

## PUESTA A PUNTO DE UNA TÉCNICA MOLECULAR PARA EL ESTUDIO DE HONGOS Y BACTERIAS TOTALES DE SUELO EN ECOSISTEMAS TROPICALES DEL SUR DE ECUADOR

ANDREA P CASTILLO-MONROY\*; AMINAEI SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ; AUGUSTA CUEVA & MAYRA ORELLANA ORDOÑEZ

NOTA

Recibido: 20-11-14

Recibido con revisiones: 24-05-15

Aceptado: 10-09-15

### RESUMEN

Se optimizó un protocolo para la amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), del ADN de hongos y bacterias totales como punto base en el estudio molecular de las comunidades microbianas del suelo presentes en tres ecosistemas evaluados; Bosque seco tropical (BST), Matorral seco tropical (MST) y Bosque montano tropical (BMT). Estos ecosistemas son de gran interés biológico debido a su alta biodiversidad y a que han sido reconocidos dentro de los hábitats más amenazados del mundo. Se aisló ADN de muestras de suelo y se amplificó parte de la región conservada en los genomas de hongos y bacterias totales (ITS F-1 - 5.8S y EUB338 - EUB 518; respectivamente). Se estudió el efecto de diversos parámetros en 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 por cada tipo de suelo; 1:2, 1:5, 1:20 de ADN (MST, BST y BMT, respectivamente). Además, la eficiencia también se vio incrementada cuando determinamos un óptimo de concentración de  $MgCl_2$  y temperatura de anillamiento por tipo de suelo. La concentración media de ADN obtenido varió entre ecosistemas siendo mayor en las muestras del BMT. Ello refleja la presencia de mayor biomasa microbiana en los suelos de este ecosistema comparado con el BST y MST. Nosotros concluimos que extrapolar parámetros de un suelo a otro puede generar errores que afectan la eficiencia de la PCR. Así, nuestros resultados sugieren que es necesario hacer una optimización de varios parámetros de la PCR teniendo en cuenta el tipo de suelo y la región conservada del genoma que se desea amplificar. Además, pudimos verificar que la concentración de ADN es una variable consistente para estimar y comparar la biomasa microbiana de suelos en ecosistemas contrastados.

**Palabras clave.** PCR, ecosistema seco tropical, bosque montano tropical, concentración de ADN.

## OPTIMIZATION OF A MOLECULAR TECHNIQUE FOR THE CHARACTERIZATION OF BACTERIAL AND FUNGAL SOIL COMMUNITIES IN TROPICAL ECOSYSTEMS IN SOUTHERN ECUADOR

### ABSTRACT

A protocol for molecular characterization of soil microbial communities of tropical ecosystems (Tropical Dry Forest, TDF; Tropical Dry Scrub, TDS and Tropical Montane Forest, TMF) in southern Ecuador, was optimized. These ecosystems were selected due to their great biological interest, its high biodiversity and its vulnerability. Total genomic DNA from soil samples was isolated and then a polymerase chain reaction (PCR) was performed in order to amplify conserved regions of fungal and bacterial genome (using universal primers; ITS F-1 - 5.8S, EUB338 - EUB 518; fungal and bacteria; respectively). We evaluated the effect of some parameters to reach the maximum efficiency of PCR. The results suggest 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 TDS, TDF, and TMF respectively. Furthermore, the efficiency was increased when we determined the optimal concentration of  $MgCl_2$  and optimal annealing temperature for every soil type. The obtained average DNA concentration varies between ecosystems, being higher in the samples from TMF. This reflects the presence of higher microbial biomass in soils of this ecosystem compared to TDF and TDS. We, conclude that extrapolating parameters from one soil type to another which affect the PCR efficiency may result in errors. Our results suggest that it is necessary to standardize various parameters, taking into account the soil type and the conserved region of the genome to be amplified. Besides, we could verify that DNA concentration could be a consistent variable to estimate or compare the microbial biomass in different soil types.

**Key words.** PCR, tropical dryland ecosystem, tropical montane forest, DNA concentration.

Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Técnica Particular de Loja, San Cayetano Alto, Loja, Ecuador;

\*Autor de contacto: apcastillo4@utpl.edu.ec\*, asanchez2@utpl.edu.ec, acueva@utpl.edu.ec, mlorellana@utpl.edu.ec.

## INTRODUCCIÓN

La región sur de Ecuador es de gran interés biológico pese a que solo representa el 15% del territorio nacional. Dicho interés viene dado por la presencia de una gran diversidad de ecosistemas, climas, pisos altitudinales y un alto grado de endemismo (Myers *et al.*, 2000; Brehm *et al.*, 2005). Entre los ecosistemas más diversos de la región tenemos el Bosque Montano Tropical (BMT), el Bosque Seco Tropical (BST) y el Matorral Seco Tropical (MST). El BMT ha sido uno de los más estudiados en las últimas décadas, del cual se reporta una alta biodiversidad, especialmente de plantas vasculares (Barthlott *et al.*, 1996). El BST, aunque menos estudiado, es casi tan diverso como el BMT (Aguirre & Kvist, 2005; Espinosa *et al.*, 2011; Jara-Guerrero *et al.*, 2011; 2015). El MST ha sido poco estudiado en la región; sin embargo, algunas investigaciones realizadas en MST reportan que este ecosistema, contra todo pronóstico, presenta una alta diversidad (Espinosa *et al.*, 2013a; 2013b). De estos tres ecosistemas, BMT y BST han sido reconocidos como uno de los hábitat más amenazados del mundo (Fajardo *et al.*, 2005) y sólo una pequeña parte de estos ecosistemas está bajo una figura de protección (Miles *et al.*, 2006). El MST por su parte, está siendo objeto de una presión antrópica sin precedentes, esto sumado al desconocimiento de su ecología (sin embargo revisar Espinosa *et al.*, 2013a; 2013b), lo convierte en un ecosistema en peligro de extinción. Además, los tres ecosistemas antes mencionados sufren una alta tasa de deforestación, o están en peligro de sufrirla no sólo en Ecuador, sino también en otras partes de América del Sur, principalmente por la conversión de la vegetación natural en áreas de pastoreo (FAO, 2009). Es por ello que resulta una prioridad acelerar la descripción y caracterización de los mismos para proponer estrategias adecuadas para su conservación y manejo.

Dada la importancia que tienen los ecosistemas en cuestión, es necesario comenzar, o continuar, estudios de biodiversidad y funcionamiento, no solo a nivel superficial como se ha venido haciendo hasta la fecha (*e.g.*, composición florística; Aguirre & Kvist, 2005), sino también a nivel subsuperficial, entendiéndose como el estudio de las comunidades microbianas del suelo. Estas comunidades son responsables de una parte importante de los ciclos biogeo-químicos, y por lo tanto, influyen significativamente en el funcionamiento de los ecosistemas (Nannipieri *et al.*, 2003; van der Heijden *et al.*, 2008).

El desarrollo de técnicas moleculares ha posibilitado el estudio de comunidades microbianas antes inexploradas

(Eldor, 2007; Miki *et al.*, 2014), las cuales presentan ventajas sobre otros métodos tradicionales debido a que reduce el tiempo necesario para procesar una muestra (*e.g.*, crecimiento de microorganismos en un medio de cultivo), y aumenta la capacidad de resolución. Únicamente el 1% de los microorganismos del suelo son cultivables (Torsvik *et al.*, 1990; Øvreås, 2000) por lo que los métodos tradicionales no permiten llegar a resultados representativos de la situación real de los suelos (Eldor, 2007). Así, los métodos moleculares, que no requieren necesariamente del crecimiento previo de microorganismos del suelo en condiciones *in vitro*, se han establecido como una herramienta básica en el estudio de comunidades microbianas por su alto nivel resolutivo (Lynch *et al.*, 2004; Miki *et al.*, 2014). Estos análisis consisten principalmente en la extracción de ADN directamente de muestras de suelo y la amplificación de regiones específicas en los genomas (*e.g.*, hongos y bacterias) mediante la técnica de PCR (por sus siglas en inglés- *Polymerase Chain Reaction*), con el fin de obtener una estimación de la diversidad microbiana del suelos. No obstante, la extracción de ADN de los suelos resulta frecuentemente inadecuada para la lisis de las células microbianas, así como también para la eliminación de los ácidos húmicos (AH) debido a que evitan la correcta hibridación de oligonucleótidos al ADN molde e inhiben la amplificación de la PCR. Las muestras procesadas pueden ser influenciadas por los grupos fenólicos de los AH, los cuales desnaturalizan proteínas por la unión de amidas. Además, dichos grupos se pueden oxidar para formar quinonas que inactivan la polimerasa (Kontanis & Reed, 2006; Lakay *et al.*, 2007). Así, para buscar un óptimo rendimiento y la máxima eficiencia de la extracción y amplificación del ADN de microorganismos del suelo, es de vital importancia considerar los siguientes factores: i) eficiencia de la lisis celular; la cual es realizada por rotura mecánica (trituración), agentes químicos (detergentes) o digestión enzimática (proteinasas K), que aseguran la ruptura de las estructuras celulares resistentes. ii) eliminación de sustancias contaminantes (*e.g.*, AH) que son extraídas junto con los ácidos nucleicos e interfieren con el subsecuente análisis molecular (O'Donnell *et al.*, 1999), iii) concentración de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) que determina la capacidad de acción de la polimerasa, e inactiva o reduce la fiabilidad de copiado dependiendo de su exceso o su ausencia en la reacción final de la PCR (Eckert & Kunkel, 1991) y iv) temperatura de anillamiento (T<sub>a</sub>) que permite que los oligonucleótidos se asocien, de manera estable, con el ADN molde para estimular la acción de la polimerasa. Entre estos factores, el primero se puede controlar escogiendo un adecua-

do sistema comercial de extracción de ADN, que asegure una eficiente ruptura celular, remueva inhibidores de la PCR y el color oscuro de las muestras de suelos, no igual con los otros factores que requieren de una evaluación experimental. Dichos factores en conjunto cobran mayor importancia cuando se analizan suelos de ecosistemas con características marcadamente diferentes como los del presente estudio. Así, nuestro objetivo fue poner a punto un protocolo para la amplificación adecuada de hongos y bacterias totales, como punto base en el estudio molecular de las comunidades del suelo presentes en los tres ecosistemas evaluados; bosque seco tropical, bosque montano tropical, y matorral seco tropical del sur de Ecuador. Nosotros entonces hipotetizamos que es posible aumentar el éxito de la PCR en suelos provenientes de ecosistemas contrastados si se controlan adecuadamente los factores como: lisis celular, sustancias contaminantes,  $MgCl_2$  y temperatura de anillamiento.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

El presente trabajo se realizó en Catamayo (Alamala; AL), Arenillas (Reserva Ecológica de Arenillas; REA) y Zamora (Estación Científica de San Francisco; ECSF) correspondientes a las provincias de Loja, El Oro y Zamora Chinchipe respectivamente (Fig. 1). AL está clasificado como MST. Presenta un clima subtropical (cálido-seco a muy seco), con una temperatura media anual de 27 °C. La precipitación media anual es de 388 mm año<sup>-1</sup> (Sierra, 1999) y la elevación de aproximadamente 1600 m snm. La época seca va desde mayo a enero y la temporada lluviosa generalmente de febrero a abril (Espinosa *et al.*, 2013a). La cobertura de vegetación sucede en forma de parches dentro de una matriz de suelo desprovista de vegetación y costra biológica del suelo (Castillo-Monroy, com. pers.). Una especie del género *Croton* (Euphorbiaceae) se destaca como la especie arbustiva más abundante en la zona. REA por su parte corresponde a un remanente de BST muy bien conservado y representa un área importante

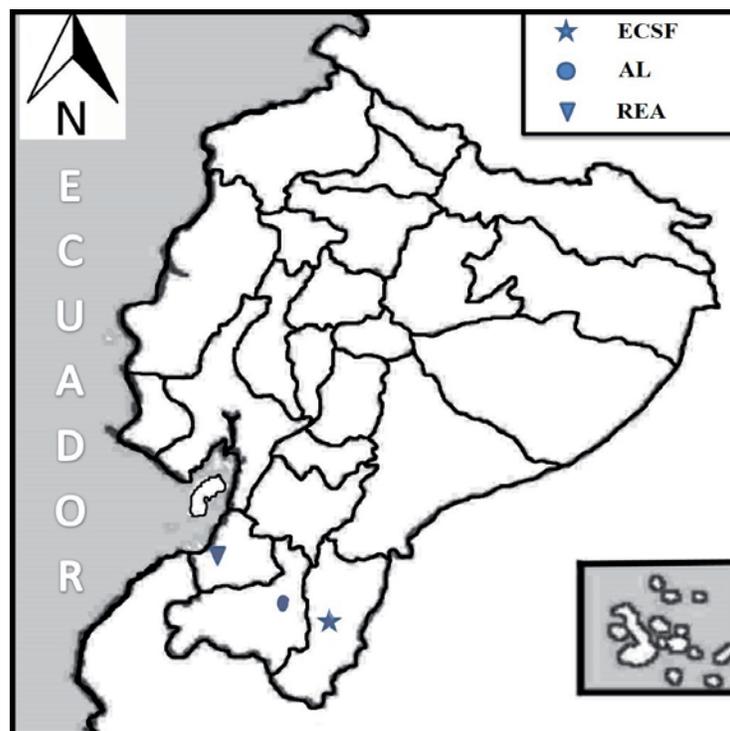


Figura 1. Localización de las zonas de estudio. ECSF: Estación científica de San Francisco, correspondiente al Bosque montano tropical. AL: Catamayo, sector Alamala, correspondiente al Matorral seco tropical y REA: Reserva ecológica de Arenillas, correspondiente al Bosque seco tropical.

Figure 1. Study area and location of the sampling sites. ECSF: Estación científica de San Francisco, corresponding to Tropical montane forest. AL: Catamayo, sector Alamala, corresponding to Tropical dry scrub and y REA: Reserva ecológica de Arenillas, corresponding to Tropical dry forest.

de endemismo en el mundo (Best & Kessler, 1995). Presenta una temperatura media anual de 23 °C, precipitación media anual de 300 mm año<sup>-1</sup> (Aguirre & Kvist, 2005) y elevación de aproximadamente 50 m snm. Su clima está caracterizado por una estación extremadamente seca de mayo a noviembre y una estación lluviosa de diciembre a abril (Aguirre & Kvist, 2005). ECSF se encuentra bordeada por el Parque Nacional Podocarpus y corresponde a un BMT bien conservado. Tiene una temperatura media anual de 16 °C, precipitación media anual de 2500 mm año<sup>-1</sup> y elevación de 2000 m snm. Debido a las fuertes pendientes que presenta esta vertiente, los suelos son muy frágiles y sensibles a la erosión hídrica y son altamente heterogéneos (Wilcke *et al.*, 2002). El color predominante, en el horizonte superficial de los suelos de la ECSF, es oscuro y el contenido de materia orgánica es 103,18 mg g<sup>-1</sup> de suelo. En REA y AL predominan colores claros y el contenido de materia orgánica es 31,31 y 42,29 mg g<sup>-1</sup> de suelo, respectivamente (Castillo-Monroy, com. pers.).

### Diseño experimental y muestreo

Se recolectaron 32 muestras de suelos en cada uno de los tres sitios muestreados bajo un diseño completamente al azar. Todas las muestras se tomaron a 8 cm de profundidad con ayuda de una sonda de suelo. Posteriormente fueron almacenadas en bolsas plásticas previamente etiquetadas y enviadas al laboratorio de la Universidad Técnica Particular de Loja en donde fueron conservadas a -80 °C hasta su procesamiento.

### Extracción de ADN

El ADN total, de las muestras de suelo (1,0 g independientemente del ecosistema evaluado) previamente descongeladas, fue extraído utilizando un sistema comercial, PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories Inc., CA USA) según las instrucciones del fabricante. Este sistema de extracción fue seleccionado por que garantiza una eficiente ruptura de las estructuras celulares resistentes (lisis celular) además de incluir un procedimiento patentado que remueve inhibidores de la PCR y el color oscuro de las muestras (presentes principalmente en los suelos de la ECSF). En general, 5 mL de cada extracción fueron visualizados en una cámara de electroforesis en un gel de agarosa al 1%, disuelto en buffer TBE 1X Trisborato, EDTA. La cuantificación del ADN fue realizada en un espectrofotómetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 260 nm. La pureza del ADN se determinó estableciendo la relación de absorbancia A260/A280 para todas las muestras entre un rango de 1,8-2,0. Valores fuera de este rango indican presencia de contaminantes como ácidos húmicos, proteína y/o fenoles. La concentración de ADN fue tomada como indicativo de la biomasa del suelo (Kowalchuk *et al.*, 2003).

### Amplificación de regiones conservadas en los genomas de hongos totales

Se utilizó 1 µL de ADN genómico como molde independiente

de su concentración. Se realizó una mezcla 24 µL de volumen de reacción que contenía: 5 µL de tampón de PCR, 0,5-1,5 µL de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µL de dNTPs, 0,25 µL del oligonucleótido directo, 0,25 µL del oligonucleótido reverso y 0,25 µL de polimerasa GoTaq™ Flexi (Promega, CO, USA).

El programa de amplificación en termociclador fue: un ciclo de desnaturalización inicial de 94 °C (9 min), seguido de 40 ciclos de 94 °C (45 seg) 53-59 °C (45 seg), 72 °C (20 seg), y un ciclo final de extensión de 72 °C por 5 min (Veriti 96wel Thermal Cycler, Applied Biosystems). La amplificación se llevó a cabo con los siguientes oligonucleótidos: ITSF-1 (TCCGTA GGT GAACT GCG C) y 5.8S (CGC TGC GTT CTT CAT CG; Invitrogen) específicos para la región conservada ITS-5.8S de aproximadamente 500 pb. Sin embargo, la longitud de dicha región puede variar significativamente entre diferentes cepas de hongos. La selección de dichos oligonucleótidos se realizó de acuerdo a lo reportado por Fierer *et al.* (2005). Cada producto amplificado fue visualizado en una cámara de electroforesis en un gel de agarosa al 1% disuelto en buffer TBE 1X Trisborato, EDTA.

### Amplificación de regiones conservadas en los genomas de bacterias totales

Se realizó una mezcla de reacción de 25 µL que contenía: 1 µL de ADN genómico independiente de su concentración, 5 µL de buffer de PCR, 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µL de dNTPs, 0,25 µL del oligonucleótido sentido, 0,25 µL del oligonucleótido contra sentido y 0,25 µL de Taq polimerasa.

El programa de amplificación en termociclador fue: 94 °C (9 min), seguido de 40 ciclos de 94 °C (45 seg), 53-57 °C (45 seg), 72 °C (20 seg), y un segmento final de extensión de 72 °C por 5 min (Veriti 96wel Thermal Cycler, Applied Biosystems). La amplificación se llevó a cabo con el par de oligonucleótidos; EUB338 (ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG) y EUB518 (ATT ACC GCG GCT GCT GG; Invitrogen), para amplificar una región conservada de 200 pb del gen 16S rRNA a partir de todos los genomas de bacterias presentes en las muestras. Dichos oligo-nucleótidos fueron seleccionados de acuerdo a lo reportado por Fierer *et al.* (2005). Cada producto amplificado fue visualizado en una cámara de electroforesis en un gel de agarosa al 1% disuelto en buffer TBE 1X Trisborato, EDTA.

### Puesta a punto de algunos parámetros de la PCR

i) Concentración de MgCl<sub>2</sub>: Realizamos un experimento para determinar la concentración adecuada de MgCl<sub>2</sub> con el fin de evitar la formación de dímeros de oligonucleótidos, es decir, de productos inespecíficos que pueden repercutir en el rendimiento de la PCR, así como en la especificidad del producto esperado. Se utilizó el siguiente rango: 0,5-1,0-1,5 µL (volumen final) correspondientes a 0,25-0,5-0,75 mM de MgCl<sub>2</sub> (concentración final), respectivamente y se utilizaron las muestras de suelo de los tres ecosistemas evaluados. ii) Temperatura

de anillamiento (Ta): Con el fin de evitar eventos de inespecificidad en la hibridación de los oligonucleótidos o un rendimiento de la amplificación muy bajo, se determinó la Ta óptima de los fragmentos conservados del genoma de hongos totales mediante un experimento de gradiente utilizando las siguientes temperaturas: 53 °C, 55 °C, 57 °C, 58 °C y 59 °C. Para determinar la Ta óptima de los fragmentos conservados del genoma de bacterias, se probaron las siguientes temperaturas: 53 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C y 57 °C y iii) Eliminación de agentes contaminantes: Con el fin de comprobar el efecto de la concentración inicial de ADN sobre la eficiencia de la PCR se experimentó con las siguientes diluciones del ADN molde en función de los tres tipos de suelo evaluados: 1:2; 1:5; 1:10; 1:20 y 1:50; ADN:H<sub>2</sub>O.

La concentración de ADN de los suelos de los tres ecosistemas fue evaluada mediante un análisis de varianza (ANVA). Cuando hubo diferencias significativas con el ANVA los promedios se compararon con la prueba de Tukey. Los datos se transformaron a logaritmos para ajustarlos a la distribución normal cuando se requirió (Sokal & Rohlf, 1995) y se presentan en su escala original de medición. Todos los análisis se realizaron en el programa SPSS versión 15 y los promedios se consideraron significativamente diferentes con  $P \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

### Cuantificación de ADN

Las muestras de suelo obtenidas de la ECSF presentaron mayores valores de concentración de ADN en relación a los otros sitios de muestreo (*i.e.*, Al y REA; Fig. 2). Dichos valores variaron en un rango de 41,3 a 211,6 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . A su vez, el 30% de las muestras presentaron una relación de absorbancia A260/A280 menor de 1,8. En las muestras de suelo de Al las concentraciones obtenidas fueron más bajas (8,5 a 39,4 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ), en relación a las muestras de suelo de la REA, con valores de 10,5 a 69,1 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . En general, el ADN obtenido para estos dos sitios muestreados fue de buena calidad; la casi totalidad de las muestras de suelos de Al y REA se encontraron dentro del rango de pureza (*i.e.*, 1,8-2,0).

### Efecto de la concentración de MgCl<sub>2</sub> sobre la eficiencia de la PCR

Del rango de MgCl<sub>2</sub> utilizado para mejorar la amplificación del fragmento conservado en los genomas de hongos totales, obtuvimos 0,5 mM como la concentración donde

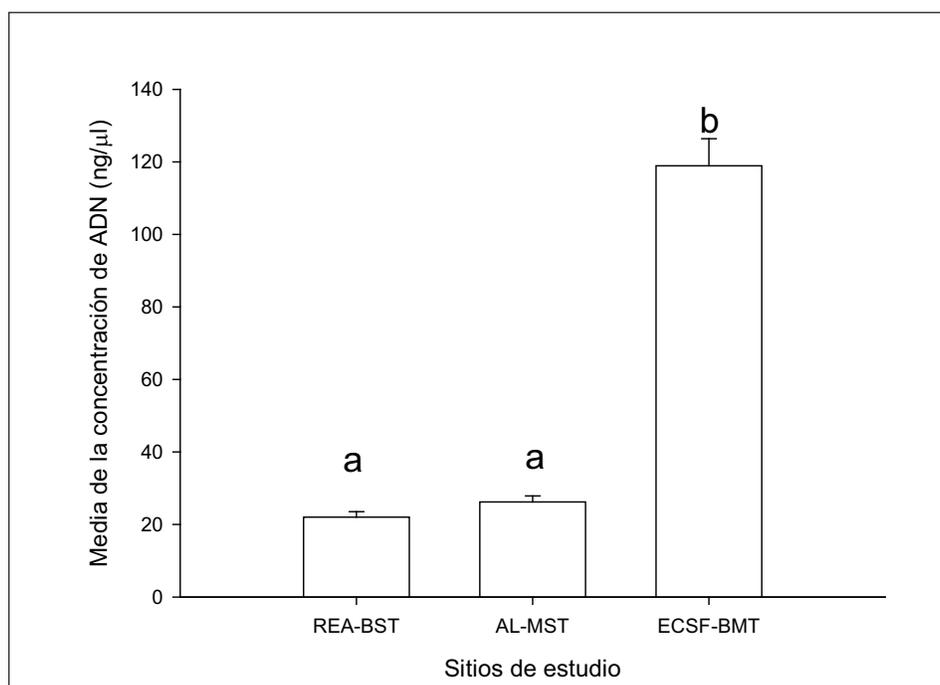


Figura 2. Biomasa microbiana expresada como concentración de ADN (ng/ $\mu\text{L}$ ) para los sitios de estudio. REA-BST: Reserva ecológica de Arenillas – Bosque Seco Tropical; AL-MST: Catamayo, sector Alamala-Matorral Seco Tropical; ECSF-BMT: Estación Científica de San Francisco-Bosque Montano Tropical. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los sitios ( $p < 0.05$ ;  $n = 32$ ).

Figure 2. Microbial biomass expressed as DNA concentration (ng/ $\mu\text{L}$ ) in the three studies site. REA-BST: Reserva ecológica de Arenillas – Tropical dry forest; AL-MST: Catamayo, sector Alamala-Tropical dry scrub; ECSF-BMT: Estación Científica de San Francisco-Tropical montane forest. Different superscript indicate significance differences between sites after one-way Anova ( $p < 0.05$ ;  $n = 32$ ).

la visualización del producto específico fue más intenso y sin bandas inespecíficas (Fig. 3), es decir bandas cuyas tallas difirieran significativamente del tamaño esperado de 500 pb. Este procedimiento no se realizó para bacterias totales ya que una vez realizada la amplificación, las bandas obtenidas fueron suficientemente intensas y no se observaron productos inespecíficos, por lo que la concentración de  $MgCl_2$  recomendada por el fabricante (0,75 mM) del kit de PCR fue seleccionada.

#### Efecto de la Ta sobre la eficiencia y especificidad de la PCR

Del gradiente de Ta utilizado en la amplificación del fragmento conservado del genoma de hongos totales, se seleccionó 57 °C como Ta (Fig. 4A) en la cual las bandas fueron más intensas (*i.e.*, mejor amplificación del producto), mientras que para los fragmentos conservados en genomas de bacterias totales, la Ta fue menor, 55 °C (Fig. 4B).

#### Efecto de la dilución de ADN sobre la eficiencia de la PCR

Una vez amplificado los fragmentos de los genomas de hongos y bacterias totales, la eficiencia de la PCR no fue la que esperábamos: el 75% de las muestras de Al y solo el 40% de las muestras de REA amplificaron y se pudieron visualizar mediante electroforesis en gel de agarosa, mientras que las muestras de la ESCF presentaron la mayor dificultad para ser amplificadas y visualizadas (25% de

amplificación). En consecuencia diluimos el ADN molde para encontrar óptimos por cada tipo de suelo correspondiente a los tres ecosistemas estudiados. El 95 % de las muestras de Al y la ECSF y el 85% de las muestras de REA fueron amplificadas luego de la dilución (Tabla 1). En general, el ADN utilizado para amplificar fragmentos conservados del genoma de bacterias totales fue más diluido que el ADN utilizado para amplificar fragmentos conservados en genomas de hongos totales. Sin embargo, en ambos casos, los suelos de la ECSF fueron los más diluidos mientras que los suelos de Al fueron los que necesitaron menor dilución (Tabla 1).

#### DISCUSIÓN

Uno de los principales problemas en el rendimiento y calidad de ADN, a partir de muestras de suelo, ha sido asociado con el fracaso para remover compuestos de AH (Zhou *et al.*, 1996). Se estima que la enzima Taq polimerasa puede ser inhibida incluso cuando el ADN molde es contaminado con menos de  $1 \mu L mL^{-1}$  de AH (Clegg *et al.*, 1997). Suelos con alto contenido de materia orgánica producen preparaciones de ADN de color oscuro (Thakuria *et al.*, 2008), y la fracción orgánica que más influye sobre el color oscuro del suelo es la de los AH (Schulze *et al.*, 1993). Por tanto, no es de extrañar que los suelos de la ECSF, que presentaron sustancialmente más materia orgánica y muestras de color oscuro que los otros dos sitios evalua-

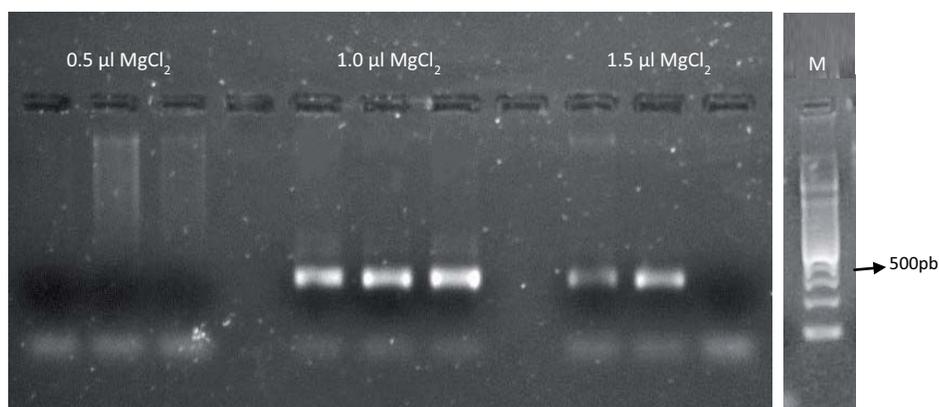


Figura 3. Rango utilizado en un experimento para determinar la concentración adecuada de  $MgCl_2$  con el fin de optimizar el rendimiento de la PCR. 0,5-1,0-1,5  $\mu L$  (volumen final) correspondientes a 0,25-0,5-0,75 mM de  $MgCl_2$  (concentración final). Las muestras representan parte de la región conservada del genoma de hongos de los suelos de Matorral seco tropical (Catamayo, sector Alamala).

Figure 3. Range used in a lab experiment to determine the appropriated concentration of  $MgCl_2$  in order to optimize efficiency of PCR. 0.5-1.0-1.5  $\mu L$  (final volume) corresponding to 0.25-0.5-0.75 mM of  $MgCl_2$  (final concentration). Soil samples represent the conserved region of fungal genome from the Tropical dry scrub (Catamayo, sector Alamala).

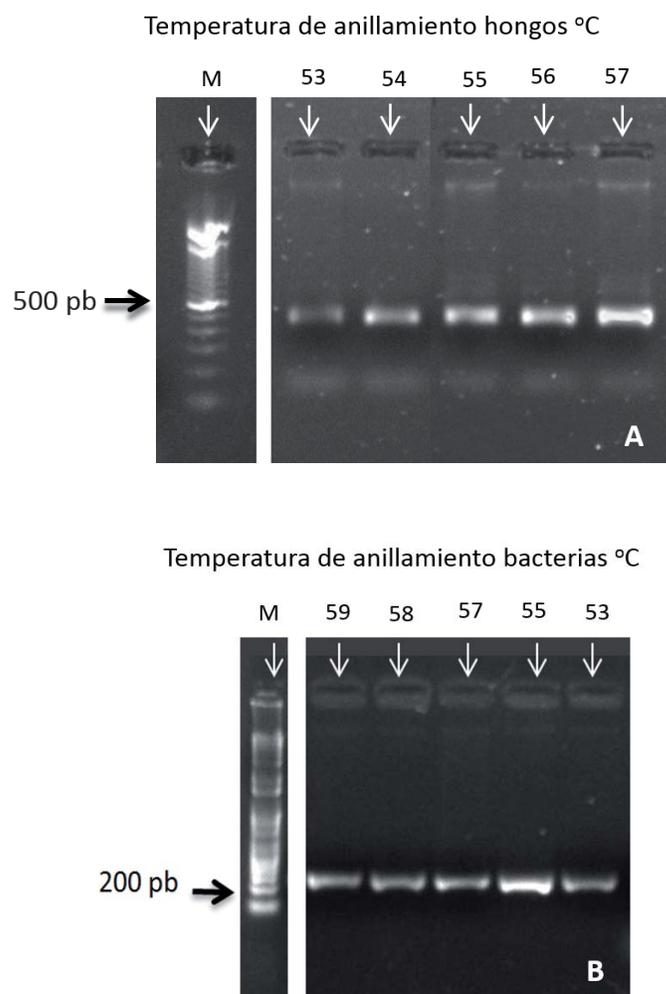


Figura 4. Gradiente utilizado en un experimento para determinar la temperatura de anillamiento adecuada de  $MgCl_2$  con el fin de optimizar el rendimiento de la PCR. Amplificación de la región conservada del genoma de hongos (A) y de bacterias (B) de los suelos de Matorral seco tropical (Catamayo, sector Alamala). M: Marcador molecular.

Figure 4. Gradient used in a lab experiment to determine the optimal annealing temperature in order to optimize efficiency of PCR. Conserved regions of fungal (A) and bacterial (B) genome were amplified. Soil samples come from Tropical dry scrub (Catamayo, sector Alamala).

Tabla 1. Diluciones óptimas de ADN para una eficiente amplificación en los tres tipos de suelo estudiados.

Table 1. Optimal DNA dilutions for an efficient amplification in three soil types studied.

Área de estudio	Formación vegetal		Diluciones óptimas	
	-Suelos-		Hongos	Bacterias
Estación Científica de San Francisco	Bosque Montano Tropical		1:20	1:50
Reserva Ecológica de Arenillas	Bosque Seco Tropical		1:5	1:10
Catamayo, sector Alamala	Matorral Seco Tropical		1:2	1:5

dos, generasen mayor problema para amplificar mediante la PCR. Esto se vio reflejado cuando calculamos la pureza de ADN de las muestras de la ECSF ya que un alto porcentaje se encontró fuera del rango (*i.e.*, 1,8-2,0). Aunque nosotros no medimos los AH presentes en las muestras de suelos, nuestros resultados están de acuerdo con Wilcke *et al.* (2002), quienes reportaron, para la misma zona de muestreo, que los suelos de la ECSF están dominados por cambisoles húmicos, los cuales se caracterizan por ser suelos jóvenes con una capa superficial oscura y de regular a buen contenido de materia orgánica.

Cuando se amplificó por PCR fragmentos conservados en genomas de hongos totales, se observaron bandas inespecíficas en algunos casos (de entre 3500 -4500 bp) y en otros, la inhibición total de la amplificación (*e.g.*, algunas muestras de suelos de la ECSF). Es bien sabido que el exceso de ADN puede ejercer un efecto inhibitorio de la PCR ya que puede dar lugar a uniones inespecíficas de los oligonucleótidos, aumentando la temperatura de desnaturalización o inhibiendo la polimerasa (Altshuler, 2006). También se sabe que la PCR se comporta mejor al diluir ADN debido a que, mediante ese procedimiento, se pueden eliminar agentes contaminantes como AH (Clegg *et al.*, 1997; Cáceres *et al.*, 2012). Entonces, cuando fueron empleadas las diluciones de ADN se observó una buena intensidad de bandas, lo cual significó un incremento de la eficiencia de la PCR además que fueron eliminados también, productos inespecíficos, especialmente cuando se amplificó fragmentos conservados en los genomas de hongos totales. Nuestros resultados sugieren que, diluir el ADN molde de las muestras originales para amplificarlo mediante la PCR es un procedimiento necesario en suelos oscuros principalmente, ya sea por un alto contenido de MO, o por presencia de AH. No obstante, cuando se hicieron las diluciones del ADN de las muestras de suelos de AL y REA, los resultados de la amplificación por PCR también fueron más eficientes que cuando se utilizó el ADN molde inicial.

Además de un ADN de calidad, la optimización de la PCR envuelve muchas otras variables entre ellas, la concentración de  $MgCl_2$  y  $T_a$ . La eficiencia de la PCR se vio incrementada cuando determinamos la concentración óptima del  $MgCl_2$  para hongos totales. Con 0,5 mM de  $MgCl_2$  logramos disminuir la presencia de productos inespecíficos, con tamaños fuera del rango esperado para ITS. No obstante, este procedimiento no fue necesario cuando amplificamos fragmentos conservados de bacterias totales ya que nunca aparecieron productos inespecíficos, así que en el caso

de bacterias nos centramos en optimizar la eficiencia de la PCR y no en la eliminación de productos inespecíficos. Es bien sabido que la  $T_a$  influye en la eficiencia de la PCR. Sin embargo, este parámetro ha sido utilizado en muchos trabajos con base a referencias bibliográficas. Existen muchas publicaciones que utilizan los mismos oligonucleótidos empleados en el presente trabajo pero que reportan valores diferentes de  $T_a$ . Yergeau *et al.* (2010), por ejemplo, amplificaron las regiones conservadas de bacterias y hongos totales con 53 °C como  $T_a$  en ambos casos, mientras que Castillo-Monroy *et al.* (2011) y Jagadamma *et al.* (2014) utilizaron 53 °C como  $T_a$  para amplificar fracciones conservadas de bacterias totales. Estos trabajos tomaron como referencia los oligonucleótidos y las condiciones de amplificación del trabajo de Fierer *et al.* (2005). Otros trabajos modificaron las condiciones de la PCR de acuerdo a sus requerimientos, como por ejemplo Hamelin *et al.* (1996) quienes reportaron una  $T_a$  de 55 °C para amplificar fragmentos conservados de hongos y Khodadad *et al.* (2011) reportaron 60 °C como la  $T_a$  óptima para amplificar fragmentos conservados de bacterias totales. Nosotros también optimizamos experimentalmente la  $T_a$ , en función de las características de los suelos de los diferentes ecosistemas evaluados, para maximizar la especificidad de fragmentos conservados de hongos y bacterias. Por tanto, nuestros resultados sugieren que las características de los suelos influyen significativamente a la hora de seleccionar  $T_a$ . Es necesario, entonces, optimizar las condiciones de PCR y en particular la  $T_a$ , cuando se realicen investigaciones en suelos que no han sido previamente estudiados. Tomar una  $T_a$  de referencia puede generar un error que se ve reflejado en la eficiencia de la PCR, lo cual puede generar conclusiones erróneas derivadas de una falla metodológica (estandarización incompleta).

Varios investigadores han utilizado la concentración de ADN como indicativo de la biomasa microbiana del suelo. Marstorp *et al.* (2000) relacionaron los dos parámetros y encontró que podían ser medidas equivalentes indistintamente de las características del suelo evaluados. Kowalchuk *et al.* (2003) también utilizaron exitosamente la concentración de ADN para relacionar la biomasa del suelo de diferentes tratamientos (*i.e.*, fumigación, esterilización, inoculación y control) y Wolinska *et al.* (2012) compararon suelos agrícolas con suelos en barbecho y encontró una relación significativamente positiva entre el ADN y la biomasa microbiana del suelo. Nosotros aquí utilizamos la misma aproximación para estimar la biomasa microbiana de los suelos de los tres ecosistemas evaluados a partir de la concentración ADN. No es de extrañar que la biomasa mi-

microbiana de la ECSF fuera significativamente mayor que los otros dos sitios de estudio (*i.e.*, REA y AI) ya que presenta mayor contenido de materia orgánica, y es bien sabido que la biomasa microbiana es un parámetro que está positivamente relacionada con el contenido de materia orgánica de los suelos (Schnürer *et al.*, 1985).

En conclusión, no es conveniente extrapolar parámetros de la PCR de un suelo a otro ya que se puede incurrir en errores que afectan directamente su eficiencia. Es necesario hacer una puesta a punto para cada tipo de suelo que se estudie y tener en cuenta los parámetros más influyentes en el éxito de la amplificación, los cuales fueron abordados en el presente estudio: correcta concentración de  $MgCl_2$ , adecuada selección de Ta y para eliminar sustancias contaminantes, dilución del ADN y selección adecuada del sistema de extracción que se va a utilizar.

Es importante resaltar que diluir el ADN es una estrategia común para disminuir inhibidores. Sin embargo, no se recomienda hacer diluciones mayores de 1:100 ya que se puede disminuir la concentración de ADN molde a valores inferiores al límite de amplificación. Una alternativa, para muestras cuya inhibición no se pueda resolver mediante dilución, es el uso de un sistema de purificación previo a la amplificación por PCR. No obstante, los altos costos que acarrea el uso de este tipo de sistemas conllevan a modificar protocolos de extracción de manera experimental. Así, Fatima *et al.* (2011) agregaron matinol al tampón de extracción para aumentar la eficiencia de la extracción de ADN de muestras de suelo. Estos mismos investigadores (Fatima *et al.* 2014) utilizaron fosfatos, matinol y nitrógeno líquido para obtener una máxima eficiencia de extracción. Por tanto, otra alternativa para eliminar sustancias contaminantes y mejorar la productividad y la calidad de ADN, es modificar los protocolos de extracción siguiendo las indicaciones antes mencionadas. De esta manera, se optimizará tiempo, dinero y esfuerzo para el desarrollo de proyectos en metagenómica del suelo. Por otro lado, con nuestros resultados, pudimos verificar, además, que la concentración del ADN es una variable consistente para estimar biomasa microbiana de los suelos.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a F Salvaggiotti por sus comentarios y sugerencias. Al Pardo, K Sánchez, V Rojas y M Samaniego por su colaboración en la edición del trabajo. Este estudio es parte del proyecto "PROY\_CCNN 852", financiado por la V convocatoria de proyectos internos de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL), Ecuador.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, Z & L Kvist. 2005. Composición florística y estado de conservación de los bosques secos del sur-occidente del Ecuador. *Lyonia* 8(2): 41-67.
- Altshuler, ML. 2006. PCR troubleshooting the essential guide. Editorial Caister Academic Press, Wymondham, UK.
- Barthlott, W; W Lauer & A Placke. 1996. Global distribution of species diversity in vascular plants: towards a world map of phytodiversity. *Erdkunde* 50: 317-327.
- Best, BJ & M Kessler. 1995. Biodiversity and conservation in Tumbesian Ecuador and Peru. BirdLife International, Cambridge, UK.
- Brehm, G; LM Pitkin; N Hilt & K Fiedler. 2005. Montane andean rain forests are global diversity hotspot of geometrid moths. *J Biogeogr.* 32(9): 1621-1627.
- Cáceres, P; C Cordero; G González; K Quiroz; JC Bobadilla; C Bravo; PDS Caligari; B Carrasco & R García-Gonzales. 2012. Efficient protocols for the extraction of microbial DNA from the rhizosphere of hydrophilic forests in Chile. *Cienc Investig Agrar.* 39(3): 585-592.
- Castillo-Monroy, AP; MA Bowker; FT Maestre; S Rodríguez-Echeverría; I Martínez; CE Barraza-Zepeda & C Escolar. 2011. Relationships between biological soil crusts, bacterial diversity and abundance, and ecosystem functioning: insights from a semi-arid Mediterranean environment. *J Veg Sci.* 22: 165-74.
- Clegg, CD; K Ritz & BS Griffiths. 1997. Direct extraction of microbial community DNA from humified upland soils. *Lett Appl Microbiol.* 25(1): 30-33.
- Eckert, KA & TA Kunkel. 1991. DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *Genome Res.* 1: 17-24.
- Eldor, AP. 2007. Soil microbiology, ecology and biochemistry. 3rd ed Pp 532. Elsevier. USA.
- Espinosa, CI; O Cabrera; AL Luzuriaga & A Escudero. 2011. What factors affect diversity and species composition of endangered tumbesian dry forests in southern Ecuador? *Biotropica* 43(1): 15-22.
- Espinosa, CI; AL Luzuriaga; M De La Cruz & A Escudero. 2013a. Climate and grazing control nurse effects in an ecuadorian dry shrubby community. *J Trop Ecol.* 30(1): 23-32.
- Espinosa, CI; A Luzuriaga; M De La Cruz; M Montero & A Escudero. 2013b. Co-occurring grazing and climate stressors have different effects on the total seed bank when compared to the persistent seed bank. *J Veg Sci.* 24(1): 1098-1107.
- Fajardo, L; V Gonzalez; J Nassar; P Lacabana; C Portillo; F Carrasquel & J Rodríguez. 2005. Tropical dry forests of Venezuela: characterization and current conservation status. *Biotropica* 37(4): 531-546.
- FAO. 2009. Guía para la descripción de suelos. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/a0541s/a0541s00.pdf>
- Fatima, F; I Chaudhary; J Ali; S Rastogi & N Pathak. 2011. Microbial DNA extraction from soil by different methods and its PCR amplification. *Biochem Cell Archives*, 11: 85-90.
- Fatima, F; N Pathak & SR Verma. 2014. An Improved Method for Soil DNA Extraction to Study the Microbial Assortment within Rhizospheric Region. *Mol Biol International*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/518960>

- Fierer, N; JA Jackson; R Vilgalys & RB Jackson. 2005. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl Environ Microb.* 71(7): 4117-4120.
- Hamelin, RC; P Bérubé; M Gignac & M Bourassa. 1996. Identification of Root Rot Fungi in Nursery Seedlings by Nested Multiplex PCR. *Appl Environ Microb.* 62(11): 4026-4031.
- Jagadamma, S; MA Mayes; JM Steinweg & SM Schaeffer. 2014. Substrate quality alters the microbial mineralization of added substrate and soil organic carbon. *Biogeosciences* 11: 4665-4678.
- Jara-Guerrero, A; M De la Cruz; CI Espinosa; A Escudero, & M Méndez. 2015. Does spatial heterogeneity blur the signature of dispersal syndromes on spatial patterns of woody species? A test in a tropical dry forest. Oikos DOI: 10.1111/oik.02098
- Jara-Guerrero, A; M De la Cruz & M Méndez. 2011. Seed dispersal spectrum of woody species in south ecuadorian dry forests: environmental correlates and the effect of considering species abundance. *Biotropica* 43(6): 722-730.
- Khodadad, CLM; AR Zimmerman; SJ Green; S Uthandi & JS Foster. 2011. Taxa-specific changes in soil microbial community composition induced by pyrogenic carbon amendments. *Soil Biol Biochem.* 43(2): 385-392.
- Kontanis, EJ & FA Reed. 2006. Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors. *J Forensic Sci.* 51(4): 795-804.
- Kowalchuk, GA; GJ Os; J Aartrijk & JA Veen. 2003. Microbial community responses to disease management soil treatments used in flower bulb cultivation. *Biol Fert Soils.* 37: 55-63.
- Lakay, FM; A Botha & BA Prior. 2007. Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils. *J Appl Microbiol.* 102(1): 265-273.
- Lynch, JM; A Benedetti; H Insam; MP Nuti; K Smalla; V Torsvik & P Nannipieri. 2004. Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular technique and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. *Biol Fert Soils.* 40: 363-385.
- Marstorp, H; X Guan & P Gong. 2000. Relationship between dsDNA, chloroform labile C and ergosterol in soil of different organic matter contents and pH. *Soil Biol Biochem.* 32(6): 879-882.
- Miles, L; AC Newton; RS DeFries; C Ravilious; I May; S Blyth; V Kapos & JE Gordon. 2006. A global overview of the conservation status of tropical dry forests. *J Biogeogr.* 33(3): 491-505.
- Miki, T; T Yokokawa & K Matsui. 2014. Biodiversity and multifunctionality in a microbial community: a novel theoretical approach to quantify functional redundancy. *P Roy Soc B-Biol Sci.* 281(1176): 20132498.
- Myers, N; RA Mittermeier; CG Mittermeier; GAB da Fonseca & J Kent. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853-858.
- Nannipieri, P; J Ascher; MT Ceccherini; L Landi; G Pietramellara & G Renella. 2003. Microbial diversity and soil functions. *Eur J Soil Sci.* 54(4): 655-670.
- O'Donell, AG & HE Görres. 1999. 16S rDNA methods in soil microbiology. *Curr Opin Biotech.* 10(3): 225-229.
- Øvreås, L. 2000. Population and community level approaches for analyzing microbial diversity in natural environments. *Ecol Lett.* 3(3): 236-251.
- Schulze, DG; JL Nagel; GE van Scoyoc; TL Henderson; MF Baumgardner & DE Stott. 1993. Significance of organic matter in deterring soil color. *Int. Soil color.* Bigham, JM & EJ Ciolkosz. SSSA Special publication No. 31. Madison. pp, 71-90.
- Schnürer, J; M Clarholm & T Rosswall. 1985. Microbial biomass and activity in an agricultural soil with different organic matter contents. *Soil Biol Biochem.* 17(5): 611-618.
- Sierra, R. 1999. Propuesta Preliminar de un Sistema de Clasificación de Vegetación para el Ecuador Continental. Proyecto INEFAN, GEFBIRG y EcoCiencia, Quito, Ecuador.
- Sokal, RR & FJ Rohlf. 1995. Biometry, 3rd ed. New York, NY: W.H. Freeman & Co.
- Thakuria, D; O Schmidt; M Mac Siúrtáin; D Egan & FM Doohan. 2008. Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses. *Soil Biol Biochem.* 40(6): 1390-1403.
- Torsvik, V; J Goksøy & FL Daae. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microb.* 56(3): 782-787.
- van der Heijden, MG; RD Bardgett & NM van Straalen. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett.* 11(3): 296-310.
- Wilcke, W; S Yasin; U Abramowski; C Valarezo & W Zech. 2002. Nutrient storage and turnover in organic layers under tropical montane rain forest in Ecuador. *Eur J Soil Biol.* 53(1): 15-27.
- Wolinska, A; Z Stepniewska; A Bulas & A Banach. 2012. Evaluation of Factors Influencing the Biomass of Soil Microorganisms and DNA Content. *Open J Soil Sci.* 2(1): 64-69.
- Yergeau, E; H Hogues; LG Whyte & CW Green. 2010. The functional potential of high Arctic permafrost revealed by metagenomic sequencing, qPCR and microarray analyses. *ISME J.* 4(9): 1206-1214.
- Zhou, J; MA Bruns & JM Tiedje. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microb.* 62(2): 316-322.