



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Estandarización de una técnica molecular (PCR) para la cuantificación de hongos presentes en los suelos de dos Ecosistemas Tropicales del sur de Ecuador

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Orellana Ordoñez, Mayra Liseth

DIRECTOR: Castillo Monroy, Andrea del Pilar, Dra.

LOJA – ECUADOR

2014

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Dra.

Andrea del Pilar Castillo Monroy

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: Estandarización de una técnica molecular (PCR) para la cuantificación de hongos presentes en los suelos de dos Ecosistemas Tropicales del sur de Ecuador realizado por Orellana Ordoñez Mayra Liseth, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por se aprueba la presentación del mismo.

Loja, marzo de 2014

f) _____

Dra. Andrea del Pilar Castillo Monroy

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Orellana Ordoñez Mayra Liseth. declaro ser autor (a) del presente trabajo de fin de titulación: Estandarización de una técnica molecular (PCR) para la cuantificación de hongos presentes en los suelos de dos Ecosistemas Tropicales del sur de Ecuador, de la Titulación Bioquímica y Farmacia, siendo Andrea del Pilar Castillo Monroy director (a) del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.....

Mayra Liseth Orellana Ordoñez

1900599810

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo de investigación en primer lugar a Dios todopoderoso, por ser él quien me ha impulsado a seguir a lo largo de mi vida afrontando los retos que cada día se me han presentado, por haberme dado luz y fortaleza para alcanzar mis metas.

A mis amadísimos padres Efraín y Carmen, a quien les debo toda mi vida, les agradezco por el amor y comprensión, a ustedes quienes con sacrificio y constancia han sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores.

A mis hermanos Verónica, Jasson y María Belén por su gran amor y apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

A mi hija, Tiffany, por ser la persona que ha iluminado mi vida, que ha sido mi principal motivación para poder culminar esta carrera.

Y en especial a José Luis Ordoñez (+) quien fue un apoyo fundamental en mi etapa de estudio gracias por todo lo bello que nos pudiste brindar cuando estabas con nosotros, eres nuestro angelito que desde el cielo nos cuidas.

A mis maestros, gracias por su tiempo, por su apoyo así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional; y a mis compañeras, por su amistad fraternal; para ellos, mi respeto y gratitud.

Mayra O

AGRADECIMIENTO

A Dios que ilumina día a día mi vida por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizaje y experiencias y por permitirme culminar con éxito una más de mis metas.

A mis padres y hermanos por apoyarme en cada momento y brindarme su sabiduría y consejos diarios. A mi princesa por su comprensión y amor diario por llenar mis días de alegría, por ser mi fortaleza a cada instante.

Dejo constancia de mi especial agradecimiento, a la Dra. Andrea del Pilar Catillo M, Directora del presente trabajo investigativo, ya que gracias a su sabia dirección y vocación educativa, hizo posible la culminación de esta mi tesis.

Al Dr. Aminael Sánchez por su colaboración y apoyo en todos sus conocimientos brindados durante el desarrollo del proyecto investigativo.

Al Departamento de Ciencias Naturales, por permitirme realizar mi trabajo de investigación y por darme la oportunidad de formarme y prepararme profesionalmente.

A todos los docentes, compañeros y pasantes del departamento de Ciencias Naturales.

A mis compañeros, amigos y familiares, por el apoyo, comprensión y por los gratos momentos que compartimos juntos.

Mayra Liseth Orellana Ordoñez

INDICE

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	1
1. MARCO TEÓRICO.....	6
1.1. Acido desoxirribonucleico (ADN)	6
1.1.1 Generalidades del ADN.....	6
1.1.2 Estructura del ADN.....	6
1.1.3 ADN ribosómico (ADNr).	7
1.1.4 ADN molde	8
1.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	8
1.2.1 Principios de la PCR.....	8
1.2.2 Componentes de la PCR.....	9
1.2.2.1 Taq ADN polimerasa.....	9
1.2.2.2 Cloruro de Magnesio (MgCl ₂).	9
1.2.2.3 dNTPs.....	9
1.2.2.4 Buffers para PCR.....	9
1.2.2.5 Primers o iniciadores.....	10
1.2.3 Ciclos de la PCR.....	10
1.2.3.1 Denaturación del ADN.	10
1.2.3.2 Anillamiento.	10
1.2.3.3 Extensión.	11
1.3 Características físicas del sur de Ecuador.....	11
1.4 Formaciones vegetales del Sur de Ecuador.	12
1.4.1 Bosque Seco Tropical (BST)	12
1.4.2 Matorral Seco Tropical (MST).....	13
1.4.3 Bosque Montano Tropical (BMT).	14

CAPÍTULO II	6
2. MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1 Sitios de estudio.	16
2.1.1 Catamayo:.....	16
2.1.2 Arenillas:	16
2.1.3 San Francisco:	17
2.2 Diseño experimental y muestreo.	17
2.3 Análisis de Laboratorio	19
2.3.1 Extracción de ADN.....	19
2.3.2 Visualización del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa.	19
2.3.3 Cuantificación de ADN.....	19
2.3.4 Amplificación de la PCR.....	19
2.3.6 Análisis Estadístico	22
CAPÍTULO III	16
3. RESULTADOS Y DISCUSION	24
3.1 Muestreo.	24
3.2 Extracción de ADN.....	24
3.3 Amplificación de fragmentos conservados, mediante PCR.....	28
3.4 Diluciones de ADN	29
CONCLUSIONES.....	31
RECOMENDACIONES.....	33
ANEXO.....	39

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 . Representación del ADNr y los diferentes cebadores.....	7
Figura 2. Distribución de las zonas de estudio. San Francisco (Bosque Montano Tropical), Catamayo (Matorral Seco Tropical), Arenillas (Bosque Seco Tropical)	17
Figura 3. Calidad de ADN en gel de agarosa (1%).A-B-C: Alamala, D: Arenillas, E: ECSF.	24
Figura 4. Correlación entre la concentración y la pureza de ADN de los suelos del Bosque Seco, Matorral Seco y Bosque Montano (Nótese la diferencia de escala).	26
Figura 5. A) Media de las concentraciones de ADN por microambiente en el Matorral Seco de Alamala (<i>Lyco = Lycopodium</i>). Y B) Media de las concentraciones de ADN por tratamiento en el Bosque Montano Tropical.....	26
Figura 6. Media de la concentración de ADN por sitio de estudio. Arenillas-BST: Reserva Ecológica de Arenillas – Bosque Seco tropical; Catamayo-MST: Catamayo – Matorral Seco Tropical; Zamora-BMT: Zamora – Bosque Montano Tropical. Diferentes letras significan diferencias entre sitios de estudio ($n = 32$; $P < 0.01$).....	27
Figura 7. Producto de amplificación de regiones ITS-5.8s de hongos A-B-C-D: Alamala E: Arenillas F: ECSF	29
Figura 8. Producto de amplificación de regiones ITS-5.8s con diluciones de ADN A: Alamala B: Arenillas C: ECSF	30

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microambientes/tratamientos evaluados en cada uno de los ecosistemas tropicales.	18
Tabla 2. Cebadores universales usados en la investigación.....	20
Tabla 3. Condiciones iniciales de la PCR	20
Tabla 4. Modificación de rango de Temperatura.....	20
Tabla 5. Disminución del volumen final de la PCR	21
Tabla 6. Condiciones optimizadas de la PCR	21
Tabla 7. Diluciones optimas por tipo de suelo.....	22

INDICE DE ANEXO

Anexo 1. Datos de Cuantificación de ADN de las 160 muestras de estudio.....	39
--	----

RESUMEN

En el presente trabajo se estandarizó un protocolo para la caracterización molecular de microorganismos presentes en los suelos de los ecosistemas tropicales del sur de Ecuador: Bosque Seco Tropical (BST), Matorral Seco Tropical (MST) y Bosque Montano Tropical (BMT) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello se aisló ADN de muestras de suelo y se estudió el efecto de diversos parámetros en la eficiencia de la PCR. Se observó que la concentración media de ADN obtenido varía entre ecosistemas siendo mayor en las muestras del BMT. Refleja la presencia de mayor biomasa en los suelos de este ecosistema comparado con el BST y MST. Al estudiar la eficiencia de la PCR se observó que la concentración de ADN de partida fue el factor determinante por tipo de ecosistema; se identificaron las diluciones óptimas para cada tipo de suelo; 1:2, 1:5, 1:20 del ADN de partida (Catamayo, Arenillas y Estación Científica San Francisco). El presente trabajo sienta las bases para la cuantificación de la diversidad microbiana en los ecosistemas a partir de la PCR en tiempo real.

Palabras clave: PCR, Bosque Seco Tropical, Matorral Seco Tropical, Bosque Montano Tropical, Cuantificación de ADN.

ABSTRACT

In this thesis project, a protocol for the molecular characterization of soil microbial communities, present in soils of the tropical ecosystems (Tropical Dry Forest (TDF), Tropical Dry Scrub and Tropical Montane Forest (TMF)) in southern Ecuador was standardized. To this end, total genomic DNA from soil samples was isolated and the polymerase chain reaction (PCR) used for the amplification of conserved regions. We observed that the obtained average DNA concentration varies between ecosystems being higher in the samples from TMF. This reflects the presence of higher biomass in soils of this ecosystem compared to TDF. While optimizing the conditions of the PCR, we gathered evidences suggesting that the DNA starting concentration was the variable with the highest impact on the reaction efficiency. We therefore identified the optimal dilutions per soil type: 1:2, 1:5, 1:20 of the starting DNA preparation for Catamayo, Arenillas and San Francisco respectively. This work provides the basis for the quantification of microbial diversity in ecosystems from the real-time PCR.

Keywords: PCR, Tropical Dry Forest, Tropical Dry Scrub, Tropical Montane Forest, DNA quantification.

INTRODUCCIÓN

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), es una técnica molecular capaz de replicar *in vitro* ADN (Surzycki, 2000). Esta técnica, sumamente sensible (Van der Heidjen & Sanders, 2002), emplea primers o iniciadores (secuencias de oligonucleótidos complementarios al ADN molde) para copiar en pocas horas, específica y exponencialmente el material genético inicial (Newton, 1995; Burnett, 2003). La técnica amplifica fragmentos específicos de ADN desde un pequeñísimo número de células, de una sola espora, o aún más, de material de herbario seco, incluyendo especímenes que están extintos. La primera vez que se utilizó este tipo de análisis en micología consistió en la amplificación y secuenciación del ADNr, estableciéndose relaciones filogenéticas de hongos. Así, el desarrollo de esta técnica molecular ha permitido avances significativos en el estudio de comunidades microbianas en el suelo. A partir de entonces muchas preguntas de carácter ecológico y/o biológico relacionado al funcionamiento del ecosistema suelo han sido formuladas y/o resueltas.

La Zona 7 de Ecuador comprende tres provincias; El Oro, Loja y Zamora Chinchipe, localizadas en tres diferentes regiones Costa, Sierra y Oriente, respectivamente. La superficie aproximada es de 40.000 km (Maldonado, 2002). Entre las formaciones vegetales más representativas de esta zona tenemos al Bosque Seco Tropical, Bosque Montano Tropical y Matorral Seco Tropical. Sin embargo, el 70% del territorio está afectado por factores antrópicos como la deforestación para el establecimiento de agricultura, abastecimiento de leña y ganadería, entre otros. Esta presión antrópica genera una amenaza sobre la biodiversidad produciendo pérdidas irreversibles, de ahí la urgente necesidad de realizar estudios sobre la composición y estructura de las comunidades de los suelos encargadas del funcionamiento de los ecosistemas en general y de los bosques en particular.

Por tal razón, el objetivo que nos planteamos en el presente estudio fue estandarizar una técnica molecular (PCR) para la caracterización de hongos presentes en los suelos de los ecosistemas tropicales más representativos de la Zona 7 de Ecuador. Para cumplir dicho objetivo: i) evaluamos la concentración de ADN; ii) estandarizamos diversos parámetros en la eficiencia PCR (e.g. cloruro de magnesio, temperatura de anillamiento); iii)

determinamos diluciones óptimas para cada tipo de suelo evaluado (BST, MST, BMT) y iv) amplificamos exitosamente el ADN de los tres ecosistemas muestreados.

Identificar condiciones óptimas para realizar una PCR exitosa nos permitirá, por tanto, abordar otras técnicas moleculares (e.g. PCR en tiempo real, secuenciación genómica de nueva generación) para resolver cuestiones ecológicas y/o biológicas a una resolución más fina.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Acido desoxirribonucleico (ADN)

El acido desoxirribonucleico es una molécula simple, con una secuencia de nucleótidos que contiene la información necesaria para poder controlar el metabolismo de un ser vivo, además de ser el lugar donde reside su información genética.

1.1.1 Generalidades del ADN

El ADN está compuesto por una secuencia de nucleótidos formados por desoxirribosa. Las bases nitrogenadas que se hallan formando los nucleótidos de ADN son Adenina, Guanina, Citosina y Timina. No aparece Uracilo. Los nucleótidos se unen entre sí mediante el grupo fosfato del segundo nucleótido, que sirve de puente de unión entre el carbono 5' del primer nucleótido y el carbono 3' de siguiente nucleótido (Klug *et al.* 2006).

1.1.2 Estructura del ADN

La estructura secundaria del ADN fue propuesta por Watson & Crick (1953), y la llamaron el modelo de doble hélice de ADN. Este modelo está formado por dos hebras de nucleótidos orientada en sentido 5' → 3' y la otra de 3' → 5'. Las dos hebras son antiparalelas, formando puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas enfrentadas. Cuando en una hebra encontramos Adenina, en la otra hebra hallamos Timina. Cuando en una hebra encontramos Guanina, en la otra hallamos Citosina. Estas bases enfrentadas son las que constituyen los puentes de Hidrógeno. Adenina forma dos puentes de Hidrógeno con Timina. Guanina forma tres puentes de Hidrógeno con la Citosina. Las dos hebras están enrolladas en torno a un eje imaginario, que gira en contra del sentido de las agujas de un reloj. Las vueltas de estas hélices se estabilizan mediante puentes de Hidrógeno. Esta estructura permite que las hebras que se formen por duplicación de ADN sean copia complementaria de cada una de las hebras existentes (Klug *et al.* 2006).

1.1.3 ADN ribosómico (ADNr).

La revolución molecular en cuanto a taxonomía de hongos comenzó a inicios de 1990, con la amplificación del ADNr con la ayuda de la PCR (Hibbet, 2007); ya que existen genes presentes en todos los genomas celulares como los ribosomales, que pueden proveer de información para reconstrucciones filogenéticas (Rentarías, 2007).

El ADNr puede encontrarse en mitocondrias, cloroplastos y núcleo (Rentarías, 2007). Las regiones que se encuentran altamente conservadas nos permiten realizar estudios evolutivos a nivel de géneros y familias y suelen usarse para el diseño de cebadores universales (Rivera, 2006). Entre las secuencias altamente conservadas de los genes de esta región se encuentran regiones variables, denominadas espaciadores (internal transcribed spacers), cuya función es desconocida (Peintnen *et al.* 2004). La tasa de variabilidad en estas regiones espaciadoras es más elevada que en los genes, pero sus secuencias se pueden alinear con confianza entre taxones estrechamente relacionados (Insua, 2003).

La región del ADNr incluye el gen 18S (esta región también se denomina SSU: Small SubUnit), el espaciador intergénico ITS1, el gen 5.8S, el espaciador ITS2 y el gen 28S (también denominado LSU: Large SubUnit). Las regiones 18S, 5.8S, 28S están relativamente conservadas entre los hongos, facilitando una base molecular para buscar relaciones filogenéticas a diferentes niveles, el gen 5.8S esta conservado evolutivamente como los genes 18S y 28S, pero su tamaño pequeño limita su utilidad en comparaciones filogenéticas (Said *et al.* 2007).

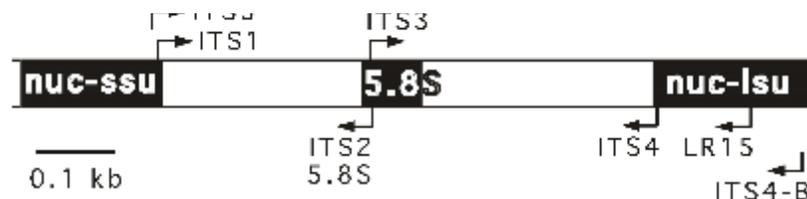


Figura 1 . Representación del ADNr y los diferentes cebadores.

Fuente 1. Binder & David, 2003.

1.1.4 ADN molde

Se denomina ADN molde al que servirá como plantilla para la amplificación durante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Su calidad y concentración determinan el éxito de amplificación (Newton, 1995). La calidad está sujeta básicamente al método de extracción y purificación empleado (a más pureza mayor calidad), mientras que la cantidad de ADN inicial, necesaria para una amplificación exitosa de PCR, dependerá de la complejidad del ADN molde. Generalmente reacciones con muy poco ADN molde pueden tener bajo rendimiento y las que lo contienen en exceso, en cambio, provocan amplificaciones no específicas (Burnett, 2003).

1.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

1.2.1 Principios de la PCR.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, más conocida por sus siglas en inglés como PCR, es una técnica molecular capaz de replicar *in vitro* ADN (Surzycki, 2000). Esta técnica, sumamente sensible (Van der Heidjen & Sanders, 2002), emplea primers o iniciadores (secuencias de oligonucleótidos complementarios al ADN molde) para copiar en pocas horas, específica y exponencialmente el material genético inicial (Newton, 1995; Burnett, 2003).

Desde su primera descripción por Mullis (1983), la PCR ha tenido un efecto importante en muchos de los campos de investigación de la Biología (Ayra *et al.* 2001). La técnica amplifica fragmentos específicos de ADN, extraído desde un pequeñísimo número de células, de una sola espora, o aún más, de material de herbario seco, incluyendo especímenes que están extintos. La primera vez que se utilizó este tipo de análisis en micología consistió en la amplificación y secuenciación del ADNr, estableciéndose relaciones filogenéticas de hongos.

Uno de los aspectos más relevantes en el desarrollo de esta metodología fue el diseño de los cebadores, los cuales fueron elaborados a partir de regiones conservadas. Ello permitió la amplificación de los fragmentos del ADNr en la mayoría de los hongos, conduciendo al desarrollo de los estudios taxonómicos y filogenéticos intra e inter especies fúngicas (Said *et al.* 2007; Gutiérrez *et al.* 2002; Costa, 2004). Su principio es

muy simple y se basa en la amplificación in vitro del ADN, lo que trae como resultado la replicación exponencial de la secuencia blanco hasta en un millón de veces, aun en presencia de gran cantidad de moléculas de ADN no relacionadas, obteniéndose como producto un ADN altamente homogéneo que se convierte en fuente excelente para diversas manipulaciones moleculares (Ayra *et al.* 2001).

1.2.2 Componentes de la PCR.

1.2.2.1 Taq ADN polimerasa.

Es la enzima más comúnmente usada para copiar ADN. Es capaz de procesar 60 nucleótidos/segundo a 70°C (Innis *et al.*, 1988) en un tiempo de vida media de 40 minutos a 95°C (Lawyer *et al.*, 1993). Su rendimiento y fidelidad se ve influenciada por pH, concentración de magnesio y de dNTPs (Eckert & Kunkel, 1991). Cantidades excesivas de dicha enzima provocan acción exonucleasa intrínseca del ADN (en sentido 5'→3'), mientras que sus bajos niveles disminuyen la eficiencia de amplificación (Longley *et al.*1990).

1.2.2.2 Cloruro de Magnesio (MgCl₂).

Es un cofactor de la enzima Taq ADN polimerasa. Su concentración en forma libre determina la capacidad de acción de la enzima, de modo que, su ausencia la inactiva y su exceso reduce la fidelidad de copiado (Eckert & Kunkel, 1991). La disponibilidad de MgCl₂ para la enzima varía dependiendo de los agentes quelantes, concentración de dNTPs y proteínas (Newton, 1995), provocando que se incremente la amplificación no específica (Williams, 1989).

1.2.2.3 dNTPs.

Son los oligonucleótidos adenina, guanina, citosina y timina dispuestos en formas trifosfatadas y desoxidadas que la ADN polimerasa emplea como materia prima para replicar las secuencias del ADN molde (Newton, 1995).

1.2.2.4 Buffers para PCR.

Son agentes tampón muy importantes que se emplean para regular el pH de la reacción en un rango entre 8.3-8.8, sin afectar la actividad y fidelidad de la ADN polimerasa. La base de la mayoría de buffers son Tris y Cloruro de Potasio (KCl). Este último componente permite aún en concentraciones modestas, incrementar en un 50 a 60% la actividad de la enzima polimerasa. Su concentración óptima es de 50mM (Gelfand & White, 1989; Newton, 1995).

1.2.2.5 Primers o iniciadores.

Son secuencias cortas de oligonucleótidos (de 15 a 30 pares de bases) complementarias a la cadena del ADN molde. Los primers se unen al ADN para dar la señal de inicio de amplificación a la ADN polimerasa. Generalmente se los usa en pares, uno "forward" (que va en sentido 5'→3') y otro "reverse" (sentido 3'→5'). Las posiciones donde los primers se adhieran determinarán el tamaño del amplificado (producto de la amplificación). Los primers se deben diseñar para que tengan una proporción GC del 40 al 60% y, especialmente, sin regiones complementarias entre sí o estructuras secundarias que pudieran entorpecer su alineamiento con el ADN molde (Newton, 1995).

1.2.3 Ciclos de la PCR

Newton (2000) menciona que el número de ciclos que generalmente se aplica en una PCR va desde los 30 a los 60, y dentro de cada uno de ellos se presentan diferentes etapas.

1.2.3.1 Denaturación del ADN.

Su función es la de separar la doble hélice de ADN mediante calentamiento a 94°C (entre 15 segundos y 2 minutos). Lo cual permite que las cadenas de nucleótidos estén disponibles para usarse como nuevo molde de replicación.

1.2.3.2 Anillamiento.

Permite que los primers se asocien establemente con el ADN molde y entonces, se estimule la acción de la enzima Taq ADN polimerasa. Se obtiene reduciendo la

temperatura en un rango entre los 30 y 60 °C (dependiendo de la temperatura de anillamiento calculada).

1.2.3.3 Extensión.

En esta etapa se genera la síntesis del nuevo ADN hacia el extremo 3' de cada primer al incrementar la temperatura entre de los 70 y 74°C.

Las tres etapas forman un solo ciclo de amplificación y pueden optimizarse de acuerdo a la combinación de ADN molde y a cada par de primers empleado. Generalmente luego de 20 a 40 ciclos de amplificación se puede analizar el tamaño de la sección de ADN amplificado y cuantificarlo (Promega Protocols and Applications Guide, 2006).

1.3 Características físicas del sur de Ecuador.

La Zona 7 del Ecuador comprende tres provincias El Oro, Loja y Zamora Chinchipe, localizadas en tres diferentes regiones Costa, Sierra y Oriente respectivamente. La superficie aproximada es de 40.000 km (Maldonado, 2002). El 70% es afectada por factores antrópicos como la deforestación para el establecimiento de agricultura y el abastecimiento de leña, entre otros.

No existen volcanes en el sur del Ecuador. El cerro más alto es Fierro-Urco con 3900 m s.n.m, y las cadenas montañosas más representativas son: las cordilleras de Cordoncillos, Sabanilla, Santa Rosa, Ramos, Guachanamá y Cabeza de Toro, esta última declina hacia la parte más occidental, en el cantón Zapotillo. Los principales sistemas fluviales que se originan en esta región y desembocan en el Océano Pacífico son Puyango y Catamayo, y hacia el Amazonas el río Zamora (Palacios, 1995).

La provincia de El Oro se compone, en su mayor parte, de tierras planas con dos macizos montañosos que cruzan de este a oeste, siendo su parte terminal la que declina en esta provincia (Lozano *et al.* 2002).

En la Sierra que corresponde en su mayoría a la provincia de Loja, la Cordillera Real de los Andes no está claramente definida generándose la depresión de los Andes, accidente geográfico que se acentúa hacia el sur, retomando su existencia real al norte del Perú en

Cajamarca. Esta área se conforma por una serie de cadenas montañosas entrecruzadas denominadas nudos (Cajanuma, Guagrahuma y Sabanilla), originando el relieve más irregular del país (Espinosa [1948–1949] 1997).

El Oriente sur, provincia de Zamora Chinchipe, se compone de tierras altas de la Amazonía. Sus límites altitudinales más bajos llegan a los 800 msnm., siendo una zona de transición de la vegetación. Varias ramificaciones montañosas atraviesan la región sur-oriental entre éstas se pueden mencionar las cordilleras de Sábanas, Calima, Cerro Negro, Paredones, Numbala, Nanguipa, Guambime, Tzumantza, Wintza, Sordomoras, Manga Urcu, del Oso, de Picho, Zarza y su mayor representante la Cordillera de El Cóndor, la cual está relacionada tectónicamente con la Cordillera Oriental de Colombia, y está conformada de sedimentos cretáceos y terciarios. En esta zona se originan los sistemas fluviales que desembocan en el río Amazonas (Paute, Santiago y el Chinchipe) (Neill, 1999).

1.4 Formaciones vegetales del Sur de Ecuador.

Entre las formaciones vegetales más representativas del sur de Ecuador tenemos al Bosque Seco Tropical, Bosque Montano Tropical y Matorral Seco Tropical.

1.4.1 Bosque Seco Tropical (BST)

Los bosques secos tropicales (BST), son considerados como el Centro de Endemismo Tumbesino (Kessler, 1992), también como Centro de Endemismo de Plantas Áridas del Guayas (Madsen *et al.* 2001), se caracterizan por poseer bosques caducifolios y semicaducifolios que crecen en áreas sujetas a una severa estacionalidad climática. Estos bosques reciben alrededor de 80% de la precipitación durante cuatro meses, a lo largo de los cuales la media de precipitación puede sobrepasar con creces 200 mm por mes (Maass & Burgos, 2011). En el otro extremo, el periodo de sequía se prolonga entre 5 a 6 meses al año. Durante este periodo la precipitación raramente supera 10 mm mensuales (Maass & Burgos, 2011) creando un déficit hídrico (Gotsch *et al.* 2010; Lima & Rodal, 2010) que determina una de las características más conspicuas de los BST; la fenología distintiva de la mayoría de plantas, ligada a la pérdida estacional de las hojas y del

bosque en general, con una época sin hojas durante la estación seca y una fisionomía de bosque siempre verde a lo largo de la estación lluviosa.

De acuerdo con el sistema de clasificación de zonas de vida de Holdridge (Holdridge, 1982), los bosques Secos Tropicales y Subtropicales se encuentran en áreas donde el promedio de temperatura anual es mayor a 17°C, la precipitación anual es mayor a 250 mm y menor a 2000 mm; con un promedio de evapotranspiración potencial que excede la unidad de la precipitación (Murphy & Lugo, 1986).

En Ecuador, las zonas de bosque seco están incluidas en las formaciones de la costa, en las subregiones Centro y Sur (Sierra 1999), que se extienden desde la Provincia de Esmeraldas y los Ríos al Norte hasta Lambayeque y Libertad al Sur del Perú (Aguirre et al. 2006). En la provincia de Loja se encuentra la mayor superficie de este ecosistema, que incluyen las tierras bajas, estribaciones occidentales bajas de la cordillera de los andes y los valles secos interandinos del sur (Aguirre y Kvist 2005). Los bosques secos del Sur del Ecuador están caracterizados por poseer una alta diversidad y una extraordinaria cantidad de especies endémicas de diferentes grupos taxonómicos (Espinosa et al. 2012). Sin embargo éstos bosques están ubicados en zonas densamente pobladas, (aproximadamente el 60% de la población rural se encuentra en esta formación vegetal, con suelos aptos para cultivos) que han sido muy intervenidos y destruidos (PDOT, ZCH, 2010).

1.4.2 Matorral Seco Tropical (MST)

Los matorrales secos tropicales se encuentran en las zonas áridas y semiáridas. Estas zonas se caracterizan por las elevadas temperaturas y la precipitación que, por ser tan escasa, se evapora rápidamente al caer al suelo. Se ubica en los valles interandinos entre 1.400 y 2.200 m s.n.m. Se caracteriza por un fuerte y prolongado periodo seco. Cerca del 80% de la precipitación ocurre entre febrero y marzo. La vegetación no es muy alta (5-15 m), xerofítica, espinosa, achaparrada con presencia de cactus columnares, con arbustos de los géneros *Capparis*, *Croton* y *Euphorbia*, así como árboles aislados, en particular de la familia Mimosaceae. Esta formación se localiza en los valles de Loja (Catamayo, Vilcabamba, Malacatos, Quinara) hasta el sur de la provincia del Azuay (Susudel-río León, valle Yunguilla-Jubones). La cobertura de vegetación sucede en forma de parches dentro de una matriz de suelo desprovista de vegetación y costra biológica del suelo (CBS).

La CBS está formada por la íntima asociación entre partículas de suelo, cianobacterias, algas, hongos, líquenes, hepáticas y briófitos (West, 1990; Belnap & Gardner, 1993). Entre sus múltiples funciones ecológicas están: i) aporte de carbono (C) y nitrógeno (N) al suelo (Castillo-Monroy *et al.* 2011); ii) incrementa su estabilidad y protege frente a la acción erosiva de la lluvia y el viento (Bowker *et al.* 2006); iii) favorece la agregación y cohesión de partículas de suelo; iv) modula la infiltración y afecta de manera directa a las plantas vasculares influyendo en su establecimiento, contenido nutricional y estado hídrico (Belnap & Ollange, 2003).

1.4.3 Bosque Montano Tropical (BMT).

Los bosques Montanos del sur de Ecuador se caracterizan por una alta biodiversidad, los cuales han demostrado ser florísticamente más diversos que los de la parte norte del país. (Joergensen & Ulloa Ulloa, 1994). Muestreos de vegetación en la parte occidental del Parque Nacional Podocarpus a 2800 m s.n.m. indican una densidad de 2310 árboles por hectárea (Madsen & Ollgaard, 1994).

El BMT en el Sur del Ecuador se distribuye entre las provincias de Loja y Zamora Chinchipe a partir de altitudes de 1800 m s.n.m., hasta los 2750 m s.n.m.. En este ecosistema se encuentran gran cantidad de especies desde epífitas hasta forestales (Cuenca, 2007), sin embargo está altamente intervenido llegando a encontrarse reducido en parches aislados producto de la actividad antrópica, principalmente por ganadería. Los suelos presentan una alta biodiversidad representada en su mayoría por los microorganismos existente en el medio, es por esto que en los últimos años se ha despertado un gran interés en su estudio, siendo descritos como el motor de los ecosistemas terrestres.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Sitios de estudio.

2.1.1 Catamayo:

El valle de Catamayo (Provincia de Loja) sector Alamala, está clasificado como Matorral Seco Tropical, y es uno de los ecosistemas mejor conservados en la actualidad. Presenta un clima del tipo subtropical (cálido-seco a muy seco), con una temperatura media anual de 27 °C siendo octubre y junio la máxima y la mínima temperatura registrada (30.8 y 17.9 °C, respectivamente). La precipitación y evapotranspiración media es de 388 mm y 1112 mm/año, respectivamente (Sierra, 1999). La temporada invernal generalmente es de febrero a abril y la época seca va desde mayo a enero, aunque se tienen periodos esporádicos de lluvia entre los meses de septiembre a enero, los meses más secos se los encuentra entre junio a agosto. La cobertura de vegetación sucede en forma de parches dentro de una matriz de suelo desprovista de vegetación y costra biológica del suelo. Su flora característica está constituida por *Aloe vera* (Aloeaceae), *Opuntia* spp. (Cactaceae), *Acacia macracantha* (Mimosaceae), destacándose *Croton wagneri* (Euphorbiaceae) como la especie arbustiva más abundante (Ver figura 2).

2.1.2 Arenillas:

En la parte Sur-occidental del territorio ecuatoriano y de la provincia de El Oro encontramos la Reserva Ecológica de Arenillas que corresponde a un remanente de Bosque Seco Tropical muy bien conservado. Representa un área importante de endemismo en el mundo (Best & Kessler, 1995). Su clima está caracterizado por una estación extremadamente seca de mayo a noviembre y una estación lluviosa de diciembre a abril (Aguirre & Kvist 2005). Temperatura media anual entre 20 - 26°C, precipitación media anual entre 300 y 700 mm (Aguirre & Kvist, 2005) y elevación entre 50 – 100 m s.n.m. (Ver figura 2).

2.1.3 San Francisco:

La Estación Científica de San Francisco (ECSF) se encuentra en la provincia Zamora Chinchipe, bordeado por el Parque Nacional Podocarpus. La ECSF cuenta con un Bosque Montano Tropical bien conservado. Tiene una precipitación media anual de 2500 mm y temperatura media anual entre 15-17 °C. La zona es altamente lluviosa, en tal virtud, las características de los suelos varían principalmente en función de la altitud (temperatura). Los suelos corresponden al grupo Dystrudept y Eutrudept que son profundos, colores pardos amarillentos y rojizos. Debido a las fuertes pendientes que presenta esta vertiente, los suelos son muy frágiles y sensibles a la erosión hídrica (Wilcke *et al.* 2002) (Ver figura 2).

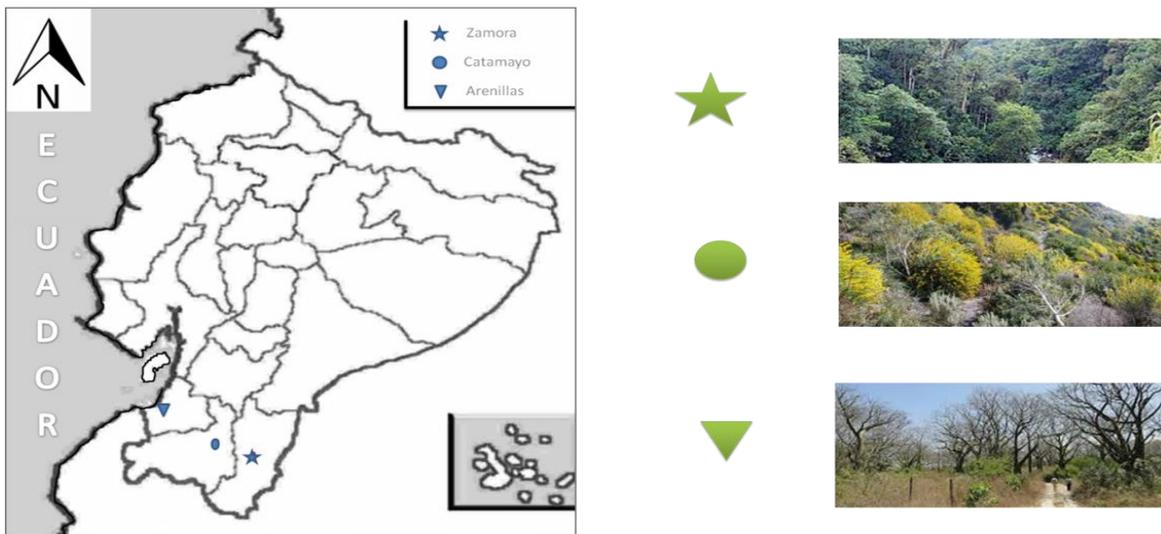


Figura 2. Distribución de las zonas de estudio. San Francisco (Bosque Montano Tropical), Catamayo (Matorral Seco Tropical), Arenillas (Bosque Seco Tropical)
Fuente 2. Autora

2.2 Diseño experimental y muestreo.

Se seleccionaron 3 parcelas de 10 x 10 m en Catamayo, sector Alamala, distribuidas aleatoriamente en un gradiente de altitud; 1400, 1500 y 1600 m s.n.m.. Se recolectó 5 muestras de suelo en cada parcela bajo arbusto y en suelo desprovisto de vegetación (CBS). El suelo fue muestreado a una profundidad de 10 cm con la ayuda de un barreno. Se tuvo en cuenta no recoger piedras ni raíces de plantas (Ver Tabla 1).

En la Reserva Ecológica de Arenillas se seleccionaron 32 parcelas distribuidas sistemáticamente a lo largo de 9 ha. Se recolectó muestras de suelos a una profundidad de 10 cm mediante un barreno. Se tuvo en cuenta no recoger piedras ni raíces de plantas a la hora de realizar el muestreo (Ver Tabla 1).

Aprovechando un diseño experimental de manipulación de nutrientes previamente establecido en la Estación Científica San Francisco (ECSF) por la DFG, el cual está constituido por tres bloques distribuidos a lo largo de un rango de altitud (2050-2150). Cada bloque presenta parcelas de adición de: i) Nitrógeno (N); ii) Fosforo (P); iii) N+P y iv) tratamiento control. Así, recolectamos 2 muestras de suelo en cada una de las parcelas de los tres bloques para un total de 32 muestras de suelos. El suelo fue muestreado a una profundidad de 10 cm mediante un barreno. Se tuvo en cuenta no recoger piedras ni raíces de plantas (Ver Tabla 1).

Tabla 1. Microambientes/tratamientos evaluados en cada uno de los ecosistemas tropicales.

ECOSISTEMA- Ubicación geográfica	Microambiente 1/ Tratamiento2	Altitud (m s.n.m)
Matorral seco Catamayo*	Costra biológica del suelo Lycopodium Matorral	1400
	Costra biológica del suelo Matorral	1500
	Costra biológica del suelo Lycopodium Matorral	1600
Bosque seco - Arenillas		50
Bosque Montano – Estación Científica de San Francisco+	Nitrógeno (N) Fósforo (P) N + P Control	2000-2150

*Se muestrearon los suelos debajo de cada microambiente.

+Parcelas fertilizadas con nitrógeno y fósforo

Fuente 1. Autora

Una vez recogidas las muestras de suelo, éstas fueron llevadas al laboratorio de la UTPL en donde fueron almacenadas en un congelador a -80°C para conservar su ADN. Se

mantuvieron en el congelador hasta ser extraído el ADN de cada una de las muestras de suelo.

2.3 Análisis de Laboratorio

2.3.1 Extracción de ADN.

A partir de los suelos recolectados se realizó la extracción de ADN con el kit PowerSoil (MOBIO Laboratories, Inc.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

2.3.2 Visualización del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa.

La electroforesis en gel de agarosa es un método normalizado que se puede utilizar para visualizar fragmentos de ADN. Una vez terminada la extracción de ADN de las muestras de suelos de los tres sitios de estudio, todas las muestras fueron visualizadas por medio de electroforesis para determinar el éxito de la extracción. Se agregaron 3 μ l ADN + 2 μ l de azul de bromofenol a un gel de agarosa al 1% (disuelto en buffer TBE 1X Trisborato, EDTA). Se corrió a 100V, 200mA, aproximadamente por 60 min.

2.3.3 Cuantificación de ADN.

Luego de la extracción del ADN, es necesaria la cuantificación de las moléculas obtenidas. El ADN fue cuantificado en el Espectrofotómetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific), que además de valores de concentración, también da valores de relación 260/280 (ADN/proteínas) y 260/230 (ADN y solventes orgánicos) que aportan información sobre pureza del producto.

2.3.4 Amplificación de la PCR.

Se realizaron algunas pruebas para optimizar la PCR, partiendo de ciertas condiciones (i.e. volumen final de reacción, temperaturas y tiempos de proceso de PCR) descritas previamente por algunos autores (Fierer et al. 2005; Castillo-Monroy et al. 2011). Se optó por probar con intervalos de temperaturas en lugar de una temperatura específica en el proceso de amplificación.

Los productos de la PCR fueron amplificados usando el termociclador para PCR (Applied

Biosystem), la reacción de la PCR se realizó con la Taq polimerasa (GoTaqG₂ Flexi ADN Polymerase).

Se realizó una PCR utilizando los cebadores específicos para hongos totales según Fierer *et al.*, (2005), indicadas en la tabla. 2. Las condiciones iniciales de la PCR están descritas en la tabla 3.

Tabla 2. Cebadores universales usados en la investigación

Cebador	Secuencia
ITS1-F 5.8s	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G CGC TGC GTT CTT CAT CG

Fuente 2. Fierer *et al.* 2005

Tabla 3. Condiciones iniciales de la PCR

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	9 min	1
Desnaturalización	94°C	45 s	
Anillamiento	53°C	45 s	30
Extensión	72°C	45 s	
Extensión final	72°C	9 min	1
Conservación	4	∞	

Fuente 3. Autora

Para tratar de eliminar algunas bandas inespecíficas modificamos las condiciones de la PCR, se utilizó un rango de concentración de MgCl₂ de 1,5 a 0,5, mM y un rango de temperatura de anillamiento de: 53°C, 55°C, 57°C, 58 °C, 59 °C (Tabla 4).

Tabla 4. Modificación de rango de Temperatura

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	9 min	1
Desnaturalización	94°C	45 s	
Anillamiento	53, 55, 57, 58 y 59°C	45 s	30
Extensión	72°C	30 s	
Extensión final	72°C	7	1

Conservación	4	∞
--------------	---	---

Fuente 4. Autora

Los reactivos utilizados para realizar la PCR se describen a continuación (Tabla 5). Una vez optimizadas las condiciones de la PCR, disminuimos el volumen final para reservar reactivos (Tabla 5). Economizar

Tabla 5. Disminución del volumen final de la PCR

Reactivo	Mix (µl) inicial	Mix (µl) Final
Buffer	5	2
MgCl ₂ (Cloruro de Magnesio)	1.0	0.4
dNTPs (Desoxirribonucleótidos trifosfato)	0.5	0.2
Primers	0.25	0.1
Primers	0.25	0.1
Taq Polimerasa	0.25	0.1
Agua	16.75	6.1
ADN	1	1
Vf (Volumen final)	25	10

Fuente 5. Autora

Ya estandarizado el protocolo de PCR (57°C anillamiento y 1.0 µl MgCl₂) se dio paso a realizar cada una de las muestras de los tipos de suelo. Adicionalmente se disminuyó el tiempo de la temperatura de anillamiento y la extensión final. Ver Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones optimizadas de la PCR

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	9 min	1
Desnaturalización	94°C	45 s	40
Anillamiento	57°C	45 s	
Extensión	72°C	20 s	
Extensión final	72°C	5	1
Conservación	4	∞	

Fuente 6. Autora

Posteriormente diluimos el ADN de todas las muestras para determinar una amplificación óptima para cada uno de los tipos de suelo. Para ello se realizó un gradiente de dilución (1 ADN: 2 H₂O – 1 ADN: 20 H₂O) como muestra la Tabla 7.

Tabla 7. Diluciones evaluadas por tipo de suelo

	ADN	H ₂ O	Total
1:2	1 µl	1 µl	* 2µl H ₂ O+ADN
1:5	1 µl	4 µl	†5µl H ₂ O+ADN
1:10	1 µl	9µl	10µl H ₂ O+ADN
1:20	1 µl	19 µl	•20µl H ₂ O+ADN

Fuente 7. Autora

2.3.5 Electroforesis en gel de agarosa

Una vez terminado el proceso de amplificación, todas las muestras fueron analizadas por medio de electroforesis. Tomamos 3 µl de producto de PCR de cada reacción + 2 µl de azul de bromofenol, posteriormente fue colocando en geles de agarosa al 1%. Para identificar posible contaminación utilizamos como control un blanco (reactivo sin ADN), además se utilizó un marcador de peso molecular de 24 a 726 pb. Se corrió a 100V, 200mA, aproximadamente por 60 min.

2.3.6 Análisis Estadístico

La diferencias entre las concentraciones de ADN de los suelos en los tres ecosistemas fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA). Estos análisis se realizaron en el programa SPSS versión 15.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Muestreo.

En total fueron analizadas 160 muestras de suelos de las cuales 96 muestras fueron obtenidas de Catamayo, sector Alamala de la provincia de Loja, 32 muestras de la Reserva Ecológica de Arenillas al sur-occidente de la provincia del Oro y 32 muestras de la Estación Científica San Francisco ubicada en la provincia de Zamora Chinchipe.

3.2 Extracción de ADN.

Una vez obtenido el ADN de cada muestra, se realizó la cuantificación utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific), como se muestra en el Anexo1. Además se visualizó el ADN mediante un gel de agarosa, los resultados se muestran en la Figura 3.

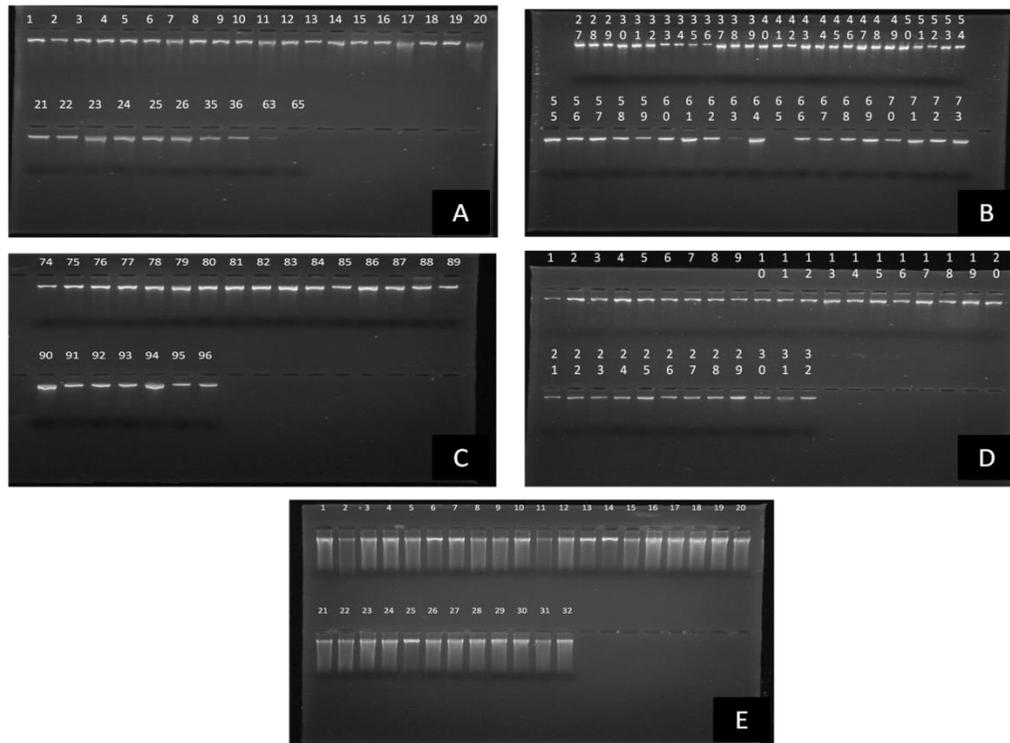


Figura 3. Calidad de ADN en gel de agarosa (1%). **A-B-C:** Alamala, **D:** Arenillas, **E:** ECSF.

Fuente 3. Autora

Al observar los resultados del Anexo1, es muy fácil apreciar que las muestras de suelo obtenidas de la ECSF presentaron sustancialmente mayores concentraciones de ADN en relación a los otros sitios de estudio. Dichas concentraciones varían en un rango de 41.3 a 211.6 (ng/μl). Este resultado puede ser debido a que la ECSF corresponde al Bosque Montano Tropical, cuyos suelos presentan alto contenido de nutrientes y materia orgánica (MO) generando un ambiente óptimo para la proliferación de los microorganismos. Los resultados obtenidos nos dan una idea de mayor biomasa de hongos en los suelos de la ESFC en relación a los otros dos sitios de estudio. Sin embargo, también encontramos los valores más altos de impurezas correspondientes al rango 260/230 (ver Anexo 1). Esto puede ser debido a la presencia de ácidos húmicos en las muestras de la ECSF.

En las muestras obtenidas en Arenillas se aprecian concentraciones más bajas, que van desde 8.5 a 39.4. Mientras que el rango observado en Alamala fue de 10.5 a 69.1 (Anexo 1.) Estos resultados pueden deberse al contenido MO presente en los dos sitios

Como podemos observar en la Figura 4., tenemos ADN de buena calidad en los tres sitios de estudio, sin embargo se destaca Catamayo, sector Alamala, cuyo ADN se encuentra en su mayoría dentro del rango de pureza 1.8 – 2.0. Caso contrario sucede con las muestras de la ECSF en donde encontramos que un gran porcentaje de las muestras se encuentran bajo el rango de pureza, lo cual puede ser debido, como ya mencionamos anteriormente, a la concentración de ácidos húmicos.

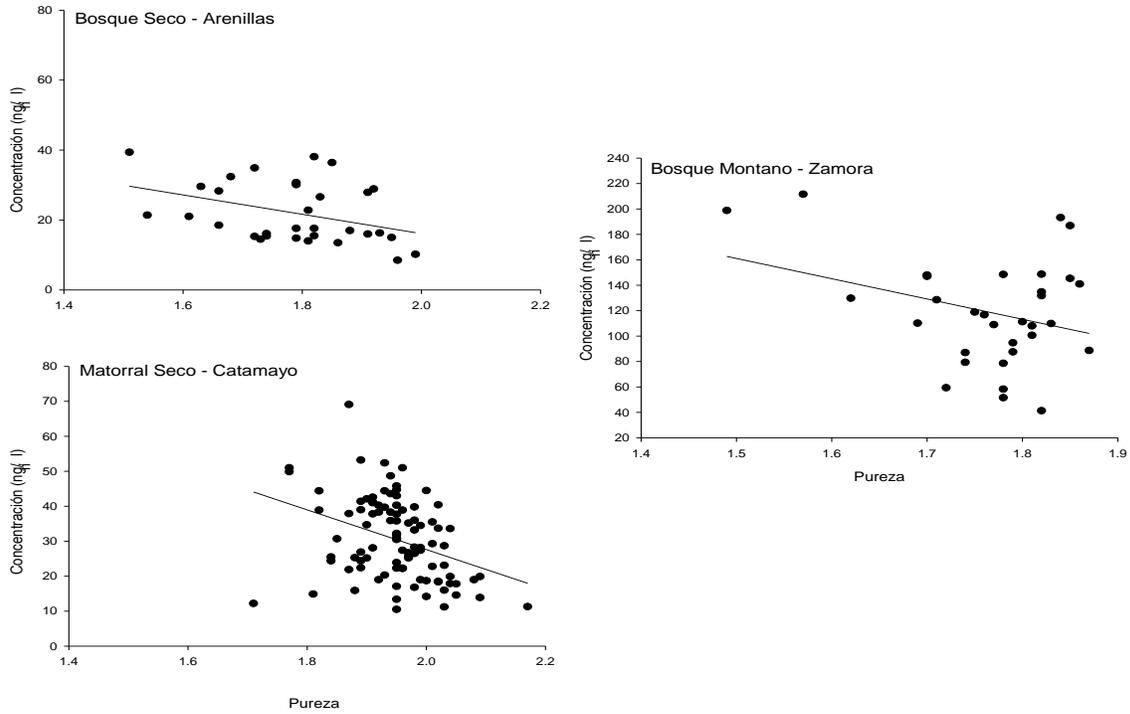


Figura 4. Correlación entre la concentración y la pureza de ADN de los suelos del Bosque Seco, Matorral Seco y Bosque Montano (Nótese la diferencia de escala). Rango de pureza 1.8 – 2.0.

Fuente 4: Autora

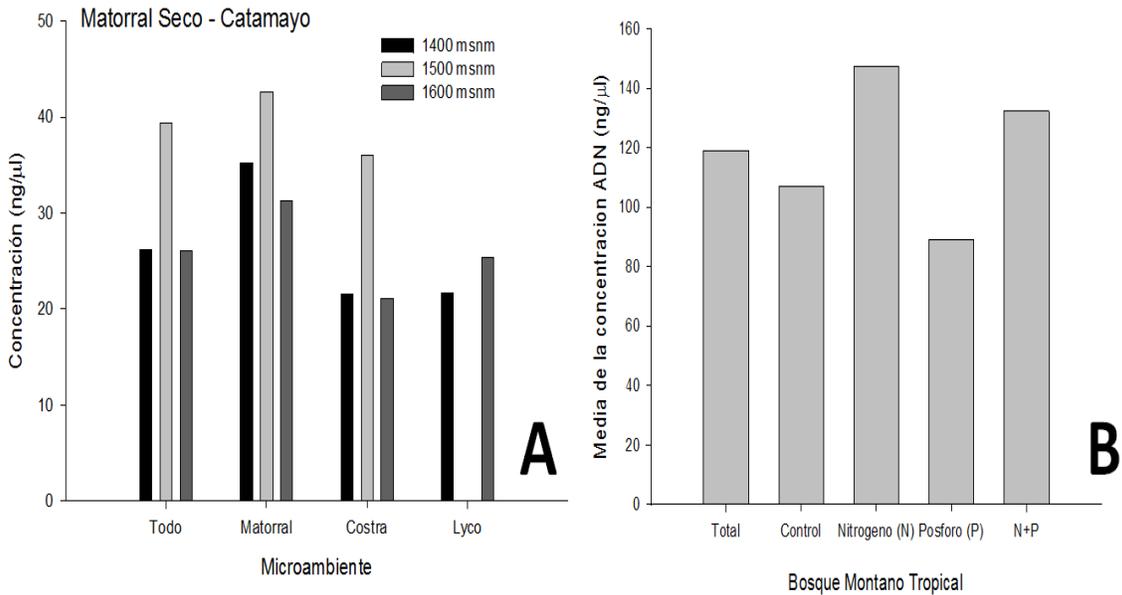


Figura 5. A) Media de las concentraciones de ADN por microambiente en el Matorral Seco de Alamala (Lyco = *Lycopodium*). Y **B)** Media de las concentraciones de ADN por tratamiento en el Bosque Montano Tropical.

Fuente 5. Autora

Al analizar las muestras obtenidas en Catamayo, sector de Alamala encontramos, como era de esperar, que muestras de suelo tomadas bajo el matorral tuvieron mayor concentración de ADN que en áreas desprovistas de vegetación o CBS. Estos resultados pueden entenderse como mayor biomasa de hongos bajo matorral que en CBS debido principalmente al aporte de hojarasca y por ende de MO al suelo (Figura 5A)

En los suelos de la ECSF, correspondiente al Bosque Montano Tropical podemos observar (Figura 5B) que la concentración de ADN es mayor en suelos con tratamiento de adición de Nitrógeno. Es altamente sorprendente que suelos con tratamiento de adición de Fósforo presenten menor concentración de ADN que los suelos donde no se adicionó ningún nutriente (Control) Esto puede deberse a una posible contaminación de suelos por exceso de fertilización, por ende disminución de la biomasa de microorganismo totales. Los suelos de la Reserva Ecológica de Arenillas fueron recogidos de manera aleatoria en un área de 9 ha; ningún tratamiento ni microambiente fue asignado para su análisis.

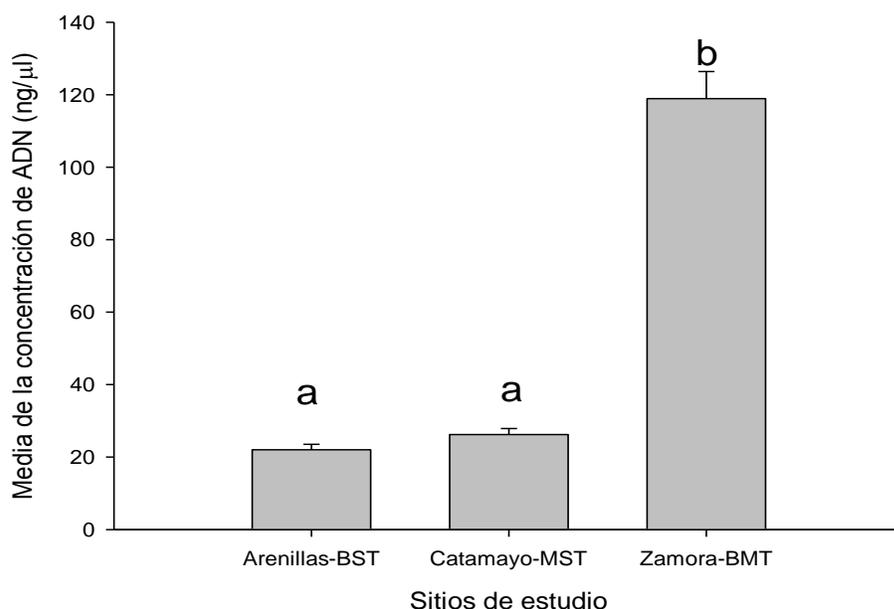


Figura 6. Media de la concentración de ADN por sitio de estudio. Arenillas-BST: Reserva Ecológica de Arenillas – Bosque Seco tropical; Catamayo-MST: Catamayo – Matorral Seco Tropical; Zamora-BMT: Zamora – Bosque Montano Tropical. Diferentes letras significan diferencias entre sitios de estudio ($n = 32$; $P < 0.01$)

Fuente 6: Autora

Una vez analizados los datos, encontramos diferencias significativas entre los sitios de estudios ($F_{2,30} = 186,380$, $P < 0.001$). La biomasa microbiana es notablemente mayor en el Bosque Montano Tropical en relación al Bosque Seco y al Matorral Seco. No se encontraron diferencias entre los dos ecosistemas secos aunque la biomasa es parcialmente mayor en el Matorral Seco (ver en la Figura 6).

3.3 Amplificación de fragmentos conservados, mediante PCR.

Las regiones amplificadas, mediante PCR fueron: ITS1-F (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) / 5.8s (CGC TGC GTT CTT CAT CG) ya que estos son primers específicos para hongos totales.

Las condiciones que modificamos y establecimos como óptimas para estandarizar el protocolo de la PCR fueron:

- i) Cloruro de magnesio ($MgCl_2$): $1\mu l$
- ii) Temperatura de anillamiento: $57^\circ C$
- iii) Tiempo de extensión en cada ciclo: 20 segundos
- iv) Tiempo de extensión final: 5 minutos

Estas condiciones optimizadas determinaron un mejor alineamiento de los primers, además que evitamos que se incremente la amplificación no específica de bandas (Williams, 1989). En la Figura 6., podemos observar las imágenes de los geles, en donde se ve el éxito de la amplificación en los tres zonas de estudio.

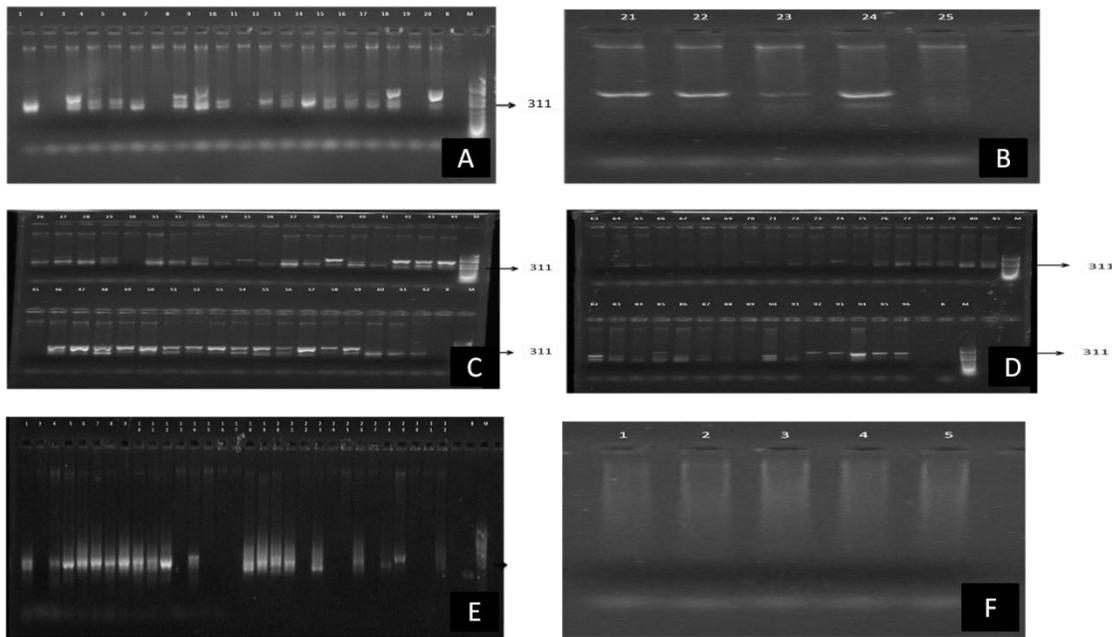


Figura 7. Producto de amplificación de regiones ITS-5.8s de hongos **A-B-C-D:** Alamala **E:** Arenillas **F:** ECSF
Fuente 7. Autora

El 75% de las muestras de Catamayo, sector Alamala, amplificaron y se pudieron visualizar mediante electroforesis en gel de agarosa, mientras que en Arenillas obtuvimos un 40 % de éxito de amplificación. Las muestras de la ESCF presentaron la mayor dificultad para ser visualizados mediante electroforesis.

3.4 Diluciones de ADN

Para mayor éxito de la amplificación del ADN y poder eliminar agentes inhibidores se realizaron diluciones (Figura 7): 1:2; 1:5; 1:10; 1:20; para cada tipo de muestras de suelo.

Las diluciones óptimas fueron:

- i) Catamayo, sector Alamala → 1:2
- ii) Arenillas → 1:5
- iii) ECSF → 1:20

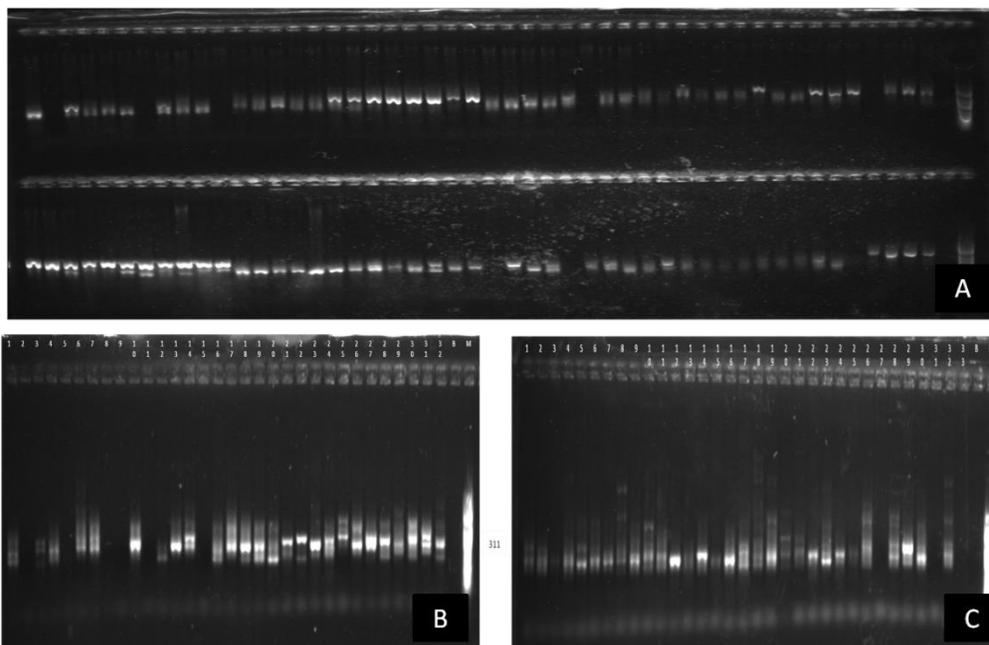


Figura 8. Producto de amplificación de regiones ITS-5.8s con diluciones de ADN **A:** Alamala **B:** Arenillas **C:** ECSF

Fuente 8. Autora

Amplificamos la región ITS-5.8s a partir de ADN total del suelo (diluido de acuerdo al sitio de estudio). La dilución óptima para Catamayo fue 1:2. Este resultado puede deberse a que las muestras presentan baja concentración y mayor pureza de ADN. La mayor dilución fue en las muestras de la ECSF, que fue 1:20 debido principalmente a que la concentración de ADN fue alta y la pureza de la muestra baja. Como podemos observar en la Figura 7, el 90% de las muestras de Catamayo y ECSF y el 80% de las muestras de Arenillas se amplificaron luego de la dilución.

En conclusión, luego de la dilución del ADN se obtuvo un alto porcentaje de amplificación en las diferentes áreas de estudio analizadas, lo que nos sugiere la importancia de establecer condiciones óptimas de la PCR dependiendo del tipo de suelo que se va a analizar.

CONCLUSIONES

- Las muestras de suelo obtenidas de la ECSF presentaron mayor concentración de ADN en relación a los otros dos sitios analizados. Dichas concentración varió en un rango de 41.3 a 211.6 (ng/μl), debido a que ECSF corresponde a un Bosque Montano Tropical, cuyos suelos presentan alto contenido de nutrientes y materia orgánica (MO) generando un ambiente óptimo para la proliferación de los microorganismos.
- En Catamayo, sector Alamala se obtuvo una buena calidad de ADN, su concentración de pureza se encuentra en los rangos aceptables, mientras que en el sector de la ECSF se encuentra un rango bajo de pureza, lo cual puede ser debido a la concentración de ácidos húmicos
- La concentración y pureza no se correlacionan en ninguno de los ecosistemas estudiados. No obstante, la mayoría de las muestras se encuentran entre el rango aceptable de pureza (1.8 - 2.0).
- Nuestros resultados sugieren que los microambientes y/o tratamientos evaluados, afectan las concentraciones de ADN encontradas.
- Las condiciones óptimas de amplificación de la región ITS-5.8s ADN debe establecerse de acuerdo al tipo de suelo que se va a estudiar. Los suelos no son iguales, por ende las condiciones para su amplificación no lo serán.
- Es importante optimizar las condiciones de la PCR (e.g. MgCl₂, Temperatura de anillamiento, tiempo de extensión y tiempo de extensión final) para poder obtener una mejor alineación de los primers, además que evitamos que se incremente la amplificación no específica de bandas.
- Para un mayor éxito en la amplificación del ADN y poder eliminar agentes inhibidores se realizaron diluciones debido a las diferencias en concentración y pureza de los 3 diferente tipos de suelos analizadas.
- Es recomendable hacer diluciones del producto de ADN para eliminar los agentes contaminantes (inhibidores de la PCR) cuando en el Nanodrop dé como resultado concentraciones de ADN muy elevadas.

- Las condiciones para PCR fueron estandarizadas para hongos totales presentes en los tres diferentes sitios de estudio. La amplificación fue exitosa luego de la dilución del ADN de los suelos.

RECOMENDACIONES

- Analizadas ya las muestras en el cuantificador, no es necesario realizar una electroforesis para verificar si existe ADN ya que con la cuantificación obtenemos rangos aceptables de pureza o contaminación de la muestra.
- Es recomendable luego de la extracción realizar la cuantificación del ADN y observar si se encuentra en los rangos aceptables para realizar la PCR, de lo contrario es factible realizar la extracción nuevamente.
- Si existe una elevada concentración de ADN, es importante realizar diluciones para poder disminuir agentes contaminantes.
- En aconsejable disminuir el volumen total de la PCR para economizar reactivos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, Z., Kvist, L.P. (2005). Floristic composition and conservation status of the dry forests in Ecuador. *Lyonia* 8:41 - 67.
- Aguirre, Z., Linares, P., Kvist, L.P. (2006). Especies leñosas y formaciones vegetales en los bosques estacionalmente secos de Ecuador y Perú. *Arnaldoa* 13:324-350.
- Ayra, L., Cabrera, I., Gómez, M., Hernández, D. (2001). Empleo de marcadores bioquímicos y de DNA en la caracterización molecular de hongos entomopatógenos. Dpto. de ácaros y hongos entomopatógenos, Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT). Habana.
- Belnap, J., & Garder, J. (1993). Soil microstructure in soils of the Colorado Plateau: The role of the cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. *Great Basin Naturalist* 53: 40-47.
- Belnap, J., & Ollange. (2003). Biological soil crust: Structure, function, and management. Springer- Verlag, Berlin.
- Best, B., Kessler, M. (1995). Biodiversity and Conservation in Tumbesian Ecuador and Peru. Pp.: 218 *BirdLife I. BirdLife International*, Wellbrook Court, Girton Road, Cambridge CB3 0NA, U.K.
- Bowker, M., Belnap, J., Davidson, D., Goldstein, H. (2006). Correlates of biological soil crust abundance across a continuum of spatial scales: support for a hierarchical conceptual model. *Journal of Applied Ecology* 43: 152-163.
- Burnett, J. (2003). *Fungal Populations & Species*. First published. Oxford University press. Great Britain. Pp:19-100, 239-262.
- Castillo-Monroy, A. P., Bowker, M. a., Maestre, F. T., Rodríguez-Echeverría, S., Martínez, I., Barraza-Zepeda, C. E., & Escolar, C. (2011). Relationships between biological soil crusts, bacterial diversity and abundance, and ecosystem functioning: Insights from a semi-arid Mediterranean environment. *Journal of Vegetation Science*, 22(1), 165–174. doi:10.1111/j.1654-1103.2010.01236.x
- Castillo-Monroy, A., Maestre, F. (2011). La costra biológica del suelo: Avances recientes en el conocimiento de su estructura y función ecológica. *Revista Chilena de Historia Natural* 84: 1-21.
- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa

(PCR) a tiempo real. Servicio de Microbiología. Hospital Clínica Provincial. Barcelona. España. Cap12.

Eckert, K., & Kunkel, A. (1991). DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *PCR Methods Appl.* 1: 17–24.

Espinosa, R. [1948–1949] 1997. *Estudios Botánicos en el Sur del Ecuador*. 2. ed. con prólogos por F. Vivar y B. B. Klitgaard. Gráficas Cosmos, Loja. 239 pp. Espinosa, C., Luzuriaga, A., Escudero, A., Alto, S. C., Champagnat, M., Luzuriaga, L., & Escudero, A. (2012). Bosques tropicales secos de la región Pacífico Ecuatorial: diversidad, estructura, funcionamiento e implicaciones para la, *21*, 167–179.

Fierer, N., Jackson, J., Vilgalys, R., & Jackson, R. (2005). Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays, *71*(7), 4117–4120. doi:10.1128/AEM.71.7.4117.

Gelfand, D., & White, T. (1990). *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press inc. pp: 129-141.

Gotsch, S., Powers, J., Lerda, M. (2010). Leaf traits and water relations of 12 evergreen species in Costa Rican wet and dry forests: patterns of intra-specific variation across forests and seasons. *Plant Ecology* 211:133-146.

Gutierrez, A., Honrubia, M., Morte, A., Díaz, G. (2002). Edible fungi adapted to arid and semi-arid areas. Molecular characterization and *in vitro* mycorrhization of micropropagated plantlets. Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. España.

Hibbett, D. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycological Research* 111: 509-547.

Holdridge, L. (1982). *Ecología basada en zona de vida*. Trad. del inglés por Jiménez H. Segunda reimpresión. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica.

Insua, A., López, M., Freire, R., Méndez, J. (2003). Sequence analysis in the ribosomal DNA internal transcribed spacer region in some scallop species (Mollusca:

Bivalvia: Pectinidae). Departamento de biología Celular y Molecular. La Coruña, España. Genome. Vol 46.

- Innis, M., Myambo, K., Gelfand, D., & Brow, M. (1988). DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9436-9440.
- Joergensen, P., & Ulloa, C. (1994). Seed plants of the High Andes of Ecuador – a checklist. *AAU Reports* 34: 1-443.
- Kessler, M. (1992). The Vegetation of South-West Ecuador. Best (ed.), *The Threatened Forest of South-West Ecuador*. Biosphere Publications, Leeds. Pp. 79-100 en B. J. Klug, W., Cummings, M., & Spencer, C. (2006). *Conceptos de genética*. Octava edición. Pearson Prentice Hall. España, 920pp.
- Lawyer, F., Stoffel, S., Saiki, R., Chang, S., Landre, P., Abramson, R., & Gelfand, D. (1993). High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl.* 2: 275-287.
- Lima, L., Rodal, M. (2010). Phenology and wood density of plants growing in the semi-arid region of northeastern Brazil. *Journal of Arid Environments* 74:1363-1373.
- Longley, M., Bennett, S., & Mosbaugh, D. (1990). Characterization of the 5' to 3' exonuclease associated with *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucl. Acids Res.* 18: 7317–7322.
- Lozano, C., Delgado, T., Z. & Aguirre, M. (2002). La flora endémica de plantas vasculares del Parque Nacional Podocarpus. Pp. 453–460 en Z. Aguirre M., J. E. Madsen, E. Cotton y H. Balslev (eds.), *Botánica Austroecuatorialiana — Estudios sobre los Recursos Vegetales en las Provincias de El Oro, Loja y Zamora-Chinchipe*. Ediciones Abya Yala, Quito.
- Maass, M., Burgos, A. (2011). Water Dynamics at the Ecosystem Level in Seasonally Dry Tropical Forests. En: Dirzo, R., Mooney, H., Ceballos, G., Young, H. (eds.). *Seasonally Dry Tropical Forests: Ecology and Conservation*, pp. 141-156. Island Press. Washington, DC 20009, USA.
- Madsen, E., Mix., & Balslev, H. (2001). *Flora of Puná Island — Plant Resources on a Neotropical Island*. Aarhus University Press, Aarhus. 289 pp.

- Madsen, J., & Ollgaard, B. (1994). Floristic composition, structure, and dynamics of an upper montane rain forest in southern Ecuador. *Nordic Journal of Botany* 14: 403–423.
- Maldonado, N. (2002). Clima y vegetación de la región sur del Ecuador. Pp. 1–28 en Z. Aguirre M, J. E. Madsen, E. Cotton y H. Balslev (eds.), *Botánica Austroecuatoriana — Estudios sobre los Recursos Vegetales en las Provincias de El Oro, Loja y Zamora-Chinchipe*. Ediciones Abya Yala, Quito.
- Murphy, P., Lugo, A. (1986). Ecology of Tropical Dry Forest. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 17:67- 88.
- Neill, D. (1999). Geografía de Ecuador. Pp. 2–5 en P. Jørgensen y S. León-Yáñez (eds.), *Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 75.
- Newton, C. (1995). PCR Essencial data. John Wiley and Sons Ltd published in association with Bios Scientific Publishers Ltd, Ucrania. Pp: 72-86; 99-120.
- Palacios, W. (1995). Cuenca del Río Nangaritzza (Cordillera del Cóndor) una Zona para Conservar. Herbario Nacional del Ecuador, QCNE, Quito.
- PDOT ZCH. (2010). Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial de la Provincia de Zamora Chinchipe. Gobierno Autónomo Provincial de Zamora Chinchipe.
- Peintnen, U., Moncalvo, J., Vilgalys, R. (2004). Toward a better understanding of the infrageneric relationships in *Cortinarius* (Agaricales, Basidiomycota). *Mycologia*, 96(5):1042-1058.
- Rentaría, M. (2007). Herramientas Moleculares. Breve revisión de los marcadores moleculares. Cap. 18. Pag. (541-566).
- Rivera, G. (2006). Bacterias presentes en el sistema vascular de algunos cítricos en Puerto Rico. Tesis doctoral. Recinto Universitario de Mayaguez. Universidad de Puerto Rico.
- Said, N., Fernández, J., Acevedo, E. (2007). Aplicación de técnicas de Biología molecular y análisis bio-informático en la tipificación de levaduras nativas procedentes de diversos ambientes. Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica.
- Sierra, R. (1999). Propuesta preliminar de un sistema de clasificación de vegetación para el Ecuador continental. 2da. Impresión (2001). Proyecto INEFAN/GEF y EcoCiencia. Quito.

- Surzycki, S. (2000). Basic Techniques in Molecular Biology. Department of Biology Indiana University. Springer lab manual. . Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp: 406-420.
- Van der Heidjen, M., & Sanders, I. (2002). Mycorrhizal ecology. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. Pp: 135-153.
- Watson, J., & Crick, F. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171** (4356): 737–738.
- West, N. (1990). Structure and function of mycophytic soil crusts in wildland ecosystems of arid to semi-arid regions. *Advances in Ecological Research* 20: 179-223.
- Wilcke, W., Yasin, S., Abranowski, U., Valarezo, C., & Zech, W. (2002). Nutrient storage and turnover in organic layers under tropical montane rain forest in Ecuador. *European Journal of Soil Science*: 53, pp. 15 – 27.
- Williams, J. (1989) Optimization strategies for the polymerase chain reaction. *Biotechniques*. 7: 762–769.

ANEXO

Anexo 1. Datos de Cuantificación de ADN de las 160 muestras de estudio.

POBLACIONES											
Alamala				Arenillas				ECSF			
Codigo	(ng/μl)	260/280	260/230	Codigo	(ng/μl)	260/280	260/230	Codigo	(ng/μl)	260/280	260/230
AL1A1	44,5	2,00	1,55	1	15,4	1,74	0,78	1	118,9	1,75	1,76
AL1A2	25,5	1,84	1,04	2	30,1	1,79	1,14	2	211,6	1,57	1,01
AL1A3	39,8	1,98	1,62	3	29,6	1,63	0,81	3	148,5	1,78	1,48
AL1A4	37,7	1,95	1,58	4	36,4	1,85	1,22	4	94,7	1,79	1,38
AL1A5	33,6	2,04	1,56	5	26,6	1,83	1,15	5	128,6	1,71	1,32
AL1B1	23,1	2,03	1,38	6	16,0	1,91	1,09	6	51,6	1,78	1,42
AL1B2	44,4	1,82	1,21	7	16,3	1,93	1,11	7	79,4	1,74	1,38
AL1B3	40,4	2,02	1,52	8	15,5	1,82	0,96	8	148,0	1,70	1,25
AL1B4	35,5	2,01	1,62	9	14,8	1,79	0,88	9	110,2	1,69	1,23
AL1B5	34,5	1,99	1,58	10	14,0	1,81	0,79	10	87,0	1,74	1,41
AL1C1	51,0	1,77	1,25	11	17,6	1,79	1,02	11	198,8	1,49	0,85
AL1C2	41,0	1,91	1,45	12	15,3	1,72	0,98	12	116,8	1,76	1,37
AL1C3	30,9	1,95	1,45	13	34,9	1,72	1,11	13	58,3	1,78	1,33
AL1C4	39,0	1,89	1,54	14	22,8	1,81	1,17	14	41,3	1,82	1,42
AL1C5	28,1	1,91	1,44	15	30,7	1,79	1,17	15	147,0	1,70	1,14
AL1D1	26,9	1,89	1,49	16	18,5	1,66	0,89	16	186,9	1,85	1,73
AL1AM1	53,2	1,89	1,64	17	38,1	1,82	1,40	17	109,9	1,83	1,67
AL1AM2	38,3	1,92	1,51	18	15,0	1,95	1,07	18	141,0	1,86	1,77
AL1AM3	37,9	1,87	1,58	19	28,9	1,92	1,35	19	145,4	1,85	1,72
AL1AM4	69,1	1,87	1,71	20	17,0	1,88	1,14	20	108,0	1,81	1,48
AL1AM5	48,7	1,94	1,65	21	8,5	1,96	0,72	21	109,0	1,77	1,54
AL1BM1	30,5	1,95	1,54	22	21,4	1,54	0,77	22	129,8	1,62	1,35
AL1BM2	52,4	1,93	1,71	23	10,2	1,99	0,90	23	193,2	1,84	1,83
AL1BM3	35,9	1,94	1,55	24	21,0	1,61	0,84	24	131,8	1,82	1,74
AL1BM4	40,3	1,92	1,63	25	32,4	1,68	0,83	25	59,4	1,72	1,35
AL1BM5	39,7	1,93	1,57	26	14,5	1,73	0,82	26	87,6	1,79	1,43
AL1CM1	43,6	1,94	1,62	27	39,4	1,51	0,70	27	134,8	1,82	1,73
AL1CM2	35,2	1,97	1,49	28	17,6	1,82	0,89	28	111,3	1,80	1,58
AL1CM3	27,4	1,96	1,42	29	27,9	1,91	1,45	29	100,6	1,81	1,70
AL1CM4	49,9	1,77	1,23	30	16,1	1,74	0,94	30	88,7	1,87	1,59
AL1CM5	44,4	1,93	1,57	31	28,3	1,66	0,96	31	78,6	1,78	1,44
AL1DM1	35,8	1,95	1,54	32	13,5	1,86	1,10	32	148,7	1,82	1,68
AL2A1	15,9	1,88	1,14								
AL2A2	14,9	1,81	1,09								
AL2A3	10,5	1,95	0,98								
AL2B1	12,2	1,71	0,74								
AL2B2	40,3	1,95	1,57								

AL2B3	25,3	1,88	1,40
AL2C1	22,4	1,89	1,32
AL2C2	30,7	1,85	1,19
AL2C3	22,3	1,96	1,23
AL2AM1	22,2	1,96	1,31
AL2AM2	31,8	1,95	1,42
AL2AM3	25,2	1,97	1,23
AL2BM1	38,9	1,82	1,31
AL2BM2	33,2	1,98	1,43
AL2BM3	45,8	1,95	1,56
AL2CM1	38,9	1,96	1,53
AL2CM2	43,0	1,95	1,54
AL2CM3	37,8	1,91	1,49
AL2AL1	19,0	1,92	1,20
AL2AL2	13,4	1,95	0,96
AL2AL3	18,7	2,00	1,21
AL2BL1	17,9	2,04	0,88
AL2BL2	28,3	1,98	1,23
AL2BL3	25,2	1,90	1,23
AL2CL1	38,3	1,94	1,48
AL2CL2	18,5	2,02	1,13
AL2CL3	16,0	2,03	1,11
AL3A1	26,5	1,98	1,31
AL3A2	28,7	2,03	1,60
AL3A3	17,8	2,05	1,14
AL3A4	23,9	1,95	1,41
AL3A5	36,0	1,98	1,63
AL3B1	26,7	1,97	1,64
AL3B2	14,6	2,05	1,17
AL3B3	14,2	2,00	1,14
AL3B4	13,9	2,09	1,32
AL3B5	22,8	2,01	1,50
AL3C1	11,2	2,03	1,23
AL3C2	19,9	2,09	1,32
AL3C3	19,0	2,08	1,32
AL3C4	27,4	1,99	1,40
AL3C5	16,8	1,98	1,18
AL3D1	19,0	1,99	1,34
AL3AM1	28,2	1,99	1,51
AL3AM2	32,2	1,95	1,44
AL3AM3	29,3	2,01	1,55
AL3AM4	44,7	1,95	1,63
AL3AM5	33,7	2,02	1,51
AL3BM1	42,6	1,91	1,70

AL3BM2	41,2	1,91	1,65
AL3BM3	41,4	1,89	1,70
AL3BM4	24,4	1,89	1,58
AL3BM5	24,4	1,84	1,45
AL3CM1	42,1	1,90	1,67
AL3CM2	22,3	1,95	1,48
AL3CM3	21,9	1,87	1,48
AL3CM4	17,1	1,95	1,32
AL3CM5	34,7	1,90	1,66
AL3DM1	19,9	2,04	1,26
AL3CL1	25,7	1,97	1,44
AL3CL2	18,4	2,02	1,19
AL3CL3	51,0	1,96	1,68
AL3CL4	11,3	2,17	1,01
AL3CL5	20,3	1,93	1,26

Valores de relación $260/280 = 1.8 - 2.0$ (ADN/proteínas) y $260/230 = 2.0 - 2.2$ (ADN y solventes orgánicos) que aportan información sobre pureza del producto.