



Composición de las comunidades de hongos micorrízicos arbusculares asociados a la raíz del árbol manzanilla de la muerte (*Hippomane mancinella*), en dos ecosistemas

Sigüenza Robles, Sasha Valeria

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Duchicela Escobar, Jessica Ivonne, Ph.D.

19 de agosto del 2020



Document Information

Analyzed document TESIS_RAICES_SS_.docx (D77881201)
Submitted 8/18/2020 3:01:00 AM
Submitted by
Submitter email svsiguenza@espe.edu.ec
Similarity 1%
Analysis address jiduchicela.espe@analysis.arkund.com

Sources included in the report

SA

Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE /
Tesis_Hernández_1stdraft.docx
Document Tesis_Hernández_1stdraft.docx (D53811963)
Submitted by: jiduchicela@espe.edu.ec
Receiver: jiduchicela.espe@analysis.arkund.com

1

Firma:

Duchicela Escobar, Jessica Ivonne, Ph.D.

C.C. 1710463835

DIRECTORA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "**Composición de las comunidades de hongos micorrízicos arbusculares asociados a la raíz del árbol manzanilla de la muerte (*Hippomane mancinella*), en dos ecosistemas**" fue realizado por la señorita **Sigüenza Robles, Sasha Valeria** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 19 de agosto de 2020

Firma:

Duchicela Escobar, Jessica Ivonne, Ph.D.

C.C. 1710463835



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Sigüenza Robles, Sasha Valeria**, con cédula de ciudadanía n° 1725626111, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Composición de las comunidades de hongos micorrízicos arbusculares asociados a la raíz del árbol manzanilla de la muerte (*Hippomane mancinella*), en dos ecosistemas”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 19 de agosto de 2020

Firma:

Sigüenza Robles, Sasha Valeria

C.C.: 1725626111



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Sigüenza Robles, Sasha Valeria**, con cédula de ciudadanía n° 1725626111, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: “**Composición de las comunidades de hongos micorrízicos arbusculares asociados a la raíz del árbol manzanilla de la muerte (*Hippomane mancinella*), en dos ecosistemas**” en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 19 de agosto de 2020

Firma:



Sigüenza Robles, Sasha Valeria

C.C.: 1725626111

Dedicatoria

La presente investigación la dedico a mi Dios, por darme salud y el espíritu para lograr mis metas como persona y profesional. A mi madre, que es el principal pilar de mi vida, que sentó en mí bases de responsabilidad y deseos de superación, a más de mostrarme que con constancia, dedicación y esfuerzo puedo salir adelante y no decaer ante los problemas. A mis hermanos, quienes no han perdido la fe en mí y en mis capacidades. Y a mi novio John, por todo su amor y apoyo incondicional en todos estos años de mi carrera.

Sasha

Agradecimiento

Primeramente, doy gracias a Dios por bendecirme con la experiencia de una vida universitaria, rodeada de amigos y maestros que fueron parte de mi desarrollo.

A mi madre por estar junto a mí en cada momento a lo largo de todos estos años, gracias por tu entrega, tu gran corazón y virtudes que me han llevado a admirarte.

A mi tutora, la Doctora Jessica Duchicela por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto y brindarme su apoyo en todo el proceso de titulación. Gracias por compartir su conocimiento y experiencia para la realización de mi trabajo de tesis.

Al laboratorio de Botánica del Campus IASA I, por apoyarme en el desarrollo experimental de mi tesis con el préstamo de equipos que me ayudaron a terminar la parte práctica de mi proyecto.

A mi compañero José Luis Hernández, quien desde el inicio ha estado guiándome en cada proceso. Es cierto, todo este camino no ha sido fácil, pero gracias a su asesoramiento todo ha parecido menos complicado.

A mi hermana, Evelyn por siempre confiar en mis capacidades, por su motivación para enseñarme cosas nuevas y sobre todo por cada consejo que me servirá para toda mi vida.

Gracias Ciruelin por tu amor, apoyo e inmensa bondad. Tu ayuda ha sido fundamental en mi crecimiento, siempre estuviste motivándome y ayudándome hasta donde tus alcances lo permitieron, te lo agradezco muchísimo, amor.

Índice de contenidos

Composición de las comunidades de hongos micorrízicos arbusculares asociados a la raíz del árbol manzanilla de la muerte (<i>Hippomane mancinella</i>), en dos ecosistemas ..	1
Hoja de resultados de la herramienta urkund	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimiento	7
Índice de contenidos	9
Índice de tablas.....	14
Índice de figuras.....	15
Resumen	16
Abstract.....	17
Introducción.....	18
Formulación del problema	18
Justificación del problema.....	20

	10
Objetivos de investigación	23
<i>Objetivo general</i>	23
<i>Objetivos específicos</i>	23
Marco teórico	24
Micorrizas	24
Tipos de micorrizas.....	24
<i>Ectomicorrizas</i>	24
<i>Ectendomicorizas</i>	25
<i>Endomicorrizas</i>	25
Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA).	25
Análisis de diversidad	26
<i>Criterios morfológicos</i>	26
<i>Aproximaciones moleculares</i>	26
Estudios en raíces y suelo.....	27
Extracción de ADN de tejidos vegetales.....	28
<i>Protocolos de extracción tradicional y comercial</i>	28
<i>Ventajas y desventajas de los métodos de extracción tradicionales y comerciales</i> ..	29
<i>Selección del método de extracción</i>	30
Árbol manzanillo de la muerte	30
Hipótesis.....	30

Materiales y métodos	32
Zona de estudio.....	32
<i>Obtención de muestras.....</i>	<i>32</i>
<i>Trabajo de laboratorio.....</i>	<i>32</i>
Procedimientos	34
<i>Muestreo de raíces</i>	<i>34</i>
<i>Preparación del material vegetal</i>	<i>34</i>
<i>Identificación de micorrizas por técnicas moleculares</i>	<i>34</i>
Extracción de ADN genómico de raíces.	34
Dilución del ADN extraído.....	35
Cuantificación de ADN genómico	35
Espectrofotometría.	35
<i>Amplificación de ADN y secuenciación</i>	<i>37</i>
<i>Análisis Bioinformático</i>	<i>38</i>
Validación técnica.	38
Procesamiento y control de calidad de secuencias.	38
Alineación de secuencias.	39
Asignación Taxonómica.	39
Comparación de secuencias.....	39
Análisis Filogenético.....	40
<i>Determinación de Biodiversidad de comunidades</i>	<i>40</i>

	12
Curva de rarefacción.....	40
Comunidad de micorrizas arbusculares.....	41
<i>Análisis Estadístico</i>	41
Diseño experimental.....	41
Análisis.....	41
Estandarización del homogeneizador BEAD RUPTOR ELITE.....	41
Biodiversidad de comunidades micorrízicas.....	42
Índice de diversidad y Riqueza de OTUs.....	42
Resultados	43
Estandarización del homogeneizador BEAD RUPTOR ELITE.....	43
<i>Cuantificación de ADN</i>	44
<i>Pureza de ADN</i>	46
Extracción de ADN de la especie de estudio.....	49
Análisis de secuencias.....	50
<i>Asignación taxonómica de OTUs</i>	50
<i>Perfiles Taxonómicos y abundancia</i>	54
<i>Riqueza e índices de diversidad</i>	56
<i>Comparación de los indicadores de diversidad en las dos zonas de estudio</i>	57
Discusión	60
Estandarización del homogeneizador BEAD RUPTOR ELITE.....	60

	13
<i>Concentración</i>	60
<i>Pureza</i>	62
Extracción de ADN de la especie de estudio	62
Análisis de secuencias	64
<i>Validación técnica</i>	64
<i>Asignación taxonómica de OTUs</i>	65
<i>Perfiles taxonómicos y abundancia</i>	67
<i>Comparación de los indicadores de diversidad en las dos zonas de estudio</i>	69
Conclusiones	71
Recomendaciones	73
Bibliografía	75
Anexos	87

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Ventajas y Desventajas de los métodos de extracción</i>	29
Tabla 2 <i>Localización y descripción general de las muestras estudiadas</i>	33
Tabla 3 <i>Valores indicativos de pureza en muestras de ADN</i>	36
Tabla 4 <i>Primers utilizados en este estudio</i>	37
Tabla 5 <i>Rendimiento de ADN y rango de pureza de todos los tratamientos</i>	43
Tabla 6 <i>Resultados de la Prueba de Bonferroni para el parámetro Concentración.</i>	44
Tabla 7 <i>ADN extraído de raíces del Árbol manzanilla de la muerte</i>	49
Tabla 8 <i>Secuencias de micorrizas encontradas en las muestras de raíces del árbol manzanilla de la muerte (Hippomane mancinella)</i>	52
Tabla 9 <i>Parámetros de diversidad alfa para las comunidades de micorrizas arbusculares presentes en las zonas de estudio.</i>	56
Tabla 10 <i>Estadísticos descriptivos para los parámetros de diversidad alfa de micorrizas arbusculares en raíces del árbol de la muerte (Hippomane mancinella)</i>	58
Tabla 11 <i>Resultados de la prueba t-student para indicadores de diversidad en raíces del del árbol de la muerte (Hippomane mancinella)</i>	58

Índice de figuras

Figura 1 <i>Zonas de recolección de muestras</i>	33
Figura 2 <i>Concentración de ADN en $\mu\text{g/ml}$ obtenido de cada tratamiento.</i>	45
Figura 3 <i>Pureza de ADN extraído de los distintos tratamientos considerando la proporción de absorbancia $A_{260/230}$</i>	47
Figura 4 <i>Pureza de ADN extraído de los distintos tratamientos considerando la proporción de absorbancia $A_{260/230}$</i>	47
Figura 5 <i>Electroforesis en gel de agarosa al 1%</i>	49
Figura 6 <i>Árbol filogenético de secuencias de la región 28S de ARNr</i>	53
Figura 7 <i>Grafica de OTUs compartidas y específicas de las zonas de estudio</i>	54
Figura 8 <i>Abundancia relativa de las 6 familias encontradas en cada zona</i>	55
Figura 9 <i>Abundancia relativa de micorrizas arbusculares a nivel de especie identificadas en cada zona de estudio</i>	57
Figura 10 <i>Gráfico de medias para los parámetros de diversidad alfa</i>	59

Resumen

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son organismos que se encuentran en la mayoría de ecosistemas, formando asociaciones mutualistas que permite la transferencia de agua y nutrientes desde el suelo a la planta. Últimamente, los análisis moleculares son usados para la caracterización y estudios de comunidades micorrízicas, donde la extracción de ADN es un punto crucial que el investigador debe realizar. Por lo general, los métodos de extracción y purificación de ADN deben ajustarse a cada especie de planta, incluso del tejido vegetal, por la variación de su consistencia y la presencia de metabolitos secundarios, que causa degradación y cizallamiento de ADN. Pero independientemente del método, se debe generar la suficiente cantidad de material genético con la pureza adecuada, que garantice la integridad física y bioquímica de la molécula para proporcionar datos que se acoplen al tipo de análisis que se realizará posteriormente. Por ende, el presente estudio describe un protocolo enfocado en el proceso de lisis celular de raíces de distinta consistencia, variando la velocidad y tiempo del homogenizador BEAD RUPTOR ELITE, para obtener alta calidad de ADN con la menor cantidad de contaminantes, necesaria para el proceso de secuenciación masiva, permitiendo la identificación de hongos micorrízicos arbusculares asociados a la raíz del árbol manzanilla de la muerte (*Hippomane mancinella*) en dos diferentes ecosistemas.

PALABRAS CLAVE:

- **MICORRIZAS**
- **HOMOGENIZACIÓN**
- **DIVERSIDAD**

Abstract

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are organisms found in most ecosystems, forming mutualistic associations that allow the transfer of water and nutrients from the soil to the plant. Lately, molecular analyzes are used for the characterization and studies of mycorrhizal communities, where DNA extraction is a crucial point that the researcher must carry out. In general, DNA extraction and purification methods must be tailored to each plant species, including plant tissue, due to the variation in consistency and the presence of secondary metabolites, which cause DNA degradation and shear. But regardless of the method, a sufficient amount of genetic material must be generated with adequate purity, which guarantees the physical and biochemical integrity of the molecule to provide data that is coupled with the type of analysis that will be carried out later. Therefore, the present study describes a protocol focused on the cell lysis process of roots of different consistencies, varying the speed and time of the BEAD RUPTOR ELITE homogenizer, to obtain high quality DNA with the least amount of contaminants, necessary for the process. of massive sequencing, allowing the identification of arbuscular mycorrhizal fungi associated with the root of the chamomile of death tree (*Hippomane mancinella*) in two different ecosystems.

KEYWORDS:

- MYCORRHIZES
- HOMOGENIZATION
- DIVERSITY

Introducción

Formulación del problema

Es un hecho que la biodiversidad de las especies es necesaria para que exista el funcionamiento y estabilidad en los ecosistemas, pero los mecanismos ecológicos que mantienen y regulan la biodiversidad se ha estudiado únicamente en plantas y animales (Castro, 2009). En la actualidad se ha reconocido la actividad del microbiota del suelo para el desarrollo, mantenimiento, estabilidad y funcionamiento de un ecosistema, es así, que recientemente se ha planteado la importancia de abordar un estudio de comunidades micorrízicas (Truong et al., 2019). La simbiosis micorrízicas que se forma entre raíces de plantas terrestres y hongos micorrízicos arbusculares (HMA), es de interés para ecologistas por la influencia de estos en los procesos que se dan en los ecosistemas y por su capacidad de inducir una variedad de respuestas en especies de plantas coexistentes (Mosbah et al., 2018). Sin embargo, en la mayoría de las investigaciones, se ha prestado poca o ninguna atención a la diversidad y el rol ecológico que posee los HMA, por la falta de información, que se debe a inconvenientes encontrados en la identificación, cultivo, taxonomía o problemas de manipulación de HMA en ecosistemas naturales (Sanders et al., 1996).

Los problemas de identificación y caracterización de HMA en raíces siempre ha sido un obstáculo, a pesar de que las observaciones morfológicas de las esporas han tenido éxito en experimentos con macetas estos análisis han sido cuestionables, ya que no se han establecido una relación entre la diversidad morfológica de los HMA y su diversidad

genética y funcional, a esto se suma la utilidad limitada para investigaciones de campo, es aquí donde el uso de ADN para técnicas moleculares se está usando con éxito al proporcionar información sobre la diversidad genética de comunidades micorrízicas que podría ayudar a entender ciertos fenómenos e identificar las diferencias ecológicas y funcionales entre HMA de distintos ecosistemas (Tedersoo et al., 2010).

En las plantas, los ácidos nucleicos (ADN y ARN) se extraen de varios tejidos, como raíces, tallos, hojas, flores, frutos y embriones; y son estos los que nos ayudan a obtener información referente a cuestiones evolutivas y ecológicas, pero existe cierta influencia tanto en el proceso de manipulación por parte del investigador, como del tipo de tejido que se va analizar, que dificultan la extracción de ADN (Lucas et al., 2019). Los tejidos como tallo y raíz, están más lignificados y pueden contener mayor cantidad de metabolitos secundarios, lo que dificulta el proceso de extracción de ADN y genera resultados ineficientes para los siguientes procesos de análisis (Henry, 2009).

Para hacer uso de enfoques moleculares el investigador debe obtener una buena cantidad y calidad de ADN, que proporcione datos confiables para el análisis de las comunidades micorrízicas, para lo cual existen diversos métodos de extracción de ADN, todo dependerá del costo, tiempo, cantidad de tejido y su estado de conservación (Crossay et al., 2017).

Justificación del problema

La ecología ha estudiado durante mucho tiempo como se da la distribución de las especies a lo largo de distintos gradientes ambientales (Maarja Öpik et al., 2006). Por lo general, la descripción de ecosistemas se centra en la composición de especies y la fisiología de las comunidades de plantas, pero recientemente, se ha puesto gran énfasis en comprender cómo funcionan los ecosistemas y en particular, el papel que desempeña la biodiversidad en el ecosistema y los efectos que podrían tener sobre el medio ambiente las pérdidas globales y locales de biodiversidad (Asmelash et al., 2016).

Es así, como la creciente conciencia en la comunidad científica de alcanzar el conocimiento sobre otros grupos taxonómicos, como es el caso de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), que cumplen un rol de importancia en el funcionamiento de los ecosistemas ha aumentado (Maarja Öpik et al., 2006).

Se ha demostrado que los HMA, contribuyen a la adquisición de nutrientes que se pensaba que no estaban disponibles, control de estrés abiótico, resistencia a patógenos, dinámica y evolución de muchas especies, permitiendo la diversidad de plantas, por medio de un sistema de redes (van der Heijden & Sanders, 2002). Por esta razón la importancia de su identificación y caracterización para llenar los vacíos en el conocimiento actual entre los vínculos de diversidad genética y distribución de HMA en los ecosistemas por medio de datos de secuencia de ADN que contiene suficiente información para distinguir especies de HMA, mediante el uso de herramientas

moleculares y de bioinformática indispensables para poder caracterizar y entender los factores que determinan la estructura de la comunidad vegetal con ciertas garantías ofreciéndonos una visión concreta y clara (Crossay et al., 2017). Sin embargo, para hacer uso de estas herramientas el investigador debe contar con ADN de buena cantidad y calidad, que permita la caracterización e identificación de la diversidad genética (Nunes et al., 2011). Cabe destacar que los procesos de extracción y purificación de ADN en tejidos vegetales es un paso difícil y desafiante en comparación con tejidos animales, debido a que las plantas poseen lignina y pared celular rígida hecha de material fibroso resistente, que requiere un proceso de lisis especial que permita romper la pared celular y liberar ADN de cada tejido vegetal (Spence et al., 2016). Para esto existen diversos métodos de extracción que van desde los métodos tradicionales o el uso de kits comerciales, no obstante, la elección del método debe generar la suficiente cantidad de material genético con la pureza adecuada, eliminando cualquier contaminante durante el proceso de purificación, además, de garantizar la integridad física y bioquímica de la molécula, y evitar posibles interferencias en las reacciones enzimáticas (Nunes et al., 2011).

El uso de homogeneizadores, como el BEAD RUPTOR ELITE proporciona una lisis celular rápida y eficiente de cualquier muestra biológica sea dura o blanda, esto se debe a la fricción de la muestra con el material abrasivo contenido en los tubos, lo que facilita el proceso de homogenización de muestras vegetales difíciles como tallos y raíces que son tejidos más lignificados y que contienen mayor cantidad de metabolitos

secundarios, lo que obstaculiza el proceso de extracción de ADN y genera resultados ineficientes para los siguientes procesos de análisis (Spence et al., 2016). Su uso se recomienda para muestras pequeñas ya que proporciona mayores rendimientos con un ADN intacto, libre de impurezas y de cualquier tipo de contaminación cruzada, en comparación con la homogenización criogénica (Lucas et al., 2019).

Por la variación en la cantidad y calidad de ADN extraído de tejidos vegetales, es indispensable contar con protocolos optimizados que garanticen los resultados deseados para realizar un análisis del microbioma de raíces, sin la necesidad de cultivar y aislar (Hernández, 2019). Por ende, el presente estudio se plantea optimizar un protocolo de extracción de ADN de raíz haciendo uso del homogeneizador BEAD RUPTOR ELITE, donde se probarán diferentes variaciones de velocidad y tiempo para mejorar el proceso de lisis de raíces de distinta consistencia, ya que se sabe que el ADN extraído es usado en varias herramientas y técnicas, como la comprensión del microbioma de ciertas especies de plantas de interés local en distintos ecosistemas, tal es el caso del árbol de la muerte (*Hippomane mancinella*), siendo un punto de partida para la mayoría de investigaciones que permiten responder distintas preguntas ecológicas y evolutivas.

Objetivos de investigación

Objetivo general

Comparar la composición de las comunidades de hongos micorrízicos arbusculares asociados a la raíz del árbol manzanilla de la muerte (*Hippomane mancinella*), en dos ecosistemas.

Objetivos específicos

- Estandarizar un protocolo de extracción de ADN de raíces de distinta consistencia utilizando el homogenizador BEAD RUPTOR ELITE.
- Determinar el mejor método de lisis celular mediante la evaluación de concentración y pureza por espectrofotometría.
- Obtener datos de secuenciación masiva paralela para la región LSU (micorrizas) de raíces de dos ecosistemas diferentes.
- Analizar las secuencias obtenidas mediante el uso de herramientas bioinformáticas.
- Identificar las comunidades de hongos micorrízicos arbusculares de raíces del árbol manzanilla de la muerte (*Hippomane mancinella*) en dos distintos ecosistemas.

Marco teórico

Micorrizas

Las micorrizas son estructuras simbióticas que se forman entre raíces y hongos del suelo (Tedersoo et al., 2010). Permiten mejorar las condiciones de las plantas al proporcionar resistencia al estrés, absorción de agua y nutrientes (particularmente nitrógeno y fosforo), de modo que influyen en la diversidad, productividad y funcionamiento del ecosistema (Guo, 2018).

Tipos de micorrizas

Las micorrizas se dividen en 5 agrupaciones, basadas en las diferencias filogenéticas, estructurales o ecofisiológicas entre relaciones fúngicas y vegetales (Bagyaraj, 2014). Establecidas de la siguiente manera:

Ectomicorrizas

Las asociaciones de ectomicorrizas se dan entre hongos superiores y especies leñosas; árboles y arbustos (Selosse & Le Tacon, 1998). Las hifas de este tipo de hongos se caracterizan por limitar el desarrollo del córtex, sin entrar en las células de la raíz, a lo que se denomina “red de Harting” (Castro, 2009). Además, son biomarcadores, debido a que ninguna de sus características fisiológicas puede ser redundante (Amaranthus, 1998).

Ectendomicorizas

Ectendomicorizas son asociaciones que están escénicamente restringidas a los géneros de plantas *Pinus*, *Picea* y, en menor medida, *Larix* (Selosse & Le Tacon, 1998). Este tipo de asociaciones es de importancia para la revegetación de sitios perturbados y en el establecimiento de coníferas en situaciones posteriores a incendios forestales (T. E. Yu et al., 2001).

Endomicorizas

Grupo de simbiontes cuya estructura fúngica penetra por completo a la raíz del huésped (Simon et al., 1993). En este grupo se distribuye tres agrupaciones principales: Ericoides, Orquidioides y Arbusculares (Guo, 2018).

Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA).

Los hongos micorrízicos arbusculares constituyen una asociación simbiótica más común de plantas, encontrándose en casi todos los ecosistemas terrestres (Posta & Hong Duc, 2020). Los HMA están en la mayoría de los hábitats naturales y brindan una amplia gama de beneficios ecológicos de importancia (Chen et al., 2018), en particular facilitan el crecimiento vigoroso de las plantas hospedadoras bajo condiciones de estrés al generar una red de hifas que contribuyen a la comunicación entre la planta y el hongo, lo que conduce a una tasa fotosintética mejorada, fijación de CO₂ atmosférico, protección contra hongos patógenos, mayor absorción y traslocación de agua y nutrientes e influye en el mejoramiento de la calidad del suelo en cuanto a su estructura

y textura, debido a que las hifas fúngicas pueden acelerar el proceso de descomposición de materia orgánica (Begum et al., 2019). Por esta razón, los HMA son endosimbiontes vitales que juegan un papel efectivo de productividad de las plantas y el funcionamiento del ecosistema (Gianinazzi et al., 2010).

Análisis de diversidad

Con la finalidad de realizar una clasificación filogenética de especies de hongos micorrízicos arbusculares dentro de familias y géneros de un ambiente natural, es necesario estudios de diversidad tanto taxonómicos como genéticos para que exista complementariedad en dicho análisis (Castro, 2009). Los métodos pueden basarse en distintos criterios, como:

Criterios morfológicos

Tradicionalmente para estudios de diversidad de HMA la caracterización se ha logrado por el aislamiento, identificación y cuantificación de esporas, usando rasgos morfológicos y otras estructuras fúngicas (Hifas) (Lanfranco et al., 2001).

Aproximaciones moleculares

Los genes están presentes en todos los organismos, por lo tanto, toda técnica molecular disponible para estudios ecológicos parte de la extracción de ADN que constituye una huella de identificación o estimación de diversidad genética (Sanders et al., 1996). Cabe mencionar que para hacer uso de cualquier técnica molecular para el estudio de HMA es necesario conocer la estructura de los genes ribosómicos nucleares

de eucariotas de esta forma se podrá definir la región que sea apropiada para el estudio de diversidad que se esté realizando. Los genes, poseen regiones altamente conservadas (18S, 5.8S y 28S), regiones con cierto grado de variación que son las regiones transcritas internas (ITS) y las regiones con mayor grado de variación que son las regiones espaciadoras intergénicas (IGS) (Castro, 2009).

Estudios en raíces y suelo

La investigación molecular basada en el aislamiento de ADN es uno de los enfoques más utilizados que nos permite desarrollar estudios de diversidad de HMA en distintos ecosistemas, mediante técnicas, como RFLP (Análisis de polimorfismos en fragmentos de restricción), SEAD (Enriquecimiento selectivo de ADN amplificado), construcción y análisis de genotecas, entre otras (Lanfranco et al., 2001).

Numerosos microorganismos existen localmente en el suelo, al igual, que las raíces de las plantas se encuentran colonizadas por varios tipos de microbios, incluidos acinomicetos, rizobios, bacterias como *Pseudomonas*, así como hongos micorrízicos arbusculares (M. Yu et al., 2019). Pero en general las interacciones simbióticas entre HMA y la planta se consideran inespecíficas, debido a que una misma planta puede estar colonizada por diferentes especies de HMA, sin embargo, dependerá del HMA y de las especies de plantas involucradas en la simbiosis, al igual que las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo son determinantes en la composición de la comunidad de HMA del suelo y la planta (Mahmoudi et al., 2019). Por lo tanto, los estudios de

diversidad se llevan a cabo por el tipo de planta, usos de suelo, condiciones ambientales, tipo de ecosistema y otros aspectos (Castro, 2009).

Extracción de ADN de tejidos vegetales

Emplear técnicas moleculares para la obtención de datos reproducibles y confiables parte con la extracción de ADN (Alejos et al., 2015). En el caso particular de tejidos vegetales la presencia de metabolitos secundarios, contenido de lignina y compuestos relacionados hace problemático el proceso de lisis, además de generar bajo rendimiento de ADN y afectar reacciones posteriores (Chabi Sika et al., 2015).

Protocolos de extracción tradicional y comercial

Los métodos tradicionales de extracción requieren varias horas e incluso días de trabajo, además hacen uso de solventes orgánicos que son tóxicos, sin embargo, con el apareamiento de kits comerciales se logró simplificar procesos, optimizar tiempo y obtener ADN con mayor rendimiento y calidad (Alejos et al., 2015).

Para tener resultados exitosos en toda la cadena de procesos, la recolección y almacenamiento de muestras vegetales es un paso que se debe considerar para cada tipo de planta y tejido que se va a emplear (Rocha, 2002). El proceso de homogenización es otro paso clave, este paso permite la ruptura de tejidos y paredes celulares, mediante la pulverización del material vegetal ya sea por procesos mecánicos o químicos (Verollet, 2008). De modo que los procesos comúnmente usados es la homogenización criogénica que es un método relativamente económico y el empleo de homogeneizadores

mecánicos que evita el uso de detergentes permitiendo que las proteínas citosólicas permanezcan intactas (Goldberg, 2008).

El uso de homogeneizadores mecánicos nos garantiza el rompimiento de cualquier tipo de muestra biológica sea esta dura o banda, simplemente variando el tiempo y número de ciclos, debido a que el procesamiento se da mediante la fricción de la muestra con el tubo que contiene algún material abrasivo, como son las perlas de vidrio que brinda una excelente eficiencia con potentes fuerzas de molienda (Alejos et al., 2015). Cabe destacar que su uso se recomienda para muestras pequeñas ya que proporciona mayores rendimientos con un ADN intacto (Verollet, 2008).

Ventajas y desventajas de los métodos de extracción tradicionales y comerciales

Tabla 1

Ventajas y Desventajas de los métodos de extracción tradicionales y comerciales

Condición	Métodos	
	Tradicionales	Comerciales
Material Inicial	Gramos	Miligramos
Uso de sustancias toxicas	En la mayoría de protocolos	No se usa
Tiempo	Varios días	Menor a 3 horas
Rendimiento	Varios microgramos, pero puede incluir moléculas de ADN fragmentadas	Varios nanogramos, pero con moléculas de ADN integras
Inhibición enzimática	Los reactivos usados pueden causar interferencias	Poco frecuente, y si el caso lo amerita son cantidades recomendadas por el fabricante.
Costos	Bajo	Alto

Nota: Recuperado de Extracción y purificación de ADN. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático – INECC. Copyrigh 2015 por Alejos et al. Reprinted with permission.

Selección del método de extracción

Seleccionar un método de extracción que se ajuste a la técnica de análisis, tipo de tejido, estado de conservación, costos y tiempo, es fundamental, pero independientemente del método que se emplee, como regla general, el ADN extraído debe proporcionar altos rangos de pureza y concentración, a más de mantener la integridad física y bioquímica de la molécula (Dhaliwal, 2013).

Árbol manzanillo de la muerte

Es también llamada guayaba venenosa, este árbol pertenece al género *Hippomane* y familia de Euphorbiaceae cuyo nombre científico es *Hippomane mancinella* (Muscat, 2018). Famoso por las propiedades de sus frutos, corteza y látex; ha sido usado como purgante, diurético y contra afecciones de tétanos, sin embargo, puede causar intoxicación, debido a las toxinas que posee; y que muchas de ellas aún no han sido identificadas (Tagle, 2015).

Hipótesis

Ho1: El mejor tratamiento de extracción de ADN de raíces de distinta consistencia utilizando el homogenizador BEAD RUPTOR ELITE, permitirá obtener ADN de pureza y concentración apropiada para técnicas moleculares.

Ho2: La riqueza y abundancia de hongos micorrízicos arbusculares del árbol manzanilla de la muerte (*Hippomane mancinella*) en dos ecosistemas es diferente.

Materiales y métodos

Zona de estudio

El proyecto se realizó en las siguientes fases detalladas a continuación:

Obtención de muestras

Para la estandarización del homogeneizador BEAD RUPTOR ELITE se tomaron muestras modelo de raíces de distinta consistencia del campus central de la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE”. Las muestras para el análisis de comunidades micorrízicas fueron recolectadas anteriormente de dos cantones del Ecuador (Figura 1), el Cantón Loja ubicado en la provincia de Loja, Región Interandina o Sierra y el Cantón Puerto López ubicado en la provincia de Manabí, situada en la región Costa; a continuación, se detalla los sitios de muestreo y las muestras utilizadas (Tabla 2).

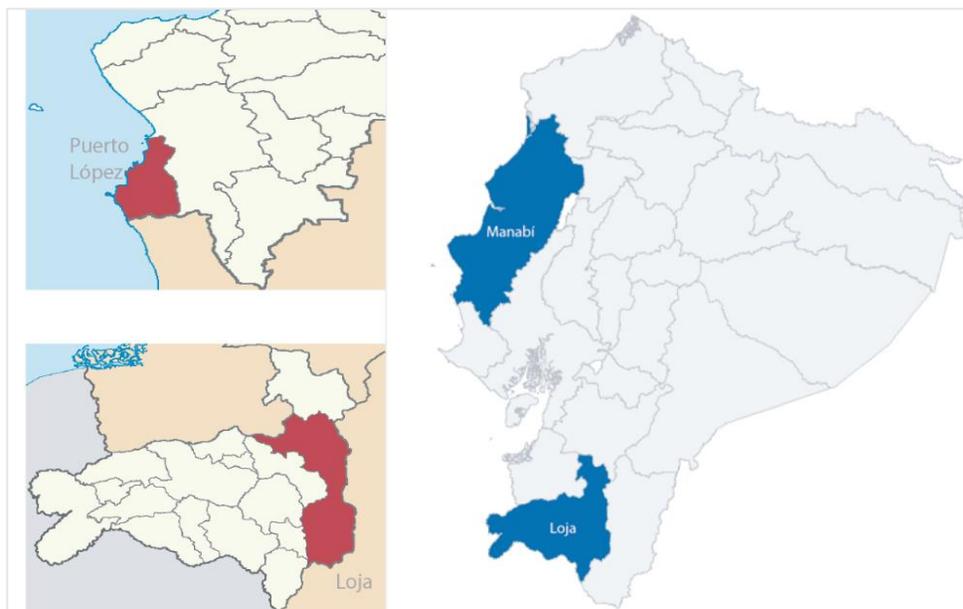
Trabajo de laboratorio

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Botánica del Campus IASA I, de la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE”, ubicado en el Valle de los Chillos en la Hacienda el Prado sector Selva Alegre, Sangolquí.

Las muestras de ADN del árbol manzanilla de la muerte (*Hippomane mancinella*), se enviaron a la Universidad de Kansas – EEUU, precisamente al Departamento de Ecología y Biología Evolutiva para que se realice el proceso de secuenciación.

Figura 1

Zonas de recolección de muestras



Nota: El gráfico muestra las dos zonas donde el material vegetal de la especie de estudio (*Hippomane mancinella*) fue recolectado.

Tabla 2

Localización y descripción general de las muestras estudiadas

Especie	Región	Muestra	Ubicación GPS
Árbol manzanilla de la muerte (<i>Hippomane mancinella</i>)	Loja	L1	S 01°32.490' W 080°48.367'
		L2	S 01°32.694' W 080°48.649'
		L3	S 01°32.495' W 080°48.653'
	Puerto López	PL1	S 03°58.921' W 079°14.054'
		PL2	S 03°58.921' W 079°18.685'
		PL3	S 04°00.206' W 079°10.736'

Procedimientos

Muestreo de raíces

Diferentes tipos de raíces modelo se recolectaron en el campus central de la Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE" para estandarizar el uso del homogeneizador. En el proceso de recolección, se desinfectó la pala y las tijeras de poda con alcohol al 70% antes de usarse para evitar cualquier tipo de contaminación o daño a la planta. Se removió la hojarasca y la tierra, para dejar al descubierto las raíces y cortarlas. Posteriormente las raíces se coloraron en fundas ziploc correctamente etiquetadas con la zona de recolección y la fecha, para su almacenaje y transporte al laboratorio.

Preparación del material vegetal

Las raíces recolectadas se colocaron en cajas Petri para lavarlas con agua destilada, luego se secaron sobre papel absorbente. Una vez secas se las clasificó en base a la consistencia de su raíz, como raíces de plantas leñosas, semileñosas y herbáceas; y luego fueron guardadas en papel dentro de fundas ziploc para almacenarlas en el refrigerador a 4 °C, hasta su posterior uso.

Identificación de micorrizas por técnicas moleculares

Extracción de ADN genómico de raíces.

Para la extracción de ADN de raíces, se empleó el kit comercial DNeasy® PowerSoil® Pro, donde se colocó aproximadamente 25 mg de raíces en los tubos que

contienen perlas de vidrio para la homogenización. Antes de colocar en el homogeneizador BEAD RUPTOR ELITE se agregó 800 μL del buffer de lisis y se homogenizó usando diferentes tiempos y velocidades para los distintos tratamientos. Las perlas de vidrio permitieron moler el tejido y convertirlo en polvo fino que se usó en los demás pasos descritos en el protocolo del kit de extracción para completar el aislamiento de ADN.

Dilución del ADN extraído

En el tubo de elución proporcionado por el kit DNeasy® PowerSoil® Pro, que contiene la columna MB Spim se colocó 50 μL de la Solución C6 y se centrifugó a 15000 xg por 1 min, luego se descartó la columna.

En el caso particular del ADN de raíz del árbol manzanilla de la muerte (*Hippomane mancinella*), de los 50 μL obtenidos 20 μL se enviaron al Departamento de Ecología y Biología Evolutiva de la Universidad de Kansas para el proceso de secuenciación de ADN.

Cuantificación de ADN genómico

Espectrofotometría.

La concentración de ADN se determinó por espectrofotometría a una absorbancia de 260nm y la pureza de ADN se midió empleando los rangos de $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$. Ambos análisis se realizaron usando el espectrofotómetro Multiskan™ Sky

Microplate. Para esto se colocó en la primera celda del microplato 2 μ L de la Solución C6 como blanco y en las celdas restantes las muestras de ADN.

La pureza optima de ADN se determinó al encontrarse entre 1,8-2,0 en el ratio $A_{260/280}$, y aquellos valores que están por encima de 2.1 y por debajo de 1.6, fueron considerados como ADN contaminado con ARN o con compuestos aromáticos respectivamente. Por otro lado, un ADN puro en el ratio de $A_{260/230}$ debe encontrarse entre los rangos de 1.5-2.2 y los valores que estén por debajo de lo establecido se consideraron muestras contaminadas con sales, carbohidratos y fenoles (Tabla 3.).

Tabla 3

Valores indicativos de pureza en muestras de ADN

RADIO	VALOR	PUREZA
260/280	1.8-2	ADN de pureza óptima
	1.6-1.8	ADN pureza aceptable
	< 1,6	Presencia de compuestos aromáticos
	> 2.1	Contaminación con ARN
A260/230	1,5-2,2	ADN de pureza óptima
	< 1,5	Contaminación con sales, carbohidratos, fenoles

Nota: Recuperado de Banco Nacional de ADN Carlos III, Universidad de Salamanca.

Copyright BancoADN. Reprinted with permission.

Amplificación de ADN y secuenciación

Las secuencias de ADN fúngico se generaron con los cebadores que se especifican en la Tabla 4 para la región grande (LSU / 28S).

Tabla 4

Primers utilizados en este estudio

Organismo objetivo	Locus	Cebador	Secuencia de nucleótidos (5 'a 3')
Glomeromycota	Subunidad grande (LSU, 28S) del ARNr [~ 1200 bp]	LROR	ACC CGC TGA ACT TAA GC
		LR6	CGC CAG TTC TGC TTA CC

Para el proceso de amplificación en PCR las reacciones se realizaron en el termociclador Thermo Fisher Scientific®, y se utilizó 0.5 µM de cada uno de los primers y 1 µL del ADN extraído, conjuntamente con 2 µL de 10X PCR buffer, 0.2mM dNTPs, 1U Taq polimerasa. Las condiciones de PCR fueron 95 ° C durante 3 minutos para el proceso de desnaturalización, seguidos de 30 ciclos a 96 ° C durante 1 minuto, 58 ° C durante 1 minuto, para la hibridación de primers y finalmente a 72 ° C durante 1 minuto, seguido de un período de extensión final de 10 minutos a 72 ° C (Hernández, 2019). Se usaron controles negativos (agua estéril) en todas las reacciones de PCR.

En la unidad de secuenciamiento de la Universidad de Kansas se prepararan las librerías y la secuenciación de ampliaciones utilizando el Kit V3 de la plataforma Illumina Miseq.

Análisis Bioinformático

Validación técnica.

Para el análisis metagenómico de esta tesis se usó secuencias de la base de datos EBI (European Bioinformatics Institute; <http://www.ebi.ac.uk>), del estudio enfocado en las propiedades a escala comunitaria de micorrizas arbusculares, ectomicorrizas y asociaciones endofíticas en bosques templados y subtropicales.

Se eligió EMBL-European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) como base de datos para la descarga de secuencias analizadas, debido a la confiabilidad de los documentos publicados y los criterios que se cumplen para depositar secuencias en esta plataforma.

Procesamiento y control de calidad de secuencias.

Se importaron las secuencias de análisis en formato FASTQ a la plataforma Galaxy (<http://galaxyproject.org>) aquí se filtró y recortó las secuencias con la herramienta **Cutadapt** para eliminar los primers usados (Tabla 4) y lecturas de secuenciación que incluían nucleótidos con puntuaciones de calidad baja (<30) con el fin de evitar posibles errores. Luego se realizó el proceso de emparejamiento con la herramienta **Build List of Dataset Pairs** y finalmente se estimó la calidad de las secuencias con **FastQC** para después convertirlos a formato FASTA y preparar un solo conjunto de datos para su posterior análisis.

Alineación de secuencias.

Con la herramienta **align.seqs** se alinearon las secuencias de formato FASTA a una alineación plantilla obtenida de la base de datos de MaarjAM (<http://maarjam.botany.ut.ee/>) y con **summary.seqs** se pudo conocer la calidad de alineación.

Asignación Taxonómica.

Primero se eliminaron posibles errores en las secuencias usando el comando **pre.cluster**, este permitió dividir las secuencias por grupo y luego ordenarlas por abundancia.

Se importó una base de datos con formato fasta y un archivo de taxonomía de referencia obtenidas en (http://www.mothur.org/wiki/RDP_reference_files). Para después con el comando **cluster.split** asignar las secuencias a OTU con lo que se obtuvo una tabla con las diferentes OTUs identificadas. A continuación, con el **make.shared** se logró conocer cuántas lecturas hay en cada OTU con una distancia de 0.03 (97% de similitud) y finalmente para identificar la taxonomía de cada OTU se utilizó el comando **classify.otu**.

Comparación de secuencias.

Las secuencias de análisis de este estudio se contrastaron con las que se encuentran en la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando Blastn.

Para realizar los análisis filogenéticos se buscaron las secuencias que corresponden a la subunidad LSU de hongos micorrízicos arbusculares tanto en la base de datos de NCBI como de MaarjAM para proporcionar una identificación a nivel de especie más concluyente.

Análisis Filogenético.

Se realizó un alineamiento múltiple usando el software Mega X para la construcción del árbol filogenético entre las secuencias analizadas y las secuencias de referencia descargadas de GenBank. Se utilizó el método *Neighbour-Joining* de máxima verosimilitud para el análisis filogenético con una similitud de secuencia $\geq 97\%$.

Determinación de Biodiversidad de comunidades

La biodiversidad de amplicones se analizaron con el paquete **ampvis2** (Andersen et al., 2018) y **phyloseq** (McMurdie & Holmes, 2013) en R, donde se cargaron dos archivos; una tabla OTU que incluye la taxonomía asignada obtenida del análisis de Galaxy y los metadatos que recopila la información relevante de las muestras de estudio.

Curva de rarefacción.

Se utilizó el comando **amp_rarecurve** de paquete ampvis2 en R para generar el proceso de rarefacción y de esta forma obtener el número de lecturas de las OTUs más abundantes en cada zona de análisis.

Comunidad de micorrizas arbusculares.

Para obtener una descripción general de la composición como de la abundancia de micorrizas arbusculares de las muestras presentes en las dos zonas de estudio se realizó un gráfico de barras apiladas con los comandos **plot_bar** y **geom_bar** del paquete phyloseq que muestra las abundancias relativas de cada familia, y con el comando **amp_heatmap** de ampvis2 se visualizó la abundancia relativa a nivel de especie.

Análisis Estadístico

Diseño experimental.

Para estandarizar el uso del homogenizador BEAD RUPTOR ELITE, se ejecutaron 27 tratamientos generados por todas las combinaciones de los factores controlables (Tipo de planta, tiempo y velocidad) y cada uno contó con 3 repeticiones.

Análisis.

Todos los análisis fueron procesados en el software estadístico R versión 4.0.2 (R Development Core Team, 2020).

Estandarización del homogeneizador BEAD RUPTOR ELITE.

Los datos de concentración como pureza en los rangos $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$, obtenidos de la extracción de ADN, se analizaron mediante la prueba paramétrica ANOVA (aov) de tres vías con un intervalo de confianza del 95%, la que permitió evaluar simultáneamente el efecto de interacción significativo de las tres variables de

agrupación o factores (Tipo de planta, Tiempo y Velocidad) en una variable resultado (Concentración y Pureza). Antes de este análisis se revisó los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianza con el estadístico Shapiro-Wilk (`shapiro_test`) y Levene (`levne_test`) respectivamente, finalmente para identificar que tratamiento presenta diferencias significativas en cada tipo de planta (Herbácea, Leñosa y Semileñosas) se utilizó la prueba de Bonferroni con un alfa ajustado 0.025.

Biodiversidad de comunidades micorrízicas.

Índice de diversidad y Riqueza de OTUs.

Se estimó la riqueza de OTUs y los índices de diversidad de Chao1, Simpson y Shannon con el comando **`estimate_richness`** del paquete de `phyloseq` en R. Luego se revisó los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianza con el estadístico Shapiro-Wilk (`shapiro_test`) y Levene (`levne_test`) respectivamente, para después realizar la prueba t-student (`t.test`) de las muestras y de esta forma determinar si existen diferencias significativas entre las dos zonas de estudio, el nivel de significancia que se utilizó fue del 5%.

Resultados

Estandarización del homogeneizador BEAD RUPTOR ELITE

Los resultados que se detallan en la Tabla 5, fueron evaluados para identificar el mejor tratamiento en cada tipo de planta.

Tabla 5

Rendimiento de ADN y rango de pureza de todos los tratamientos

Tipo de planta	Tratamiento	Descripción		Concentración [$\mu\text{g/ml}$]	Pureza	
		Velocidad [m/s]	Tiempo [s]		A _{260/230}	A _{260/280}
Herbácea	T1	5.5	60	132.67 \pm 39.17	0.83 \pm 0.287	1.98 \pm 0.010
	T2		45	115.20 \pm 38.36	1.99 \pm 0.028	2.01 \pm 0.006
	T3		30	45.39 \pm 4.13	1.28 \pm 0.070	1.85 \pm 0.065
	T4	4.5	60	116.57 \pm 20.20	1.48 \pm 0.087	1.98 \pm 0.006
	T5		45	38.20 \pm 7.47	1.45 \pm 0.135	2.02 \pm 0.015
	T6		30	50.41 \pm 1.98	1.52 \pm 0.040	1.97 \pm 0.017
	T7	4.0	60	70.80 \pm 13.45	2.02 \pm 0.407	2.02 \pm 0.006
	T8		45	41.47 \pm 1.87	1.15 \pm 0.054	1.95 \pm 0.031
	T9		30	60.49 \pm 1.32	1.76 \pm 0.120	2.01 \pm 0.025
Leñosa	T10	5.5	60	26.67 \pm 5.89	1.49 \pm 0.286	2.09 \pm 0.062
	T11		45	11.91 \pm 1.73	1.29 \pm 0.189	1.75 \pm 0.076
	T12		30	7.39 \pm 0.69	1.05 \pm 0.026	1.94 \pm 0.046
	T13	4.5	60	7.68 \pm 1.78	1.22 \pm 0.142	1.54 \pm 0.217
	T14		45	6.67 \pm 1.84	1.15 \pm 0.140	2.14 \pm 0.025
	T15		30	9.16 \pm 0.62	1.02 \pm 0.055	2.05 \pm 0.075
	T16	4.0	60	3.23 \pm 0.94	0.50 \pm 0.422	0.52 \pm 0.059
	T17		45	5.51 \pm 0.27	1.26 \pm 0.046	2.59 \pm 0.068
	T18		30	13.23 \pm 1.27	1.23 \pm 0.044	1.99 \pm 0.015
Semileñosa	T19	5.5	60	62.43 \pm 8,30	1.69 \pm 0.416	1.99 \pm 0.012
	T20		45	135.00 \pm 22,54	1.69 \pm 0.202	2.02 \pm 0.001
	T21		30	276.00 \pm 10,15	1.62 \pm 0.067	1.92 \pm 0.047
	T22	4.5	60	120.97 \pm 30,31	1.49 \pm 0.412	1.95 \pm 0.006
	T23		45	112.60 \pm 31,45	1.10 \pm 0.066	1.99 \pm 0.006
	T24		30	184.83 \pm 11,51	1.24 \pm 0.112	1.93 \pm 0.070
	T25	4.0	60	100.90 \pm 20,10	1.53 \pm 0.121	2.01 \pm 0.025
	T26		45	248.43 \pm 2,43	1.98 \pm 0.031	1.96 \pm 0.015
	T27		30	235.27 \pm 0,66	1.61 \pm 0.066	1.98 \pm 0.025

Cuantificación de ADN

Se verificó el supuesto de normalidad analizando los residuos del modelo con la prueba de Shapiro-Wilk para cada combinación de modo que la puntuación de la variable concentración fue 0.06 ($p > 0.05$), comprobando una distribución normal de los datos analizados; la prueba de Levene no es significativa con un valor de 0.09 ($p > 0.05$), asumiendo la homogeneidad de varianza en los diferentes grupos.

Tabla 6

Resultados de la Prueba de Bonferroni para el parámetro Concentración.

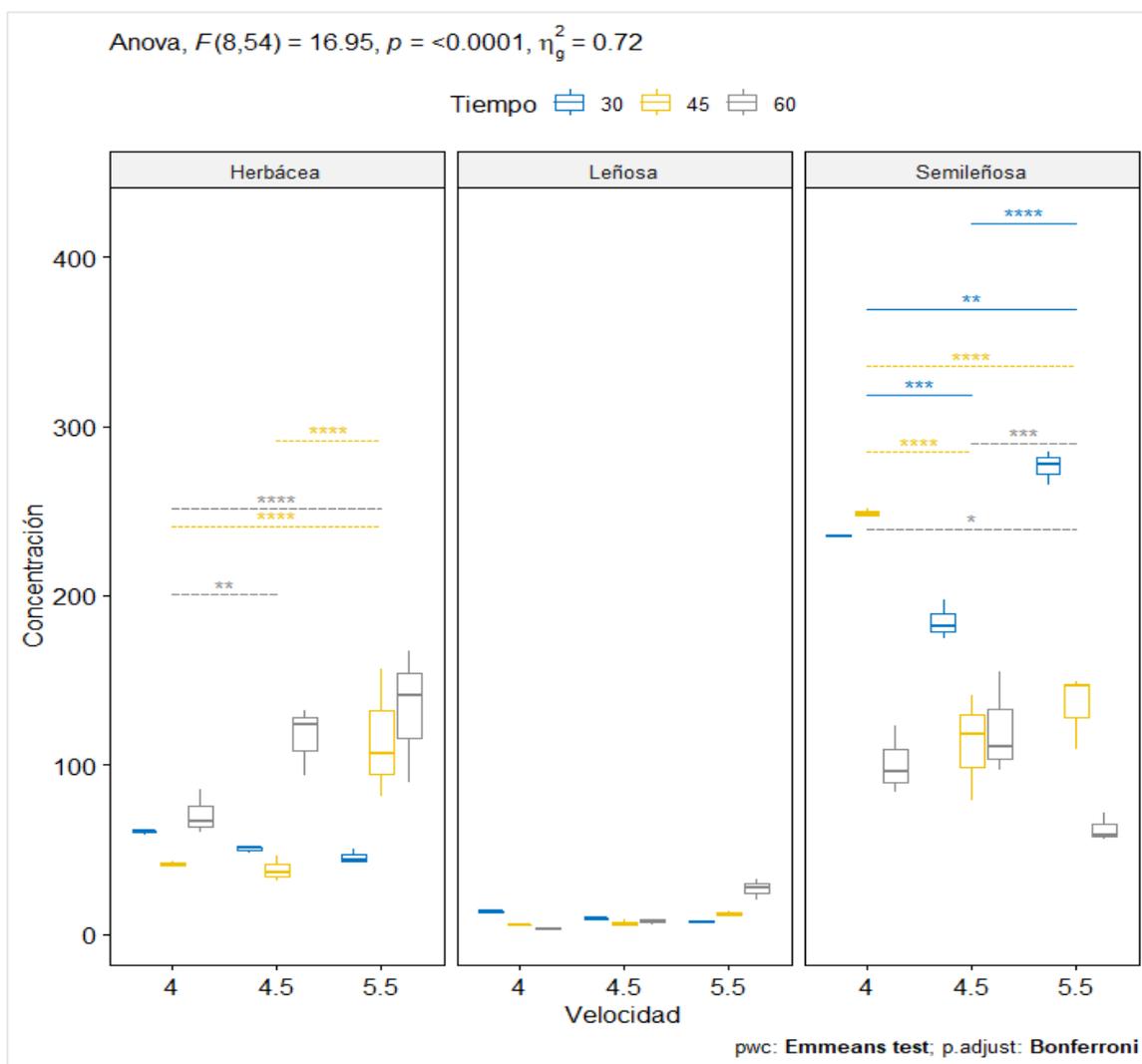
Tipo de planta	Tratamiento		Bonferroni	
	Grupo1	Grupo2	p-valor	Inferencia
Herbácea	T8	T2	1.73×10^{-6}	*** p < 0
	T5	T2	6.91×10^{-7}	*** p < 0
	T7	T4	2.67×10^{-3}	** p < 0.001
	T7	T1	4.54×10^{-5}	*** p < 0
Semileñosa	T27	T24	8.68×10^{-4}	*** p < 0
	T27	T21	8.43×10^{-3}	* p < 0.01
	T24	T21	1.20×10^{-8}	** p < 0.001
	T26	T23	4.36×10^{-14}	*** p < 0
	T26	T20	2.08×10^{-11}	*** p < 0
	T25	T19	1.38×10^{-2}	p < 0.05
	T22	T19	1.10×10^{-4}	*** p < 0.001

Nota: * significa que existe diferencias significativas en la comparación de

tratamientos. Códigos.Sig: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 '' 1

Figura 2

Concentración de ADN en $\mu\text{g/ml}$ obtenido de cada tratamiento



Nota: Diagrama de cajas del rendimiento de ADN. * significa que existe diferencias significativas en la comparación de tratamientos.

Los resultados del análisis de varianza ANOVA de tres vías señala que hay diferencia estadísticamente significativa entre los tres factores analizados (Tipo de planta, Tiempo y Velocidad), ($F(8,54) = 16.95$, $p < 0.0001$, $h^2 = 0.72$), de tal forma, que se acepta la hipótesis alternativa donde al menos un tratamiento difiere en valores de concentración de ADN.

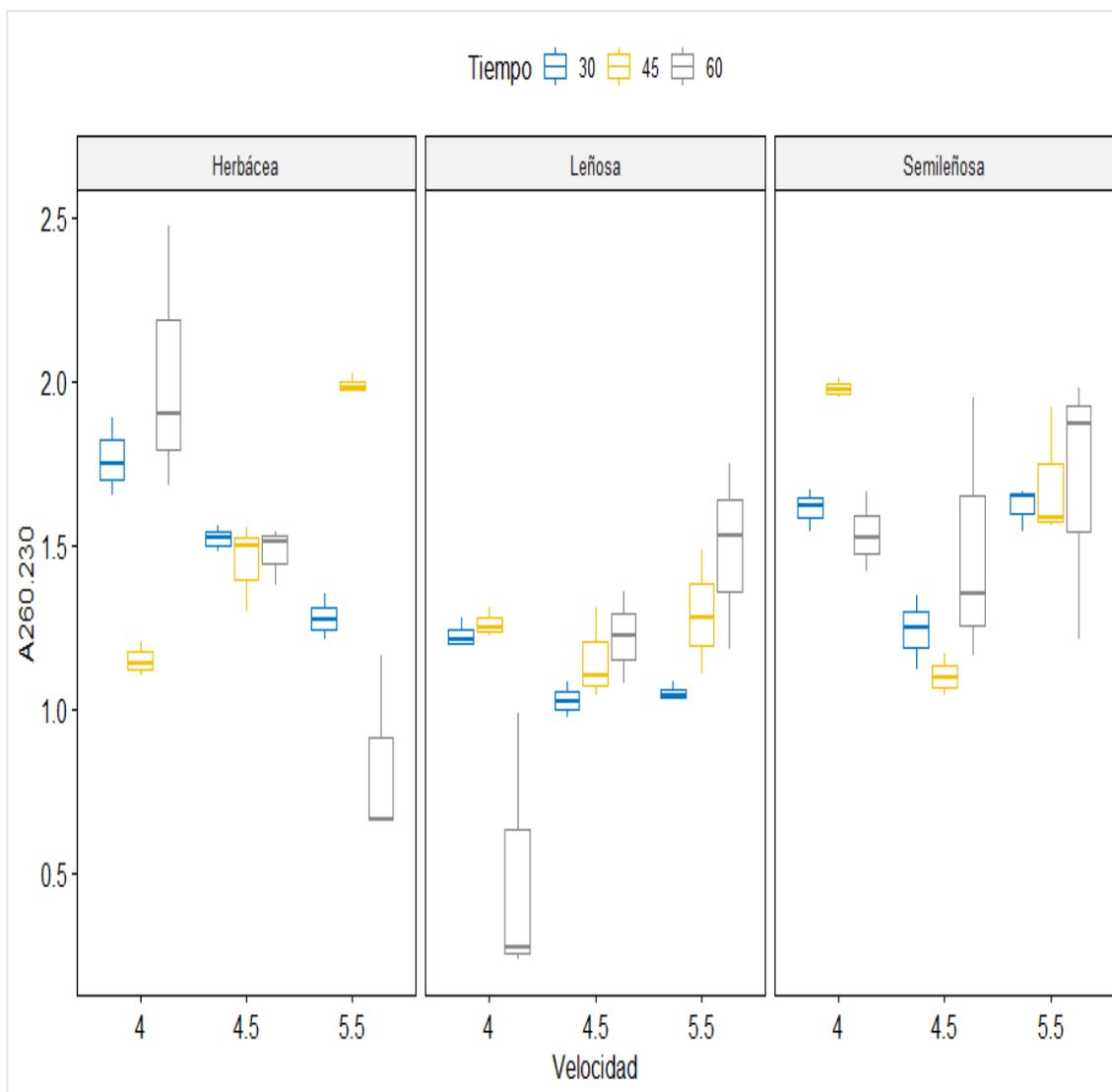
La prueba de Bonferroni se muestra en la Tabla 6 y en el diagrama de cajas de la Figura 2, en el que se observa que existe diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en las plantas Herbáceas y Semileñosas, sin embargo, no hubo ningún tratamiento significativo en plantas Leñosas. Además, en la Figura 2 se indica que los mejores tratamientos en cuanto a rendimiento son T1, T10 y T21 con 132.67 ± 39.17 , 26.67 ± 5.89 y 276.00 ± 10.15 ($\mu\text{g/ml}$) respectivamente.

Pureza de ADN

Se encontró que los mejores tratamientos en cuanto a calidad de ADN en ambos ratios de absorbancia ($A_{260/230}$ y $A_{260/280}$) y en base a los niveles indicativos de pureza que se muestran en la Tabla 3 conjuntamente con un alto rendimiento de ADN, fueron los tratamientos T2 y T4 para plantas herbáceas, mientras que para Leñosas y Semileñosas son T10 y T21 respectivamente (Figura 3 y 4).

Figura 3

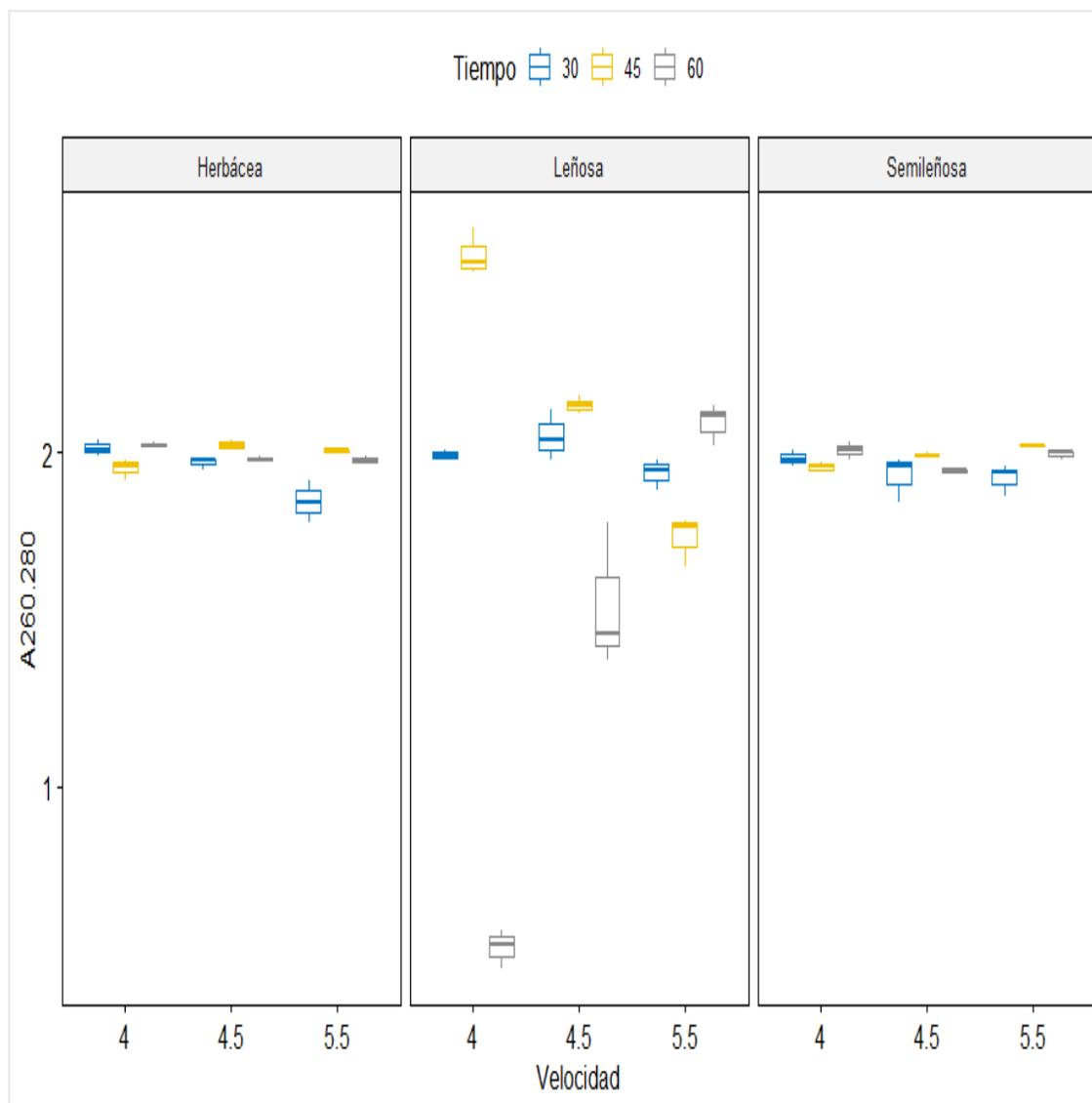
Pureza de ADN extraído de los distintos tratamientos considerando la proporción de absorbancia $A_{260/230}$



Nota: Diagrama de cajas de la pureza de ADN en el rango de *absorbancia* $A_{260/230}$. La línea horizontal dentro del cuadro define la mediana, mientras que los bigotes representan los valores más bajos y altos dentro del rango intercuartílico de 1.5 (IQR).

Figura 4

Pureza de ADN extraído de los distintos tratamientos considerando la proporción de absorbancia $A_{260/230}$



Nota: Diagramas de cajas de la pureza de ADN en el rango de *absorbancia* $A_{260/280}$. La línea horizontal dentro del cuadro define la mediana, mientras que los bigotes representan los valores más bajos y altos dentro del rango intercuartílico de 1.5 (IQR).

Extracción de ADN de la especie de estudio

Una vez concluido cual es el mejor tratamiento para el proceso de lisis celular de plantas leñosas, se aplicó el tratamiento T10 (Velocidad 5.5 [m/s] y Tiempo 60 [s]) para la ruptura celular de raíces del árbol manzanilla de la muerte (*Hippomane mancinella*), los resultados de rendimiento y pureza se especifica en la Tabla 7.

También se corrió un gel de electroforesis para visualizar las bandas de ADN extradido de la especie de estudio (Figura 5).

Tabla 7

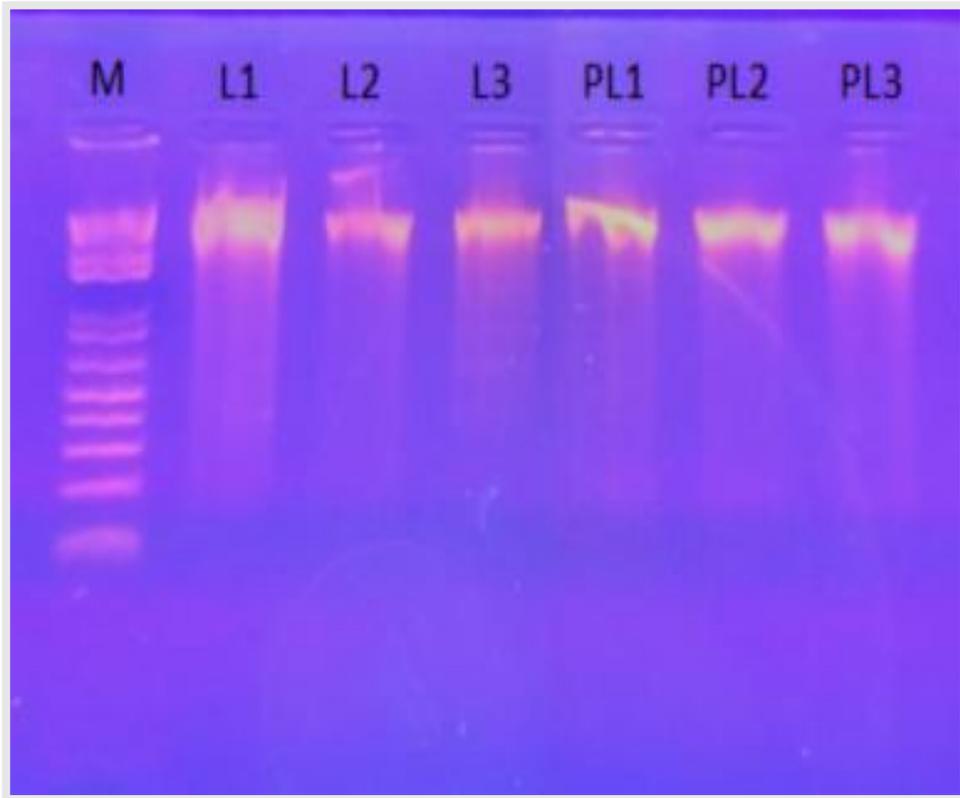
ADN extraído de raíces del Árbol manzanilla de la muerte (Hippomane mancinella)

Especie	Región	Muestra	Peso [g]	Concentración [ug/ml]	Pureza	
					A _{260/230}	A _{260/280}
Árbol manzanilla de la muerte (<i>Hippomane mancinella</i>)	Loja	L1	0,0250	27,96	0,59	1,95
		L2	0,0251	39,29	1,14	1,67
		L3	0,0157	15,70	0,92	2,15
	Puerto López	PL1	0,0143	32,14	0,54	1,59
		PL2	0,0144	15,20	0,63	2,03
		PL3	0,0252	51,33	1,28	1,79

Nota: Resultados de rendimiento y pureza en los dos rangos de absorbancia por espectrofotometría, tras la extracción de ADN de raíces de la especie de estudio.

Figura 5

Electroforesis en gel de agarosa al 1%



Nota: El gel de electroforesis de los resultados de extracción de ADN de raíces del Árbol manzanilla de la muerte (*Hippomane mancinella*) muestra degradación de ADN.

Análisis de secuencias

Asignación taxonómica de OTUs

Las secuencias de este estudio fueron tomadas de la base de datos EBI y tras su análisis en Galaxy se obtuvo un total de 62.256 lecturas, después del paso de

eliminación de ruido se alcanzó 22.586 lecturas sin procesar, posteriormente con el paso de recorte se eliminaron 2.481 lecturas. De las 20.105 lecturas restantes, se eliminaron 1.186 secuencias quiméricas potenciales (secuencias que no son productos reales de la amplificación del gen). Las 18.919 lecturas no quiméricas restantes se asignaron a 89 unidades taxonómicas operacionales (OTU) en base a una similitud de secuencia del 97%. De estas 89 OTUs, 21 (12.789 lecturas) pertenecen a hongos micorrízicos arbusculares. Como el resultado de lecturas de HMA varió de 214 a 7.465 entre las muestras, los números de lectura se normalizaron, obteniendo un conjunto de datos que contenían 21 OTUs (5.801 lecturas).

Las 21 OTUs (24%) fueron comparadas con los organismos más próximos en la base de datos NCBI, presentando 95 a 99% de homología (% de identidad) con secuencias proporcionales a la subunidad 28S ARNr de distintos hongos micorrízicos arbusculares pertenecientes a la clase Glomeromycetes (Tabla 8). Las secuencias restantes son hongos no identificados que representan el 76 % de OTUs.

Se procedió a la construcción de un árbol filogenético en Mega X mediante el método de Neighbour-Joining de máxima verosimilitud, con bootstrap de 1000 y modelo evolutivo de Tamura – Nei, 93 (TN93). Este análisis filogenético permitió ratificar la taxonomía analizada con Galaxy en donde las secuencias que no se lograron clasificar en ningún grupo conocido se asignó como “Unidentified”. Las OTUs fúngicas del filo Glomeromycota, clase Glomeromycetes se asignaron en cuatro órdenes, seis familias, siete géneros y 21 especies.

Tabla 8

Secuencias de micorrizas encontradas en las muestras de raíces del árbol manzanilla de la muerte (Hippomane mancinella)

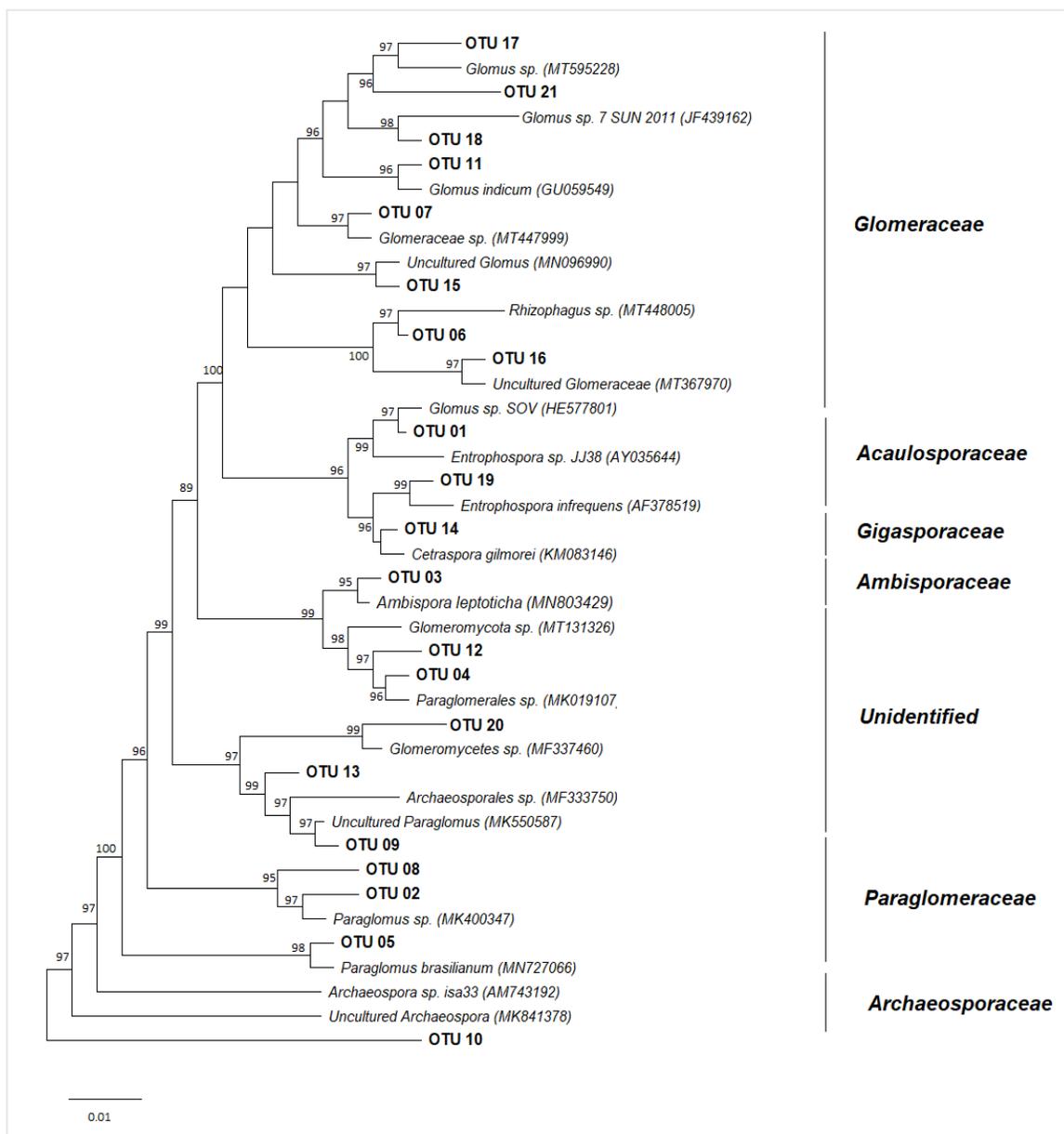
OTU	Coincidencia más cercana en la base de datos NCIB				Homología
	Familia	Especie	No. Acceso	GI ¹	(%)
OTU_01	Acaulosporaceae	<i>Entrophospora sp. JJ38</i>	AY035644	15809596	99
OTU_02	Paraglomeraceae	<i>Paraglomus sp.</i>	MK400347	1558440760	97
OTU_03	Ambisporaceae	<i>Ambispora leptoticha</i>	MN803429	1782152757	95
OTU_04	unidentified	<i>Paraglomerales sp.</i>	MK019107	1486698521	96
OTU_05	Paraglomeraceae	<i>Paraglomus brasilianum</i>	MN727066	1778014736	98
OTU_06	Glomeraceae	<i>Rhizophagus sp.</i>	MT448005	1839422827	97
OTU_07	Glomeraceae	<i>Glomeraceae sp.</i>	MT447999	1839422821	97
OTU_08	Archaeosporaceae	<i>Archaeospora sp. isa33</i>	AM743192	172046499	95
OTU_09	unidentified	Uncultured <i>Paraglomus</i>	MK550587	1578866536	97
OTU_10	Archaeosporaceae	Uncultured <i>Archaeospora</i>	MK841378	1624799963	97
OTU_11	Glomeraceae	<i>Glomus indicum</i>	GU059549	300432608	96
OTU_12	unidentified	<i>Glomeromycota sp.</i>	MT131326	1817956624	98
OTU_13	unidentified	<i>Archaeosporales sp.</i>	MF333750	1206519962	97
OTU_14	Gigasporaceae	<i>Cetraspora gilmorei</i>	KM083146	699026350	96
OTU_15	Glomeraceae	Uncultured <i>Glomus</i>	MN096990	1691659316	97
OTU_16	Glomeraceae	Uncultured <i>Glomeraceae</i>	MT367970	1834242699	97
OTU_17	Glomeraceae	<i>Glomus sp. SOV</i>	HE577801	348031140	97
OTU_18	Glomeraceae	<i>Glomus sp. 7 SUN 2011</i>	JF439162	344165606	98
OTU_19	Acaulosporaceae	<i>Entrophospora infrequens</i>	AF378519	15429437	99
OTU_20	unidentified	<i>Glomeromycetes sp.</i>	MF337460	1206523672	99
OTU_21	Glomeraceae	<i>Glomus sp.</i>	MT595228	1852007947	96

Nota: ¹GI: GenInfo Identifier

Las OTUs con asignación taxonómica fueron distribuidas en seis familias (Figura 6): 8 (38.1%) pertenecen a Glomeraceae, 2 (9.5 %) a Acaulosporaceae, Archaeosporaceae y Paraglomeraceae, 1 (4.8%) Ambisporaceae y Gigasporaceae; y 5 (23.8%) no se pudieron asignar a una familia de HMA.

Figura 6

Árbol filogenético de secuencias de la región 28S de ARNr



Nota: Representación del árbol filogenético de muestras de raíces del árbol manzanilla de la muerte (*Hippomane mancinella*) construido con el software Mega X. El método usado fue el de Neighbour-Joining de máxima verosimilitud, con bootstrap de 1000 y modelo

evolutivo de Tamura – Nei, 93 (TN93). Solo se muestran los valores de probabilidad bootstrap >80% que indica mayor fiabilidad. Los números de acceso de secuencias de GenBank se encuentran entre paréntesis.

Perfiles Taxonómicos y abundancia

En la Figura 7 se muestra un diagrama de las OTUs detectadas en las muestras de raíz de *Hippomane mancinella*, donde existen 3 y 2 OTUs de micorrizas arbusculares exclusivas para las regiones templada fría y subtropical respectivamente, además de 16 OTUs compartidas y de 68 OTUs que no se logró dar una asignación taxonómica. El porcentaje presente en el paréntesis corresponde a las lecturas generadas.

Figura 7

Grafica de OTUs compartidas y específicas de las zonas de estudio

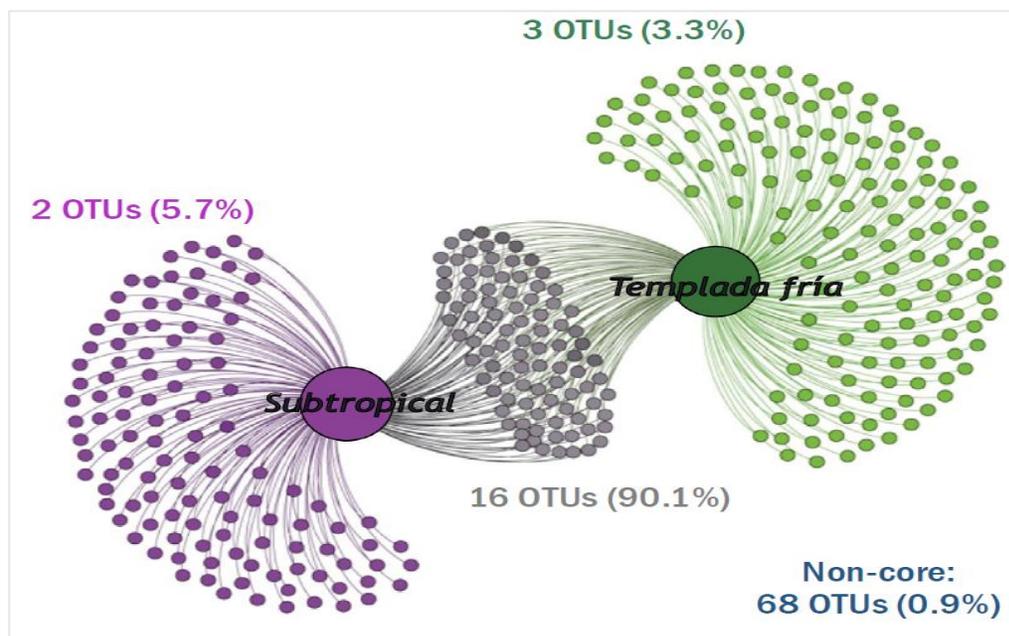
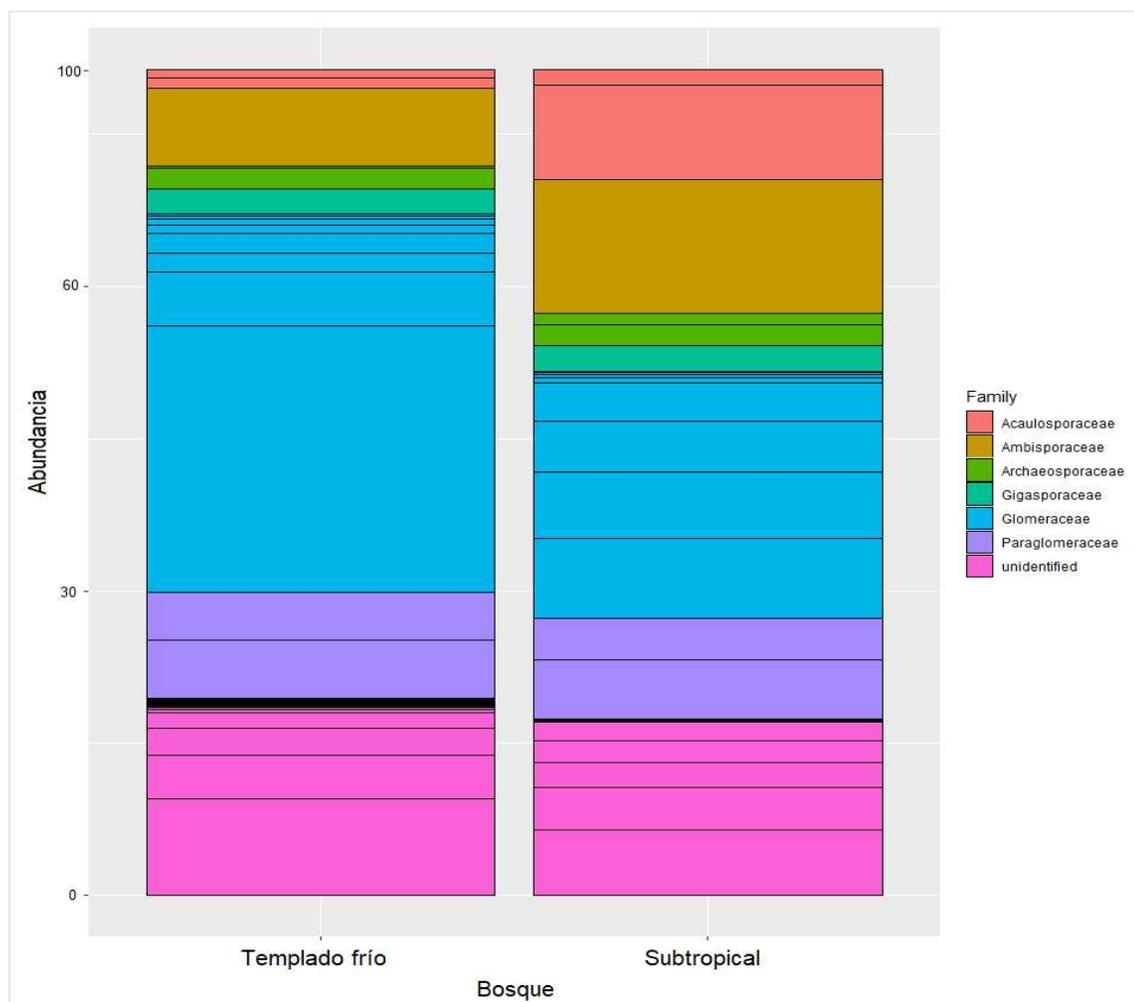


Figura 8

Abundancia relativa de las 6 familias encontradas en cada zona



De las seis familias identificadas de micorrizas, se detectó una fuerte variación en la abundancia relativa de la familia Glomeraceae para el bosque templado frío y Acaulosporaceae para el bosque subtropical, por el contrario, Acaulosporaceae para la región templada tuvo una enérgica disminución. Finalmente, se mostraron una misma prevalencia para las demás familias en ambos ecosistemas.

Teniendo en cuenta los géneros de HMA detectados en este estudio, *Glomus indicum* fue la especie más abundante para la región templada fría con 32.3 %, mientras que para la región subtropical hubo mayor prevalencia de *Ambispora leptoticha* con 16.22% (Figura 8).

Riqueza e índices de diversidad

Con la matriz de abundancia se estimó los parámetros de diversidad alfa de OTUs de micorrizas arbusculares presentes en las muestras de raíces de *Hippomane mancinella* en las dos zonas de estudio. En la Tabla 9 se reporta la riqueza observada como números de OTUs de cada muestra conjuntamente con el estimador de riqueza Chao 1 y los índices de diversidad comunitaria (Simpson y Shannon) los que se calcularon con el conteo de lecturas.

Tabla 9

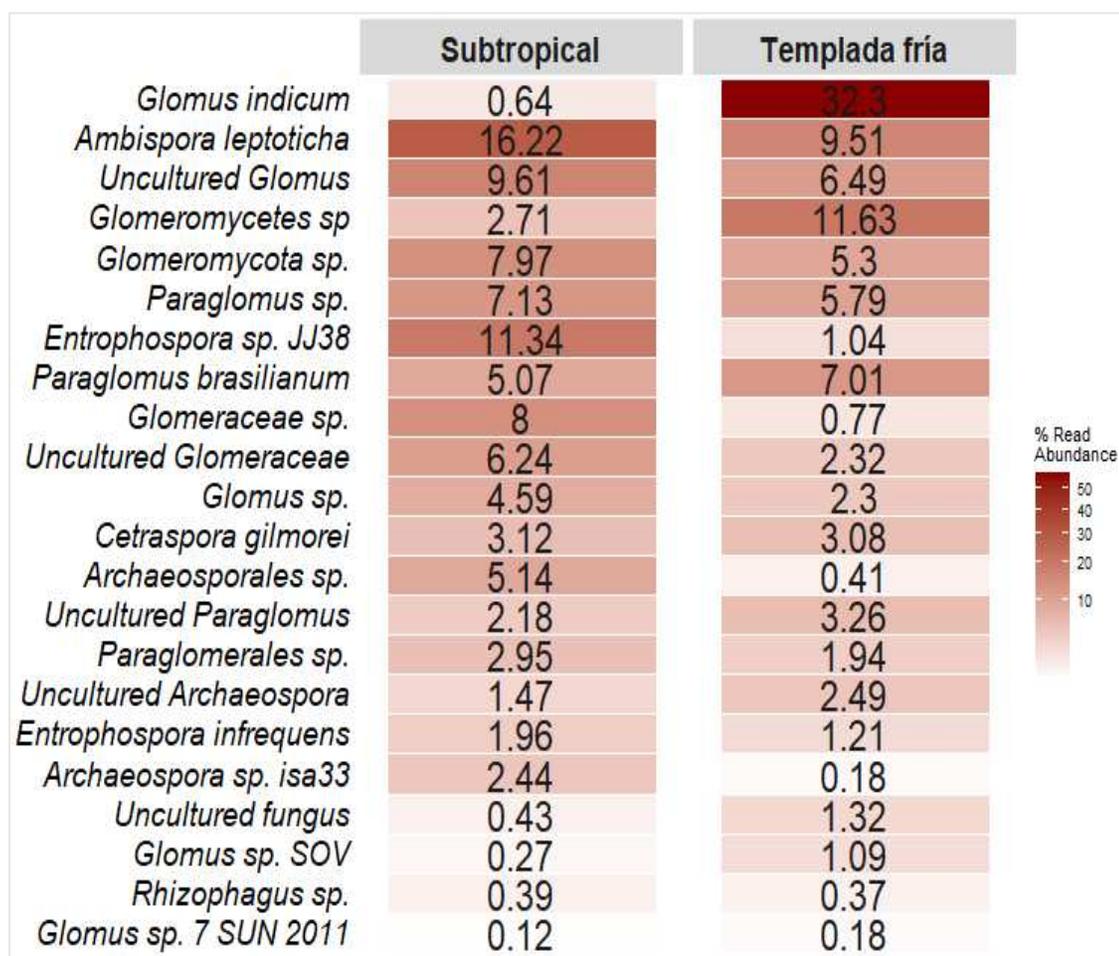
Parámetros de diversidad alfa para las comunidades de micorrizas arbusculares presentes en las zonas de estudio.

Especie	Región	Muestra	Riqueza de OTUs	Índice		
				Chao1	Simpson	Shannon
Árbol manzanilla de la muerte	Templada fría	T1	58	58,00	0,832	2,258
		T2	64	75,35	0,884	2,430
		T3	59	96,50	0,650	1,725
<i>(Hippomane mancinella)</i>	Subtropical	S1	61	61,00	0,900	2,540
		S2	75	86,27	0,874	2,413
		S3	70	61,50	0,749	1,954

Figura 9

Abundancia relativa de micorrizas arbusculares a nivel de especie identificadas en cada zona de estudio

	Subtropical	Templada fría
<i>Glomus indicum</i>	0.64	32.3
<i>Ambispora leptoticha</i>	16.22	9.51
<i>Uncultured Glomus</i>	9.61	6.49
<i>Glomeromyces sp</i>	2.71	11.63
<i>Glomeromycota sp.</i>	7.97	5.3
<i>Paraglomus sp.</i>	7.13	5.79
<i>Entrophospora sp. JJ38</i>	11.34	1.04
<i>Paraglomus brasilianum</i>	5.07	7.01
<i>Glomeraceae sp.</i>	8	0.77
<i>Uncultured Glomeraceae</i>	6.24	2.32
<i>Glomus sp.</i>	4.59	2.3
<i>Cetraspora gilmorei</i>	3.12	3.08
<i>Archaeosporales sp.</i>	5.14	0.41
<i>Uncultured Paraglomus</i>	2.18	3.26
<i>Paraglomerales sp.</i>	2.95	1.94
<i>Uncultured Archaeospora</i>	1.47	2.49
<i>Entrophospora infrequens</i>	1.96	1.21
<i>Archaeospora sp. isa33</i>	2.44	0.18
<i>Uncultured fungus</i>	0.43	1.32
<i>Glomus sp. SOV</i>	0.27	1.09
<i>Rhizophagus sp.</i>	0.39	0.37
<i>Glomus sp. 7 SUN 2011</i>	0.12	0.18



Comparación de los indicadores de diversidad en las dos zonas de estudio

En la tabla 10 se detalla los estadísticos descriptivos tanto para riqueza e índices de diversidad alfa calculados de la matriz de OTUs de micorrizas arbusculares obtenida de Galaxy.

Tabla 10

Estadísticos descriptivos para los parámetros de diversidad alfa de micorrizas arbusculares en raíces del árbol manzanilla de la muerte (Hippomane mancinella)

Región	n	Riqueza de OTUs		Índice					
				Chao1		Simpson		Shannon	
		Media	Sd	Media	Sd	Media	Sd	Media	Sd
Templada fría	3	60,33	3,215	76,62	19,28	0,789	0,123	2,138	0,368
Subtropical	3	68,67	7,095	69,59	14,45	0,841	0,081	2,302	0,308

Tabla 11

Resultados de la prueba t-student para indicadores de diversidad en raíces del del árbol manzanilla de la muerte (Hippomane mancinella)

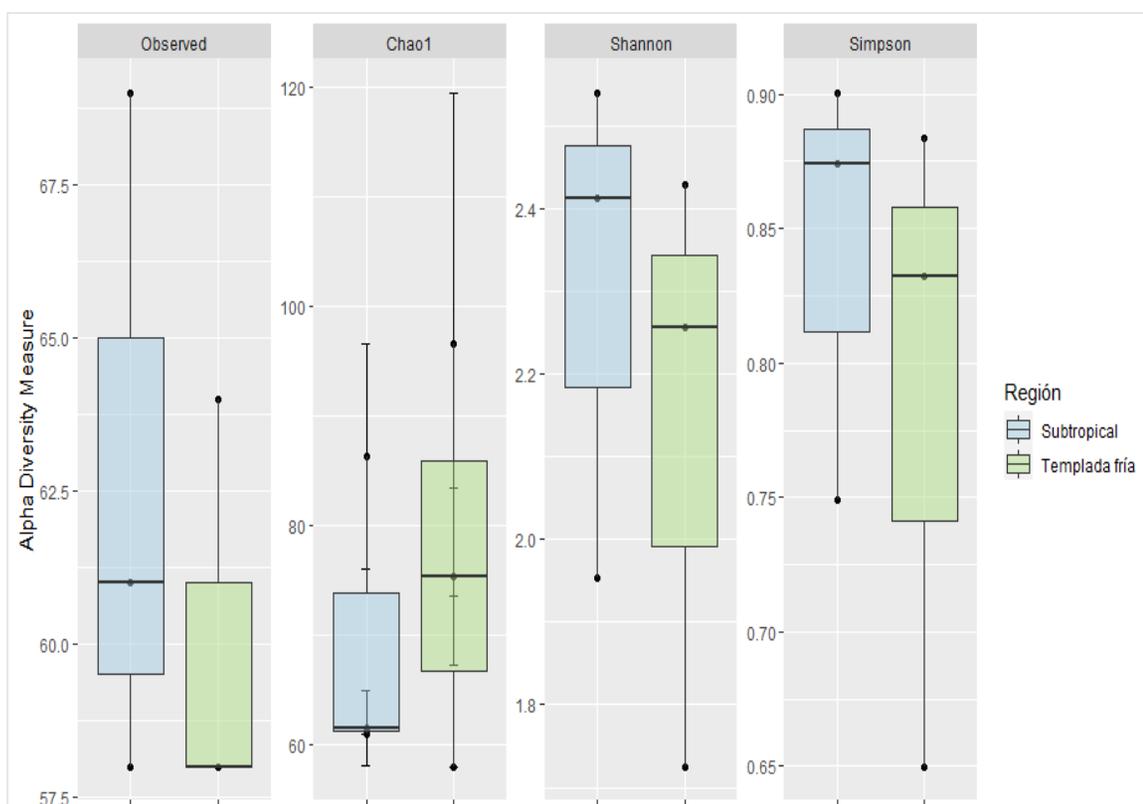
Medida de diversidad	T	Grados de libertad	Valor p	Intervalo de confianza	
				Inferior	Superior
Riqueza	0,505	4	0,640	-31,60	45,70
Índice de Chao1	0,019	4	0,989	-28,80	29,20
Índice de Simpson	-0,617	4	0,571	-0,288	0,184
Índice de Shannon	-0,595	4	0,584	-0,933	0,061

Los resultados de la prueba t-student de los datos analizados de micorrizas arbusculares en las muestras de raíces del del árbol de la muerte (*Hippomane mancinella*), no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 10), los índices de diversidad en las dos regiones de estudio fueron muy parejos, sin embargo,

se observa que en el bosque subtropical hay un incremento en la riqueza observada de OTUs, lo que es totalmente diferente en la riqueza estimada por el valor de Chao 1.

Figura 10

Gráfico de medias para los parámetros de diversidad alfa



Nota: Diagrama de cajas de los parámetros de diversidad y riqueza de micorrizas arbusculares en raíces del del árbol de la muerte (*Hippomane mancinella*). La línea horizontal dentro del cuadro define la mediana, mientras que los bigotes representan los valores más bajos y altos dentro del rango intercuartílico de 1.5 (IQR). Los valores atípicos se muestran como puntos.

Discusión

Estandarización del homogeneizador BEAD RUPTOR ELITE

En este estudio se establecieron tratamientos donde se varió tiempo y velocidad del homogeneizador BEAD RUPTOR ELITE para el proceso de lisis celular de raíces en plantas de distinta consistencia en combinación con el kit comercial DNeasy® PowerSoil® Pro para obtener mayor rendimiento e integridad de ADN.

Concentración

Usar homogeneizadores brinda una excelente eficiencia en la ruptura de tejidos blandos o duros, al ser práctico en comparación con los métodos tradicionales que siguen siendo tediosos y laboriosos. Según Verollet (2008), los protocolos para el uso de homogeneizadores deben ajustarse para cada tipo de tejido de modo que no se presente ninguna degradación o desnaturalización de las moléculas diana por el movimiento tridimensional y multidireccional que usan estos homogeneizadores para lisar eficazmente los tejidos, por esta razón en este estudio se ejecutaron distintos tratamientos variando velocidad y tiempo del homogeneizador BEAD RUPTOR ELITE para evaluar los mejores resultados en el proceso de lisis, es así como se obtuvo que los tratamientos T1 y T10 (Velocidad= 5.5 [m/s] y Tiempo = 60 [s]) son óptimos para las plantas Herbáceas y Leñosas; sin embargo en las raíces de plantas Leñosas se aplicó el tratamiento en dos ciclos para impedir la degradación de ADN por el incremento de temperatura debido a la fricción, en cambio el tratamiento T21 (Velocidad= 5.5 [m/s] y

Tiempo = 30 [s]) se adaptó mejor para la ruptura celular de raíces de plantas Semileñosas.

Según Lucas et al. (2019), aislar ADN de tejidos vegetales puede ser difícil, esto se debe a que las plantas poseen rigidez en sus tejidos, debido a la presencia de lignina; pero de forma general, en este estudio se logró extraer la cantidad suficiente de ADN para ser usado en cualquier prueba molecular (Tabla 5). Sin embargo, varió el rendimiento de ADN en cada tipo de planta. En el caso particular de raíces de plantas Leñosas se obtuvo menor cantidad de ADN en comparación con el ADN extraído de plantas Herbáceas y Semileñosas que si mostraron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 2).

Si bien es cierto el sistema de raíces en todas las plantas tiene las mismas funciones principales, es decir, absorción de agua y nutrientes, anclaje, almacenamiento y asociación con organismos simbióticos, no obstante, las raíces de las plantas Leñosas difieren de las plantas Semileñosas y Herbáceas en gran parte al marco de raíces rígidas que se debe a un contexto de variación estacional, longevidad y mortalidad (Danjon et al., 2013), esto causó problemas en la ruptura de los tejidos impidiendo la liberación de ADN, además de generar una fuerte fricción del tejido con el material abrasivo que son perlas de cerámica de óxido de circonio que está contenido en los tubos del kit DNeasy® PowerSoil® Pro, lo que causó la degradación del ADN provocado por la generación de calor durante el proceso de molienda (Dubacq, 2016).

Pureza

Los metabolitos secundarios presentes en plantas son el principal problema en la extracción y purificación de ADN (Spence et al., 2016). Se encontró que la mayoría de los tratamientos de plantas Leñosas no presentaron resultados favorables en cuanto a la relación de $A_{260/230}$, ya que fue < 1.5 (Tabla 5), por la probable presencia de contaminantes, tales como sales, carbohidratos y fenoles (Chabi Sika et al., 2015). Es importante destacar que la relación $A_{260/280}$ fue < 1.6 (Tabla 5) para T13 y T16 que puede deberse a la presencia de compuestos aromáticos. En su estudio Ramírez et al. (2017), menciona que en plantas Leñosas la principal fuente de contaminación es por polifenoles y polisacáridos, que interfieren con la calidad y rendimiento del ADN, dificultando la aplicación de pruebas moleculares posteriores, debido a que inhiben la acción de la enzima Taq polimerasa, además que estos problemas se incrementan con la edad de la planta y las condiciones desfavorables de crecimiento, induciendo la producción de metabolitos secundarios necesarios para su mantenimiento.

Extracción de ADN de la especie de estudio

Como lo menciona Garrett (2015) el proceso de disrupción celular de una muestra es el primer paso donde se debe tener en cuenta el tipo de tejido y la cantidad de muestra con la que se cuenta, para seleccionar un método de lisis celular. Una vez ya elegido el tipo de homogeneización que se usará se debe evaluar el rendimiento e integridad del analito que se obtendrá después del proceso. En este estudio, para el análisis de comunidades micorrízicas se utilizaron muestras de raíces del árbol

manzanilla de la muerte (*Hippomane mancinella*), que es una planta leñosa que oscila de 6 – 26 metros de alto (Wurdack & Farfan-Rios, 2017). La cantidad de muestra usada para el proceso de extracción y purificación de ADN varió entre 14- 25 [mg], por ende, el uso del homogeneizador BEAD RUPTOR ELITE, que proporciona mayores rendimientos para muestras pequeñas con un ADN intacto (Verollet, 2008), a diferencia de la homogenización criogénica que en el caso particular de muestras pequeñas pueden ser difícilmente recuperadas (Goldberg, 2008).

De acuerdo a los resultados de concentración y pureza obtenidos en el proceso de estandarización del homogeneizador BEAD RUPTOR ELITE el tratamiento T10 (Velocidad= 5.5 [m/s] y Tiempo = 60 [s]) se usó para el proceso de lisis celular de raíces del árbol de la muerte, obteniendo una cantidad de ADN aceptable para el proceso de secuenciación (Tabla 7), sin embargo, si existió variación entre las muestras en cuanto al rendimiento de ADN, esto pudo deberse a que algunos tejidos estuvieron congelados cuando fueron sometidos al proceso de molienda, causando que el ADN se fragmentara por acción de DNAsas, ya que las células del interior del tejido se descongelan antes de entrar en contacto con la solución de lisis (Alejos et al., 2015). Por otro lado, la pureza en el rango de absorbancia $A_{260/230}$ fue < 1.5 , esto se debe a la cantidad de metabolitos secundarios que este ejemplar posee, ya que como lo señala Tagle (2015), los principales compuestos secundarios que produce son fenoles, cumarinas, taninos, ligninas, entre otros que aún no ha sido identificados, brindándole protección contra

organismos e inclemencias del ambiente. Por otro lado, los resultados para el ratio de $A_{260/280}$, son aceptables encontrándose entre 1.59 – 2.03.

Análisis de secuencias

Validación técnica

EMBL-European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) tiene acceso libre a bases de datos de distintos estudios y los resultados de búsqueda abre la opción para la descarga de secuencias, debido a esta facilidad se logró descargar secuencias del estudio enfocado en las “Propiedades a escala comunitaria de micorrizas arbusculares, ectomicorrizas y asociaciones endofíticas en bosques templados y subtropicales.” cuyos resultados se publicaron en la revista *BMC Plant Biol* con el título “Structural diversity across arbuscular mycorrhizal, ectomycorrhizal, and endophytic plant–fungus networks” (Toju et al., 2018). El conjunto de datos se verificó tomando en cuenta que la secuenciación sea de amplicones, la preparación de librerías se haya realizado en la plataforma Illumina Miseq, a esto se suma la calidad de secuencia y que los cebadores utilizados sean para detectar exclusivamente hongos micorrízicos de la región LSU.

Al ser un estudio cuya última actualización fue en febrero del presente año y cuenta con más de 33 secuencias, se filtraron todas aquellas que no cumplieran con las especificaciones que se mencionaron anteriormente.

Asignación taxonómica de OTUs

El análisis de diversidad de hongos micorrízicos arbusculares en ecosistemas naturales por lo general se ha descrito usando enfoques morfológicos de esporas para la identificación de especies, aunque no siempre funciona de forma correcta debido a los caracteres morfológicos que pueden ser problemáticos impidiendo proporcionar agrupaciones específicas dentro de un marco evolutivo (Mosbah et al., 2018). Tedersoo et al. (2010) explica la importancia de explorar la diversidad genética de comunidades micorrízicas por métodos moleculares para evitar problemas de identificación y caracterización; además de conocer conjuntamente las diferencias ecológicas y funcionales entre HMA de distintos ecosistemas. En este estudio se evaluó la diversidad de HMA presentes en las raíces del árbol manzanilla de la muerte (*Hippomane mancinella*) en dos bosques a lo largo del archipiélago japonés, mediante el análisis de los genes de ADN ribosómico de la región LSU.

Raja et al. (2017) considera que si la identificación necesita hacerse a niveles taxonómicos intermedios (familia, géneros), entonces el investigador puede amplificar y secuenciar la región 28S o LSU, debido a que esta región contiene los dominios hipervariables D1 y D2 que permite mostrar variabilidad genética entre individuos estrechamente relacionados, y que la región ITS a pesar de que funciona bien como un marcador de código de barras fúngico, según Lindner et al. (2013) los problemas con esta región van desde la falta de variación interespecífica en algunos grupos de hongos, especialmente algunos Ascomycota, Basidiomycota y Glomeromycota hasta una gran

variación entre los individuos dentro de las poblaciones (Lee et al., 2018), por tal razón se utilizó la región LSU alcanzando la identificación a nivel de especie de 21 OTUs.

En el análisis metagenómico realizado en Galaxy se obtuvo un total de 89 unidades taxonómicas operacionales (OTU) en base a una similitud de secuencia del 97% y de estas 21 OTUs pertenecen a hongos micorrízicos arbusculares, las 68 OTUs restantes contienen secuencias desconocidas u hongos no identificados, esto según Mosbah et al. (2018) puede explicarse por el hecho de que las secuencias de ADNr de algunas especies de HMA no están disponibles debido a que la mayoría de HMA hasta ahora no se han secuenciado, también puede que los nombres taxonómicos no están actualizados o tienen un nombre parcial en la base de datos GenBank limitando su asignación taxonómica o incluso como lo ha sugerido Mahmoudi et al. (2019) la diversidad de HMA está lejos de estar adecuadamente descrita, y es posible que algunos ecosistemas inexplorados alberguen muchas especies de hongos micorrízicos desconocidas. Por tal razón, U'Ren et al. (2016) concluye en su estudio que una asignación de taxonomía para aislamientos desconocidos y que se base únicamente en resultados de BLASTN podría conducir a una identificación errónea, sin embargo, hay varias bases de datos que nos permiten contrastar nuestros análisis, por este motivo se utilizó a la par la base de datos de MaarjAM.

Si bien la taxonomía basada en ADN que usa la teoría filogenética no siempre puede ayudar a identificar las especies exactas de un hongo, Raja et al. (2017) menciona que si ayuda a colocar una especie desconocida dentro de un clado o grupo filogenético,

por ésta razón tras la comparación con la base de datos de NCBI, mediante un BLASTN, se construyó un árbol filogenético para poder corroborar la taxonomía de las secuencias identificadas, utilizado el método de Neighbour-Joining de máxima verosimilitud (Chi Chim, 2013), con bootstrap de 1000 y modelo evolutivo de Tamura – Nei, 93 (TN93), constatando la asignación de OTUs a nivel de género con porcentajes de identidad entre 95-97%.

Perfiles taxonómicos y abundancia

El análisis en Galaxy y la búsqueda en BLASTN, permitió identificar 21 OTUs fúngicas del filo Glomeromycota, clase Glomeromycetes que se asignaron en cuatro órdenes, seis familias, siete géneros y 21 especies; cabe destacar que la cantidad de OTUs en ambos ecosistemas tuvo un patrón muy similar (Figura 7).

Birhane et al. (2017), menciona que la lignificación que poseen algunas plantas leñosas pueden impedir el crecimiento de hongos a través de tejidos vegetales debido a que son resistentes a la penetración mecánica, sin embargo de todas las familias detectadas se encontró que Glomeraceae se encuentra en ambos ecosistemas, esto según Mahmoudi et al. (2019), se puede explicar por la capacidad que tiene esta familia de hongos micorrízicos en producir grandes cantidades de esporas y fragmentos de hifas; también es conocida como la más tolerante al estrés y resistente, lo que permite adaptarse mejor a cualquier condición ambiental (M. Öpik et al., 2009). A diferencia de la región templada fría las familias más abundantes en la región subtropical fue

Acaulosporaceae y Ambisporaceae. Melo et al. (2019), ha identificado varios factores que pueden influir en la distribución de HMA, como los factores abióticos (Propiedades fisicoquímicas del suelo), bióticos (Tipo de planta Huésped), y las propiedades intrínsecas de las especies (Capacidad de dispersión), en este estudio no se evaluaron las condiciones fisicoquímicas del suelo, pero se sugiere que el tipo de suelo y sus condiciones fisicoquímicas puede ser importante para la generación de esporas de ciertas familias de hongos y así la colonización de raíces.

No hay registros ni estudios que expliquen la existencia de cierta especificidad de HMA a la planta de estudio (*Hippomane mancinella*), no obstante, la existencia de estas asociaciones preferenciales de hongos micorrízicos con plantas de similares características es un hecho de interés ecológico. En este estudio se encontró en el análisis de diversidad relativa a nivel de especie que *Glomus indicum* y *Ambispora leptoticha* fueron los más abundantes para el bosque templado y subtropical respectivamente. Likar et al.(2013) sugirió que la especie de *Glomus indicum* que está dentro del género *Glomus* que exhibe una mayor tasa de esporulación, lo que le permite adaptarse mejor a condiciones severas del suelo o del ambiente, mientras que *Ambispora leptoticha* puede aumentar la longitud de la raíz y de esta forma mejorar la absorción de nutrientes, estos roles son de gran importancia en condiciones de suelo semiáridas (Bills & Morton, 2015). Lo que es interesante ya que ambas especies de hongos micorrízicos se hayan agrupado en sitios donde hay una mayor concentración de fósforo y nitrógeno, factores que ya se conoce que son actores claves en la

determinación de diversidad de HMA (Mahmoudi et al., 2019), y son condiciones que estos dos ecosistemas poseen según bibliografía.

Comparación de los indicadores de diversidad en las dos zonas de estudio

Se realizó la prueba t-student de los parámetros de diversidad alfa de las muestras para la comparación de la comunidad de HMA en los dos ecosistemas, los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los índices de diversidad comunitaria (Shannon y Simpson), riqueza observada de OTUs (S_{obs}) y la riqueza estimada de Chao1 entre los dos sitios (Tabla 11). No obstante, se observó un ligero incremento en la riqueza (S_{obs}) de micorrizas arbusculares de la región subtropical, sin embargo, el índice de Shannon (H') (Shannon, 1948), para ambas zonas tienen una biodiversidad de media a baja ($H' < 2.5$) (Mahecha-Vásquez et al., 2017), esto se corroboró con el índice de Simpson (D) (SIMPSON, 1949), que de igual forma mostró que en los dos ecosistemas al tener valores cercanos a 1 son menos diversos (Moreno, 2013). Esto es posible, debido a que la riqueza es solo una parte de la diversidad, mientras que los índices de Shannon y Simpson toman en cuenta la abundancia relativa y las unidades taxonómicas (Hernández, 2019), y en nuestro estudio puede que la abundancia no sea grande pero que haya una mayor cantidad de OTUs.

Por otro lado, se analizó la riqueza estimada con Chao 1 (Chao & Lee, 1992), que es un método no paramétrico (Hughes et al., 2001). Esta estimación para ambos ecosistemas no fue estadísticamente significativa, aunque en comparación con la

riqueza observada (S_{obs}), los resultados fueron inversos para los dos ecosistemas. Esto se puede deberse a lo que menciona Villarreal et al. (2004) al señalar que una forma sencilla de medir la diversidad de un ecosistema es a través de la riqueza observada, pero el problema de esto es que el número de especies está influenciado por el tamaño de la muestra, es decir que, si se aumenta el tamaño de muestreo, se obtiene un número de especies mayor, a esto se suma la posible causa, de que las secuencias analizadas pueden haber estado relativamente cercanas y que los tamaños de las muestras fueron insuficientes (Nawaz et al., 2019). Pero con Chao 1, se estimó la riqueza basada en la abundancia, es decir que cuanto mayor sea el índice de Chao 1, mayor es la riqueza esperada de especies.

Conclusiones

Se logró estandarizar el uso del homogeneizador BEAD RUPTOR ELITE para el proceso de molienda de tejidos vegetales blandos y fibrosos de plantas de distinta consistencia, proporcionando un aislamiento fácil y reproducible que disminuye significativamente el tiempo de preparación de muestras, con una mayor eficiencia en muestras particularmente difíciles o con poca cantidad.

Se determinó que el mejor método de lisis celular usando el homogeneizador BEAD RUPTOR ELITE específicamente para raíces de plantas herbáceas y leñosas es con una velocidad 5.5 [m/s] y tiempo 60 [s], mientras que para raíces de plantas semileñosas se requiere una velocidad 5.5 [m/s] y tiempo 30 [s]. Tras la evaluación por espectrofotometría se comprobó que el ADN genómico obtenido de la extracción de raíces es suficiente para posteriores análisis moleculares, además que la integridad del ADN en los ratios $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ se mantuvo dentro del rango aceptable.

Por medio de EMBL-European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) se obtuvo datos de secuenciación masiva paralela de amplicones de la región LSU (micorrizas) de raíces de dos ecosistemas diferentes.

El sistema interactivo de análisis a gran escala "Galaxy" que recopila un conjunto de herramientas de diferentes softwares, permitió analizar las secuencias de amplicones de muestras de raíces de dos ecosistemas distintos.

Se identificaron a nivel de especie las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) para micorrizas arbusculares mediante la construcción de un árbol filogenético realizado en el software Mega X y en contraste con la base de datos EBI y NCBI usando Blastn para proporcionar una identificación a nivel de especie más concluyente.

En el análisis de comunidades micorrizicas se encontró 16 OTUs compartidas entre los dos ecosistemas, además 2 y 3 OTUs exclusivas para la zona templada fría y subtropical respectivamente. Los indicadores de biodiversidad no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Recomendaciones

Para retener mayor cantidad de ADN en la columna MB Spin del kit comercial DNeasy® PowerSoil® Pro, se debe centrifugar la primera vez a una velocidad de 2000 x g por 3 minutos.

Las muestras vegetales previas al proceso de homogenización no deben estar congeladas de esta forma se evitará la fragmentación del ADN por acción de DNAsas ocasionando la variación en cuanto al rendimiento y pureza de ADN.

En el caso particular de muestras de tejidos vegetales duros el homogeneizador BEAD RUPTOR ELITE debe ser programado a una velocidad de 5.5 [m/s], tiempo de 60 [s], en 2 o 3 ciclos con un periodo de descanso de 2 minutos para evitar la degradación del ADN provocado por la generación de calor durante el proceso de molienda.

Siempre que sea posible, la identificación de hongos se debe realizar a nivel de género y/o familia, debido a que, si un hongo genera el suficiente interés para estudios posteriores, entonces es posible hacer un seguimiento.

Para realizar la alineación en la plataforma de Galaxy es necesario contar con una secuencia plantilla en formato FASTA, que dependiendo del organismo se puede obtener en la base de datos de MaarjAM (Hongos) o Silva (Bacterias).

Se recomienda que para la identificación de hongos no solo se emplee la búsqueda en GenBank, sino en otras bases de datos para un análisis más concluyente.

Es importante comprender que el grupo de hongos micorrízicos es muy diverso, además, que muy pocos han sido secuenciados y puestos en disposición en distintas bases de datos, entonces es posible que en un estudio se esté trabajando con un hongo no descrito o desconocido, por ende, es importante que el investigador complemente su estudio molecular con una identificación morfológica.

Bibliografía

Alejos, L., Aragón, M. D. C., & Cornejo, A. (2015). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*. www.eoearth.org/view/article/158858.

Álvarez, M., Córdoba, S., Escobar, F., Fagua, G., Gast, F., Mendoza, H., & Ospina, M. (2004). *Manual de Métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad*. Programa Inventarios de Biodiversidad Grupo de Exploración y Monitoreo Ambiental (GEMA). www.humboldt.org.co

Amaranthus, M. P. (1998). The Importance and Conservation of Ectomycorrhizal Fungal Diversity in Forest Ecosystems: Lessons From Europe and the Pacific Northwest. *United States Department of Agriculture*, 8–15.
<https://doi.org/https://doi.org/10.2737/PNW-GTR-431>

Andersen, K. S., Kirkegaard, R. H., Karst, S. M., & Albertsen, M. (2018). ampvis2: an R package to analyse and visualise 16S rRNA amplicon data. *BioRxiv (Preprint)*, 29–36.
<https://doi.org/10.1101/299537>

Asmelash, F., Bekele, T., & Birhane, E. (2016). The potential role of arbuscular mycorrhizal fungi in the restoration of degraded lands. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUL), 3–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01095>

Bagyaraj, D. J. (2014). Mycorrhizal fungi. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 80(2), 415–428. <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2014/v80i2/55118>

- Begum, N., Qin, C., Ahanger, M. A., Raza, S., Khan, M. I., Ashraf, M., Ahmed, N., & Zhang, L. (2019). Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Growth Regulation: Implications in Abiotic Stress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1068–1078. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01068>
- Benítez, E. (2019). *Caracterización de la comunidad fúngica de la rizosfera de plantas de mora de castilla (Rubus glaucus Benth), tratadas y no tratadas con Trichoderma spp. como tratamiento para la enfermedad de pie negro.* <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/20456>
- Bills, R. J., & Morton, J. B. (2015). A combination of morphology and 28S rRNA gene sequences provide grouping and ranking criteria to merge eight into three *Ambispora* species (Ambisporaceae, Glomeromycota). *Mycorrhiza*, *25*(6), 485–498. <https://doi.org/10.1007/s00572-015-0626-7>
- Birhane, E., Aregawi, K., & Giday, K. (2017). Changes in arbuscular mycorrhiza fungi spore density and root colonization of woody plants in response to enclosure age and slope position in the highlands of Tigray, Northern Ethiopia. *Journal of Arid Environments*, *142*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2017.03.002>
- Casazza, G., Lumini, E., Ercole, E., Dovana, F., Guerrina, M., Arnulfo, A., Minuto, L., Fusconi, A., & Mucciarelli, M. (2017). The abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi are linked to the soil chemistry of screes and to slope in the Alpic paleo-endemic *Berardia subacaulis*. *PLOS ONE*, *12*(2), 25–36.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171866>

Castro, I. S. (2009). *Análisis de la estructura y diversidad de las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociados a plantas de especial interés ecológico en ambientes mediterráneos* [Universidad de Granada].

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=65735>

Chabi Sika, K., Kefela, T., Adoukonou-Sagbadja, H., Ahoton, L., Saidou, A., Baba-Moussa, L., Jno Baptiste, L., Kotconi, S. O., & Gachomo, E. W. (2015). A simple and efficient genomic DNA extraction protocol for large scale genetic analyses of plant biological systems. *Plant Gene*, 1, 43–45. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2015.03.001>

Chao, A., & Lee, S.-M. (1992). Estimating the Number of Classes via Sample Coverage. *Journal of the American Statistical Association*, 87(417), 210–217.

<https://doi.org/10.1080/01621459.1992.10475194>

Chen, M., Arato, M., Borghi, L., Nouri, E., & Reinhardt, D. (2018). Beneficial Services of Arbuscular Mycorrhizal Fungi – From Ecology to Application. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1270–1291. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01270>

Chi Chim, W. A. (2013). *Análisis filogenético de *Macrophomina phaseolina* Tassi Goid* [Instituto Politécnico Nacional].

<http://tesis.ipn.mx:8080/xmlui/handle/123456789/12290>

Crossay, T., Antheaume, C., Redecker, D., Bon, L., Chedri, N., Richert, C., Guentas, L., Cavaloc, Y., & Amir, H. (2017). New method for the identification of arbuscular

mycorrhizal fungi by proteomic-based biotyping of spores using MALDI-TOF-MS.

Scientific Reports, 7(1), 14306–14381. [https://doi.org/10.1038/s41598-017-14487-](https://doi.org/10.1038/s41598-017-14487-6)

6

Danjon, F., Stokes, A., & Bakker, M. (2013). Root Systems of Woody Plants. In *Plant*

Roots (Source of, Vol. 2, pp. 26–39). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b14550-34>

Dhaliwal, A. (2013). DNA Extraction and Purification. *Rutgers University*, 3, 191–201.

<https://doi.org/10.13070/mm.en.3.191>

Dubacq, S. (2016). Performing efficient sample preparation with hard tumor tissue:

Precellys® bead-beating homogenizer solution. *Nature Methods*, 13(4), 10–25.

<https://doi.org/10.1038/nmeth.f.394>

Garrett, S. (2015). Genomic DNA Extraction from Plant Tissues on the Bead Ruptor 24. In

Omni International, Inc. <https://www.omni->

[inc.com/downloads/dl/file/id/52/product/438/genomic_dna_extraction_from_pla](https://www.omni-inc.com/downloads/dl/file/id/52/product/438/genomic_dna_extraction_from_plant_tissues_on_the_bead_ruptor_24.pdf)

[nt_tissues_on_the_bead_ruptor_24.pdf](https://www.omni-inc.com/downloads/dl/file/id/52/product/438/genomic_dna_extraction_from_plant_tissues_on_the_bead_ruptor_24.pdf)

Gianinazzi, S., Gollotte, A., Binet, M. N., van Tuinen, D., Redecker, D., & Wipf, D. (2010).

Agroecology: The key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services.

Mycorrhiza, 20(8), 519–530. <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0333-3>

Goldberg, S. (2008). Mechanical/physical methods of cell disruption and tissue

homogenization. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 424, 3–22.

https://doi.org/10.1007/978-1-60327-064-9_1

Guo, L. D. (2018). Presidential address: recent advance of mycorrhizal research in China.

Mycology, 9(1), 1–6. <https://doi.org/10.1080/21501203.2018.1437838>

Henry, R. J. (2009). Plant genotyping: the DNA fingerprinting of plants. In *Plant*

genotyping: the DNA fingerprinting of plants (Cooperativ, pp. 239–249). CABI.

<https://doi.org/10.1079/9780851995151.0239>

Hernández, J. L. (2019). *Comparación de las comunidades de oomicetos y micorrizas*

arbusculares de la rizósfera de lotes de cacao (Theobroma cacao L.) cultivado con

manejo orgánico o convencional mediante secuenciación masiva paralela en la

ciudad de Quevedo en la provincia de Los Rios [Universidad de las Fuerzas Armadas

ESPE.]. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/21226>

Hughes, J. B., Hellmann, J. J., Ricketts, T. H., & Bohannan, B. J. M. (2001). Counting the

Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Applied and*

Environmental Microbiology, 67(10), 4399–4406.

<https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4399-4406.2001>

Janowski, D., Wilgan, R., Leski, T., Karliński, L., & Rudawska, M. (2019). Effective

Molecular Identification of Ectomycorrhizal Fungi: Revisiting DNA Isolation

Methods. *Forests*, 10(3), 218–231. <https://doi.org/10.3390/f10030218>

Lanfranco, L., Bianciotto, V., Lumini, E., Souza, M., Morton, J. B., & Bonfante, P. (2001). A

combined morphological and molecular approach to characterize isolates of

arbuscular mycorrhizal fungi in Gigaspora (Glomales). *New Phytologist*, 152(1),

169–179. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646x.2001.00233.x>

Lee, E.-H., Park, S.-H., Eo, J.-K., Ka, K.-H., & Eom, A.-H. (2018). *Acaulosproa koreana*, a New Species of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Glomeromycota) Associated with Roots of Woody Plants in Korea. *Mycobiology*, *46*(4), 341–348.

<https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1548805>

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.

<https://doi.org/10.1007/s00572-012-0463-x>

Lindner, D. L., Carlsen, T., Henrik Nilsson, R., Davey, M., Schumacher, T., & Kausserud, H. (2013). Employing 454 amplicon pyrosequencing to reveal intragenomic divergence in the internal transcribed spacer rDNA region in fungi. *Ecology and Evolution*, *3*(6), 1751–1764. <https://doi.org/10.1002/ece3.586>

Lucas, M. S., Carvalho, C. da S., Hypolito, G. B., & Côrtes, M. C. (2019). Optimized protocol to isolate high quality genomic DNA from different tissues of a palm species. *Hoehnea*, *46*(2), 45–62. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-94/2018>

Mahecha-Vásquez, G., Sierra, S., & Posada, R. (2017). Diversity indices using arbuscular mycorrhizal fungi to evaluate the soil state in banana crops in Colombia. *Applied Soil Ecology*, *109*, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.09.017>

Mahmoudi, N., Cruz, C., Mahdhi, M., Mars, M., & Caeiro, M. F. (2019). Arbuscular

mycorrhizal fungi in soil, roots and rhizosphere of *Medicago truncatula*: Diversity and heterogeneity under semi-arid conditions. *PeerJ*, 2019(3), 12–17.

<https://doi.org/10.7717/peerj.6401>

McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4), 217–345. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

Melo, C. D., Walker, C., Krüger, C., Borges, P. A. V., Luna, S., Mendonça, D., Fonseca, H. M. A. C., & Machado, A. C. (2019). Environmental factors driving arbuscular mycorrhizal fungal communities associated with endemic woody plant *Picconia azorica* on native forest of Azores. *Annals of Microbiology*, 69(13), 1309–1327. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01535-x>

Moreno, C. (2013). Métodos para medir la biodiversidad. *Journal of Petrology*, 1(1), 84–101. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Mosbah, M., Philippe, D. L., & Mohamed, M. (2018). Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungal spores associated to the rhizosphere of *Retama raetam* in Tunisia. *Soil Science and Plant Nutrition*, 64(3), 335–341. <https://doi.org/10.1080/00380768.2018.1431012>

Muscat, M. (2018). Manchineel apple of death. *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 1(8), 346–348. <http://www.ifcc.org/media/478161/ejifcc2019vol30no3pp346-348.pdf>

- Nawaz, A., Purahong, W., Herrmann, M., Küsel, K., Buscot, F., & Wubet, T. (2019). DNA- and RNA- Derived Fungal Communities in Subsurface Aquifers Only Partly Overlap but React Similarly to Environmental Factors. *Microorganisms*, 7(9), 341–354. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090341>
- Nunes, C. F., Ferreira, J. L., Fernandes, M. C. N., Breves, S. de S., Generoso, A. L., Soares, B. D. F., Dias, M. S. C., Pasqual, M., Borem, A., & Cançado, G. M. de A. (2011). An improved method for genomic DNA extraction from strawberry leaves. *Ciência Rural*, 41(8), 1383–1389. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011000800014>
- Öpik, M., Metsis, M., Daniell, T. J., Zobel, M., & Moora, M. (2009). Large-scale parallel 454 sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest. *New Phytologist*, 184(2), 424–437. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02920.x>
- Öpik, Maarja, Moora, M., Liira, J., & Zobel, M. (2006). Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology*, 94(4), 778–790. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2006.01136.x>
- Posta, K., & Hong Duc, N. (2020). Benefits of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Application to Crop Production under Water Scarcity. In *Drought - Detection and Solutions* (2019th ed., pp. 25–37). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86595>
- R Development Core Team. (2020). *R: A language and environment for statistical*

computing. R Foundation for Statistical Computing.

<https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/oxygen-consuming-substances-in-rivers/r-development-core-team-2006>

Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, *80*(3), 756–770.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>

Ramírez, M. H., Salazar Duque, H. J., & Urrea Trujillo, A. I. (2018). Quality of cocoa (*Theobroma cacao* L.) DNA from foliar tissue at different stages of development. *Acta Agronómica*, *67*(2), 311–318. <https://doi.org/10.15446/acag.v67n2.63046>

Rocha, P. J. (2002). Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. *Revista Palmas*, *23*(3), 9–17.
<http://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/921>

Sanders, I. R., Clapp, J. P., & Wiemken, A. (1996). The genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in natural ecosystems - A key to understanding the ecology and functioning of the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, *133*(1), 123–134.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1996.tb04348.x>

Selosse, M.-A., & Le Tacon, F. (1998). The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology & Evolution*, *13*(1), 15–20. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(97\)01230-5](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(97)01230-5)

- Shannon, C. E. (1948). A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal*, 27(3), 379–423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- Simon, L., Lévesque, R. C., & Lalonde, M. (1993). Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(12), 4211–5021. <https://doi.org/10.1128/AEM.59.12.4211-4215.1993>
- SIMPSON, E. H. (1949). Measurement of Diversity. *Nature*, 163(4148), 688–688. <https://doi.org/10.1038/163688a0>
- Spence, A., Haj-Ahmad, Y., & Kim, W.-S. (2016). Application Note 88 Plant/Fungi Sample Preparation Optimizing Bead Homogenization of Plant Tissues for DNA and RNA Isolation. *NORGEN Biotek CORP.*, 1(2), 14–21. www.norgenbiotek.com
- Tagle, P. (2015, April 26). *Manzanillo de la muerte: Flora de Galápagos | Desde las Encantadas | La Revista | EL UNIVERSO*. El Universo. <http://www.larevista.ec/viajes/desde-las-encantadas/manzanillo-de-la-muerte-flora-de-galapagos>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00572-009-0274-x>
- Toju, H., Sato, H., Yamamoto, S., & Tanabe, A. S. (2018). Structural diversity across arbuscular mycorrhizal, ectomycorrhizal, and endophytic plant–fungus networks.

BMC Plant Biology, 18(1), 292–321. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1500-5>

Truong, C., Gabbarini, L. A., Corrales, A., Mujic, A. B., Escobar, J. M., Moretto, A., & Smith, M. E. (2019). Ectomycorrhizal fungi and soil enzymes exhibit contrasting patterns along elevation gradients in southern Patagonia. *New Phytologist*, 222(4), 1936–1950. <https://doi.org/10.1111/nph.15714>

U'Ren, J. M., Miadlikowska, J., Zimmerman, N. B., Lutzoni, F., Stajich, J. E., & Arnold, A. E. (2016). Contributions of North American endophytes to the phylogeny, ecology, and taxonomy of Xylariaceae (Sordariomycetes, Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 98, 210–232. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.02.010>

van der Heijden, M. G. A., & Sanders, I. R. (2002). Mycorrhizal Ecology: Synthesis and Perspectives. In *Ecological Studies* (pp. 441–456). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-38364-2_17

Verollet, R. (2008). A Major Step Towards Efficient Sample Preparation with Bead-Beating. *BioTechniques*, 44(6), 832–833. <https://doi.org/10.2144/000112893>

Villarreal, H., Álvarez, M., Córdoba, S., Escobar, F., Fagua, G., Gast, F., Mendoza, H., Ospina, M., & Umaña, A. M. (2004). Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad. In *Programa Inventarios de Biodiversidad*. <http://repository.humboldt.org.co/bitstream/handle/20.500.11761/31419/63.pdf?sequence=1>

- Wurdack, K. J., & Farfan-Rios, W. (2017). Incadendron : a new genus of Euphorbiaceae tribe Hippomaneae from the sub-Andean cordilleras of Ecuador and Peru. *PhytoKeys*, 85(85), 69–86. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.85.14757>
- Yu, M., Xie, W., Zhang, X., Zhang, S., Wang, Y., Hao, Z., & Chen, B. (2019). Arbuscular Mycorrhizal Fungi Can Compensate for the Loss of Indigenous Microbial Communities to Support the Growth of Liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.). *Plants*, 9(1), 7–24. <https://doi.org/10.3390/plants9010007>
- Yu, T. E., Egger, K. N., & Peterson, L. R. (2001). Ectendomycorrhizal associations - Characteristics and functions. *Mycorrhiza*, 11(4), 167–177. <https://doi.org/10.1007/s005720100110>

Anexos