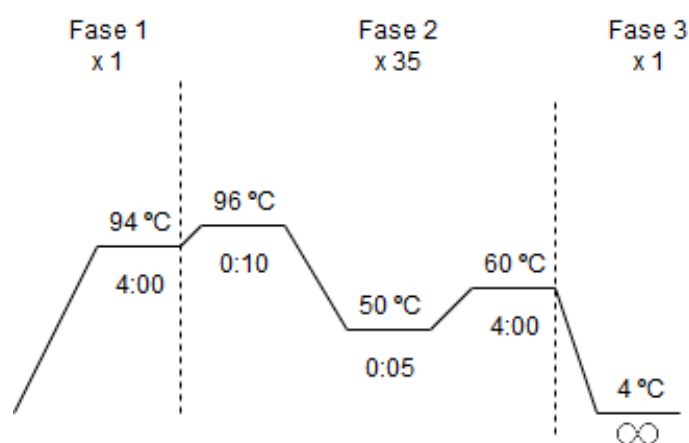


Figura 5. Cicles, temps i temperatures de la reacció de seqüenciació amb *BigDye® Terminator*

4.10 Precipitació de la reacció de seqüenciació

Les reaccions de seqüenciació es van mesclar amb 50µL d'etanol absolut (100%) i 2µL d'acetat de sodi (NaAc) (3M, pH 5.2). Una vegada ben mesclat es va procedir a centrifugar a màxima velocitat 9.800 XG durant 30 minuts, obtenint un precipitat en el fons del tub *ependorf* i un sobrenedant, el qual es va eliminar. A continuació, es realitza un altre rentat afegint 100µL d'etanol 70%. Es torna a centrifugar a màxima velocitat durant 15 minuts i es torna a eliminar el sobrenedant.

Es van posar les mostres en la bomba de buit durant 10 minuts per eliminar qualsevol resta d'alcohol. Finalment, es varen afegir 20µL d'aigua Milli-Q® als precipitats, i les mostres es carregaren a un seqüenciador automàtic *ABI PRISM 3600* (Applied Biosystems).

4.11 Edició d'electroferogrames

Les seqüències obtingudes amb el seqüenciador automàtic es van editar amb el programa CodonCode Aligner (CodonCode Corporation). Es van eliminar els fragments que tenien un excés de renou de fons, així com la fracció de les seqüències que corresponia als encebadors i els vectors de clonació utilitzats deixant només el fragment que corresponia a l'ADN a analitzar. Finalment, es seleccionaren les seqüències de millor qualitat i, posteriorment, es va procedir a la seva identificació taxonòmica mitjançant la comparació amb les seqüències disponibles a la base de dades GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>).

4.12 Anàlisi bioinformàtic de les seqüències

La identificació molecular de les seqüències d'ADN obtingudes es va fer amb dues aproximacions diferents. Per una banda, les seqüències problema es van emprar per fer una comparació mitjançant l'algoritme BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) amb la informació corresponent a la base de dades GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) i es va anotar la espècie més semblant i el percentatge de semblança. Per altra banda, es va dur a terme un protocol d'identificació en un context filogenètic (e.g. Jurado-Rivera et al., 2009). Concretament, per a cada una de les seqüències problema es va realitzar una cerca BLAST i es van descarregar les 300 seqüències més semblants. A continuació, aquestes seqüències es van sotmetre a un protocol d'eliminació de duplicats, així com també de les seqüències amb una longitud inferior al 50% de la seqüència problema. El conjunt de dades resultant es va combinar amb la seqüència problema i es van alinear amb l'algoritme MAFFT (Katoh i Standley, 2013).

La matriu de seqüències alineades es va sotmetre a un anàlisi per establir el model evolutiu que millor s'ajusta a les dades i a continuació es va inferir un arbre evolutiu en un context de màxima versemblança amb el programa IQtree (Nguyen, Schmidt, von Haeseler, & Minh, 2015) – especificant 1000 rèpliques de suport de *bootstrap* –. L'arbre resultant es va visualitzar amb el programa FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

5 RESULTATS

5.1 Extracció i quantificació d'ADN

Després del procés d'extracció d'ADN de les mostres, es va procedir a la quantificació (Taula 5). El rang d'ADN quantificat va des de 2.32 ng/ μ L (mostra MS3.2) a 22.6 ng/ μ L (mostra CR2.1). L'èxit de l'extracció va ser del 100%, ja que es va obtenir ADN de totes les mostres (valor mitjà de concentració = 6.83ng/ μ L; desviació estàndard = 3.98) (Taula 5 i Figura 6).

Taula 5.
Concentracions d'ADN per cada una de les mostres

NOM	VARIETAT	TRACTAMENT	Concentració (ng/μL)		
CR1.1	Callet	Reg	4.01		
CR1.2			3.83		
CR2.1			22.6		
CR2.2			9.44		
CR4.1			5.58		
CR4.2			4.05		
CR5.1			7.47		
CR5.2			5.12		
CS1.1			Merlot	Sequera	7.47
CS1.2					6.22
CS2.1	2.68				
CS2.2	3.91				
CS4.1	5.03				
CS4.2	4.36				
CS6.1	7.71				
CS6.2	13				
MR2.1	Merlot	Reg			8.34
MR2.2					6.82
MR3.1			4.24		
MR3.2			3.71		
MR5.1			9.52		
MR5.2			10.1		
MR6.1			4.36		
MR6.2			4.92		
MS1.1			Merlot	Sequera	4.75
MS1.2					7.88
MS2.1	9.14				
MS2.2	12.8				
MS3.1	4.37				
MS3.2	2.32				
MS4.1	4.05				
MS4.2	8.87				

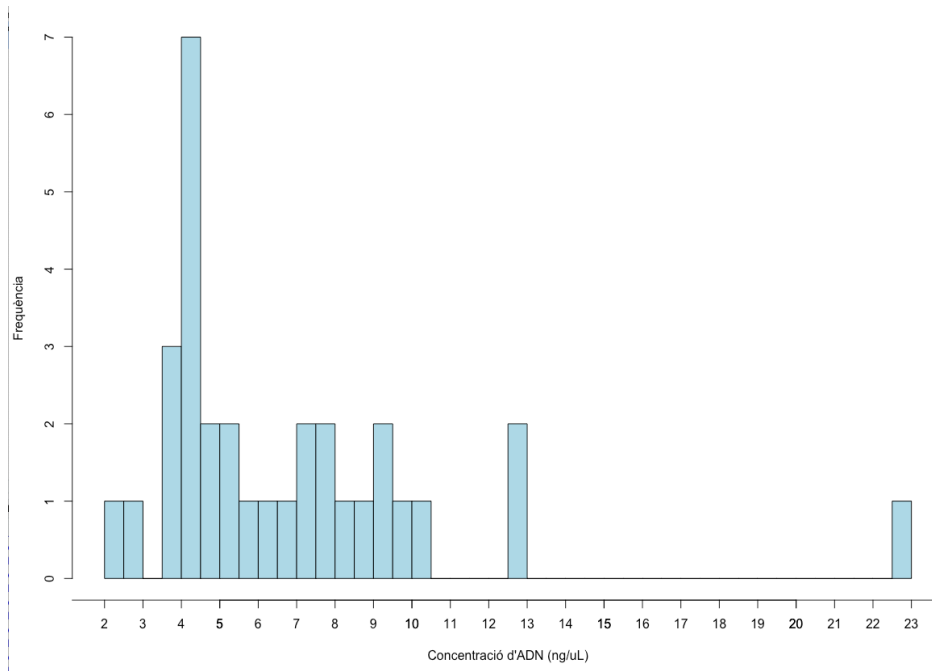


Figura 6. Histograma de la freqüència de concentracions d'ADN en les mostres quantificades. Observar com la majoria de mostres es troben dins el rang de concentració de 2 a 11 ng/μL.

5.2 PCR

L'amplificació dels distints productes de PCR es va comprovar mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa amb BrEt (Figures 7 i 8). Es va verificar la obtenció de productes d'amplificació en la majoria de mostres analitzades amb les condicions de PCR establertes i que, a més, en el control negatiu no va aparèixer cap banda.

L'èxit d'amplificació va ser variable depenent del marcador molecular utilitzat. Les mostres CS1-1, CS2-1, MR1-1, MR3-1 i CR1-1 van amplificar amb el marcador molecular *SSU* i, en canvi, no hi va haver amplificació de les mostres MS2-1, MR2-1 i CR2-1. Per altra banda, l'amplificació amb el marcador *ITS* va ser efectiva en el cas de les mostres CS1-1, CS2-1, MS1-1 i MR3-1; i no va amplificar en el cas de les mostres MS2-1, MR2-1, CR1-1 i CR2-1. Amb els resultats obtinguts amb aquests marcadors moleculars es van dur a terme la resta de processos experimentals de l'estudi.

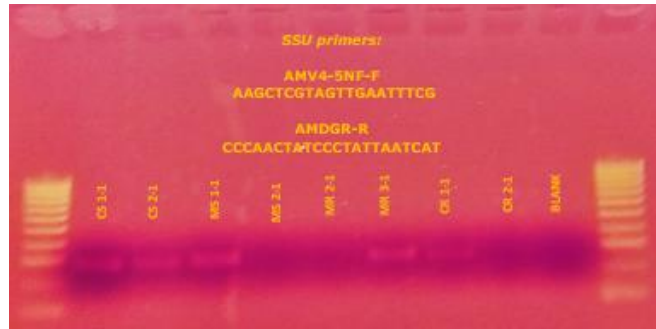


Figura 7. Resultat d'electroforesi en gel d'agarosa (1.5%) amb bromur d'etidi del gen *SSU*. Marcador de pes molecular 100pb.

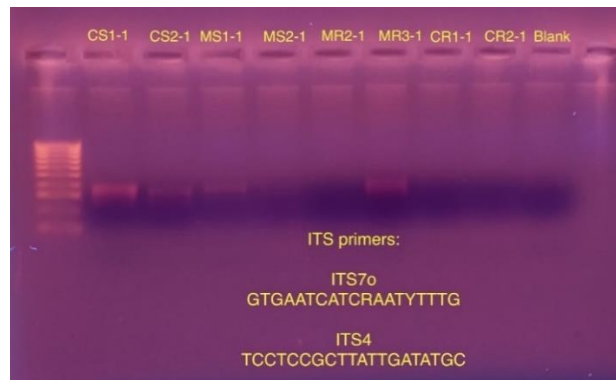


Figura 8. Resultat d'electroforesi en gel d'agarosa (1.5%) amb bromur d'etidi del gen *ITS2*. Marcador de pes molecular 100pb.

5.3 Clonació i purificació dels productes de PCR

Es van clonar els productes de PCR obtinguts de la mostra MS1-1 pel gen *SSU* (Figura 9). Una vegada les colònies havien crescut, es van seleccionar a l'atzar 96 colònies recombinants de cada mostra. Es van sotmetre a una PCR amb els encebadors específics del vector utilitzat – pUC-F i pUC-R -. Es va seguir el mateix procediment amb els productes de PCR de la mostra MR3-1 obtinguts del gen *ITS2* i es van seleccionar les 23 mostres marcades per a ser seqüenciades (Figura 10).



Figura 9. Placa de Petri amb colònies d'*Escherichia coli* recombinants. Les colònies negres, com la que apareix marcada amb una fletxa, són clons no recombinants i per tant no es van utilitzar.

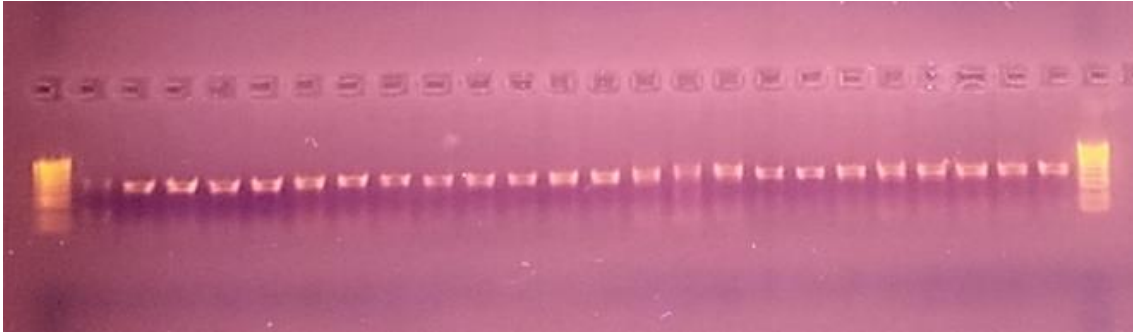


Figura 10. Exemple d'electroforesi de la reacció d'amplificació dels inserts clonats amb els encebadors pUC-F i pUC-R per a la mostra MR3-1.

A continuació, es va procedir a la purificació i quantificació dels clons obtinguts per a la posterior seqüenciació d'aquest (Taula 6). L'èxit de la purificació va ser del 100%, ja que es va obtenir ADN de totes les mostres purificades (valor mitjà de la concentració d'ADN = 25.7ng/μL; desviació estàndard = 4.89). El rang de concentracions és de 16.5 a 35 ng/μL (Taula 6).

Taula 6.

Concentració d'ADN de les PCRs purificades a partir dels clons seleccionats per a la seqüenciació de la mostra MR 3-1 (marcador molecular *ITS2*)

PCRs dels clons procedents de la mostra MR 3-1	[ADN] (ng/μL)
468F	26.5
469F	26.5
470F	23.5
471F	25.0
472F	23.0
473F	28.0
474F	24.5
475F	25.0
498F	16.5
499F	20.0
500F	19.0
501F	24.5
502F	28.0
503F	19.0
504F	27.5
505F	35.0
506F	29.0
507F	26.0
508F	19.5
509F	27.5
510F	30.5
511F	35.0
512F	32.0

5.4 Edició d'electroferogrames

De les 23 mostres seqüenciades – corresponents al marcador molecular *ITS2* – 14 d'elles resultaren ser de bona qualitat, fet que representa un èxit de seqüenciació del 60.9%. En la figura 11 es mostra un exemple d'un electroferograma de bona qualitat, on és possible identificar nítidament les bases que conformen la seqüència d'ADN. Pel que fa a les mostres del marcador molecular *SSU*, només una va resultar ser de bona qualitat.

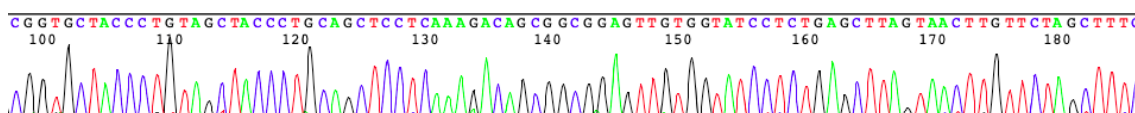


Figura 11. Exemple d'electroferograma obtingut a partir de la mostra 468F

5.5 Anàlisi bioinformàtic de les seqüències

Després d'editar i agrupar les seqüències de bona qualitat en contigs en funció de la seva semblança mitjançant el programa *CodonCode Aligner*, es van seleccionar les de millor qualitat per realitzar l'anàlisi filogenètic. Els resultats dels arbres filogenètics obtinguts permeten establir la posició taxonòmica dels fongs amb un suport estadístic de *bootstrap* superior a 95 en tots els casos (Taules 7-8, Figures 12-15).

Taula 7.

Resum de les inferències filogenètiques de les posicions sistemàtiques de cada una de les mostres seqüenciades. Es mostren els clades amb un suport estadístic de *bootstrap* major a 95.

MARCADOR MOLECULAR	CODI D'ADN	CODI DE LA SEQÜÈNCIA	INFERÈNCIA FILOGENÈTICA	SUPORTS BOOTSTRAP
<i>ITS2</i>	MR 3-1	Clon 472F	Gènere <i>Fusarium</i>	100
		Clon 509F	Gènere <i>Glomus</i>	98
		MR_3-1_Contig1	<i>Hydnocystis bombycina</i>	96
		MR_3-1_Contig2	Sordariomycetes	97
		MR_3-1_Contig3	<i>Fusarium acuminatum</i>	98
18S	MS 1-1	MIC202F	Gènere <i>Glomus</i>	97

Taula 8.

Resum de les inferències fenètiques de les mostres seqüenciades en base a la semblança entre les seqüències d'ADN

MARCADOR MOLECULAR	CODI D'ADN	CODI DE LA SEQÜÈNCIA	INFERÈNCIA FENÈTICA (BLAST)	SEMBLANÇA (%)
<i>ITS2</i>	MR 3-1	Clon 472F	<i>Fusarium nematophilum</i> i <i>Fusarium</i> sp.	99.63
		Clon 509F	<i>Uncultured Glomus</i>	93.596
		MR_3-1_Contig1	<i>Hydnocystis bombycina</i>	99.605
		MR_3-1_Contig2	<i>Xylariales</i> sp., <i>Uncultured Fusidium</i> , <i>Uncultured Sordariomycetes</i> y <i>Sordariomycetes</i> sp.	100
		MR_3-1_Contig3	<i>Nectriaceae</i>	99.6
18S	MS 1-1	MIC202F	<i>Glomus (Septoglomus) constrictum</i>	98.14

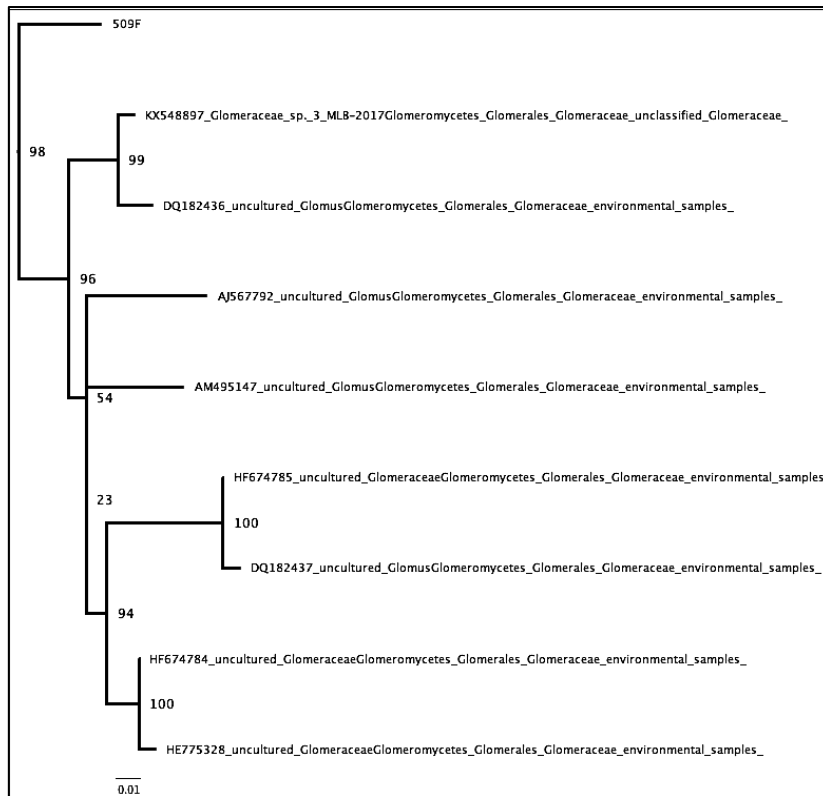


Figura 12. Arbre filogenètic obtingut a partir del mètode de màxima versemblança de la mostra 509F. Els nombres junt als nodes representen els valors corresponents als suports estadístics de *bootstrap*

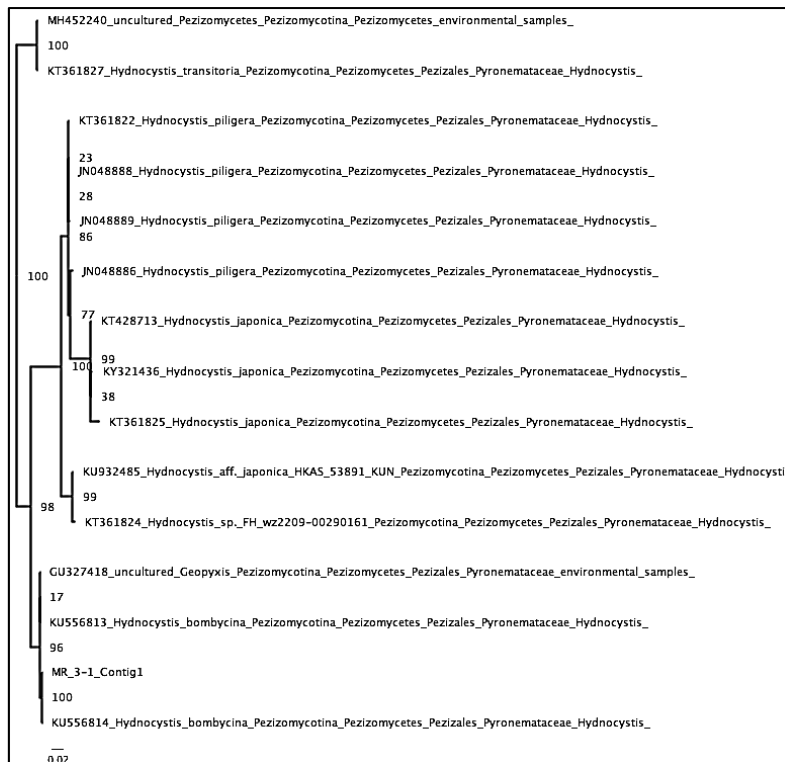


Figura 13. Arbre filogenètic obtingut a partir del mètode de màxima versemblança de la mostra MR_3-1_Contig1. Els nombres junt als nodes representen els valors corresponents als suports estadístics de *bootstrap*

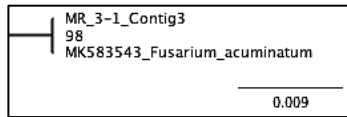


Figura 14. Arbre filogenètic obtingut a partir del mètode de màxima versemblança de la mostra MR_3-1_Contig3. Els nombres junt als nodes representen els valors corresponents als suports estadístics de *bootstrap*

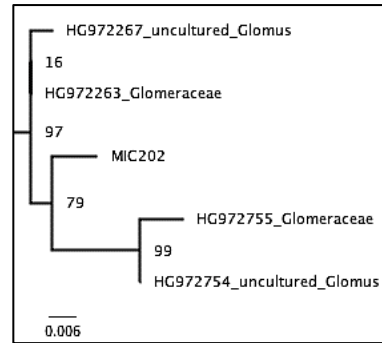


Figura 15. Arbre filogenètic obtingut a partir del mètode de màxima versemblança de la mostra MIC202. Els nombres junt als nodes representen els valors corresponents als suports estadístics de *bootstrap*

6 DISCUSIÓ

6.1 Qualitat de les mostres

Totes les mostres de teixit de vinya processades a aquest Treball de Final de Grau van generar extraccions d'ADN amb concentració suficient per ser sotmeses a tècniques d'amplificació i seqüenciació. La finalitat de la validació que es fa al present estudi és la verificació de que les mostres superen els requeriments mínims exigits per les plataformes de seqüenciació massiva d'ADN, i que en el cas de la concentració es correspon a valors per damunt dels 125 ng totals d'ADN genòmic. En aquest sentit, totes les mostres aquí processades compleixen aquest requisit

Per altra banda, és important fer referència a que per limitacions econòmiques al nostre estudi només es va sotmetre a amplificació un subconjunt de les mostres totals. Els resultats de les PCRs realitzades amb aquestes mostres indiquen que una fracció de les extraccions és susceptible de ser amplificada pels marcadors moleculars avaluats. Hem de tenir en compte que al nostre estudi no vàrem fer un anàlisi exhaustiu de les condicions d'amplificació òptimes per a cada una de les mostres (concentració relativa dels reactius de PCR, quantitat d'ADN motlle inicial, temperatura d'hibridació, nombre de cicles, programes de PCR especials tipus *touchdown*, *touchup*, etc). Aquest fet obre la possibilitat a l'obtenció d'èxit d'aquelles mostres que no van donar cap banda d'amplificació en els gels d'electroforesi.

Per a la mateixa limitació econòmica esmentada anteriorment, es van seleccionar pocs clons per a dur a terme la seva amplificació i seqüenciació, ja que per poder abordar l'amplitud de la identificació molecular de micorrizes seria necessari un major nombre de clons. Així i tot s'ha demostrat que totes les mostres processades

contenien material genètic d'origen fúngic i que la majoria de mostres amplificades mitjançant PCR generaven resultats positius. Aquest fet incrementa molt les possibilitats d'èxit quan les mostres siguin analitzades per seqüenciació massiva.

A més, també és important tenir en compte que la seqüenciació de les mostres es va dur a terme mitjançant un protocol de clonació i seqüenciació clàssica seguint el mètode de Sanger, Nicklen, i Coulson, (1977). Amb aquest tipus de seqüenciació, només es va obtenir una mostra de bona qualitat en el cas del *SSU* a causa de la complexitat de les tècniques, ja que hem de tenir en compte que al llarg del grau de Bioquímica no hem dut a terme aquest tipus de seqüenciació i es necessita un temps de pràctica i entrenament per assolir la destresa necessària. Així i tot, encara que només es va obtenir un resultat per al marcador molecular *SSU*, ja és suficient per verificar que la mostra és de bona qualitat i que els encebadors utilitzats funcionen i s'han pogut recuperar seqüències de fongs formadors de micorrizes. Si aquest pas s'hagués realitzat mitjançant un protocol de seqüenciació massiva de darrera generació, com per exemple Illumina®, probablement s'haguessin detectat un major nombre d'espècies de fongs formadores de micorrizes (Hadidi, Flores, Candresse, i Barba, 2016).

6.2 Precisió de les identifications taxonòmiques

Els resultats obtinguts amb els dos mètodes d'identificació taxonòmica aquí implementats resultaren ser congruents (Taula 7-8). Per a la majoria de mostres es va poder arribar al nivell de gènere del fong al qual pertanyien les seqüències obtingudes i, en un menor nombre de mostres, al nivell d'espècie. Tot i així, encara que no s'hagi arribat al nivell d'espècie en algunes de les seqüències obtingudes, la informació a nivell de gènere o família ja és suficientment rellevant a l'hora d'analitzar la composició de la comunitat de fongs formadors de micorrizes.

És important fer referència a que les bases de dades de seqüències d'ADN es troben en continu creixement, de manera que cada dia es van incorporant nous registres. Aquest fet implica que la repetició dels mateixos anàlisis d'identificació taxonòmica en un moment futur permetrà obtenir unes identifications taxonòmiques encara més precises.

Per a la identificació de les diferents espècies de fongs formadors de micorrizes es van utilitzar dues metodologies diferents – basades en l'algoritme BLAST i MAFFT –, de manera que podria ser que una mateixa seqüència donés resultats diferents. Per exemple referent a la mostra amb codi de seqüència Clon472F, l'aproximació fenètica

ens dona com a resultat que la seqüència té una semblança del 99.63% a *Fusarium nematophilum* i a *Fusarium sp.*; en canvi, l'aproximació filogenètica ens mostra que donada la informació disponible en la base de dades i la capacitat resolutive del marcador molecular utilitzat la seqüència correspon a algun fong del gènere *Fusarium* amb un suport estadístic de *bootstrap* del 100%.

En el cas de la mostra amb el codi Clon509F s'arriba al mateix gènere tant amb la inferència filogenètica com fenètica. I finalment, l'inferència fenètica de la mostra amb codi MIC202F ens mostra que la seqüència s'assembla en un 98.14% a *Glomus (Septoglomus) constrictum* i l'aproximació filogenètica ens assegura que la mostra MIC202F pertany al gènere *Glomus*.

La especificitat dels encebadors utilitzats és un factor important a tenir en compte de cara a una correcta caracterització de les comunitats de fongs formadors de micorrizes. En una investigació recent, Řezáčová et al., (2016) van analitzar un nombre concret de mostres d'arrels i sòl per identificar fongs formadors de micorrizes. El 100% dels microorganismes identificats pel marcador molecular *SSU* corresponien en Glomeromycota, mentre que en el cas de la regió *LSU* la proporció va ser del 75%, i només d'un 25% en el cas del marcador *ITS*. Els nostres resultats són consistents amb aquest darrer estudi en el sentit de que també hem utilitzat el marcador específic de Glomeromycota (*SSU*) i en efecte, el resultat obtingut es correspon amb el gènere *Glomus* i, per altra banda, també hem emprat *ITS* i només el 20% de les seqüències obtingudes es corresponen amb Glomeromycota.

És important fer referència a que la precisió de les identifications també depèn molt de la capacitat resolutive del marcador molecular escollit, ja que no totes les regions del genoma presenten les mateixes taxes de substitució nucleotídica. Pot donar-se el cas de que un marcador molecular no presenti diferències significatives entre espècies o, al contrari, que presenti diferències substancials entre espècies molt pròximes. Per exemple, i encara que té poca especificitat pels fongs Glomeromycota, el marcador molecular *ITS2* – utilitzat en aquest estudi – és una regió intergènica de l'ADNr nuclear amb una gran susceptibilitat a acumular mutacions i, a més, és una regió molt variable en el grup dels Glomeromycota (Iturralde, 2005).

Aquest fet fa que la regió *ITS* sigui de gran interès en l'estudi de la identificació d'espècies fúngiques. En un estudi realitzat anys enrere (Schoch et al., 2012), va identificar la regió *ITS* com a la regió de *DNA barcode* universal superior per als fongs, inclosa la Divisió *Glomeromycota*.

Cada vegada és més conegut que l'elecció dels encebadors és crucial en la identificació dels perfils de fongs formadors de micorrizes, encara que encara hi ha informació distorsionada en quant als diferents encebadors del perfil de la comunitat de fongs micorrízics (Jansa. et al., 2002). Les diferents espècies de plantes hostegen a diferents comunitats de fongs (Torrecillas, Alguacil, & Roldán, 2012); així com les diferents comunitats de fongs micorrízics varien entre els ecosistemes (Davison et al., 2015).

6.3 Fongs identificats

De les identificacions realitzades, només aquelles relatives al gènere *Glomus* es corresponen amb fongs formadors de micorrizes. Seria el cas de les mostres MIC202 pel marcador *SSU* a partir de la mostra d'arrel MS1-1, i la mostra 509F pel marcador *ITS* a partir de la mostra MR3-1. Aquests resultats indiquen que el gènere *Glomus* es troba a les vinyes de la varietat Merlot independentment de si estan sotmeses a un tractament de reg o de sequera.

L'habilitat dels fongs formadors de micorrizes arbusculars per estimular el creixement de les vinyes varia depenent dels fongs implicats en la micorrització. Robert G. Linderman et al., (2001) van estudiar la resposta de distintes varietats de fongs formadors de micorrizes i van demostrar que tots els fongs estimulaven el creixement de la planta i que aquest augment del creixement era causat per la inoculació de fongs del gènere *Glomus*.

Es tracta d'un gènere on totes les espècies – més de 85 descrites fins al moment – formen micorrizes amb les arrels de les plantes. Es troben pràcticament en tots els hàbitats terrestres, incloent deserts, terra llaurable, prats, boscs tropicals, etc.

En el cas concret de la mostra MIC202 hem trobat que s'assembla al microorganisme *Septoglomus (Glomus) constrictum* (Trappe, 1977) (Figura 16), el qual s'ha reportat com un dels fongs formadors de micorrizes predominant a les rizosferes de les vinyes (Mahdavi et al., 2012) i s'ha demostrat que en el cas de les tomaqueres millora la tolerància a l'estrès tèrmic (Duc & Posta, 2019).



Figura 16. Micorrització de *Glomus constrictum* a la planta hoste *Plantago lanceolata* L. La micorrització consisteix en arbuscles, vesícules, hifes intra i extraradicals (Adaptat de <http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/Glomus%20constrictum.html>)

La resta d'identificacions fan referència a fongs de grups diferents dels formadors de micorrizes. La mostra amb codi MR_3-1_Contig 1 correspon al microorganisme *Hydnocystis bombycina* (Kumar et al., 2017) (sinònim de *Stephensia bombycina*). És un fong formador de trufes i encara que en el passat es va considerar com a fong formador de micorrizes (Rinaldi, Comandini, i Kuyper, 2008), els estudis més recents indiquen que tal vegada no ho sigui (Tedersoo, May, & Smith, 2010).

Les mostres amb codi Clon472F i MR_3-1_Contig 3 corresponen a fongs procedents del gènere *Fusarium*, la mostra Clon 472F al microorganisme *Fusarium nematophilum* (Helgard I. Nirenberg, 2008) i la mostra MR_3-1_Contig3 al microorganisme *Fusarium acuminatum*, conegut també com a *Gibberella acuminata* (Wollenweber i Otto August, 1935). Les espècies del gènere *Fusarium* s'han identificat en una gran varietat d'espècies d'arbres i vinya. Hi ha una gran varietat d'afeccions tractant-se del gènere *Fusarium* ja que, per exemple, en un estudi realitzat fa uns anys observaren com certes espècies de *Fusarium* – entre altres – causaren infeccions en distints tipus d'espècies d'arbres i vinya (Markakis et al., 2017). Per altra banda, en un estudi més recent van definir al microorganisme *Fusarium acuminatum* com una de les espècies més tòxiques ja que és capaç de matar a la cèl·lula hoste causant necrosis tissular per degradació de components presents en les parets cel·lulars – especialment la pectina – (Petrasch et al., 2019).

Finalment, pel que fa a la mostra amb codi MR_3-1_Contig2, la única informació obtinguda és que es tracta d'una seqüència que correspon a un microorganisme de l'ordre *Xylariales*, de la classe Sordariomycetes (Nannfeldt, 1932). Els microorganismes de l'ordre *Xylariales* solen fongs endòfits, és a dir, viuen sense causar dany a les cèl·lules o plantes superiors. Es troben sobretot a la fusta, però també s'han trobat en fulles, fruits, sòls, etc. (Cueva et al., 2011).

7 CONCLUSIONS

Les mostres d'arrel de vinya processades a aquest estudi van generar extraccions d'ADN amb qualitat suficient per ser sotmeses en el futur a protocols de seqüenciació massiva d'ADN.

Els marcadors moleculars relatius als gens *SSU* i *ITS* són susceptibles de ser utilitzats en estudis de caracterització molecular dels fongs formadors de micorrizes a mostres de vinya.

La informació disponible actualment a la base de dades GenBank fa possible establir identificacions taxonòmiques dels fongs formadors de micorrizes amb resolució al nivell de gènere en la majoria dels casos.

El gènere *Glomus* s'ha trobat a micorrizes de vinyes de la varietat Merlot amb independència de si han estat sotmeses a un tractament de reg o de sequera

La metodologia implementada en aquest estudi permet identificar altres fongs diferents dels formadors de micorrizes que també es troben associats a les arrels de les vinyes.

8 AGRAÏMENTS

En primer lloc voldria agrair al meu tutor, el Dr. José Antonio Jurado Rivera per tot el temps dedicat en ajudar-me a realitzar el treball i per facilitar-me tots els coneixements necessaris.

Per altra banda, també m'agradaria agrair a l'àrea de Genètica de la Universitat de les Illes Balears (UIB) per l'ajuda que m'hagin pogut aportar durant el procés experimental, i també a les àrees d'Ecologia (Dra. Elena Baraza) i de Producció Vegetal (Dra. Josefina Bota) per proporcionar-nos les mostres per aquest estudi.

9 BIBLIOGRAFIA

1. Ambrosini, V. G., Voges, J. G., Canton, L., Couto, R. da R., Ferreira, P. A. A., Comin, J. J., ... Soares, C. R. F. S. (2015). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on young vines in copper-contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(4), 1045–1052.
2. Bidondo, L. F., Colombo, R. P., Recchi, M., Silvani, V. A., Pérgola, M., Martínez, A., & Godeas, A. M. (2018). Detection of arbuscular mycorrhizal fungi associated with pecan (*Carya illinoensis*) trees by molecular and morphological approaches. *MycKeys*, 42(42), 73–88.
3. Camprubí, A., Estaún, V., Nogales, A., García-Figueres, F., Pitet, M., & Calvet, C. (2008). Response of the grapevine rootstock Richter 110 to inoculation with native and selected arbuscular mycorrhizal fungi and growth performance in a replant vineyard. *Mycorrhiza*, 18(4), 211–216.
4. Cueva, C., Moreno-Arribas, M. V., Bartolomé, B., Salazar, Ó., Vicente, M. F., & Bills, G. F. (2011). Antibiosis of vineyard ecosystem fungi against food-borne microorganisms. *Research in Microbiology*, 162(10), 1043–1051.
5. Davison, J., Moora, M., Opik, M., Adholeya, A., Ainsaar, L., Ba, A., ... Zobel, M. (2015). Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science*, 349(6251), 970–973.
6. Dighton, J., & White, J. F. (James F. (2017). *The fungal community : its organization and role in the ecosystem*. Retrieved from https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=qG5dDgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=mycorrhizal+fungi+molecular+ssu&ots=A-1UmIdX1_&sig=GBebxp9VbbYs1n0O96RwL2bHQZ8#v=onepage&q=mycorrhizal+fungi+molecular+ssu&f=false
7. Dodd, J. C., Rosendahl, S., Giovannetti, M., Broome, A., Lanfranco, L., & Walker, C. (1996). *Inter- and Intraspecific Variation Within the Morphologically-Similar Arbuscular Mycorrhizal Fungi Glomus mosseae and Glomus coronatum*. *The New Phytologist* (Vol. 133). WileyNew Phytologist Trust.
8. Duc, N. H., & Posta, K. (2019). Inoculation with *Septoglomus constrictum* improves tolerance to heat shock in tomato plants. *Columella : Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 5(2), 7–14.
9. Hadidi, A., Flores, R., Candresse, T., & Barba, M. (2016). Next-Generation Sequencing and Genome Editing in Plant Virology. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1325.
10. Helgard I. Nirenberg, G. H. (2008). *Fusarium nematophilum* spec. nov. – ein neuer Nematoden-assoziiertes Pilz. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.*, 60(10), 213–216.
11. HEPPEL, C. M., SEN, R., & MASKALL, C. S. (1986). IDENTIFICATION OF VESICULAR-ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN ROOTS OF LEEK (*ALLIUM PORRUM* L.) AND MAIZE (*ZEA MAYS* L.) ON THE BASIS OF ENZYME MOBILITY DURING POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS. *New Phytologist*, 102(4), 529–539.
12. Hoysted, G. A., Kowal, J., Jacob, A., Rimington, W. R., Duckett, J. G., Pressel, S., ... Bidartondo, M. I. (2018). A mycorrhizal revolution. *Current Opinion in Plant Biology*, 44, 1–6.
13. Iturralde, M. J. (2005). Identificación genética de hongos. *Sociedad Micológica de Madrid*. Retrieved from <http://www.socmicolmadrid.org/noti/noticias30.html>
14. Jansa, J.; Mozafar, A.; Anken, T; Ruth, R.; Sanders, I. Frossard, E. (2002). Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza*, 12(5), 225–234.
15. Jurado-Rivera, J. A., Vogler, A. P., Reid, C. A. M., Petitpierre, E., & Gómez-Zurita, J. (2009). DNA barcoding insect-host plant associations. *Proceedings. Biological Sciences*, 276(1657), 639–648.
16. Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780.
17. Kohout, P., Sudová, R., Janoušková, M., Čtvrtlíková, M., Hejda, M., Pánková, H., ... Sýkorová, Z.

- (2014). *Comparison of commonly used primer sets for evaluating arbuscular mycorrhizal fungal communities: Is there a universal solution?* *Soil Biology and Biochemistry* (Vol. 68). Pergamon. Retrieved from https://www.academia.edu/22549381/Comparison_of_commonly_used_primer_sets_for_evaluating_arbuscular_mycorrhizal_fungal_communities_Is_there_a_universal_solution
18. Kumar, L. M., Smith, M. E., Nouhra, E. R., Orihara, T., Sandoval Leiva, P., Pfister, D. H., ... Healy, R. A. (2017). A molecular and morphological re-examination of the generic limits of truffles in the tarzetta-geopyxis lineage – *Densocarpa*, *Hydnocystis*, and *Paurocotylis*. *Fungal Biology*, *121*(3), 264–284.
 19. Lee, E.-H., Park, S.-H., Eo, J.-K., Ka, K.-H., & Eom, A.-H. (2018). *Acaulospora koreana*, a New Species of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Glomeromycota) Associated with Roots of Woody Plants in Korea. *Mycobiology*, *46*(4), 341–348.
 20. Lee, J., Lee, S., & Young, J. P. W. (2008). Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, *65*(2), 339–349.
 21. Likar, M., Hančević, K., Radić, T., & Regvar, M. (2013). Distribution and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grapevines from production vineyards along the eastern Adriatic coast. *Mycorrhiza*, *23*(3), 209–219.
 22. Mahdavi, A., Rezaeedanesh, Y., Abbasi, A., Mahdavi, F., & Jamaati-e-Somarin, S. (2012). *Study on occurrence and diversity of Arbuscular mycorrhizal fungi associated with grapevine rhizosphere in West Azerbaijan Province in Iran*. *African Journal of Microbiology Research* (Vol. 6). Academic Journals. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20123116178>
 23. Markakis, E. A., Kavroulakis, N., Ntougias, S., Koubouris, G. C., Sergentani, C. K., & Ligoixgakis, E. K. (2017). Characterization of Fungi Associated With Wood Decay of Tree Species and Grapevine in Greece. *Plant Disease*, *101*(11), 1929–1940.
 24. Messing, J., & Vieira, J. (1982). A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. *Gene*, *19*(3), 269–276. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6295880>
 25. Nannfeldt, J. (1932). *Studien über die Morphologie und Systematik der nichtlichenisierten inoperculaten Discomyceten*. Upsala: Norblad. Retrieved from <https://www.worldcat.org/title/studien-uber-die-morphologie-und-systematik-der-nichtlichenisierten-inoperculaten-discomyceten/oclc/73010189>
 26. Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, *32*(1), 268–274.
 27. Nogales, A. (2006). *Formadores de micorrizas arbusculares Glomus intraradiceses Schenck y Smith y el hongo patogeno armillaria mellea (Vahl : fr) P . Kuhn En vid.*
 28. Petrasch, S., Silva, C. J., Mesquida-Pesci, S. D., Gallegos, K., van den Abeele, C., Papin, V., ... Blanco-Ulate, B. (2019). Infection Strategies Deployed by *Botrytis cinerea*, *Fusarium acuminatum*, and *Rhizopus stolonifer* as a Function of Tomato Fruit Ripening Stage. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 223.
 29. Prates Júnior, P., Moreira, B. C., da Silva, M. de C. S., Veloso, T. G. R., Stürmer, S. L., Fernandes, R. B. A., ... Kasuya, M. C. M. (2019). Agroecological coffee management increases arbuscular mycorrhizal fungi diversity. *PLOS ONE*, *14*(1), e0209093.
 30. Řezáčová, V., Gryndler, M., Bukovská, P., Šmilauer, P., & Jansa, J. (2016). Molecular community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi—Contributions of PCR primer and host plant selectivity to the detected community profiles. *Pedobiologia*, *59*(4), 179–187.
 31. Rinaldi, A. C., Comandini, O., & Kuyper, T. W. (2008). Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity*, *33*, 1–45.
 32. Robert G. Linderman, E. A. D. (2001). Comparative Response of Selected Grapevine Rootstocks and Cultivars to Inoculation with Different Mycorrhizal Fungi. *American Journal of Enology and Viticulture*,

- 52(1), 8–11. Retrieved from <https://www.ajeonline.org/content/52/1/8>
33. Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467.
 34. Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241–6246.
 35. Schreiner, R. P. (2003). Mycorrhizal Colonization of Grapevine Rootstocks – 143. *Am J. Enol. Vitic*, 543(November 2002), 143–149. Retrieved from <https://pubag.nal.usda.gov/download/48561/PDF>
 36. Schwarzott, D., Walker, C., & Schubler, A. (2001). A new fungal phylum , the Glomeromycota : phylogeny and evolution *. *Mycological Research*, 105(12), 1413–1421.
 37. Sieverding, E., & Oehl, F. (2006). Revision of Entrophospora and description of Kuklospora and Intrasporea, two new genera in the arbuscular mycorrhizal Glomeromycetes. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 80(1), 69–81.
 38. Stürmer, S. L. (2012). A history of the taxonomy and systematics of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the phylum Glomeromycota. *Mycorrhiza*, 22(4), 247–258.
 39. Sun, X., Hu, W., Tang, M., & Chen, H. (2016). Characterizing and handling different kinds of AM fungal spores in the rhizosphere. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(6), 1–8.
 40. Tedersoo, L., May, T. W., & Smith, M. E. (2010). Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza*, 20(4), 217–263.
 41. Torrecillas, E., Alguacil, M. M., & Roldán, A. (2012). Host preferences of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing annual herbaceous plant species in semiarid Mediterranean prairies. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(17), 6180–6186.
 42. Torres, N., Goicoechea, N., Zamarreño, A. M., & Carmen Antolín, M. (2018). Mycorrhizal symbiosis affects ABA metabolism during berry ripening in *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo grown under climate change scenarios. *Plant Science*, 274, 383–393. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2018.06.009>
 43. Trappe, J. . (1977). Three new Endogonaceae: *Glomus constrictus*, *Sclerocystis clavispora* and *Acaulospora scrobiculata*. *Mycotaxon*, 62(2), 359–366.
 44. Van Geel, M., Busschaert, P., Honnay, O., & Lievens, B. (2014). Evaluation of six primer pairs targeting the nuclear rRNA operon for characterization of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities using 454 pyrosequencing. *Journal of Microbiological Methods*, 106, 93–100.
 45. Vigneron, N., Radhakrishnan, G. V., & Delaux, P. M. (2018). What have we learnt from studying the evolution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis? *Current Opinion in Plant Biology*, 44, 49–56.
 46. Voříšková, A., Jansa, J., Püschel, D., Krüger, M., Cajthaml, T., Vosátka, M., & Janoušková, M. (2017). Real-time PCR quantification of arbuscular mycorrhizal fungi: does the use of nuclear or mitochondrial markers make a difference? *Mycorrhiza*, 27(6), 577–585. <https://doi.org/10.1007/s00572-017-0777-9>
 47. Wang, W., Shi, J., Xie, Q., Jiang, Y., Yu, N., & Wang, E. (2017). Nutrient Exchange and Regulation in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Molecular Plant*, 10(9), 1147–1158.
 48. White, T. ., Burns, T., Lee, S., & Taylo, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applcations*, 315–322.
 49. Wollenweber, H. W., & Otto August, R. (1935). *Die Fusarien : ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung*. Berlin ;[Ann Arbor, Mich.]: P. Parey ;[J.W. Edward]. Retrieved from <https://www.worldcat.org/title/fusarien-ihre-beschreibung-schadwirkung-und-bekampfung/oclc/23334633>