

Tesis defendida por
Lluvia Beatriz Vargas Gastélum
y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Codirector del Comité

Dra. Ana Elena Escalante Hernández
Codirector del Comité

Dr. Axayácatl Rocha Olivares
Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
Miembro del Comité

Dr. Fernando Díaz Herrera
Coordinador
Coordinador Programa de Posgrado
en Ciencias de la Vida

Dr. Jesús Favela Vara
Encargado del Despacho de la
Dirección de Estudios de Posgrado

Septiembre de 2013.

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**Programa de Posgrado en Ciencias
En Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología**

**Análisis metagenómico de la diversidad fúngica de un ecosistema semi-árido de
Baja California**

Tesis

**para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias**

Presenta:

Lluvia Beatriz Vargas Gastélum

**Ensenada, Baja California, México
2013**

Resumen de la tesis de Lluvia Beatriz Vargas Gastélum, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología.

Análisis metagenómico de la diversidad fúngica de un ecosistema semi-árido de Baja California

Resumen aprobado por:

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Codirector de tesis

Dra. Ana Elena Escalante
Hernández

El suelo es considerado como el reservorio de biodiversidad más grande del planeta. En ecosistemas terrestres, los hongos del suelo juegan un papel ecológico principal en el reciclaje de nutrientes, así como por sus relaciones mutualistas y patógenas con plantas. Una tercera parte de la superficie terrestre es considerada como árida o semi-árida. A pesar del papel fundamental que juegan los hongos en la dinámica de los ecosistemas, poco es sabido sobre su distribución, diversidad y abundancia en ecosistemas áridos y semi-áridos. Para evaluar la diversidad y abundancia de hongos en un ecosistema semi-árido con clima mediterráneo de Baja California, México, el espaciador interno transcrito (ITS) del ADN nuclear fue empleado como código de barras del ADN fúngico y pirosecuenciación 454 como plataforma de secuenciación. Fueron analizados dos micro-hábitats diferentes en verano e invierno, uno influenciado por la actividad de roedores (madriguera) y otro sin disturbio (superficie). Para todas las muestras se determinaron características físico-químicas del suelo. Se obtuvieron de 148×10^3 a 340×10^3 secuencias, correspondientes a 3,800-4,500 OTUs, dependiendo de la región ITS considerada y de la muestra. Consistentemente, los filos Ascomycota y Basidiomycota fueron los más abundantes. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en relación a la composición y abundancia de la diversidad fúngica entre micro-hábitats así como entre estaciones del año. Estas diferencias estacionales entre micro-hábitats podrían ser debidas a las variaciones de temperatura y humedad del suelo que se registraron. Para determinar la influencia de dichos factores ambientales se empleó un análisis de correspondencia canónica, el cual sugiere que las muestras de superficie pueden estar mayormente influenciadas a cambios de humedad, mientras

que las muestras de madriguera pueden ser más sensibles a cambios de temperatura. El índice de Simpson indicó una gran riqueza de especies, ya que se obtuvieron valores entre 0.866 y 0.976. El índice de Shannon indicó una alta diversidad ya que se estimaron valores de 3.79 hasta 5.18. El índice de Chao 1 estimó valores de riqueza de 1,454 hasta 4,548, que en comparación al número de OTUs obtenido por tipo de muestra, indicó que el esfuerzo de muestreo no fue suficiente, siendo congruente con las curvas de rarefacción las cuales no alcanzaron la asíntota. Este estudio nos muestra que la composición de la comunidad fúngica en estos ecosistemas es influenciada por factores ambientales estacionales, algo que regularmente no es considerado en este tipo de estudios.

Palabras clave: Ecosistemas semi-áridos, diversidad fúngica, región ITS, pirosecuenciación

Abstract of the thesis presented by Lluvia Beatriz Vargas Gastélum as a partial requirement to obtain the Master in Science degree of Life Sciences with an orientation in Microbiology.

Metagenomic analysis of fungal diversity in a semi-arid ecosystem of Baja California

Abstract approved by:

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Codirector de tesis

Dra. Ana Elena Escalante
Hernández

The soil is considered the largest reservoir of biodiversity in the world. In all terrestrial ecosystems, soil fungi play an important ecological role in nutrient recycling, and in addition they establish mutualistic and pathogenic interactions with plants. One third of the terrestrial surface is considered as arid or semi-arid. Despite of the fundamental role that fungi play in the ecosystem dynamics, little is known about their distribution, diversity and abundance in arid and semi-arid ecosystems. To assess the diversity and abundance of fungi in a semi-arid ecosystem with mediterranean climate from Baja California, Mexico, the internal transcribed spacer (ITS) of nuclear DNA was used as a marker for fungal DNA barcoding and a 454 pyrosequencing approach was undertaken. Two different micro-habitats, one influenced by rodent's activity (burrow) and the other one with undisturbed soil (surface), were analyzed both in Winter and Summer. Physicochemical characteristics of the soil were also established. Between 148×10^3 and 340×10^3 sequences were obtained, resulting between 3,800 and 4,500 OTUs, depending on the sample and ITS region considered. Consistently, the phyla Ascomycota and Basidiomycota were the most abundant. However, significant differences were found in the composition and abundance of fungal diversity between the two micro-habitats as well as between the two seasons analyzed. These differences could be primarily due the seasonal season and micro-habitat variations in temperature and moisture registered. A canonical correspondence analysis was employed to determine the influence of the environmental factors; this analysis suggest that surface samples could be influenced by humidity changes, mean while the burrow samples could be more sensitive to temperature changes. According to indexes results, the Simpson index showed that in all kind of samples there is a great species abundance, due to

obtained values from 0.866 to 0.976; the Shannon index showed values from 3.79 to 5.18 indicating a high diversity. The Chao 1 index estimated richness values from 1,454 to 4,548, that in comparison with the OTUs numbers obtained by sample, indicating that the sampling effort was not sufficient, being consistent rarefaction curves that not reached the asymptote. This study showed that the fungal community composition in this ecosystem is influenced by seasonal environmental factors that are not commonly considered in this kind of studies.

Keywords: Semi-arid ecosystems, fungal diversity, ITS region, pyrosequencing

Dedicatoria

A mi felicidad

Porque después de todo he comprendido
que no se goza lo bien gozado
si no después de haberlo padecido.
Porque después de todo he comprobado
que lo que tiene el árbol de florido,
vive lo que tiene de sepultado.

Agradecimientos

Agradezco a mis padres por todo el apoyo y el cariño a lo largo de este camino que emprendí, sé que llevo años fuera de mi hogar, pero siempre los llevo conmigo. A mis hermanos por su apoyo incondicional y por hacerme reír.

Agradezco al CICESE así como al Departamento de Ciencias de la Vida, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado, pero aún más agradezco a Adriana Mejía y a Melissa Corral, secretarias del Departamento y de la Especialidad en Microbiología, que siempre estuvieron ahí para ayudarnos.

Agradezco al CONACyT, por el financiamiento otorgado a través de una beca de manutención (#263435) y al haberme concedido su beca mixta para realizar un intercambio académico nacional.

Agradezco a la Dra. Meritxell Riquelme, por haberme aceptado en su grupo de trabajo y por la enseñanza y el apoyo durante el desarrollo de esta investigación, la palabra "gracias" no es suficiente.

A la Dra. Ana Escalante, por su apoyo durante el desarrollo de esta investigación, y sobre todo por haber contribuido enormemente a mi desarrollo profesional, ¡Muchísimas gracias!.

Al comité conformado por el Dr. Axayácatl Rocha y la Dra. Rufina Hernández, por su valioso apoyo y observaciones durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Stephen Bullock, Mario Salazar y Miriam Poumian por su ayuda durante los análisis de suelo. A Guillermo González por su ayuda en campo y el laboratorio. A Olga Callejas por su apoyo en el laboratorio. Al Dr. Carlos Brizuela por su apoyo en el análisis de los datos.

Alejandro, no hay forma de que pueda expresar mi gratitud por todo el apoyo que me has dado a lo largo de esta etapa que iniciamos juntos. Gracias por el amor y sobre todo la paciencia, como siempre he dicho: mejor pareja no podría tener, eres único. Ana Karina, amiga mía de mí y de mi alma, muchísimas gracias por todo, Oh! Karina! Llegaste a mi vida Oh Karina!. A mis amigas Leonora, Roxy y Adria, muchísimas gracias por aguantarme, por apoyarme, por hacerme reír, las adoro y las quiero niñas!.

Esta investigación fue financiada por el Fondo de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del CICESE a través del proyecto "Análisis metagenómicos de la biodiversidad nacional para la solución de problemas ambientales estratégicos".

Contenido

	Página
Resumen español.....	ii
Resumen inglés.....	iv
Dedicatorias.....	vi
Agradecimientos.....	vii
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tablas.....	xii
Capítulo 1. Introducción	
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 Microorganismos en el suelo.....	2
1.1.2 Diversidad y distribución de hongos en el suelo.....	4
1.1.3 Importancia de los hongos en el suelo de ecosistemas áridos y semi-áridos.....	6
1.1.4 Estrategias para el estudio de la diversidad de hongos.....	7
1.1.5 Región ITS como “código de barras” para la identificación fúngica.....	10
1.1.6 Secuenciación Sanger y secuenciación masiva.....	13
1.1.7 Metagenómica de hongos en suelos áridos.....	17
1.1.8 Ecosistemas áridos y semi-áridos de Baja California.....	18
1.2 Justificación.....	18
1.3 Hipótesis.....	19
1.4 Objetivos.....	20
1.4.1 Objetivo general.....	20
1.4.2 Objetivos específicos.....	20
Capítulo 2. Metodología	
2.1 Muestreo.....	22
2.1.1 Recolección de las muestras.....	23
2.1.2 Variables medidas en campo.....	24
2.1.3 Almacenamiento de las muestras.....	24
2.2 Caracterización de suelo.....	25
2.2.1 Potencial hidrógeno (pH).....	25
2.2.2 Contenido de humedad.....	25
2.2.3 Contenido de materia orgánica.....	26
2.2.4 Textura.....	26
2.2.5 Determinación de salinidad por conductividad eléctrica.....	28
2.3 Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías.....	29
2.4 Diagramas de Superficie.....	29
2.5 Extracción de ADN genómico total de muestras de suelo.....	29
2.6 Cuantificación y análisis de pureza del ADN genómico total extraído.....	30
2.7 Pruebas de PCR para seleccionar oligonucleótidos.....	30
2.8 Amplificación de la región ITS del rADN.....	33
2.9 Preparación de ADN genómico para secuenciación.....	33
2.10 Análisis de secuencias.....	34
2.10.1	

2.10.2	Revisión de algoritmos para determinar la calidad de las secuencias.....	35
2.10.3	Extracción de secuencias de ITS1 e ITS2 del rADN.....	37
2.10.4	Revisión de archivo de mapeo (<i>Mapping File</i>).....	38
2.10.5	Revisión de archivo de secuencias.....	38
2.10.6	Agrupamiento de secuencias en OTUs.....	39
2.10.7	Selección de secuencias representativas.....	39
2.10.8	Asignación taxonómica.....	39
2.10.9	Construcción de tabla de OTUs.....	40
2.11	Agrupación de OTUs por muestra.....	40
2.11.1	Análisis de diversidad.....	40
2.11.2	Índice de Chao 1 y curvas de rarefacción.....	41
2.11.3	Índices.....	42
2.11.4	Análisis comparativo de composición.....	43
2.11.5	Análisis de agrupamiento (<i>Clustering</i>).....	43
	Análisis de correspondencia canónica.....	
Capítulo 3. Resultados		
3.1	Muestreo.....	45
3.2	Variables medidas en campo.....	45
3.2.1	Humedad determinada sensor.....	45
3.2.2	Temperatura sensor.....	47
3.3	Caracterización de suelo.....	48
3.3.1	Potencial hidrógeno.....	48
3.3.2	Contenido de humedad.....	50
3.3.3	Contenido de materia orgánica.....	52
3.3.4	Textura.....	53
3.3.5	Determinación de salinidad por conductividad eléctrica.....	54
3.4	Extracción, cuantificación y análisis de pureza del ADN genómico total de muestras de suelo.....	55
3.5	Pruebas de PCR para seleccionar oligonucleótidos.....	56
3.6	Amplificación de la región ITS del rADN.....	57
3.7	Preparación de ADN genómico para secuenciación.....	59
3.8	Análisis de secuencias.....	60
3.8.1	Extracción de secuencias ITS1 e ITS2 del rADN.....	60
3.8.2	Revisión de archivo de secuencias.....	60
3.8.3	Unidad taxonómico operacional (OTU) y secuencias representativas.....	61
3.8.4	Índice de Chao 1 y análisis de rarefacción.....	62
3.8.5	Índices de diversidad ecológica.....	66
3.8.6	Análisis comparativo de composición.....	67
3.8.7	Análisis de agrupamiento y mapas de calor.....	69
3.8.8	Análisis de correlación canónica.....	75
Capítulo 4. Discusión		
4.1	Características de suelo.....	79
4.2	Diversidad, abundancia y distribución de hongos en Valle de las Palmas.....	80
Conclusiones.....		87
Referencias bibliográficas.....		88
Anexos.....		

Lista de figuras

Figura		Página
1	Composición de un micro-hábitat en el suelo.....	3
2	Organización de los genes rARN eucarióticos.....	11
3	Localización y orientación de los oligonucleótidos en las regiones ITS del rDNA.....	12
4	Diagrama de flujo del procesamiento de secuencias provenientes de pirosecuenciación.....	16
5	Ubicación de Valle de las Palmas en la Península (VDP) de Baja California Norte y puntos de muestreo del sitio de estudio.....	23
6	Panorámica del sitio de estudio y micro-hábitats.....	24
7	Triángulo textural de suelo.....	28
8	Diagrama de flujo del manejo y análisis de secuencias.....	35
9	Promedio de la Humedad medida por sensor.....	46
10	Variación espacial de la Humedad medida por sensor en el sitio VDP...	46
11	Promedio de la Temperatura medida por sensor.....	47
12	Variación espacial de la Temperatura medida por sensor en el sitio VDP.....	48
13	Potencial de hidrógeno.....	49
14	Variación espacial de pH en VDP.....	49
15	Contenido promedio de Humedad determinada por el método de gravimetría.....	50
16	Variación espacial de la Humedad en VDP.....	51
17	Contenido de Materia Orgánica.....	52
18	Variación espacial de Materia orgánica en el sitio VDP.....	52
19	Promedio de Conductividad eléctrica.....	54
20	Variación espacial de la Conductividad eléctrica en el sitio VDP.....	54
21	Prueba de oligonucleótidos para la amplificación de la región ITS del rADN.....	57
22	Amplificación de la región ITS1 del rADN utilizando el par de oligonucleótidos ITS1F e ITS2.....	58
23	Número de secuencias obtenidas por muestra.....	60
24	Curvas de rarefacción.....	64
25	Composición taxonómica de las secuencias de rADN metagenómicas obtenidas por pirosecuenciación.....	68
26	Mapa de calor de la abundancia relativa de clases de hongos en cada muestra analizando la región completa.....	70

27	Mapa de calor de la abundancia relativa de clases de hongos en cada muestra analizando la región ITS1.....	72
28	Mapa de calor de la abundancia relativa de clases de hongos en cada muestra analizando la región ITS2.....	73
29	Diagramas de ordenación de los análisis de correspondencia canónica de las variables de características de suelo y sitios de muestreo para la región completa.....	76
30	Diagramas de ordenación de los análisis de correspondencia canónica de las variables de características de suelo y sitios de muestreo para la región ITS1.....	77
31	Diagramas de ordenación de los análisis de correspondencia canónica de las variables de características de suelo y sitios de muestreo para la región ITS2.....	78

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Estimación del número de especies de microorganismos en el suelo.....	4
2	Oligonucleótidos desarrollados para la amplificación de las regiones ITS de rADN.....	13
3	Efectos de salinidad en el suelo de acuerdo a los valores de conductividad eléctrica.....	29
4	Interpretación de los datos obtenidos en la relación A260/A280.....	30
5	Reactivos y programas de PCR utilizados en la selección de oligonucleótidos.....	32
6	Condiciones de PCR utilizadas en la amplificación de la región ITS del rADN.....	33
7	Porcentaje de Arena, Arcilla y Limo en cada muestra.....	53
8	Concentraciones y pureza de ADN genómico total extraído.....	56
9	Número total de OTUs por muestra.....	61
10	Índice de Chao 1.....	62
11	Índices de diversidad ecológica calculados para cada muestra.....	66
12	Vectores para cada variable de las propiedades físico-química del suelo para el análisis de correlación canónica.....	75

Capítulo 1. Introducción

Se ha estimado que en un gramo de suelo existen de 10^3 a 10^6 especies microbianas (Torsvik & Øvreås, 2002), convirtiendo al suelo en uno de los más grandes reservorios de diversidad del planeta (Crawford *et al.*, 2005).

La diversidad microbiológica del suelo incluye principalmente hongos y bacterias (Giri *et al.*, 2005) y sus funciones contribuyen principalmente a la nutrición de las plantas así como en la estructura y fertilidad del suelo (Kirk *et al.*, 2004). A pesar de su importancia ecológica, el conocimiento sobre la diversidad microbiana es aún limitado. Se estima que sólo cerca del 1% de las bacterias han sido cultivadas y caracterizadas por métodos estándares de laboratorio (Kirk *et al.*, 2004). Al igual que las bacterias, se cree que la mayoría de los hongos no han podido ser cultivados por métodos convencionales de laboratorio (Mueller & Schmit, 2007), complicando su entendimiento en cuestiones de diversidad (variedad de especies) (Lentendu *et al.*, 2011).

Los microorganismos del suelo no se encuentran distribuidos uniformemente, si no que se localizan donde las condiciones nutrimentales y ambientales son las adecuadas para su desarrollo (Chesworth, 2008). La heterogeneidad del suelo contribuye a la coexistencia de las especies, que suelen encontrarse formando gremios, es decir, grupos de especies de microorganismos que son metabólicamente semejantes (Voroney, 2007).

En ecosistemas áridos y semi-áridos, la diversidad y distribución de microorganismos puede variar en función de la humedad y la temperatura, así como de la estructura física del suelo, las cuales interfieren con la habilidad de los microorganismos para movilizarse (Whitford, 1996). Lluvias anuales esporádicas, alto pH, alta temperatura del suelo e intensa radiación solar, son características ambientales típicas en este tipo de ecosistemas (Porrás-Alfaro *et al.*, 2011); por lo que se sugiere que la diversidad y abundancia de especies fúngicas es dependiente de sus adaptaciones fisiológicas.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Microorganismos en el suelo

Los suelos forman una capa delgada en la superficie de la Tierra, donde interactúan componentes geológicos y biológicos, tales como partículas minerales, fluidos y distintos microorganismos (Chapin *et al.*, 2002). Debido a las interacciones entre estos componentes, el suelo es considerado un sistema dinámico y complejo (Chesworth, 2008). Los microorganismos del suelo pertenecen a 5 grupos taxonómicos: hongos, bacterias, virus, algas y protistas; todos ellos relacionados con las partículas del suelo y materia orgánica compleja. Las partículas del suelo forman agregados que varían en tamaño, composición y en la relación que se establece entre las partículas y los microorganismos. Esta relación es regida por las condiciones a nivel del micro-hábitat (Giri *et al.*, 2005). La formación de micro-hábitats es posible debido al estado físico del suelo, el cual se compone de 3 fases: una sólida (compuesta por minerales y materiales orgánicos) que ocupa el 50% del volumen del suelo, una líquida (H₂O) y una gaseosa (principalmente oxígeno); el agrupamiento de estas fases, permite la formación de poros, los cuales son espacios con remanente de agua y aireación (Figura 1) (Chesworth, 2008).

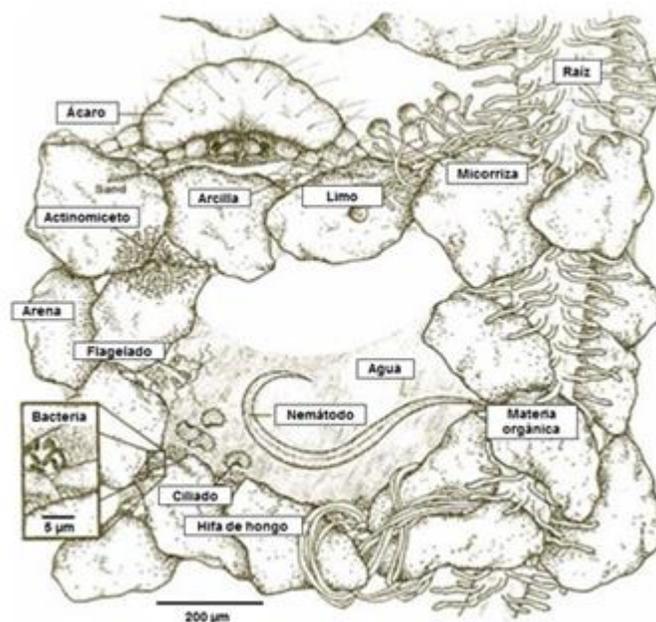


Figura 1. Composición de un micro-habitat en el suelo. Modificado: Chesworth, 2008, p. 675.

La formación y composición de los micro-habitats del suelo permite que los microorganismos (principalmente hongos y bacterias) formen comunidades que regulan entre el 80 y el 90% de los procesos que ocurren en el suelo (Chapin *et al.*, 2002; Nannipieri *et al.*, 2003); tales como la descomposición de la materia orgánica, la formación del suelo, la degradación de contaminantes, y el mantenimiento de la calidad de las aguas subterráneas (Fierer *et al.*, 2003).

Las estimaciones realizadas sobre el número de especies presentes en los suelos (Giri *et al* 2005; Tabla 1), dan una idea de la poca información con la que se cuenta de la diversidad de especies de microorganismos en los suelos, así como de sus funciones. El entender lo anterior en ecosistemas terrestres es particularmente relevante dada la importancia de los microorganismos en las funciones ecosistémicas (Konopka, 2009).

Tabla 1: Estimación del número de especies de microorganismos en el suelo. Modificado: Giri *et al.*, 2005, p. 26.

Grupos	Número de especies de microorganismos		
	Especies descritas	Especies estimadas	Total especies conocidas (%)
Hongos	69,000	1,500,000	5
Bacterias	3,000	30,000	10
Algas	40,000	60,000	67

En el caso de los hongos, durante casi dos décadas se había estimado que existen 1.5 millones de especies fúngicas de las cuales sólo cerca del 5% han sido descritas (Hawksworth & Rossman, 1997; Mueller & Schmit, 2007); sin embargo un estudio reciente, cuya estimación está basada en la relación hongo:planta (17:1) en suelos de bosque, sugiere la existencia de 6 millones de especies fúngicas (Taylor *et al.*, 2013). Si estos cálculos son ciertos, aún quedarían por caracterizar cerca de 5.931 millones de especies de la diversidad fúngica global (Taylor *et al.*, 2013). El número limitado de especies fúngicas caracterizadas se debe principalmente a que muchas especies requieren de métodos de muestreo especializados (Cannon, 1999), así como de condiciones específicas de cultivo (e.g., nutrientes, pH, temperatura), lo que dificulta su aislamiento y caracterización. Otro problema de la caracterización de la diversidad fúngica no cultivada, es el gran número de especies crípticas, es decir que son morfológicamente indistinguibles por medio de técnicas de microscopía en muestras ambientales (Jones & Richards, 2011; Shivas & Cai, 2012). La falta de conocimiento que se tiene actualmente sobre la diversidad fúngica ha llevado a una comprensión limitada sobre su estructura y dinámica en el suelo (Van Elsas *et al.*, 2000), en donde sus actividades son importantes para el funcionamiento del ecosistema.

1.1.2 Diversidad y distribución de hongos en el suelo

En ecosistemas terrestres, los hongos tienen un papel importante en la descomposición de materia orgánica (e.g., lignina y celulosa), reciclan nutrientes (e.g., carbono y nitrógeno), y establecen relaciones mutualistas y patógenas con plantas (Cannon, 1999; Hunt *et al.*, 2004; van Elsas *et al.*, 2000).

Los hongos, además de contar con una amplia diversidad (Tabla 1), tienen la cualidad de poder desarrollarse en todos los tipos de suelo (Giri *et al.*, 2005), así como la capacidad de ocupar un amplio rango de nichos ecológicos (Magan, 2007).

La unidad de crecimiento de los hongos filamentosos es la hifa, una estructura tubular que se extiende apicalmente y a su vez ramifica, dando lugar al micelio (Gadd *et al.*, 2008; Hillel, 2008; Paul & Clark, 1989). Cuando pocos recursos están disponibles, ocurre un crecimiento, así como también una disminución en la densidad del micelio, mientras que con el aumento de los recursos incrementa la densidad, la liberación de enzimas y como consecuencia la absorción de los nutrimentos (Dighton, 2003). En la mayoría de los ambientes, la distribución espacial de nutrientes no es homogénea (Allen *et al.*, 2003), por lo que el crecimiento micelial permite a los hongos filamentosos expandirse hasta encontrar una fuente de nutrimentos (Davidson, 2007). Todo ello sugiere que la distribución de los hongos está regida por la disponibilidad de los nutrientes en el suelo, y a su vez, su actividad puede verse limitada por factores abióticos (e.g., temperatura, pH, disponibilidad de agua) (Giri *et al.*, 2005).

El papel principal de estos organismos eucarióticos en el suelo reside en los procesos de descomposición y mineralización. Durante la descomposición de materia orgánica, los hongos liberan enzimas extracelulares para degradar moléculas orgánicas complejas contenidas en la hojarasca (e.g., lignina), y los productos de esta actividad enzimática pueden ser absorbidos por otros organismos (principalmente plantas; Coleman *et al.*, 2004; Dighton, 2003). La mineralización se lleva a cabo durante el proceso de descomposición, donde los nutrimentos minerales son solubilizados como iones inorgánicos (Dighton, 2003). Además, los

hongos son actores importantes en la generación de partículas de suelo, al ser capaces de modificar su composición química, permitiendo la asociación de las especies fúngicas con la materia orgánica, y cambiar la estructura física del suelo. Estos cambios influyen en la porosidad y estabilidad del suelo así como en la capacidad de retención de agua (Dighton, 2003), lo que afecta el tamaño de los poros del suelo y permite el establecimiento de los hongos y su desarrollo.

1.1.3 Importancia de los hongos en el suelo de ecosistemas áridos y semi-áridos

Los hongos son capaces de desarrollarse en una amplia variedad de ecosistemas terrestres, tales como praderas (Brodie *et al.*, 2003; Hunt *et al.*, 2004), pastizales (Jumpponen *et al.*, 2010), tundras (Lentendu *et al.*, 2011), bosques (Buee *et al.*, 2009), e incluso en ecosistemas áridos y semi-áridos (Durrell *et al.*, 1960; Oliveira *et al.*, 2013; Porrás-Alfaro *et al.*, 2011; Romero-Olivares *et al.*, 2013). Los suelos en ecosistemas áridos se consideran hábitats terrestres porosos (Thorn & Linch, 2007), lo cual permite que estructuras como las hifas realicen la exploración y la translocación de nutrientes, formando parte de los ciclos biogeoquímicos (Gadd *et al.*, 2007). Por ejemplo, Collins *et al.* (2008), demostraron que los hongos en ecosistemas áridos tienen una relación cercana con productores primarios, siendo los principales actores en el proceso de transformación de nitrógeno, y además los de mayor actividad en la descomposición de la poca materia orgánica presente en este tipo de ecosistemas.

Un tercio de la superficie del planeta es ocupado por ecosistemas áridos y semi-áridos (MEA, 2005), que se caracterizan por precipitaciones esporádicas y estacionales, temperaturas elevadas y alta radiación solar (Scott *et al.*, 2012). En los ecosistemas áridos y semiáridos los eventos de precipitación tienen una gran influencia en la actividad biológica. Cuando llueve, dependiendo de su porosidad, el agua se infiltra en el suelo, activando el metabolismo de los microorganismos (Huenneke & Noble, 1996).

En los suelos de ecosistemas áridos y semi-áridos, los espacios libres y distancias entre plantas son ocupados por diversas comunidades de organismos considerados altamente especializados, los cuales son capaces de “tolerar” la falta de agua; estos organismos (e.g., cianobacterias, micro-hongos, bacterias, algas, líquenes) forman costras biológicas (BSC, por sus siglas en inglés: Biological Soil Crusts) (Grishkan *et al.*, 2006). Estas BSC tienen una función importante dentro de ecosistemas áridos y semi-áridos, ya que incrementan la fertilidad y estabilidad de los suelos e influyen en los ciclos hidrológicos del ecosistema donde se encuentran (Belnap & Lange, 2005).

Los líquenes (organismos autotróficos) son fundamentales en las BSC. Cerca del 49% de los hongos Ascomycota son liquenizados formando asociaciones simbióticas estables con algas y cianobacterias las cuales les proveen de nutrientes (Bidartondo & Gardes, 2005). En las BSC, los líquenes participan como los actores principales para incrementar el contenido de materia orgánica y la retención de humedad en el suelo, así como para reducir la lixiviación de nutrientes (Bidartondo & Gardes, 2005), funciones importantes para el mantenimiento de ecosistemas áridos y semi-áridos. La presencia de hongos liquenizados y micro-hongos en suelos de ecosistemas áridos permite que se magnifiquen las actividades de BSC, proveyendo al suelo de fertilidad y estabilidad (Grishkan *et al.*, 2006).

1.1.4 Estrategias para el estudio de la diversidad de hongos

Se conoce que una amplia diversidad de hongos se encuentran en el suelo, pero hasta el día de hoy, hay una deficiencia en el estudio de su morfología, filogenia y papel ecológico (Jeewon & Hyde, 2007); posiblemente debido a que la mayoría de los estudios se han basado en técnicas dependientes de cultivo.

Para el estudio de la diversidad fúngica del suelo mediante métodos tradicionales (dependientes de cultivo), se usa una técnica de dilución en un medio de enriquecimiento y microscopía para la observación de la morfología de los hongos obtenidos (Jeewon & Hyde, 2007).

A partir de los años 90, el uso de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction) ha permitido superar las limitaciones de los métodos asociados al cultivo (Chris *et al.*, 2010), y profundiza en los estudios de diversidad fúngica en el suelo y otros hábitats. La construcción de genotecas de amplicones, por ejemplo, es útil en la identificación y caracterización de tipos dominantes de hongos en suelo. Esta se lleva a cabo a partir de la extracción de ADN genómico de una muestra ambiental (e. g., suelo, sedimento marino), la obtención de amplicones ITS (Internal Transcribed Spacer) mediante PCR, seguido de su ligación en plásmidos, así como de la replicación de éstos en células de *Escherichia coli*. Posteriormente se realiza la selección de colonias positivas, es decir que contienen el plásmido con el amplicón ligado (Jones & Richards, 2011), se secuencian y comparan los fragmentos. Esta técnica es costosa y requiere de una gran cantidad de tiempo, limitando el número de réplicas o secuencias individuales que pueden obtenerse por muestra (Daniel, 2005). Una de las principales consecuencias de un muestreo limitado de secuencias es la subestimación de diversidad y la imposibilidad de registrar la presencia de especies poco comunes que podrían ser funcionalmente importantes (Lim *et al.*, 2010).

Para analizar comunidades fúngicas se han desarrollado diferentes técnicas, tanto cualitativas como cuantitativas (Bidartondo & Gardes, 2005):

- a) Técnicas para la obtención de perfiles genéticos:
 - DGGE/TGGE (Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización / Electroforesis en Gel con Gradiente Térmico). Esta técnica permite la separación de diferentes productos de PCR que tienen la misma longitud, pero difieren en su secuencia nucleotídica (Souza *et al.*, 2004). Se realiza en geles de poliacrilamida, en donde el producto de PCR se introduce en los pocillos; conforme migra el ADN, las condiciones de desnaturalización del gel aumentan de forma gradual (Paul, 2007). Una de las ventajas de este tipo de técnica, es que permite purificar y secuenciar los fragmentos de interés; en contraste, y como desventaja, existe la posibilidad de perder resolución al

seleccionar amplicones mayores a 500 pb, limitando así información taxonómica (Anderson & Cairney, 2004)

- RFLP (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción). La digestión del ADN por medio de endonucleasas de restricción permite que la variación en la longitud de los fragmentos resultantes indique diferencias entre comunidades del suelo (Paul, 2007; Segal, 2005). Esta técnica puede funcionar como un análisis previo de selección ya que permite diferenciar entre secuencias del mismo tamaño pero que son diferentes en su composición.
- T-RFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción Terminales). Esta técnica se basa en la realización de una PCR con alguno de los dos oligonucleótidos marcados con un fluoróforo, seguido de una digestión con enzimas de restricción; los fragmentos se separan por electroforesis de acuerdo a su tamaño en un gel o secuenciador capilar (Pfenning & Magalhães de Abreu, 2012).

A pesar de que los métodos anteriores (DGGE/TGGE, RFLP y T-RFLP) han sido empleados en muchos estudios de diversidad, estos pueden subestimar el nivel de la diversidad debido a la presencia de bandas heterogéneas o de baja resolución (Lim *et al.*, 2010).

- b) PCR-cuantitativa en tiempo real. Esta técnica parte de la cuantificación de la concentración de ADN, estimando la biomasa del taxón etiquetado (con oligonucleótidos previamente diseñados) en base a técnicas de tiempo real (Pfenning & Magalhães de Abreu, 2012). Se determina la cinética de síntesis del ADN en el proceso de PCR, a partir de la fluorescencia irradiada por fluorocromos (Montesinos *et al.*, 2008).
- c) FISH (Hibridación Fluorescente in situ). Permite la enumeración, visualización e identificación de células microbianas individuales (Moter & Göbel, 2000). Lo anterior es posible mediante la fijación de las células, mientras que la molécula de rARN se hibridiza con sondas de oligonucleótidos específicos para el taxón de interés (Souza *et al.*, 2004).

- d) **Secuenciación Sanger:** El método de Sanger (también llamado método dideoxi) es considerado como de “primera generación” (Metzker, 2009). Este método se basa en el uso de ciertos análogos químicos de los nucleótidos (dideoxi nucleótidos o ddA, ddT, ddC, ddG). Al carecer de un grupo hidroxilo 3' terminal en su desoxirribosa, cuando los dideoxi nucleótidos se incorporan a una cadena creciente de ADN, no permiten que la ADN polimerasa se una a la consecuente base complementaria del ADN molde original (la cual está siendo secuenciada), conteniendo la cadena de ADN en formación. Para conocer la secuencia, cada dideoxi nucleótido se marca con un colorante fluorescente diferente que cuenta con su propia emisión de luminiscencia; así, cuando la cadena de ADN es finalizada, esta es separada por medio de electroforesis (Nussbaum, 2008). Para poder realizar este método se necesita de una gran cantidad de copias del fragmento de ADN de interés, por lo que es necesario insertarlo en vectores de clonación. También es posible realizar una secuenciación directa, esto con el producto de PCR (cadena doble), utilizándolo como molde y estableciendo las condiciones para que esta hibride con el oligonucleótido, procediendo a continuación con el proceso de secuenciación (Soslau, 2004).

1.1.5 Región ITS como “código de barras” para la identificación fúngica

En organismos eucariotas, los genes que codifican para ARN ribosomales se encuentran ordenados en arreglos que incluyen unidades transcripcionales en repetición: 18S - 5.8S – 28S, dos regiones variables: espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2), así como dos secuencias externas ETS (por sus siglas en inglés: External Transcribed Spacer) (Figura 2) (Jeewon & Hyde, 2007; Korabecna, 2007).

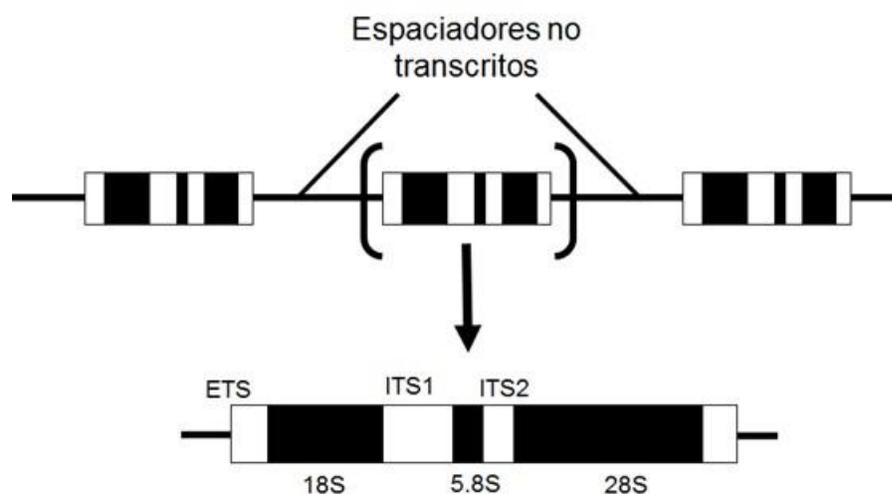


Figura 2. Organización de los genes rARN eucarióticos. Modificado de: Deacon, 2006, p. 171.

Las regiones ITS de genomas de organismos eucarióticos, pueden variar considerablemente, tanto en tamaño como en secuencia. Por ejemplo, en un ratón, la región ITS1 tiene una longitud de 999 pb y la región ITS2 de 1,089 pb, mientras que en un protozooario parásito, la región ITS1 es de 41 bp y la región ITS2 de 55 pb (Korabecna, 2007).

La variabilidad de las regiones ITS permite que sean validadas como “código de barras” (Buée *et al.*, 2009; Wang, *et al.*, 2011) para la identificación fúngica ya que posibilita la identificación a nivel de género y especie (Lai *et al.*, 2007; Schoch *et al.*, 2012; Tedersoo *et al.*, 2010;), en contraste con las subunidades 18S, 5.8S y 28S, las cuales no permiten la identificación a nivel de especie, esto debido a que se consideran regiones conservadas con poca variabilidad en su secuencia.

El uso de las regiones variables ITS para el estudio de la diversidad fúngica, ha hecho necesario el diseño de oligonucleótidos universales; es decir, que permitan la amplificación de la región de interés pero de todos los taxa (Bidartondo & Gardes, 2005).

White y colaboradores (1990) diseñaron los primeros oligonucleótidos universales (ITS1/ITS2 e ITS3/ITS4) para lograr la amplificación de estas regiones,

lo que dio pauta al diseño de oligonucleótidos universales y específicos para cada taxón de hongos.

Gardes y Bruns (1993) diseñaron oligonucleótidos para la amplificación de Basidiomicetos (ITS1F-ITS4-B). Años más tarde, Egger (1995) hizo lo mismo para ectomicorrizas (ITS8mun, ITS9mun, ITS10mun, NL5mun, NL6Amun, NL6Bmun, NL8mun). Estos oligonucleótidos además de amplificar regiones pertenecientes al rADN de hongos, también amplifican rADN de plantas, por lo que Martin y Rygielwicz (2005) diseñaron oligonucleótidos para disminuir este sesgo (NSA3, NSI1, 58A1F, 58A2F, 58A2R, NLB4, NLC2) (Figura 3).

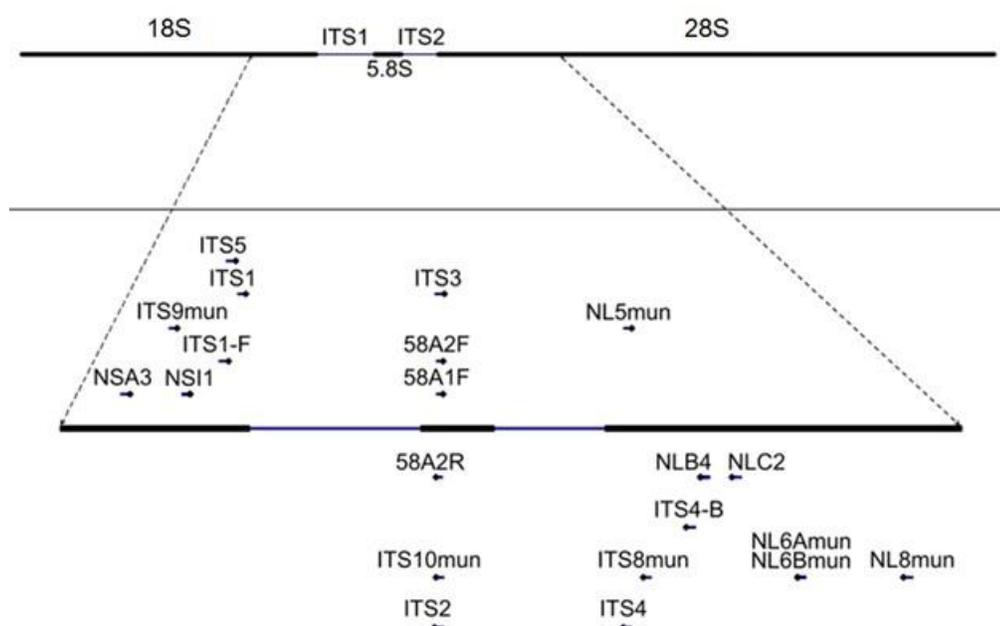


Figura 3. Localización y orientación de los oligonucleótidos en 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S del rDNA. Modificado de: Martin & Rygielwicz, 2005, p. 11.

Así, hasta el día de hoy, se han desarrollado y combinado distintos pares de oligonucleótidos para la amplificación, ya sea universal o taxón-específica, de las regiones ITS en muestras ambientales (Tabla 2).

En el caso de la determinación de la diversidad fúngica donde se busca la amplificación de la región total ITS (ITS1-ITS2, incluyendo 5.8S), se han empleado el par de oligonucleótidos considerados “universales”: ITS1F e ITS4 (Bazzicalupo *et*

al., 2013; Christ *et al.*, 2010; Manter & Vivanco, 2007; Monard, 2012; Porrás-Alfaro *et al.*, 2011) y el par de oligonucleótidos: ITS1 e ITS4 (O'Brien *et al.*, 2005).

Tabla 2. Oligonucleótidos desarrollados para la amplificación de las regiones ITS de rADN (Egger, 1995; Martín & Rygiewicz, 2005; White *et al.*, 1990).

Nombre oligo	Secuencia (5' → 3')	Sentido (S) / Anti-sentido (AS)	Referencia
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	S	(White <i>et al.</i> , 1990)
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	AS	(White <i>et al.</i> , 1990)
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	S	(White <i>et al.</i> , 1990)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	AS	(White <i>et al.</i> , 1990)
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	S	(White <i>et al.</i> , 1990)
ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	S	(Gardes & Bruns, 1993)
ITS4-B	CAGGAGACTTGACACGGTCCAG	AS	(Gardes & Bruns, 1993)
ITS8mun	CTTCACTCGCCGTTACTA	AS	(Egger, 1995)
ITS9mun	TGTACACACCGCCCGTCG	S	(Egger, 1995)
ITS10mun	GCTGCGTTCTTCATCGAT	AS	(Egger, 1995)
NL6Amun	CAAGCGTTTCCCTTTCAACA	AS	(Egger, 1995)
NL6Bmun	CAAGCGTTTCCCTTTCAACA	AS	(Egger, 1995)
NL8mun	TTGGTCCGTGTTTCAAGACG	AS	(Egger, 1995)
NSA3	AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA	S	(Martín & Rygiewicz, 2005)
NSI1	GATTGAATGGCTTAGTGAGG	S	(Martín & Rygiewicz, 2005)
58A1F	GCATCGATGAAGAACGC	S	(Martín & Rygiewicz, 2005)
58A2F	ATCGATGAAGAACGCAG	S	(Martín & Rygiewicz, 2005)
58A2R	CTGCGTTCTTCATCGAT	AS	(Martín & Rygiewicz, 2005)
NLB4	GGATTCTCACCTCTATGAC	AS	(Martín & Rygiewicz, 2005)
NLC2	GAGCTGCATTCCCAAACAACCTC	AS	(Martín & Rygiewicz, 2005)

1.1.6 Secuenciación Sanger y secuenciación masiva

El método convencional de secuenciación de ADN (Sanger) fue descrito hace ya más de 30 años. Este método ha ayudado a obtener una gran información sobre distintos genomas, tanto procarióticos como eucarióticos, pero a su vez las necesidades de los estudios actuales (secuenciación de genomas completos, diversidad de microorganismos, transcriptómica, descubrimiento de variables alélicas, secuenciación de ARN, etc.) ha dejado en claro que tiene limitaciones tanto en rendimiento como en costo (Ronaghi, 2001).

El surgimiento de técnicas de secuenciación de siguiente generación (NGS, por sus siglas en inglés: Next Generation Sequencing) ha permitido el desarrollo de técnicas eficientes y de alto rendimiento (Xu, 2006), además de ofrecer una alternativa menos costosa y rápida (Quince *et al.*, 2011).

Un ejemplo de este tipo de tecnologías, es HiSeq y MiSeq desarrollada por la compañía Illumina, la cual se introdujo en el 2006. Están basadas en la secuenciación por síntesis, produciendo lecturas pequeñas de alrededor de 32-150 pb, y permiten la secuenciación simultánea de miles de secuencias en pocos días (Mardis, 2007). Otra tecnología de siguiente generación es SOLiD (siglas en inglés: Sequencing by Oligo Ligation and Detection), implementada por Applied Biosystems. Esta tecnología requiere de un mínimo de 5 días para producir 3-4 Gb de secuencias de una longitud de 25-35 pb, y utiliza un adaptador ligado a un fragmento de la biblioteca utilizando PCR de emulsión acoplado a pequeñas esferas magnéticas para amplificar los fragmentos y secuenciar (Mardis, 2008). La principal desventaja de las tecnologías HiSeq, MiSeq y SOLiD, es que proveen de secuencias cortas, además de que fueron diseñadas para la re-secuenciación de genomas ya conocidos. A pesar de esto, las tecnologías pertenecientes a Illumina cuentan con una mejor cobertura de secuenciación que otras tecnologías implementadas por la compañía Roche (plataforma Pirosecuenciación), esto se ve reflejado en un menor número de errores en las secuencias provistas por las tecnología Illumina lo cual facilita la detección de ambigüedades de la secuenciación, como el caso de los homopolímeros (Luo *et al.*, 2012).

La plataforma de secuenciación de Pirosecuenciación (Roche 454) permite obtener secuencias de mayor longitud (de hasta poco menos de 1,000 pb) y un menor tiempo (7-8 horas) (Marsh, 2008). Se basa primeramente en la fragmentación del ADN, seguida de la incorporación de las secuencias de identificación (“barcode”, secuencias de no más de 12 pb las cuales ayudan a la identificación una vez realizada la secuenciación) y adaptadores (A y B) los cuales actuarán posteriormente en el proceso; una vez realizada la ligación de las secuencias de identificación, el ADN se separa en cadenas sencillas y es sujeto a una PCR de

emulsión (permite la amplificación del ADN en un medio de agua y aceite, formando pequeños micro-reactores) en donde se encuentra una sola cadena de ADN ligada a una esfera (Mardis, 2008). Una vez realizada la PCR de emulsión, las esferas son incorporadas a una placa con pequeños pocillos (44 μm), de modo que haya una sola esfera en cada pozo.

Este método no utiliza fluoróforos para detectar las bases incorporadas de ADN, si no que tan pronto un nucleótido es incorporado dentro de la cadena de ADN creciente, se libera una molécula de pirofosfato, que se convierte de forma enzimática a ATP (Adenosín trifosfato); la cual entra en contacto con la luciferasa, produciendo una luz (Fakruddin *et al*, 2012; Hert *et al.*, 2008;) que es captada por una cámara de alta resolución. La cantidad de luz emitida es proporcional al número de nucleótidos incorporados (Mardis, 2008).

Uno de los retos que conlleva el uso de este tipo de plataformas de secuenciación, es el manejo de la gran cantidad de secuencias obtenidas. Para esto, se han desarrollado diferentes programas o paquetes informáticos los cuales permiten el análisis de las secuencias, ya sean de un organismo (genoma), de un grupo de organismos (metagenoma) o de una o múltiples muestras (multiplexing).

Un ejemplo de programas es QIIME (por sus siglas en inglés: Quantitative Insights Into Microbial Ecology, www.qiime.org), el cual ha permitido realizar análisis de las secuencias obtenidas a partir de una secuencia de programas en tándem (Figura 4):

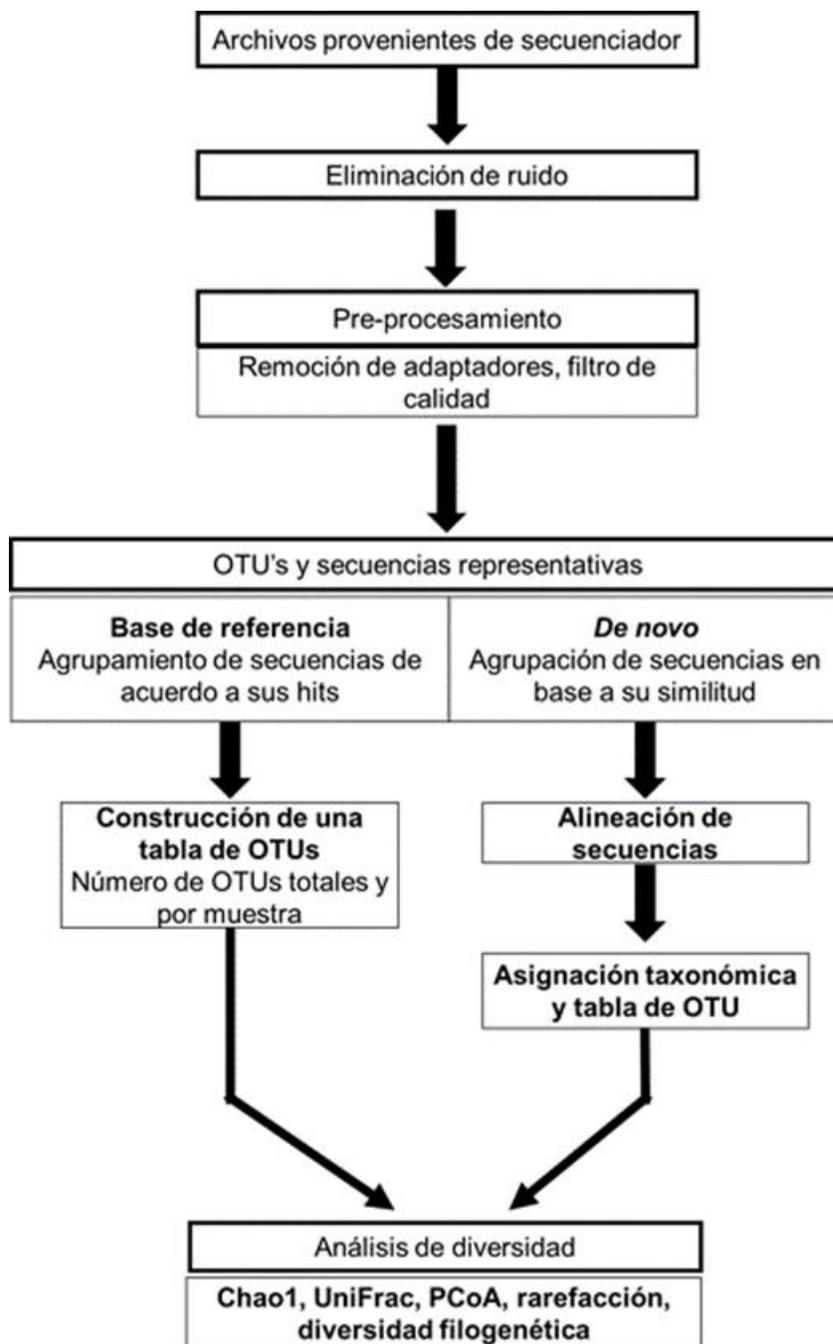


Figura 4. Diagrama de flujo del procesamiento de secuencias provenientes de pirosecuenciación.

A pesar de que la mayoría de los programas están pensados para el análisis de diversidad de bacterias, se han logrado realizar adaptaciones para el análisis de

secuencias ITS de rADN de hongos, lo que ha incrementado el interés en probar nuevas metodologías que permitan la secuenciación de comunidades enteras (Nilsson *et al.*, 2009).

En proyectos de diversidad fúngica, la plataforma de pirosecuenciación se ha convertido en la más empleada, ya que posibilita la secuenciación de las regiones ITS completas, mientras que, por el momento, las plataformas desarrolladas por Illumina/Solexa, no son capaces de cubrir la región completa (Monard *et al.*, 2012).

1.1.7 Metagenómica de hongos en suelos áridos

La metagenómica se refiere al análisis del material genético recuperado de una muestra para acceder, por medio de tecnologías genómicas y herramientas bioinformáticas, a comunidades enteras de microorganismos (Thomas *et al.*, 2012).

La mayoría de los trabajos de diversidad de hongos en el suelo han sido enfocados a ecosistemas húmedos y templados (Brodie *et al.*, 2003; Bueé *et al.*, 2009; Christ *et al.*, 2010; Jumpponen *et al.*, 2010; Lentendu *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2010; McGuire *et al.*, 2012), mientras que los trabajos de diversidad fúngica en ecosistemas áridos y semi-áridos son escasos (Durrell & Shields, 1960; Oliveira *et al.*, 2013; Porrás-Alfaro *et al.*, 2011; Romero-Olivares *et al.*, 2013).

En estudios de ecosistemas áridos y semi-áridos la presencia de diversos grupos taxonómicos de hongos hace notoria su habilidad de adaptación al estrés hídrico así como también a las altas temperaturas; entre los grupos de hongos encontrados en este tipo de ecosistemas destaca el filo Ascomycota como uno de los más abundantes, y dentro de éste los órdenes Pleosporales, Sordariales, Pezizales, Hypocreales, Dothideales, seguido del filo Basidiomycota y dentro de éste los órdenes Agaricales, Filobasidiales, Trechisporales, (Oliveira *et al.*, 2013; Porrás-Alfaro *et al.*, 2011; Romero-Olivares *et al.*, 2013); en menos abundancia se pueden encontrar a los fillos Zygomycota y Chytridiomycota (Porrás-Alfaro *et al.*, 2011)

1.1.8 Ecosistemas áridos y semi-áridos de Baja California

Los ecosistemas áridos y semiáridos abarcan aproximadamente el 40% de la superficie terrestre y su área se está expandiendo (MEA, 2005). En México, aproximadamente la mitad del territorio es considerado como árido y semiárido. En particular, la península de Baja California, localizada en el noroeste de México, está caracterizada por contar con una amplia variedad de ecosistemas, donde predominan las zonas áridas y semiáridas, existiendo en menor medida zonas templadas (Rzedowski, 2006). Su climatología, al igual que sus ecosistemas, es variada, contando con climas áridos, semiáridos, mediterráneos, templados y húmedos (Rzedowski, 2006). Esta variedad de climas es principalmente debida a que la península se encuentra geográficamente en una celda de alta presión, lo que favorece a los climas áridos y semiáridos, pero además está influenciada por una corriente marina fría que tiene efectos considerables a lo largo de la península (Rzedowski, 2006). Los patrones de precipitación en la península de Baja California se pueden dividir en tres grandes regiones (Arriaga-Ramírez & Cavazos, 2010): el sur de la península, la región central (donde las lluvias están influenciadas principalmente por el monzón de Norte América, presentando periodos de lluvias principalmente en Julio y Septiembre) y la región noroeste (periodo de lluvias desde enero hasta abril, debido al anticiclón del Norte del Pacífico).

1.2 Justificación

Se conoce poco acerca de la diversidad microbiana en ecosistemas áridos y semi-áridos de México, y aún menos en el estado de Baja California. Los hongos, en este tipo de ecosistemas, juegan un papel importante como mediadores en el reciclaje de nutrientes, formando interacciones simbióticas con plantas y bacterias, así como también en la formación de agregados del suelo, por lo que resulta importante ampliar el estudio sobre su interacción con los componentes bióticos y abióticos de este tipo de ecosistemas.

En nuestro grupo de trabajo (Laboratorio de Biología Celular y Molecular de Hongos), se han realizado estudios de diversidad fúngica en algunos ecosistemas áridos y semi-áridos de Baja California (Romero-Olivares et al., 2013), y se ha reportado que los hongos en los sitios de estudio cuentan con un patrón de distribución que tienen cierta similitud con patrones de distribución de plantas y su diversidad se encuentra influenciada por las características climáticas de cada sitio. Dentro de estos estudios, la región de Valle de las Palmas presentó mayor diversidad fúngica que el resto de los ecosistemas, lo cual podría sugerir que sus características edáficas son las óptimas para el desarrollo fúngico. A pesar de la diversidad reportada en ese trabajo, se considera que el estudio tuvo ciertas limitaciones de acuerdo al número de secuencias obtenidas para su análisis, además que el estudio fue dirigido hacia especies fúngicas pertenecientes al sub-reino Dikarya.

Este proyecto profundiza en los estudios de diversidad de hongos en Valle de las Palmas, considerando dos micro-hábitats presentes en el sitio los cuales se diferencian por el grado de perturbación de roedores así como sus cambios edafológicos y de diversidad en dos estaciones del año que difieren en temperatura y precipitación. Lo anterior permitiría expandir el conocimiento sobre la ecología de los hongos en este tipo de ecosistemas.

1.3 Hipótesis

Los hongos en el suelo no son cosmopolitas, su diversidad se encuentra regida de acuerdo a las características físico-químicas del micro-hábitat que habitan, así como a las características climáticas del ecosistema donde se encuentra dicho micro-hábitat, es por esto que su distribución puede ser explicada por la heterogeneidad del suelo dentro del ecosistema. Lo anterior se encuentra plasmado en las siguientes hipótesis.

1. Las características físico-químicas de muestras de suelo de dos micro-hábitats (madriguera y superficie) en Valle de las Palmas, Baja California, serán diferentes.
2. Las características físico-químicas de muestras de suelo en Valle de las Palmas, Baja California, serán diferentes entre estaciones (verano e invierno).
3. La diversidad y composición de comunidades de hongos en el suelo de dos micro-hábitats (madriguera y superficie) en Valle de las Palmas, Baja California, serán diferentes y tales diferencias estarán relacionadas con las características físico-químicas de los micro-hábitats.
4. La diversidad y composición de comunidades de hongos en el suelo en Valle de las Palmas, Baja California serán diferentes entre estaciones (verano e invierno) y las diferencias estarán relacionadas con las características físico-químicas de las muestras en cada estación.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar la diversidad fúngica de Valle de las Palmas, en dos micro-hábitats que contrastan en el grado de perturbación por roedores y durante dos estaciones del año que difieren en temperatura y precipitación, mediante la obtención de perfiles metagenómicos basados en secuencias de ITS-rADN.

1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar las características edafológicas de cada punto de muestreo en verano e invierno.
- Obtener y analizar información metagenómica de la microbiota de los suelos colectados.

- Identificar las diferencias de la diversidad y patrones de distribución fúngica de muestras obtenidas de superficie y suelo de madriguera.
- Determinar la relación que existe entre las características edafológicas de cada micro-hábitat y la diversidad fúngica observada.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Muestreo

El Valle de las Palmas (VDP), se encuentra al noroeste de la península de Baja California, y se caracteriza por tener un clima mediterráneo con veranos cálidos y secos, los cuales contrastan con sus inviernos húmedos y fríos. VDP se clasifica como chaparral desértico, con temperatura mínima de 4 °C, máxima de 35.2 °C y precipitación media anual de 209 mm. Las principales especies vegetales con las que cuenta son: *Simmondsia chinensis*, *Ephedra californica*, *Adenostoma fasciculatum*, *Yucca schidigera*, *Mammillaria dioica*, *Acacia greggii*, *Eriogonum fasciculatum* y *Artemisia californica* (Romero-Olivares *et al.*, 2013).

Se realizaron dos muestreos, uno en verano (11 de julio del 2012) y otro en invierno (18 de enero del 2013). Cada uno se realizó en una zona delimitada con actividad de roedores. Los puntos de muestreo se seleccionaron de forma aleatoria y se trazaron con ayuda de un GPS (Sistema de Posicionamiento Global, por sus siglas en inglés: Global Positioning System) (Figura 5). En el muestreo de invierno, se colectó el suelo ubicando el punto geográfico marcado durante el muestreo de verano; en el caso de las muestras de suelo de madriguera, la toma de muestra fue de la madriguera más cercana con actividad de roedores.

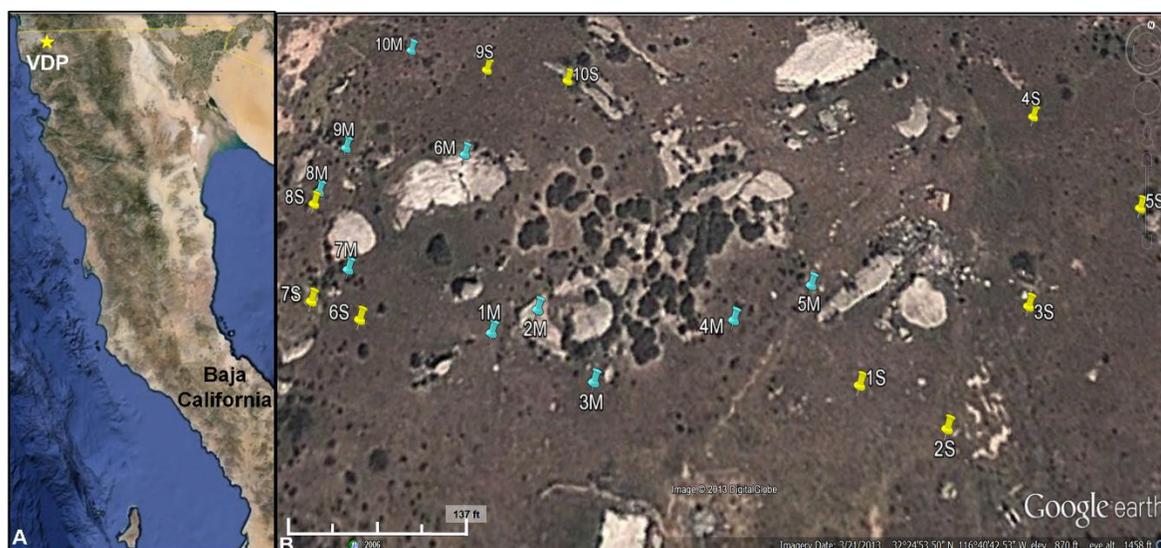


Figura 5. Sitio de estudio Valle de las Palmas (VDP). (A) Ubicación de VDP en la península de Baja California Norte. (B) Puntos de muestreo de verano en Valle de las Palmas, Tecate, Baja California, México. S: Superficie (puntos amarillos). M: Madriguera (puntos azules). (Google Earth 7.1, 2013).

2.1.1 Recolección de las muestras

En cada uno de los muestreos se recolectaron 20 muestras de alrededor de 500 gramos cada una, correspondientes a dos micro-hábitats (Figura 6): 10 muestras suelo-superficie (S) (sin perturbación y sin cubierta vegetal) y 10 muestras de suelo influenciadas por madrigueras de roedores (M), resultando en un total de 40 muestras de suelo. La profundidad a la cual se recolectó el suelo fue entre 10 y 20 cm, ya que en este tipo de ecosistemas se considera que en la superficie del suelo, al recibir radiación solar directa, las condiciones son inhóspitas para el desarrollo fúngico.

Para la recolección de las muestras se utilizó una pala, que fue lavada con cloro al 10% entre puntos de muestreo para evitar contaminación cruzada. Para la recolección de las muestras se utilizó una pala la cual, entre puntos de muestreo, fue lavada con cloro al 10% para evitar contaminaciones. Para contener las muestras se utilizaron bolsas Ziploc® y se almacenaron en una hielera para su traslado al laboratorio.

Durante el muestreo se utilizaron cubre bocas para evitar contacto con el hongo patógeno *Coccidioides spp.* cuya presencia se ha reportado en Valle de las Palmas (Baptista-Rosas *et al.*, 2012; Cairns *et al.*, 2000).

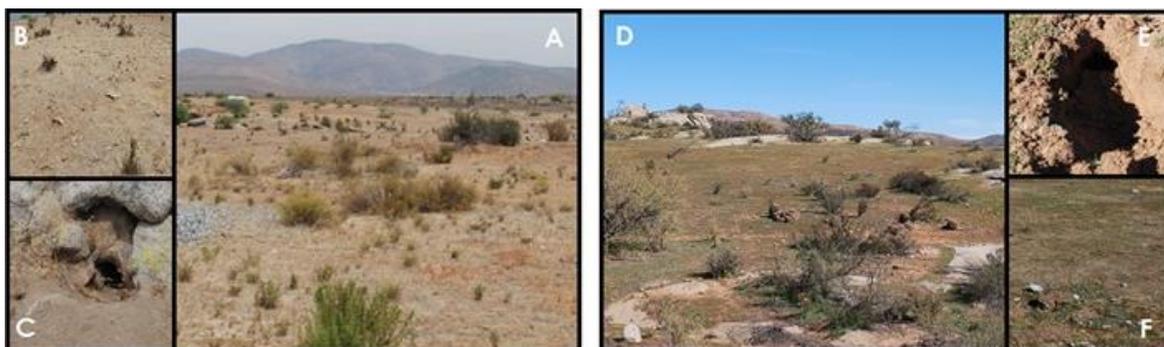


Figura 6. Panorámica del sitio de estudio en la estación de verano (A), suelo superficie (B), suelo madriguera (C). Panorámica del sitio de estudio en la estación de invierno (D), suelo madriguera (E), suelo superficie (F).

2.1.2 Variables medidas en campo

En cada punto de muestreo (en verano e invierno) se midieron las variables de temperatura y humedad, con los sensores LI-8100A (sensor temperatura) y ECH2O (sensor humedad), acoplados a un sistema Analizador de Gases en Infra Rojo (IRGA, por sus siglas en inglés) de LI-8100 (LICOR).

2.1.3 Almacenamiento de las muestras

Una vez que las muestras estuvieron en el laboratorio, se tomaron 50 gramos de suelo de cada una y se almacenaron a -80°C para posteriores análisis moleculares. El resto de las muestras fue almacenado a temperatura ambiente para su análisis edafológico. Los nombres de cada una de las muestras se asignaron de acuerdo al tipo de suelo (Madriguera (M) o Superficie (S)) así como a la estación del año en la cual se realizó el muestreo (verano (V) o invierno (I)).

2.2 Caracterización de suelo

2.2.1 Potencial hidrógeno (pH)

A cada muestra de suelo, se le determinó el pH medido en agua a través del método AS-02 de la NOM-021-RECNAT-2002, en el cual se mide la concentración del ion hidrógeno (H) mediante el uso de un electrodo cuya membrana es sensible a [H]. Se utilizaron 10 gramos de cada muestra de suelo, a los cuales se les añadieron 20 mL de agua desionizada; esta mezcla fue agitada por intervalos de 5 minutos durante 30 minutos; posteriormente se dejó en reposo por 15 minutos y se procedió a la medición de pH con un potenciómetro (Corning Pinnacle M530 pH meter, Woburn, MA USA; precisión de +/- 0.01).

2.2.2 Contenido de humedad

La determinación del contenido de humedad de cada muestra de suelo, se realizó de acuerdo al método de gravimetría especificado en la AS-05 de la NOM-021-RECNAT-2002. Primeramente se introdujeron los crisoles a una estufa para eliminar los residuos de humedad que pudieran contener y se pesaron hasta obtener un peso constante. Se utilizaron 10 gramos de cada una de las muestras (suelo húmedo) y se introdujeron en los crisoles. Todas las muestras fueron expuestas a calor en una estufa para evaporar su contenido de agua. Las muestras se pesaron hasta obtener peso constante. Los datos obtenidos fueron introducidos a la siguiente fórmula:

$$\%Humedad = \frac{(PMH - PMS)}{(PMS)} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

PMH = Peso muestra húmeda

PMS = Peso muestra seca

2.2.3 Contenido de materia orgánica

El procedimiento para determinar el contenido de materia orgánica de cada muestra de suelo, se llevó a cabo a partir del método de pérdida de peso por ignición (Reeuwijk, 2002). Se utilizaron 10 gramos de suelo de cada muestra, las cuales fueron sometidas a sequedad hasta obtener un peso constante, posteriormente fueron introducidas a una mufla a una temperatura de 550°C durante 8 horas, hasta obtener un peso constante. Los datos obtenidos fueron introducidos a la siguiente fórmula:

$$\%Materia\ orgánica = \frac{(PMS-PMQ)}{(PMQ)} \times 100 \quad (2)$$

Donde:

PMS = Peso muestra seca

PMQ = Peso muestra quemada

2.2.4 Textura

La determinación de textura se realizó en 3 muestras de cada tipo de microhábitat provenientes de las dos estaciones (verano e invierno). Las muestras fueron: 2SI, 5SI, 9SI, 1MI, 3MI y 7MI (de la estación de invierno) y 2SV, 5SV, 9SV, 1MV, 3MV y 7MV (de la estación de verano). El método utilizado fue el de Bouyoucos (AS-09) de la NOM-021-RECNAT-2002. Se utilizaron 60 gramos de cada muestra de suelo, a los cuales se les agregaron 40 mL de agua oxigenada hasta sequedad, con el fin de eliminar la materia orgánica; posteriormente se añadieron 40 mL de hexametáfosfato de sodio, con la finalidad de separar las partículas no reconocidas como de suelo. Pasadas 24 horas se agregaron 5 mL de oxalato de sodio y 5 mL de metasilicato de sodio, dejando reposar durante 15 minutos. Después se licuó durante 5 minutos y se vació todo el contenido a una probeta de 1 litro agregando agua hasta completar el volumen. Se agitó con cuidado por 1 minuto. Con un

hidrómetro y un termómetro, se midió la densidad y la temperatura a los 40 segundos a las 2 horas. Una vez obtenidos estos datos, se corrigieron las lecturas del hidrómetro con las mediciones de temperatura de acuerdo a la tabla contenida en la NOM-021-RECNAT-2002. Ya corregidos los datos, se calcularon los porcentajes de arena, arcilla y limo de acuerdo a lo siguiente:

- La lectura a los 40 segundos multiplicada por 2 es igual al porcentaje de arcilla más limo.
- El porcentaje de arena se obtiene restando de 100 el porcentaje de arcilla más limo.
- La lectura obtenida a 2 horas multiplicadas por 2 es igual al porcentaje de arcilla.
- El porcentaje de limo se obtiene por diferencia.

Para determinar a qué tipo de suelo pertenecían las muestras, se relacionaron sus porcentajes de limo, arcilla y arena de acuerdo al triángulo textural de suelo de la Figura 7.

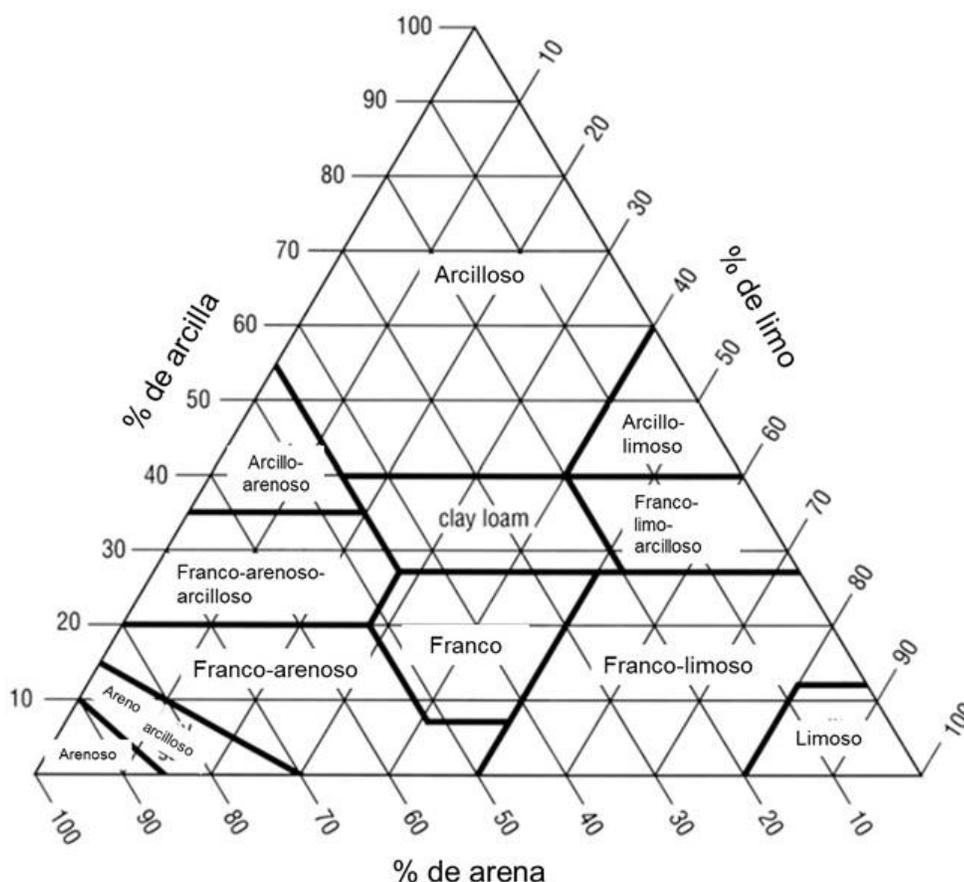


Figura 7. Triángulo textural de suelo. Modificado de: Chesworth, 2008, p 506..

2.2.5 Determinación de salinidad por conductividad eléctrica

La determinación de salinidad se llevó a cabo por medio de la medición de la conductividad eléctrica. Para formar el extracto de saturación, se utilizaron 50 gramos de cada una de las muestras y se les agregó agua destilada hasta la saturación (el suelo debe tener una apariencia brillante). Posteriormente se dejó reposar durante 24 horas. Pasado el tiempo de reposo se procedió a filtrar el extracto por medio de una bomba de vacío a través de filtros Whatman Número 1.

Una vez que se realizó el filtrado, se procedió a medir la conductividad eléctrica por medio del sensor Field Scout Direct Soil EC Meter (Spectrum Technologies, Inc.).

La salinidad se determinó de acuerdo a los resultados de conductividad eléctrica de cada muestra, de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 3. Efectos de salinidad en el suelo de acuerdo a los valores de conductividad eléctrica. (CE) Conductividad Eléctrica, (dS) deci-siemmens (NOM-021-RECNAT-2002).

CE dS m⁻¹	Efectos
< 1.0	Efectos despreciables de la salinidad
1.1 – 2.0	Muy ligeramente salino
2.1 – 4.0	Moderadamente salino
4.1 – 8.0	Suelo salino
8.1 – 16.0	Fuertemente salino
> 16.0	Muy fuertemente salino

2.3 Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías

Para determinar las diferencias de las características de suelo entre MV, SV, MI y SI, se realizó un ANOVA de dos vías, usando el programa Statistica 10 (Statsoft, Inc. Tulsa, OK, USA). Los factores fueron: estación del año y tipo de micro-hábitat.

2.4 Diagramas de Superficie

Se llevó a cabo la elaboración de diagramas de superficie de cada una de las características edafológicas, usando el programa Surfer 10 (Golden Software, Inc. Colorado). Estos diagramas proporcionan información sobre la variación de cada característica de acuerdo al punto de muestreo georeferenciado creando isocurvas interpoladas de acuerdo a la distribución espacial de la variable.

2.5 Extracción de ADN genómico total de muestras de suelo

Se realizó la extracción de ADN genómico total de cada una de las muestras de suelo. Este procedimiento se llevó a cabo utilizando el kit de extracción de ADN

PowerSoil® DNA Isolation Kit (Mebio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.6 Cuantificación y análisis de pureza del ADN genómico total extraído

Una vez extraído el ADN genómico total de suelo de cada una de las muestras, se procedió a cuantificar y determinar la pureza de los ácidos nucleicos. Lo anterior fue posible utilizando un equipo NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc., Modelo: Lite Nanodrop, Waltham, MA, USA).

Los resultados de la relación A260/A280 se consideraron de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 4. Interpretación de los datos obtenidos en la relación A260/A280.

Valor obtenido	Interpretación
1.8 - 2	La absorción es originada por la presencia de ácidos nucleicos
<1.8	Presencia de proteínas u otros contaminantes
>2	Posible contaminación con cloroformo o fenol

2.7 Pruebas de PCR para seleccionar oligonucleótidos

Se probó la efectividad de cuatro combinaciones de oligonucleótidos universales para la amplificación de la región ITS completa (ITS1-5.8S-ITS2) y la amplificación de la región ITS1 (ver Figura 3) utilizando ADN genómico de una muestra de suelo escogida al azar, además de agregar un control negativo (agua) y un control positivo (ADN del hongo *Neurospora crassa*).

Combinaciones de oligonucleótidos:

- a) ITS1F e ITS4 (oligonucleótido sentido y antisentido respectivamente), los cuales amplifican entre 600 y 800 pb.

- b) ITS1F e ITS2 (oligonucleótido sentido y antisentido respectivamente), los cuales amplifican entre 200 y 300 pb.
- c) ITS1 e ITS4 (oligonucleótido sentido y antisentido respectivamente), los cuales amplifican entre 600 y 800 pb.
- d) ITS1 e ITS2 (oligonucleótido sentido y antisentido respectivamente), los cuales amplifican entre 150 y 250 pb.

El volumen de reacción de PCR fue de 20 μ l. Las condiciones de PCR se muestran en la Tabla 5.

Para verificar la amplificación, se corrieron 10 μ l de cada reacción en geles de agarosa al 1% (para amplicones esperados de 600 a 800 pb) y al 2% (para amplicones esperados de 150 a 250 pb), se tiñeron con bromuro de etidio y se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler™ (1 kb, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) y GeneRuler™ (100 pb, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), respectivamente. Las bandas teñidas fueron observadas con luz UV.

Tabla 5. Reactivos y programas de PCR utilizados en la selección de oligonucleótidos.

Reactivo	Concentración	Volumen en reacción	Programa PCR			
				°C	Tiempo	
10X Dream Taq buffer (con MgCl ₂)	10X	4 µl	35 ciclos	Desnaturalización inicial	95	5 min
dNTP's	10 mM	1.5 µl				
Oligo sentido (ITS1F)	10 µM	1.25 µl		Desnaturalización	95	30 seg
Oligo antisentido (ITS4)	10 µM	1.25 µl				
DreamTaq polimerasa	5U/µl	0.25 µl				
H ₂ O HPLC	---	10.75 µl		Alineamiento	55	40 seg
ADN genómico	10 ng/µl	1 µl		Extensión	72	40 seg
			Extensión final	72	5 min	
10X Dream Taq buffer (con MgCl ₂)	10X	4 µl	35 ciclos	Desnaturalización inicial	95	5 min
dNTP's	10 mM	1.5 µl				
Oligo sentido (ITS1F)	10 µM	1.25 µl		Desnaturalización	95	30 seg
Oligo antisentido (ITS2)	10 µM	1.25 µl				
DreamTaq polimerasa	5U/µl	0.25 µl				
H ₂ O HPLC	---	10.75 µl		Alineamiento	55	30 seg
ADN genómico	10 ng/µl	1 µl		Extensión	72	40 seg
			Extensión final	72	5 min	
10X Dream Taq buffer (con MgCl ₂)	10X	4 µl	35 ciclos	Desnaturalización inicial	95	5 min
dNTP's	10 mM	1.5 µl				
Oligo sentido (ITS1)	10 µM	1.25 µl		Desnaturalización	95	30 seg
Oligo antisentido (ITS4)	10 µM	1.25 µl				
DreamTaq polimerasa	5U/µl	0.25 µl				
H ₂ O HPLC	---	10.75 µl		Alineamiento	58	40 seg
ADN genómico	10 ng/µl	1 µl		Extensión	72	40 seg
			Extensión final	72	5 min	
10X Dream Taq buffer (con MgCl ₂)	10X	4 µl	35 ciclos	Desnaturalización inicial	95	5 min
dNTP's	10 mM	1.5 µl				
Oligo sentido (ITS1)	10 µM	1.25 µl		Desnaturalización	95	30 seg
Oligo antisentido (ITS2)	10 µM	1.25 µl				
DreamTaq polimerasa	5U/µl	0.25 µl				
H ₂ O HPLC	---	10.75 µl		Alineamiento	58	40 seg
ADN genómico	10 ng/µl	1 µl		Extensión	72	40 seg
			Extensión final	72	5 min	

2.8 Amplificación de la región ITS del rADN

Una vez que se seleccionaron los oligonucleótidos, se procedió a la amplificación de la región ITS1 de todas las muestras de ADN genómico de suelo en reacciones de 50 μ l y las condiciones indicadas en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de PCR utilizadas en la amplificación de la región ITS del rADN.

Reactivos	Concentración	Volumen de reacción	Programa PCR			
				°C	Tiempo	
10X Dream Taq buffer (con MgCl ₂)	10X	10 μ l		Desnaturalización inicial	95	5 min
dNTP's	10 mM	3.7 μ l				
Oligo sentido (ITS1)	10 μ M	3.1 μ l				
Oligo antisentido (ITS2)	10 μ M	3.1 μ l	35 ciclos	Desnaturalización	95	30 seg
DreamTaq polimerasa	5U/ μ l	0.5 μ l		Alineamiento	62	40 seg
H ₂ O HPLC	---	28.6 μ l		Extensión	72	40 seg
ADN genómico	10 ng/ μ l	1 μ l		Extensión final	72	5 min

Para verificar la amplificación, se corrieron 10 μ l de cada reacción en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler™ (100 pb, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Las bandas amplificadas fueron observadas con luz UV.

2.9 Preparación de ADN genómico para secuenciación

La compañía seleccionada para el servicio de secuenciación por la plataforma de pirosecuenciación fue Research & Testing Laboratory (<http://www.researchandtesting.com/>).

El ADN genómico de cada muestra fue ajustado a una concentración de alrededor de 20 ng/ μ l en un volumen de 25 μ l (según especificaciones de la compañía). Las muestras de las cuales obtuvieron una concentración menor a la especificada por la compañía se enviaron sin modificaciones.

Los ajustes de concentraciones se realizaron con ayuda de un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc., Modelo: Lite Nanodrop). La compañía encargada de la pirosecuenciación llevó a cabo la amplificación y secuenciación de la región ITS completa utilizando los oligonucleótidos ITS1F e ITS4.

2.10 Análisis de secuencias

Se recibieron 3 tipos de archivos como producto del proceso de secuenciación:

- Archivo de secuencias (.fasta o .fna). Este archivo contiene las secuencias de la región ITS del rADN, correspondientes a cada una de las muestras.
- Archivo de calidad (.qual). Archivo que contiene las puntuaciones de calidad de cada base de cada una de las secuencias.
- Archivo de mapeo (.txt, *Mapping File*). Archivo que contiene las secuencias de identificación de cada una de las secuencias, así como la secuencia del oligonucleótido sentido.

En la Figura 8, se muestra un diagrama de flujo del manejo y análisis de las secuencias.

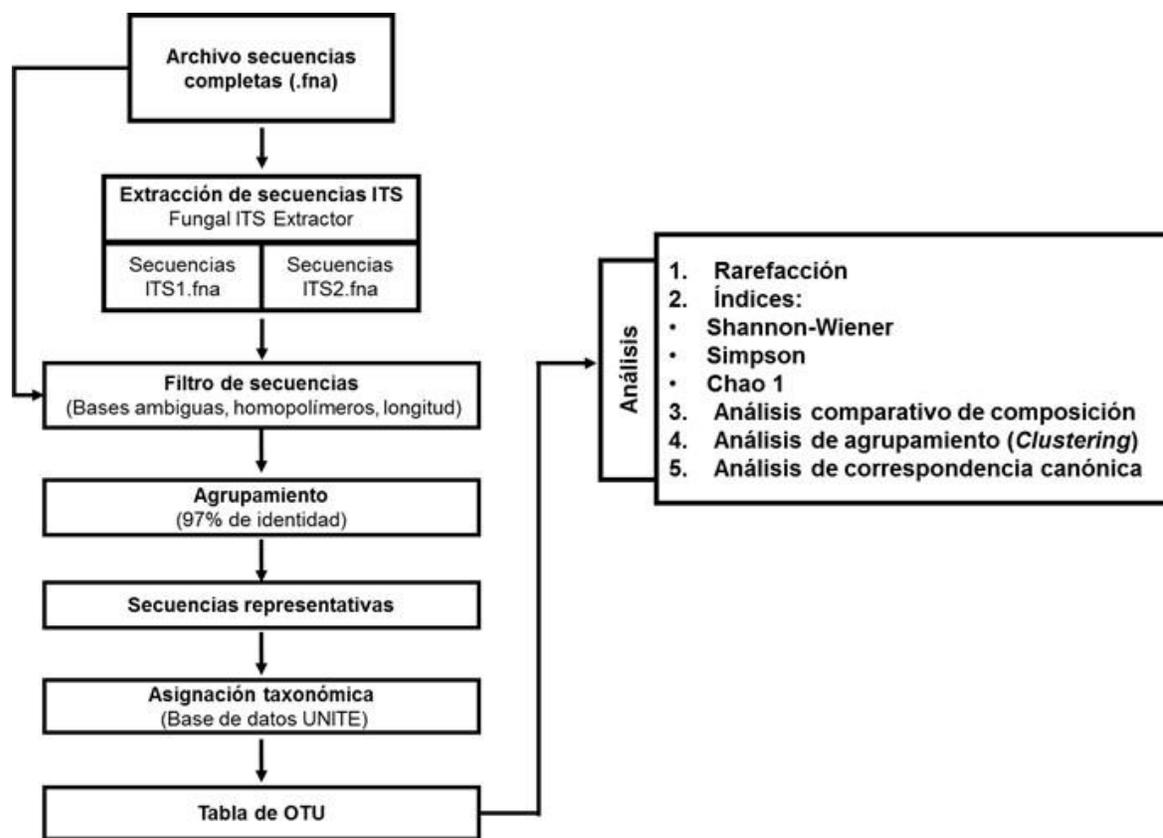


Figura 8. Diagrama de flujo del manejo y análisis de secuencias. (OTU) Unidad Taxonómica Operacional.

2.10.1 Revisión de algoritmos para determinar la calidad de las secuencias

El proceso de limpieza de las secuencias realizado por la compañía fue el siguiente:

- **Calidad (*Quality Trimming*)**. Este proceso se basó en determinar la calidad de los extremos de cada lectura. Para esto se utilizó el archivo con terminación .qual (provisto por el secuenciador) el cual ayuda a determinar en qué parte de la secuencia se encuentran bases que no cumplen con el criterio de calidad.
- **Detección de quimeras (*Chimera Checking*)**. La formación de secuencias quiméricas se produce cuando la extensión de una secuencia es “abortada” y esta juega un papel de oligonucleótido en procesos subsecuentes de extensión durante los siguientes ciclos de PCR (Petrosino *et al.*, 2009; Quince *et al.*, 2011). El

procedimiento que se utilizó para detectar secuencias quiméricas, fue mediante la ejecución del algoritmo UCHIME en modo de *novo* (Edgar *et al.*, 2011).

De acuerdo con Edgar y colaboradores (2011), el algoritmo UCHIME asume, principalmente, que la secuencia a analizar corresponde a una secuencia única en la muestra amplificada y que las secuencias quiméricas se encuentran en menor proporción. El programa de UCHIME en modo de *novo* se basa en lo siguiente:

- a) Se construye una base de datos, esto es, situando a las secuencias en orden decreciente de abundancia ya que se considera que las secuencias “reales” tendrán una abundancia por lo menos dos veces mayor que las secuencias quiméricas.
- b) Las secuencias no consideradas quiméricas, constituyen la base de datos.
 - **Eliminación de ruido (*Denoising*)**. Este proceso toma los archivos-resultado del Quality Trimming y el Chimera Checking, eliminando los errores de bases y secuencias de mala calidad. El algoritmo que se utiliza es el siguiente:
 - a) El sistema lee en el archivo una lista de secuencias no quiméricas y analiza de nuevo las secuencias que hay que conservar y las colectará.
 - b) Cada secuencia es comparada con una secuencia consenso usando un patrón de alineamiento y su puntuación de calidad, de acuerdo con las siguientes condiciones:
 - Si una base ha sido marcada para ser removida y además tiene una puntuación menor a 30, es eliminada.
 - Si la base ha sido marcada para ser removida pero cuenta con una puntuación mayor a 30, es retenida.
 - Si la base es marcada como alteración y su puntuación es menor a 30, la base es cambiada por la letra *N*.
 - Si la base es marcada como alteración pero su puntuación es mayor a 30, la base es retenida.
 - Si el patrón indica que una base debe ser insertada dentro de la secuencia, entonces la base se inserta en la secuencia en la posición indicada.

- Por cada base que es cambiada o insertada se genera una nueva puntuación, así como por cada base que es removida de la secuencia, su puntuación registrada es removida.

Los archivos resultado de *Denoising* son utilizados para análisis posteriores (archivos .fna o .fasta y .qual).

2.10.2 Extracción de secuencias de ITS1 e ITS2 del rADN

Se realizó la extracción de las regiones ITS1 e ITS2 de cada una de las secuencias de cada muestra, con ayuda del programa Fungal ITS Extractor (Nilsson *et al.*, 2009), y a partir del archivo de secuencias (.fna).

El programa Fungal ITS Extractor realiza la extracción de las regiones ITS de la siguiente manera:

- a) Las regiones ITS1 e ITS2 se localizan utilizando secuencias cortas (18 a 25 pb) y largas (30 a 50 pb) de los genes 18S, 5.8S y 28S.
- b) Cada una de las secuencias problema se alinea contra secuencias largas de 18S, 5.8S y 28S a través de un modelo estadístico de cadenas ocultas de Markov (Nilsson *et al.*, 2008). Este modelo estadístico optimiza el alineamiento usando reiteraciones estocásticas.
- c) Las regiones ITS se extraen de la secuencia problema si se encuentran los límites de los genes 18S, 5.8S y 28S. En caso de no ser localizados, se realiza un re-escaneo utilizando las secuencias cortas de los genes 18S, 5.8S y 28S.
- d) Se realizan extracciones parciales de las regiones ITS si solo se reconocen extremos del 18S y 5.8S o 5.8S y 28S.
- e) Se producen archivos .fasta (por separado) de las regiones ITS.

2.10.3 Revisión de archivo de mapeo (*Mapping File*)

Se realizó una revisión del archivo de mapeo con ayuda del programa QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*, www.qiime.org), utilizando el script `check_id_map.py` (Ver Anexo 1). Características que se revisaron:

- a) Caracteres inválidos tales como: + - % . / : , ;
- b) Presencia de todas las secuencias de identificación, así como del oligonucleótido sentido.
- c) Corrección de duplicados de las secuencias de identificación y que tuvieran la misma longitud.

2.10.4 Revisión de archivo de secuencias

Las secuencias que se analizaron fueron el archivo `.fna` con las secuencias completas, así como también los archivos `.fna` de la región ITS1 e ITS2 (por separado).

Utilizando el script *Split Libraries* (Ver Anexo 2) en QIIME, se realizó un filtrado previo de las secuencias. Los archivos que se necesitaron para la ejecución de este script fueron el archivo de las secuencias (`.fasta` o `.fna`), el archivo de calidad (`.qual`), y el archivo de mapeo (*Mapping File*, `.txt`).

Los parámetros que se especificaron en el script fueron los siguientes:

- a) Longitud de la secuencia de identificación: 8 (Tipo de secuencia de identificación *Hamming*: longitud de 8 nucleótidos). Esta secuencia permitió la separación de cada una de las secuencias de acuerdo a la muestra que pertenecían.
- b) Número de bases ambiguas en las secuencias: 0 (cero) (White *et al.*, 2013).
- c) Longitud mínima y máxima de las secuencias:
 - Secuencias completas: 510 pb – 550 pb
 - Secuencias ITS1: 160 pb (Orgiazzi *et al.*, 2012) – 250 pb (Buee *et al.*, 2009).
 - Secuencias ITS2: 110 pb (Orgiazzi *et al.*, 2012) – 170 pb (Nilsson *et al.*, 2010)

2.10.5 Agrupamiento de secuencias en OTUs

Se asignaron secuencias similares a OTUs, agrupándolas en base a un porcentaje de similitud. Para este estudio se utilizó un porcentaje de similitud $\geq 97\%$, esto se aplicó a las secuencias completas, así como de las regiones ITS1 e ITS2. Se utilizó el script *Pick OTUs* (Ver Anexo 3) en QIIME empleando el algoritmo de UCLUST (Edgar, 2010).

El algoritmo de UCLUST define un grupo (*cluster*) en base a una secuencia representativa o centroide. Cada secuencia que sea agregada a este grupo, debe cumplir con el porcentaje de similitud a la secuencia centroide.

2.10.6 Selección de secuencias representativas

Para un mejor manejo de las secuencias, se llevó a cabo la selección de secuencias representativas de cada OTU en los archivos de secuencias completas y archivos de la región ITS1 e ITS2, utilizando el script *Pick Rep Set* (Ver Anexo 4) en QIIME.

2.10.7 Asignación taxonómica

La asignación taxonómica de las secuencias representativas se realizó tomando como base de datos a UNITE (Abarenkov & Nilsson, 2010) y a través de RDP (Ribosomal Database Program), el cual permite la asignación taxonómica haciendo coincidir segmentos de las secuencias problema a una base de datos asignada (Wang *et al.*, 2007). Lo anterior se realizó con ayuda del script *Assign Taxonomy* (Ver Anexo 5) en QIIME.

2.10.8 Construcción de tabla de OTUs

La tabla de OTUs se construyó con ayuda del script Make OTU Table en QIIME (Ver Anexo 6). Este script tabuló el número de OTUs encontrado en cada muestra y su correspondiente taxonomía, es decir, una tabla de frecuencias de OTUs.

2.10.9 Agrupación de OTUs por muestra

Se realizó una agrupación de OTUs por tipo, es decir, las 40 muestras se separaron de acuerdo a su tipo: MI, MV, SI, SV, el cual resultó en una nueva tabla de OTUs. Lo anterior se realizó con el script Summarize OTU By Cat (Ver Anexo 7) en QIIME

2.11 Análisis de diversidad

Con el fin de establecer las diferencias entre las muestras, se realizaron diferentes análisis de diversidad utilizando las tablas de OTUs correspondientes a los análisis de las secuencias completas, y las secuencias de las regiones ITS1 e ITS2.

2.11.1 Índice de Chao 1 y curvas de rarefacción

Utilizando la tabla de OTUs (por muestra) de las secuencias completas y las secuencias de la región ITS1 e ITS2 el programa *EstimateS* 9 (Colwell, 2013), calculó el estimador no paramétrico Chao 1, un estimador de la riqueza de especies que se basa en el número de especies raras es una muestra (Moreno, 2001).

Fórmula:

$$S_{Chao1} = S_{obs} + (n^2_1 / 2n_2) \quad (3)$$

Donde:

S_{Chao1} → riqueza total de especies.

S_{obs} → número de especies observadas.

n_1 → número de especies observadas una vez.

n_2 → número de especies observadas dos veces.

Además, se construyeron curvas de rarefacción para cada muestra (MI, MV, SI, SV) utilizando las tablas de OTUs de las secuencias completas, así como de las secuencias de las regiones ITS1 e ITS2. El software que se utilizó para las curvas de rarefacción fue el “*Null modeling software for ecologists*” EcoSim 7 (Entsminger, 2012).

Las curvas de rarefacción permiten comparar la riqueza de cada muestra así como determinar el esfuerzo de muestreo, el cual se basa en si la cantidad de muestras son representativas de la riqueza de especies en el sitio de estudio; es decir si se alcanza la asíntota, lo cual significaría que un muestreo adicional no proporcionaría la identificación de especies adicionales (Gotelli & Colwell, 2010).

La rarefacción permite estimar el número esperado de especies de diferentes muestras si todas tuvieran un mismo tamaño de muestra. Es decir, si la muestra fuera considerada de n individuos, cuántas especies se registraría (Moreno, 2001).

Fórmula:

$$E(S) = \sum 1 - \frac{(N - N_i)/n}{N/n} \quad (4)$$

Donde:

$E(S)$ → número esperado de especies

N → número total de individuos en la muestra

N_i → número de individuos en la i ésima especie

n → tamaño de muestra estandarizado

2.11.2 Índices

Utilizando la tabla de OTUs (muestra) de las secuencias completas y las secuencias de la región ITS1 e ITS2, se estimaron los siguientes índices en el programa *EstimateS* 9 (Colwell, 2013):

- a) Índice de diversidad Shannon-Wiener. Este índice es una medida del grado de incertidumbre asociado con la selección aleatoria de un individuo/especie en una comunidad. Sus valores varían de 0 hasta el Logaritmo natural del número de especies. Entre más alto sea su valor, mayor diversidad existe (Moreno, 2001).

Fórmula:

$$H' = - \sum p_i (\ln (p_i)) \quad (5)$$

Donde:

p_i → Proporción de especies en una muestra.

- b) Índice de dominancia Simpson. Este índice evidencia la probabilidad de que dos individuos (tomados al azar) pertenezcan a la misma especie; cuando su valor se acerca a 1, se considera una riqueza alta, mientras que cuando más alejado de 1, se considera una riqueza menor (Moreno, 2001).

Fórmula:

$$D = \sum p_i^2 \quad (6)$$

Donde:

p_i^2 → Abundancia proporcional de la especie i .

2.11.3 Análisis comparativo de composición

Utilizando el script *Summarize Taxa* (Ver Anexo 8) en QIIME se realizó un análisis de los grupos taxonómicos a nivel de Clase, utilizando la tabla de OTUs (por

muestra) de las secuencias completas y las secuencias de las regiones ITS1 e ITS2. Este script sirvió como análisis previo a la construcción de la gráfica de la distribución taxonómica a nivel de Clase. Para la construcción de la gráfica se utilizó el script *Plot Taxa Summary* (Ver Anexo 8) en QIIME.

Este análisis permite observar la composición taxonómica (en porcentaje) presente en cada muestra, posibilitando la comparación entre ellas.

2.11.4 Análisis de agrupamiento (*Clustering*)

Se realizó un análisis de agrupamiento con el paquete estadístico R (R v.3.01, script: BiodiversityR). Para ello se utilizó la tabla de OTUs (por muestra) de las secuencias completas, región ITS1 e ITS2. Este análisis permitió calcular matrices de distancia de Bray & Curtis para la construcción de un dendograma, el cual reveló las diferencias de la composición a nivel de clase entre distintas muestras (Kindt & Coe, 2005), así como también entre el nivel taxonómico.

La distancia ecológica de Bray & Curtis permite establecer las diferencias entre muestras a partir del cálculo de la abundancia de cada especie; la distancia final será influenciada por especies con mayor diferencia en abundancia, esto bajo el supuesto de que estas especies están mejor muestreadas, permitiendo representar las diferencias entre muestras de una mejor manera (Kindt & Coe, 2005).

La representación de estos dendogramas se acompañó con mapas de calor, los cuales, por medio de diferentes intensidades de colores, representaron la abundancia relativa de cada taxón en cada muestra.

2.11.5 Análisis de correspondencia canónica

El análisis de correspondencia canónica (CCA) es una técnica estadística multivariada que permite representar la proximidad entre variables dependientes (sitios por especies) e independientes (variables ambientales). El CCA utiliza un

modelo cuadrático, que en comparación con el PCA (Análisis de Componentes Principales), que utiliza un modelo lineal (Euclidiano), no se sesga ante la presencia de valores extremos (Kindt & Coe, 2005), tomando en cuenta las especies poco abundantes.

El CCA arroja coeficientes canónicos (CCA1 y CCA2), los cuales son los coeficientes de la regresión múltiple ponderada. En el gráfico de ordenación del CCA, las variables independientes están representadas por aquellas, en su caso variables ambientales, que fueron estadísticamente significativas en el estudio, y en el gráfico de ordenación se presentan como una proyección (por medio de vectores) que equivale a su correlación con el eje y estas parten del centro de gravedad (centro del gráfico). En los cuadrantes del gráfico de ordenación se proyectan las variables dependientes (muestras) para observar su correlación en relación a los vectores (variables independientes o explicativas), esperando patrones de agrupamiento entre muestras.

Este análisis se llevó a cabo a partir del programa R (R v.3.01, paquete de scripts: BiodiversityR).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Muestreo

Se obtuvieron 10 muestras de suelo madriguera (M) y 10 muestras de suelo superficie (S), de alrededor de 500 gramos, en cada estación (verano, V, e invierno, I), sumando un total de 40 muestras de suelo (10 MV, 10 SV, 10 MI, 10 SI)

3.2 Variables medidas en campo

3.2.1 Humedad sensor

Los valores de humedad medidos con el sensor LI-8100 para suelos de MV, SV, MI y SI, fueron, respectivamente, 0.10 ± 0.01 (Media \pm Desviación Estándar), 0.09 ± 0.01 , 0.15 ± 0.07 y 0.15 ± 0.06 % (Figura 9).

A pesar de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes muestras (Anexo 9) ($P > 0.05$), existió variación entre estaciones. (Figura 10). En verano los valores oscilaron entre 0.02% hasta 0.12%, mientras que en invierno, los valores oscilaron desde 0.02% hasta 0.3%.

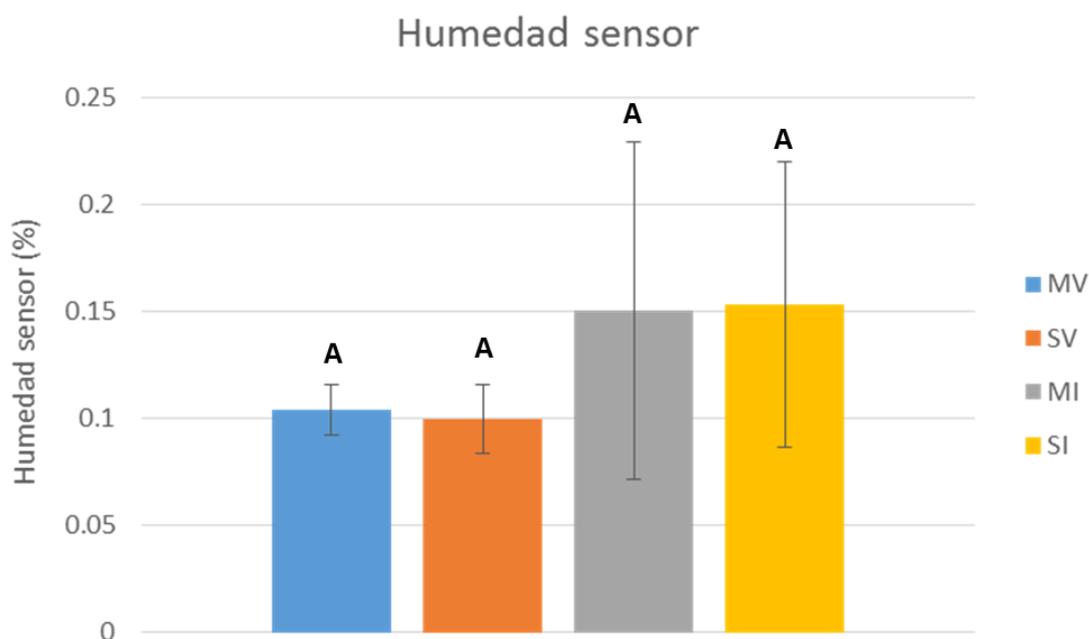


Figura 9. Humedad medida con sensor LI-8100 en suelo. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Letras diferentes indican muestras estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). (MV) Madriguera-Verano. (SV) Superficie-Verano. (MI) Madriguera-Invierno. (SI) Superficie-Invierno.

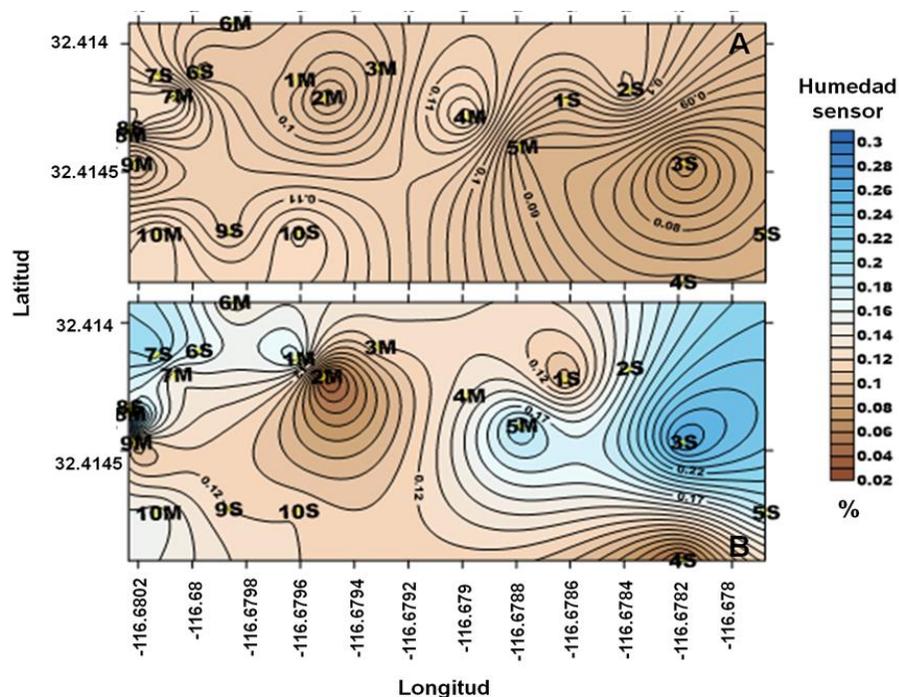


Figura 10. Variación espacial de la Humedad medida por sensor LI-8100 en suelo en VDP. (A) Verano y (B) Invierno. (M) Madriguera, (S) Superficie.

3.2.2 Temperatura sensor

Los valores de temperatura medidos con el sensor LI-8100 para suelos de MV, SV, MI y SI, fueron, respectivamente, 36.810 ± 4.188 (Media \pm Desviación Estándar), 40.46 ± 4.60 , 15.26 ± 3.29 y 14.88 ± 1.62 °C (Figura 11).

En congruencia con el ANOVA que indicó diferencias significativas entre las muestras de verano contra las de invierno (Anexo 9; $P < 0.05$), existió variación entre estaciones (Figura 12). Los valores de temperatura obtenidos durante el verano (MV y SV, Figura 12-A) alcanzaron un valor máximo de hasta 49°C, mientras que durante el invierno, alcanzaron un valor máximo de 22°C.

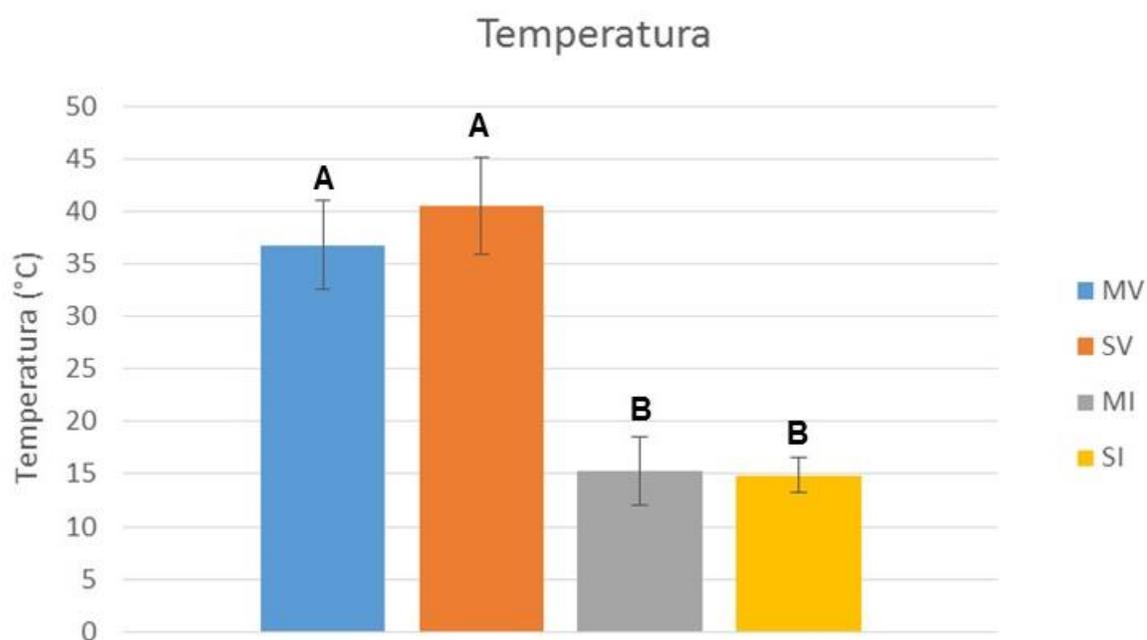


Figura 11. Temperatura medida por sensor LI-8100 en suelo. Letras diferentes indican muestras estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). (MV) Madriguera-Verano. (SV) Superficie-Verano. (MI) Madriguera-Invierno. (SI) Superficie-Invierno.

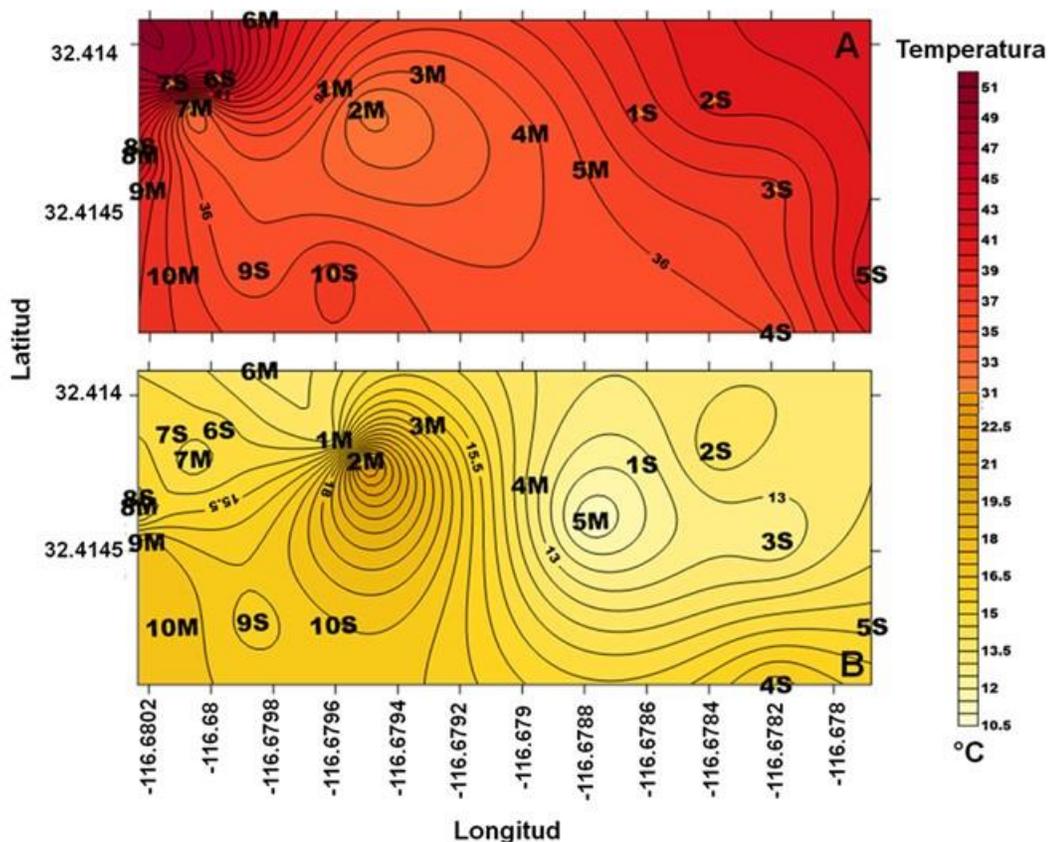


Figura 12. Variación espacial de la Temperatura medida por sensor en suelo en VDP. (A) Verano y (B) Invierno. (M) Madriguera, (S) Superficie.

3.3 Caracterización de suelo

3.3.1 Potencial de hidrógeno (pH)

Los valores de pH para suelos de MV, SV, MI y SI, fueron, respectivamente, 5.813 ± 0.295 (Media \pm Desviación Estándar), 5.92 ± 0.17 , 5.75 ± 0.61 y 5.82 ± 0.674 (Figura 13).

No se encontraron diferencias significativas entre las diferentes muestras (Anexo 9) ($P > 0.05$).

Existe una variación del pH estacional y por puntos de muestreo (Figura 14). En verano los valores oscilaron entre 5.3 hasta 6.1, mientras que en invierno, los valores oscilaron desde 4.1 hasta 6.3.

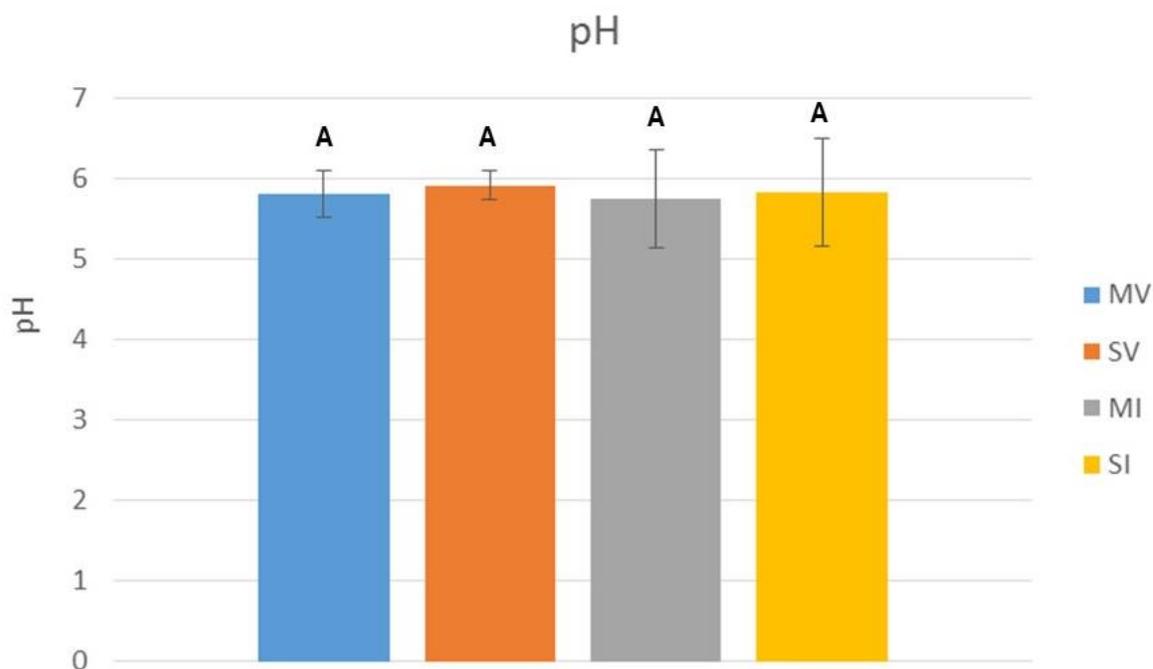


Figura 13. pH de suelo en VDP. Letras diferentes indican muestras estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). (MV) Madriguera-Verano. (SV) Superficie-Verano. (MI) Madriguera-Invierno. (SI) Superficie-Invierno.

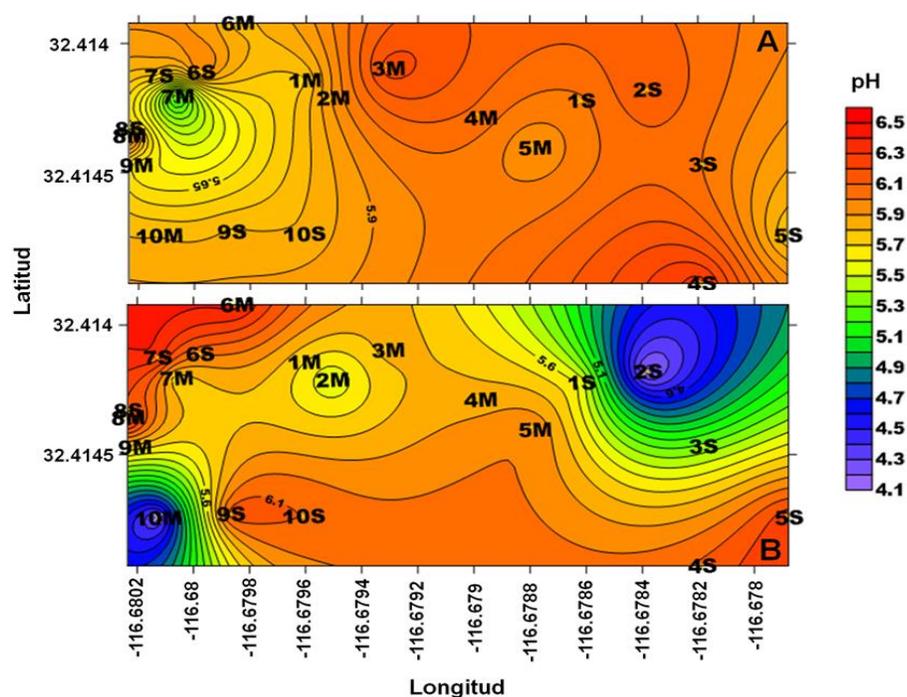


Figura 14. Variación espacial de pH en VDP en (A) Verano y (B) Invierno. (M) Madriguera, (S) Superficie.

3.3.2 Contenido de humedad

Los valores de humedad obtenidos por el método de gravimetría para suelos de MV, SV, MI y SI, fueron, respectivamente, 0.71 ± 0.73 (Media \pm Desviación Estándar), 0.80 ± 0.38 , 8.61 ± 2.62 y 7.68 ± 3.39 (Figura 15).

En congruencia con el ANOVA que indicó diferencias significativas de humedad entre las muestras de verano contra las de invierno (Anexo 9; $P < 0.05$), se encontraron diferencias estacionales (Figura 16). Los valores de humedad durante el verano alcanzaron un valor máximo de hasta 6%, mientras que durante el invierno fue de 15%.

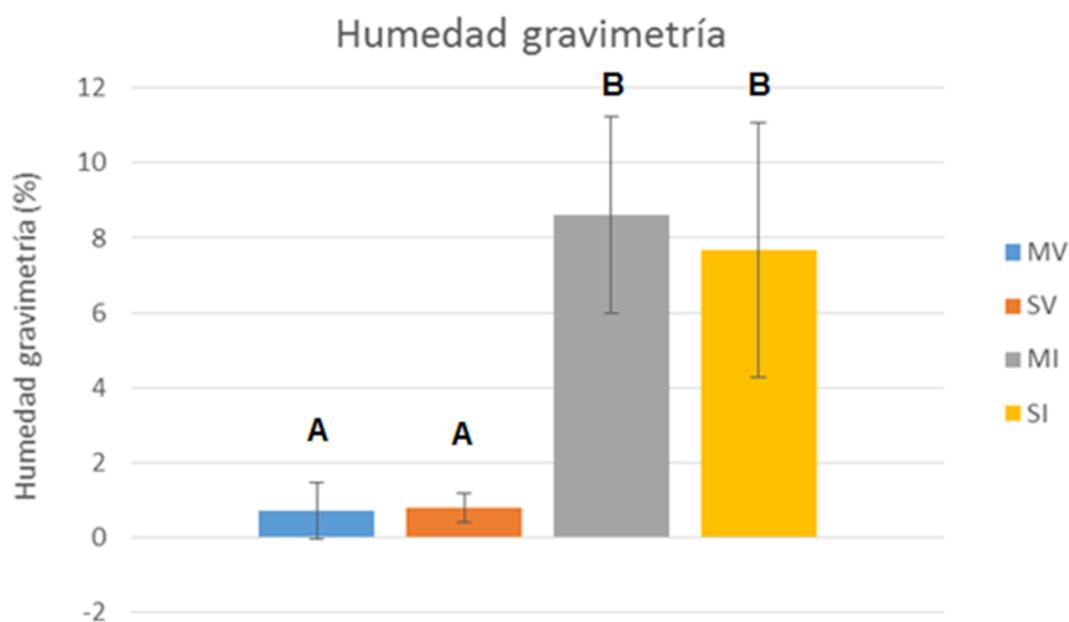


Figura 15. Contenido promedio de Humedad en suelo determinada por el método de gravimetría. Letras diferentes indican muestras estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). (MV) Madriguera-Verano. (SV) Superficie-Verano. (MI) Madriguera-Invierno. (SI) Superficie-Invierno.

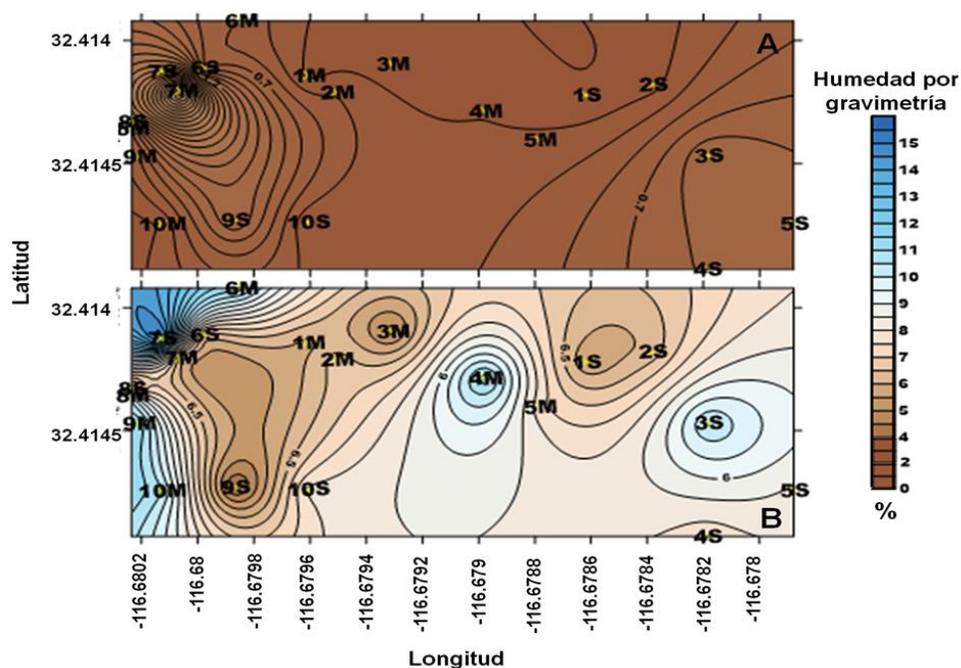


Figura 16. Variación espacial de la Humedad en VDP en (A) Verano y (B) Invierno. (M) Madriguera y (S) Superficie.

3.3.3 Contenido de materia orgánica

Los valores de materia orgánica para suelos de MV, SV, MI y SI, fueron, respectivamente, 5.813 ± 0.295 (Media \pm Desviación Estándar), 5.92 ± 0.178 , 5.756 ± 0.611 y 5.829 ± 0.674 (Figura 17).

A pesar de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas de materia orgánica entre las diferentes muestras (Anexo 9) ($P > 0.05$), se encontraron variaciones estacionales (Figura 18). Los valores de materia orgánica que se obtuvieron durante el verano alcanzaron un valor máximo de hasta 4.4%, mientras que durante el invierno, fueron de 6.8%.

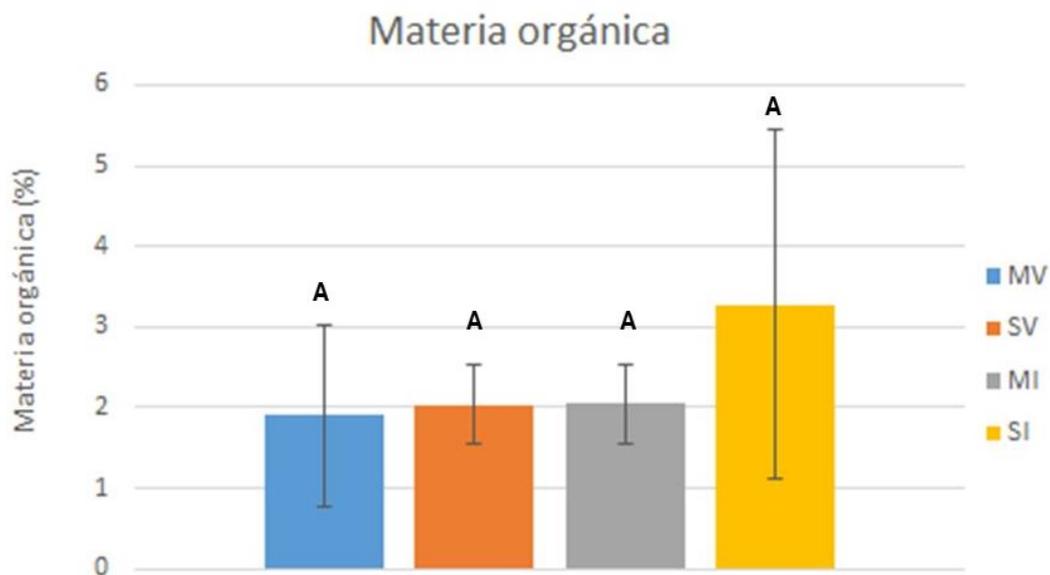


Figura 17. Contenido promedio de Materia Orgánica en suelo. Letras diferentes indican muestras estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). (MV) Madriguera-Verano. (SV) Superficie-Verano. (MI) Madriguera-Invierno. (SI) Superficie-Invierno.

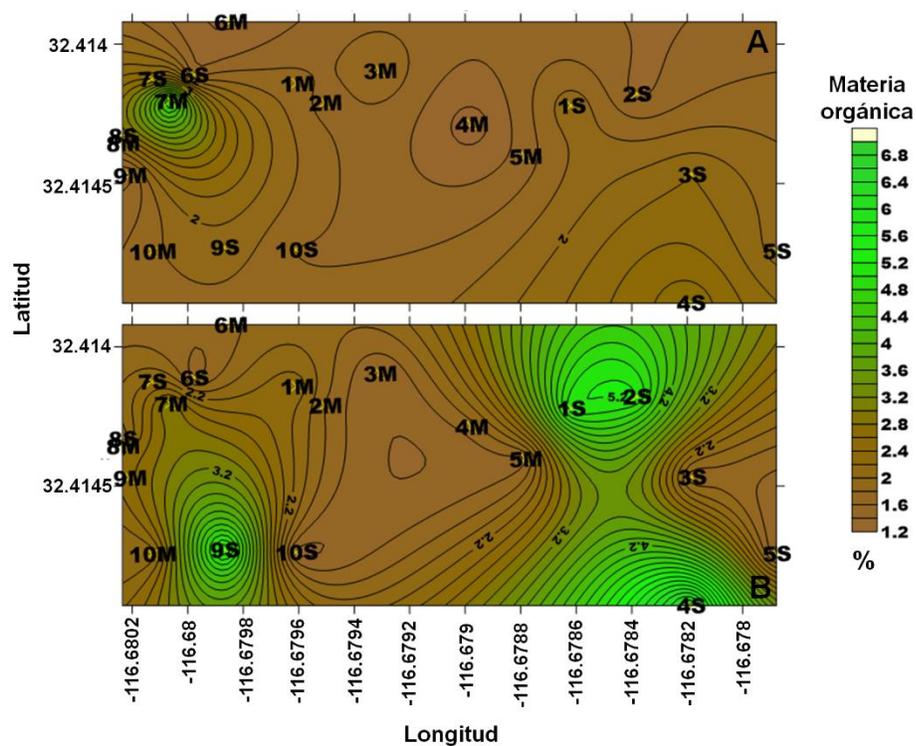


Figura 18. Variación espacial de Materia orgánica en el sitio VDP en (A) Verano e (B) Invierno. (M) Madriguera y (S) Superficie.

3.3.4 Textura

La relación entre los porcentajes arena, arcilla y limo de los suelos MV, SV, MI, SI (Tabla 7) indican que el suelo en la estación de invierno es Franco-Arenoso, mientras que el suelo en la estación de verano es Franco-Arenoso-Arcilloso.

Tabla 7. Porcentaje de arena, arcilla y limo en cada muestra. (MV) Madriguera-Verano. (SV) Superficie-Verano. (MI) Madriguera-Invierno. (SI) Superficie-Invierno.

Muestra	Arena (%)	Arcilla (%)	Limo (%)
MV	68.42	22.96	8.61
SV	56.24	23.08	20.68
MI	71.02	10.2	18.73
SI	70.57	15.12	14.13

3.3.5 Determinación de salinidad por conductividad eléctrica

Los valores de conductividad eléctrica para suelos de MV, SV, MI y SI, fueron, respectivamente, 0.72 ± 0.61 (Media \pm Desviación Estándar), 0.39 ± 0.09 , 1.24 ± 1.11 y 1.04 ± 0.97 (Figura 19).

En congruencia con el ANOVA (Anexo 9, $P > 0.05$), no hubo diferencias en la variación estacional y de micro-hábitat de la conductividad eléctrica del suelo entre las muestras, si no más bien entre los puntos de muestreo en la correspondiente estación (Figura 20). Los valores de conductividad eléctrica que se muestran durante el verano alcanzaron un valor máximo de hasta 2.3 dS m^{-1} , mientras que durante el invierno, alcanzaron un valor máximo de 2.9 dS m^{-1} .

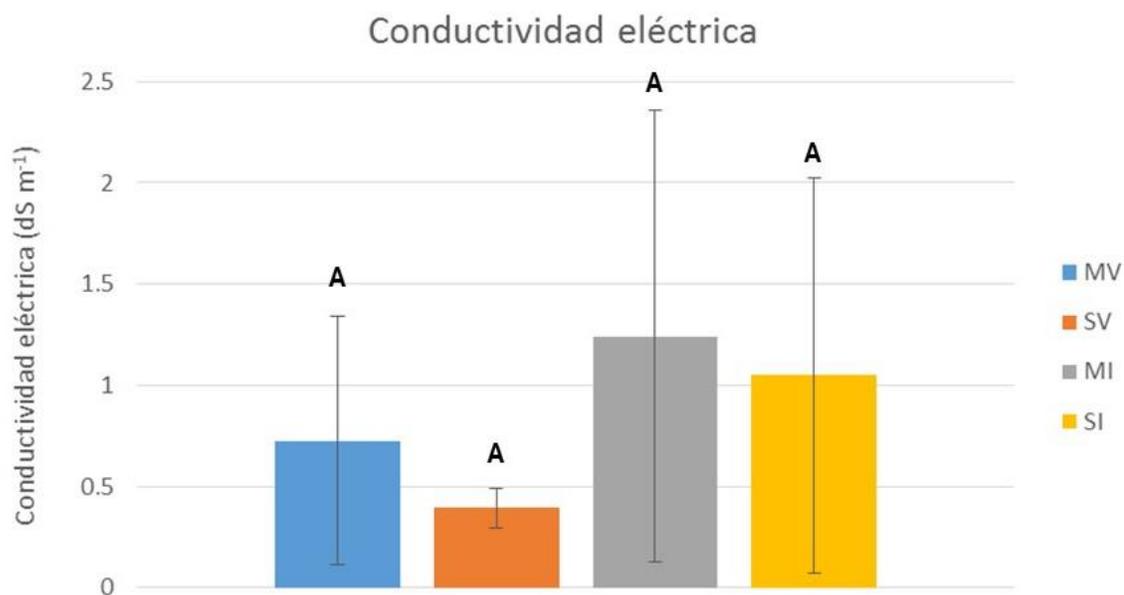


Figura 19. Promedio de Conductividad eléctrica. Letras diferentes indican muestras estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). (MV) Madriguera-Verano. (SV) Superficie-Verano. (MI) Madriguera-Invierno. (SI) Superficie-Invierno.

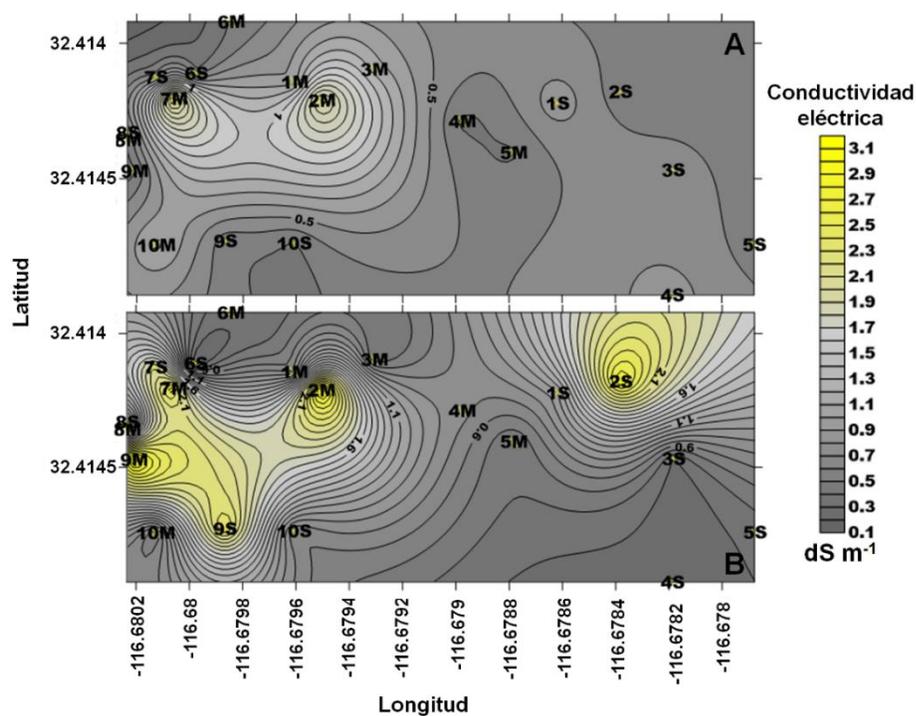


Figura 20. Variación espacial de la Conductividad eléctrica en el sitio VDP en (A) Verano y (B) Invierno. (M) Madriguera, (S) Superficie.

3.4 Extracción, cuantificación y análisis de pureza del ADN genómico total de muestras de suelo

Las muestras con mayor concentración de ADN fueron MV ($23.51 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 5.12$) y SV ($24.31 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 5.10$) con respecto a SI ($19.16 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 7.56$) y MI ($19.11 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 5.30$).

Las muestras individuales con mayor concentración de ADN (Tabla 8) fueron 1MV, 1SV, 4SV y 3SI, los cuales alcanzaron valores mayores a $30 \text{ ng}/\mu\text{l}$.

Las muestras individuales con valores de pureza más cercanos a 1.8, fueron 8MV, 5SV, 3SI, 6SI y 9SI (Tabla 8). Ninguna muestra alcanzó valores igual o mayores a 1.8, pero si cercanos a éste, por lo que se infiere la presencia de proteínas u otros contaminantes.

Tabla 8. Concentraciones y pureza de ADN genómico total extraído de muestras de suelo MV, SV, MI y SI.

Muestra	Concentración (ng/μl)	Pureza (A260/A280)	Muestra	Concentración (ng/μl)	Pureza (A260/A280)
1MV	33	1.6	1MI	26	1.59
2MV	13.6	1.41	2MI	15.4	1.54
3MV	22.4	1.59	3MI	19.9	1.54
4MV	20.3	1.45	4MI	18.7	1.61
5MV	21.6	1.61	5MI	25.7	1.65
6MV	23.1	1.46	6MI	15.9	1.58
7MV	28.1	1.52	7MI	19.65	1.52
8MV	26.4	1.73	8MI	25.5	1.66
9MV	22.1	1.68	9MI	11.7	1.49
10MV	24.5	1.65	10MI	12.7	1.55
1SV	35.4	1.66	1SI	28	1.66
2SV	20.1	1.68	2SI	10.6	1.63
3SV	20.6	1.59	3SI	32	1.75
4SV	30.4	1.67	4SI	25	1.69
5SV	23.3	1.7	5SI	12.8	1.69
6SV	19.3	1.62	6SI	19.7	1.74
7SV	24.1	1.62	7SI	12.4	1.64
8SV	25.4	1.58	8SI	20.3	1.67
9SV	20.4	1.65	9SI	20.3	1.73
10SV	24.1	1.67	10SI	10.5	1.63

3.5 Pruebas de PCR para seleccionar oligonucleótidos

Se logró la amplificación de la región ITS y la región ITS1 con los oligonucleótidos empleados. La mejor amplificación se logró para la región ITS1 con el par de oligonucleótidos ITS1 (oligo sentido) e ITS2 (oligo anti-sentido) ya que en comparación de los otros pares de oligonucleótidos, se observó una banda más definida e intensa (Figura 21).

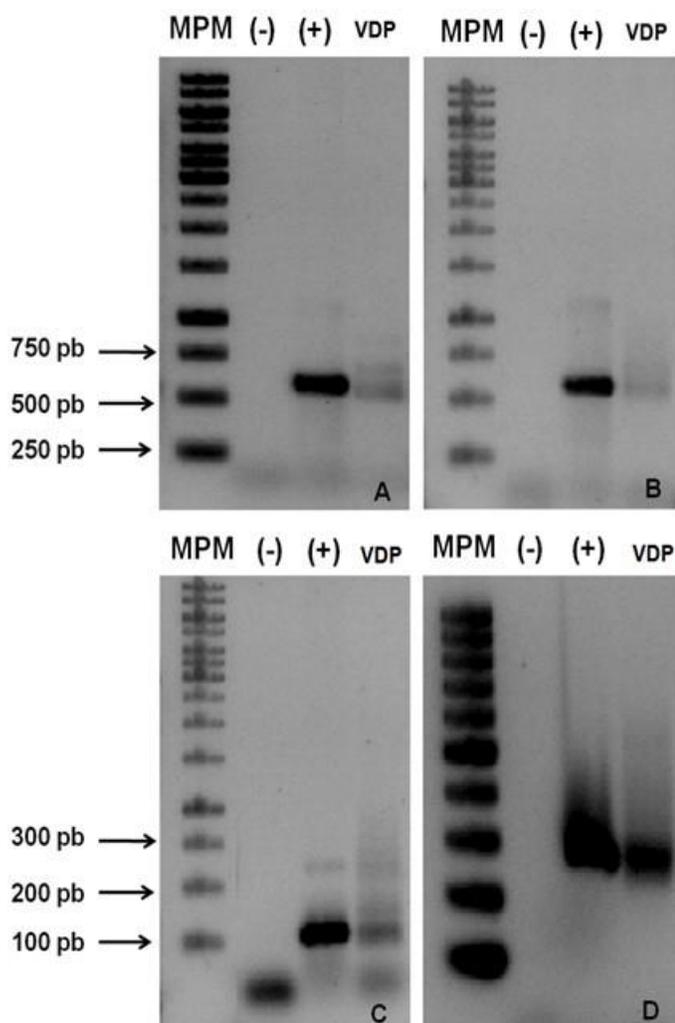


Figura 21. Prueba de oligonucleótidos para la amplificación de la región ITS del rADN de muestras ambientales obtenidas de VDP. (A) ITS1F $\rightarrow\leftarrow$ ITS4 y (B) ITS1 $\rightarrow\leftarrow$ ITS4: Marcador de Peso Molecular de 1 kb (MPM), Control negativo-H₂O (-), Control positivo-*Neurospora crassa* (+), Muestra ambiental amplificada (VDP). (C) ITS1F $\rightarrow\leftarrow$ ITS2 y (D) ITS1 $\rightarrow\leftarrow$ ITS2: Marcador de Peso Molecular de 100 pb (MPM), Control negativo (-), Control positivo (+), Muestra ambiental amplificada (VDP).

3.6 Amplificación de la región ITS del rADN

En la mayoría de las muestras amplificadas de MI se obtuvieron bandas de diferentes tamaños, de entre 200 pb hasta 300 pb, lo cual podría indicar la variabilidad en la longitud de la región ITS1 (Figura 22-A). En la amplificación de las muestras SI se observaron patrones similares a las muestras MI, solo que algunas

bandas ascienden desde 300 pb hasta 400 pb (Figura 22-B). En la amplificación de la región ITS1 en muestras de MV se obtuvieron bandas de 200 hasta 350 pb (Figura 22-C), mientras que para las muestras de SV, bandas de 200 pb hasta 300 pb fueron obtenidas (Figura 22-D).

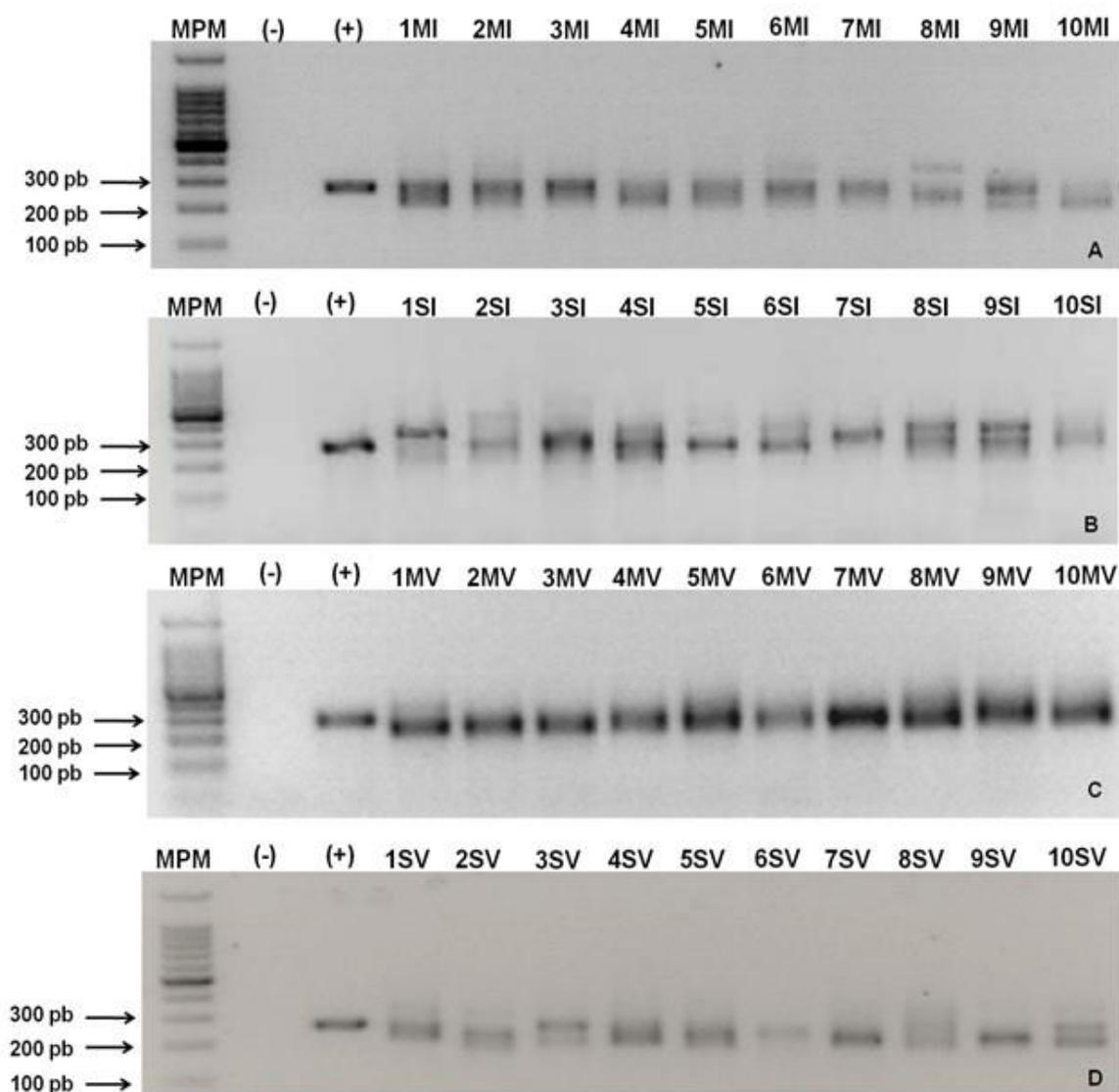


Figura 22. Amplificación de la región ITS1 del rADN utilizando el par de oligonucleótidos ITS1F e ITS2. (A) Muestras MI (Madriguera-invierno). (B) Muestras SI (Superficie-invierno). (C) Muestras MV (Madriguera-verano). D: Muestras SV (Superficie-Verano). MPM (Marcador de Peso Molecular, 100 pb). (-) Control negativo-H₂O. (+) Control positivo-ADN genómico de *Neurospora crassa* usado como templado.

3.7 Preparación de ADN genómico para su secuenciación

El ADN genómico total de la mayoría de las muestras, se logró normalizar en alrededor de 20 ng/ μ L. Las muestras que no alcanzaron esa concentración porque presentaron concentraciones de entre 10.5 ng/ μ L (10SI) hasta 15.9 ng/ μ L (6MI), también fueron enviadas a secuenciar.

3.8 Análisis de secuencias

El análisis de las secuencias realizado en el presente trabajo, se hizo con base en la (1) Región ITS completa (ver Figura 2, RC), la cual incluye parte de la región 18S, la ITS1 (completa), 5.8S (completa), y la ITS2 (parcial); así como también con base en la Región ITS1 completa y la Región ITS2 parcial.

3.8.1 Extracción de secuencias ITS1 e ITS2 del rADN

Utilizando el programa *Fungal ITS Extractor* (Nilsson *et al.*, 2009), a partir del archivo de secuencias (.fna), se logró la extracción de las regiones ITS1 e ITS2. Este programa dio como resultado dos archivos: ITS1.fasta e ITS2.fasta. De un total de 385,329 secuencias que contenía el archivo de entrada, se logró la extracción de las regiones ITS1 e ITS2 de un total de 352,637 secuencias.

3.8.2 Revisión de archivo de secuencias

Del filtro realizado con el script *Split Libraries* en QIIME, un **total de 235,861 secuencias** para la región completa (RC) lograron pasar los requerimientos de calidad especificados en el script (Anexo 10).

En el caso de las secuencias parciales de las regiones **ITS1 e ITS2, 340,593 secuencias ITS1 y 146,488 ITS2** lograron pasar el filtro de calidad.

El número de secuencias por muestra fue variable; tanto para RC como para ITS1, MV presentó un mayor número de secuencias que las demás muestras (Figura 23; Anexo 10). El número de secuencias obtenidas con la región ITS2, fue menor en todas las muestras (Figura 23; Anexo 10).

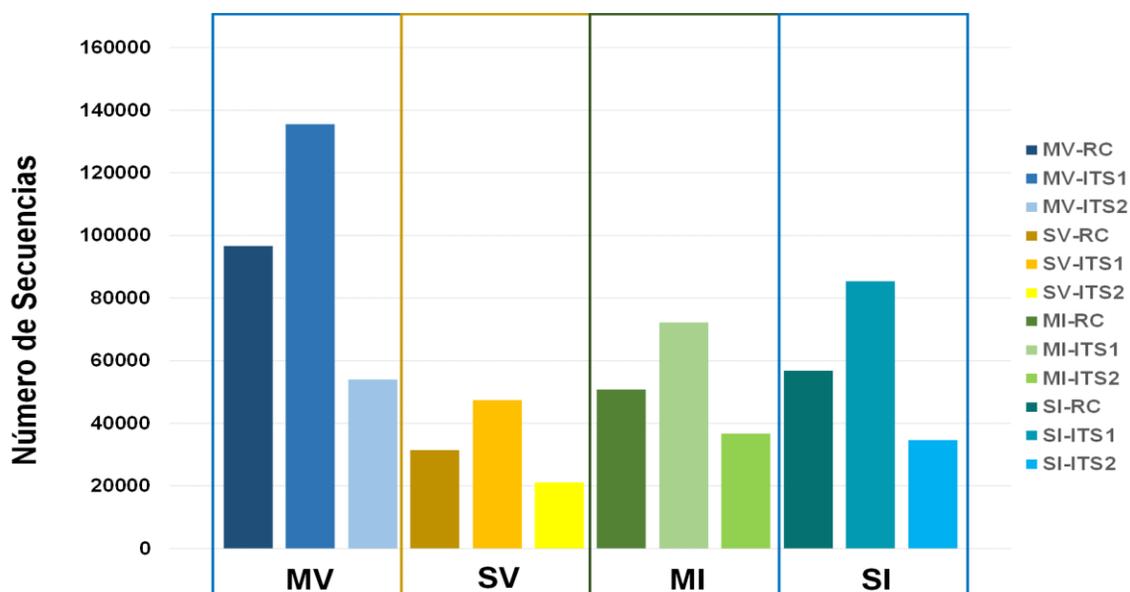


Figura 23. Número de secuencias obtenidas por muestra. Las barras representan el número total de secuencias por muestra. (RC) Región completa, (ITS1) Región ITS1, y (ITS2) Región ITS2. (MV) Madriguera-Verano, (SV) Superficie-Verano, (MI) Madriguera-Invierno, y (SI) Superficie-Invierno.

3.8.3 Unidad taxonómica operacional (OTU) y secuencias representativas

Tomando en cuenta RC, de un total de 235,861 secuencias, se obtuvieron 2,475 OTUs (umbral de agrupamiento: $\geq 97\%$ de similitud en todos los casos). En el caso de la región ITS1, de un total de 340,593 secuencias, se obtuvieron 2,725 OTUs y analizando la región ITS2, de un total de 146,488 secuencias, se identificaron 4,448 OTUs (Tabla 9).

Independientemente de la región contemplada, las muestras de MV en conjunto presentaron la mayor cantidad de OTUs (Tabla 9), mientras que la muestra

con menor cantidad de OTUs para la RC e ITS2 fue SV y para la región ITS1 fue SI (Tabla9).

Tabla 9. Número total de OTUs por tipo de muestra. (MV) Madriguera-Verano. (SV) Superficie-Verano. (MI) Madriguera-Invierno. (SI) Superficie-Invierno.

	Total OTUs	Muestra	Número de OTUs
Región completa	2,475	MV	1,249
		SV	748
		MI	906
		SI	919
Región ITS1	2,725	MV	1,368
		SV	834
		MI	1,137
		SI	1,052
Región ITS2	4,448	MV	2,036
		SV	1,348
		MI	1,904
		SI	1,686

3.8.4 Índice de Chao 1 y análisis de rarefacción

A un 97% de similitud y analizando la RC, el estimador no paramétrico Chao 1, predijo un rango de 1,455 (SV) hasta 3,735 OTUs (SI) (Tabla 10). En el caso de la región ITS1 el rango de 1,688 (SV) hasta 4,062 (SI) OTUs, mientras que para la región ITS2 fue de 1,833 (SV) hasta 4,549 (SI) (Tabla 10).

Tabla 10. Índice de Chao 1 calculado para cada muestra (MV) Madriguera-Verano, (SV) Superficie-Verano, (MI) Madriguera-Invierno, y (SI) Superficie-Invierno. (IC) Intervalo de confianza inferior y superior al 95%.

	Muestra	Chao 1		
		Media	IC inf. (95%)	IC sup. (95%)
Región completa	MV	2,363	2,210	2,553
	SV	1,455	1,336	1,612
	MI	3,092	2,915	3,307
	SI	3,735	3,538	3,969
Región ITS1	MV	2,693	2,522	2,902
	SV	1,688	1,553	1,862
	MI	3,450	3,258	3,679
	SI	4,062	3,859	4,303
Región ITS2	MV	2,923	2,716	3,175
	SV	1,833	1,666	2,047
	MI	3,776	3,540	4,055
	SI	4,549	4,282	4,860

Las curvas de rarefacción permiten estimar el esfuerzo de muestreo en relación con el número de secuencias y el número de OTUs para un tamaño reducido de muestra. Así, en el caso de haber tenido una muestra con menor número de secuencias, las demás muestras se rarifican a ésta, permitiendo la comparación entre ellas.

Considerando RC (Figura 24-A), Chao 1 predijo que el tipo de muestra para el cual se puede obtener un mayor número de OTUs es MI, seguido por MV y SV, y el de menor número fue SI. Las curvas de rarefacción sugirieron que no existen diferencias significativas entre tipos de muestra con intervalos de confianza al 95 % (Figura 24).

En el caso de la Región ITS1 (Figura 24-B), Chao 1 predijo que el tipo de muestra para la cual se puede obtener un mayor número de OTUs fue MI, seguido por MV y SI, y la muestra que presentó el menor número de OTUs fue SV. Las curvas de rarefacción para la Región ITS1 sugieren que existen diferencias significativas entre

la muestra MI contra las muestras MV, SV y SI con intervalos de confianza al 95 % (Figura 24).

En el caso de la Región ITS2 (Figura 24-C), Chao 1 predijo que el tipo de muestra para el cual se puede obtener un mayor número de OTUs es MI, seguido por SV y SI, y la muestra que tuvo el menor número de OTUs fue MV. Las curvas de rarefacción para la Región ITS2 sugieren que existen diferencias significativas entre las muestras MI y SI, MI y MV, así como también entre MV y SV, con intervalos de confianza al 95 % (Figura 24).

A pesar del gran número de secuencias, las curvas de rarefacción de cada muestra (MV, SV, MI y SI) no alcanzan una asíntota en ninguna de las regiones analizadas (completa (Figura 24-A), ITS1 (Figura 24-B) e ITS2 (Figura 24-C)).

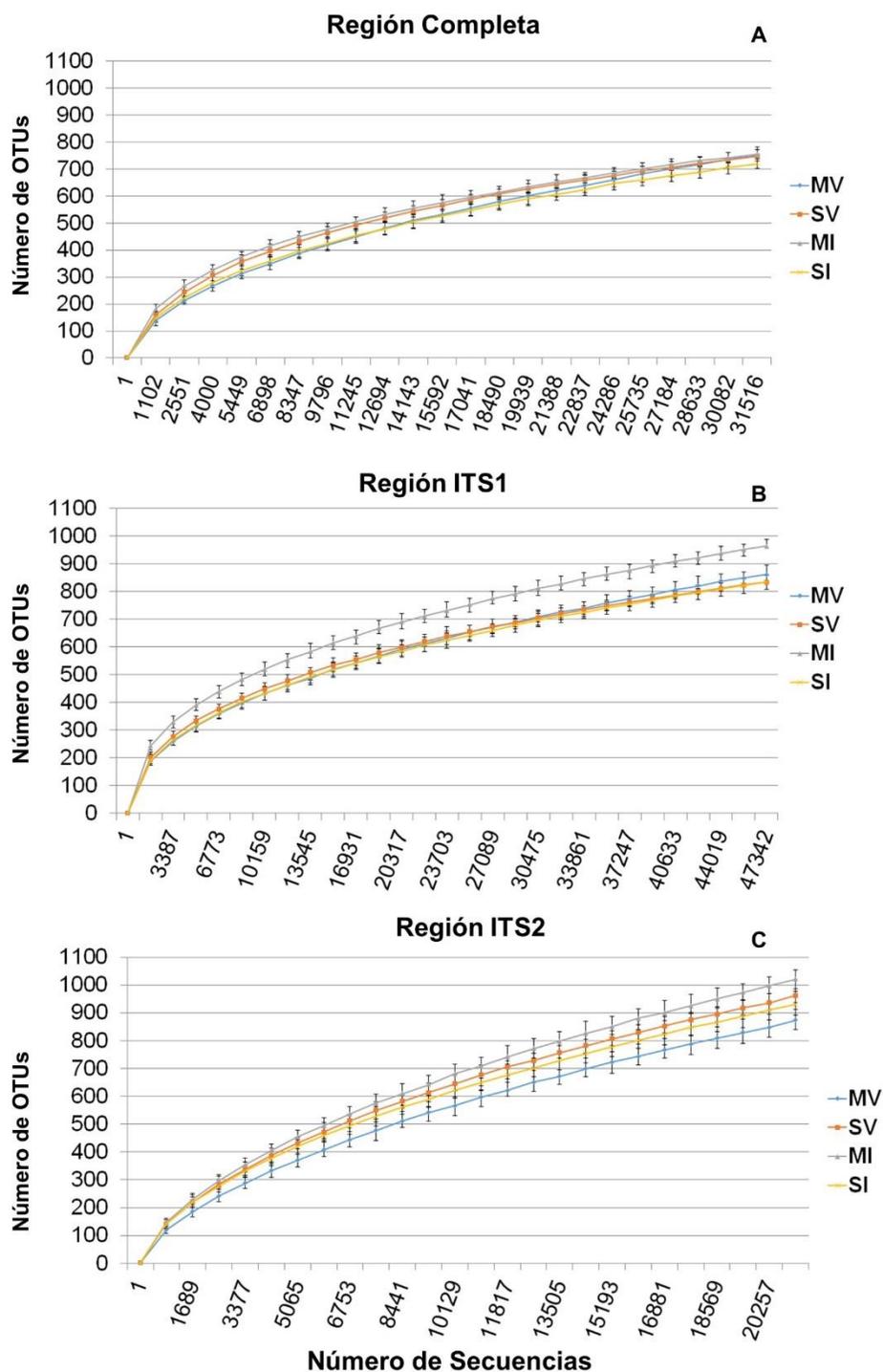


Figura 24. Curvas de rarefacción indicando el número de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) a una similitud del 97% en relación al número de secuencias pertenecientes a Región Completa (A), Región ITS1 (B) y Región ITS2 (C) y la muestra: MV (Madriguera-Verano), SV (Superficie-Verano), MI (Madriguera-Invierno), y SI (Superficie-Invierno).

3.8.5 Índices de diversidad ecológica

El índice de Shannon-Wiener fue mayor para muestras de invierno (MI y SI) que para muestras de verano (MV y SV) (Tabla 11), independientemente de la región ITS considerada. La estimación del índice de Simpson fue mayor en muestras de invierno que en muestras de verano, cuando se tomó en cuenta la RC e ITS1; mientras que al usar la región ITS2, el índice de Simpson fue mayor para S que las de M (Tabla 11).

Con relación al índice de Shannon-Wiener, en invierno consistentemente las muestras de S presentaron los valores más altos (Tabla 11). Por otro lado, en verano las muestras M fueron las que presentaron los valores más altos. Las estimaciones del índice de Simpson mostraron que en invierno las muestras M son más diversas que las de S tomando en cuenta la RC e ITS1; mientras que al usar la región ITS2 las muestras de S mostraron una mayor diversidad (Tabla 11). En cambio, para las muestras de verano, las muestras de S consistentemente mostraron una mayor diversidad que las de M para los tres tipos de región ITS considerada (Tabla 11).

Tabla 11. Índices de diversidad ecológica calculados para cada muestra (MV) Madriguera-Verano, (SV) Superficie-Verano, (MI) Madriguera-Invierno, y (SI) Superficie-Invierno. (SD) Desviación estándar.

	Muestra	Simpson	Shannon ± SD
Región completa	MV	0.866	3.98 ± 0.29
	SV	0.923	3.79 ± 0.36
	MI	0.965	4.12 ± 0.21
	SI	0.937	4.17 ± 0
Región ITS1	MV	0.909	4.25 ± 0.24
	SV	0.947	4.04 ± 0.31
	MI	0.973	4.39 ± 0.16
	SI	0.949	4.46 ± 0
Región ITS2	MV	0.834	4.9 ± 0.12
	SV	0.963	4.54 ± 0.19
	MI	0.951	5.08 ± 0.06
	SI	0.976	5.18 ± 0

3.8.6 Análisis comparativo de composición

Para estimar la diversidad fúngica, así como las diferencias de cada una de las muestras de acuerdo al análisis de la RC, región ITS1 y región ITS2, se agruparon los OTUs de acuerdo al nivel taxonómico de clase (Figura 25).

En los análisis de la RC, se observó una predominancia del filo Ascomycota con 89% en MV, 82.90% en SV, 85% en MI y un 73% en MI (Figura 25-A). Dentro de este filo, predominó la clase Dothideomycetes con 69.40% en MV, 62% en SV, 41.10% en MI y un 38.10% en SI (Figura 25-A). Esto seguido por los Sordariomycetes con 11.70% en MV, 8.10% en SV, 28% en MI y un 15.20% en SI (Figura 25-A). La clase con menos abundancia fue la de los Saccharomycetes con un 0.03% en MV, 0.02% en SV, 0.44% en MI y un 0.25% en SI (Figura 25-A). Cabe resaltar la clase Agaricostilbomycetes del filo Basidiomycota que se encontró en solo una muestra MI con un 0.01% (Figura 25-A), y la clase Monoblepharidomycetes del filo Chytridiomycota que se encontró en la muestra SI con un 0.003% (Figura

25-A). El porcentaje de hongos no identificados fue de 1.91% en MV, 3.07% en SV, 4.27% en MI y 13.40% en SI (Figura 25-A).

En los análisis de la región ITS1, al igual que para la RC, el filo Ascomycota fue el más predominante en todas las muestras con 88.60% en MV, 71.71% en SV, 80.50% en MI y 69.90% en SI (Figura 25-B). Dentro de este filo, destacó la predominancia de la clase Dothideomycetes en tres muestras con 56.95% en MV, 47.18% en SV y 29.29% en SI (Figura 24-B). En la muestra MI, la clase de mayor predominancia fue la de los Sordariomycetes con 36% (Figura 25-B), siendo también esta clase una de las más abundantes en las otras muestras, 22.50% en MV, 10.49% en SV y 16.49% en SI (Figura 25-B). El filo Chytridiomycota sólo estuvo presente en MI con un 0.06%. El porcentaje de hongos no identificados fue de 4.77% en MV, 16.43% en SV, 11.35% en MI y 15.52% en SI (Figura 25-B).

En el análisis de la región ITS2, el filo Ascomycota también fue el predominante con 86.50% en MV, 75.60% en SV, 83.90% en MI y 66.90% en SI (Figura 25-C). Dentro de este filo, la clase Dothideomycetes fue la predominante con 34.49% en SV (Figura 25-C), mientras que una clase no identificada perteneciente al filo Ascomycota se presentó como dominante con 46.42% en MV, 32.12% en MI y 25.31% en SI (Figura 25-C). La clase Sordariomycetes, fue una de las menos abundantes en todas las muestras con 12.40% en MV, 11.88% en SV, 23.47% en MI y 14.37% en SI (Figura 25-C). La clase Exobasidiomycetes solo se encontró presente en la muestra SI con 0.01%.

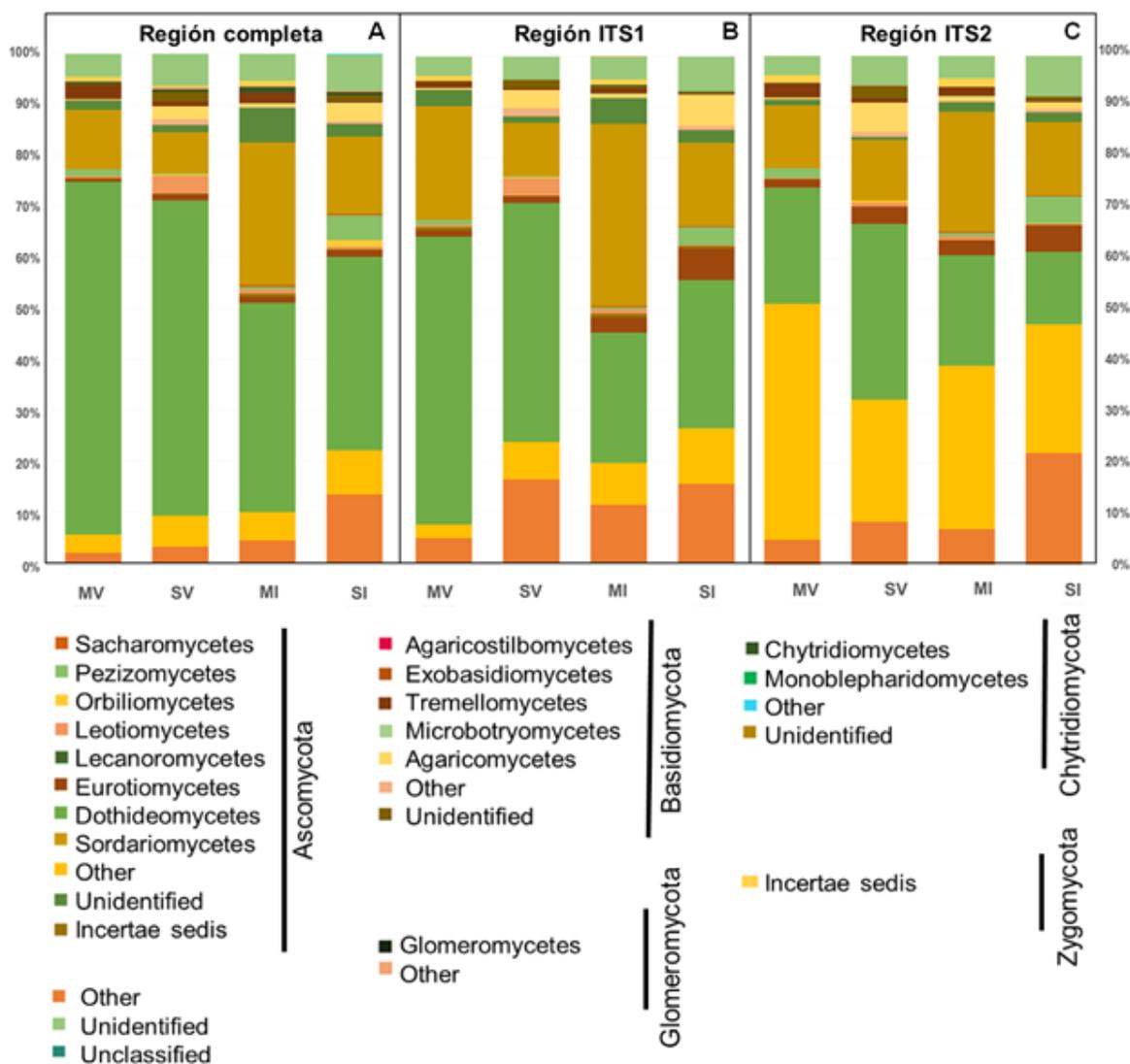


Figura 25. Composición taxonómica de las secuencias de rADN metagenómicas obtenidas por pirosecuenciación. Región Completa (A), Región ITS1 (B) y Región ITS2 (C). (MV) Madriguera-Verano, (SV) Superficie-Verano, (MI) Madriguera-Invierno, (SI) Superficie Invierno.

3.8.7 Análisis de agrupamiento y mapas de calor

Con el fin de determinar patrones de similitud entre las diferentes muestras de acuerdo a la presencia y abundancia de las clases (nivel taxonómico) de hongos, se llevó a cabo la construcción de mapas de calor para la RC, región ITS1 y región ITS2.

Junto con el mapa de calor se grafican dos dendogramas acoplados; en la parte superior se encuentra el dendograma construido con valores de disimilitud entre muestras de acuerdo a la abundancia de clases taxonómicas que la conforman, mientras que en la parte derecha del mapa de calor, se encuentra el dendograma construido con valores de disimilitud entre clases taxonómicas de acuerdo a su abundancia en las muestras (matriz transpuesta a la anterior). Las agrupaciones que se observan en ambos dendogramas fueron de acuerdo a la matriz de distancia Bray & Curtis. En el caso del dendograma de disimilitud entre muestras, se puede observar que se distinguen dos agrupamientos (clusters), uno hacia la derecha del dendograma que agrupa mayormente muestras de invierno, mientras que a la izquierda se agrupan las muestras de verano (Figura 26). En relación a las clases, en los extremos del dendograma se pueden observar las agrupaciones entre las clases raras o con menor abundancia en relación a las muestras (filo Chytridiomycota, Glomeromycota, Ascomycetes/Lecanoromycetes, Basidiomycota/Agariscotilbomycetes y Basidiomycota/Microbotriomycetes), mientras que hacia el centro del dendograma se pueden observar las clases más abundantes, las cuales se pueden definir en 2 grupos, uno dominado por hongos del filo Ascomycota (Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Saccharomycetes, e Incertae_sedis), y el segundo grupo presenta una mezcla de hongos del filo Ascomycota (Other, Leoteomycetes, Sordariomycetes) y Basidiomycota (Agaricomycetes, Other, Unidentified, Tremellomycetes), donde la clase Sordariomycetes se exhibe como la más abundante en relación a las muestras. En el grupo de muestras dominantes en verano (superior izquierda, dendograma superior), se puede observar una mayor abundancia de la clase Dothideomycetes (filo Ascomycota) y una menor abundancia en el grupo dominado por Ascomycota y Basidiomycota, mientras que en el grupo dominado por las muestras de invierno, hay una menor abundancia de la clase Dothideomycetes y una mayor abundancia para el grupo dominado por Ascomycota y Basidiomycota (Figura 26).

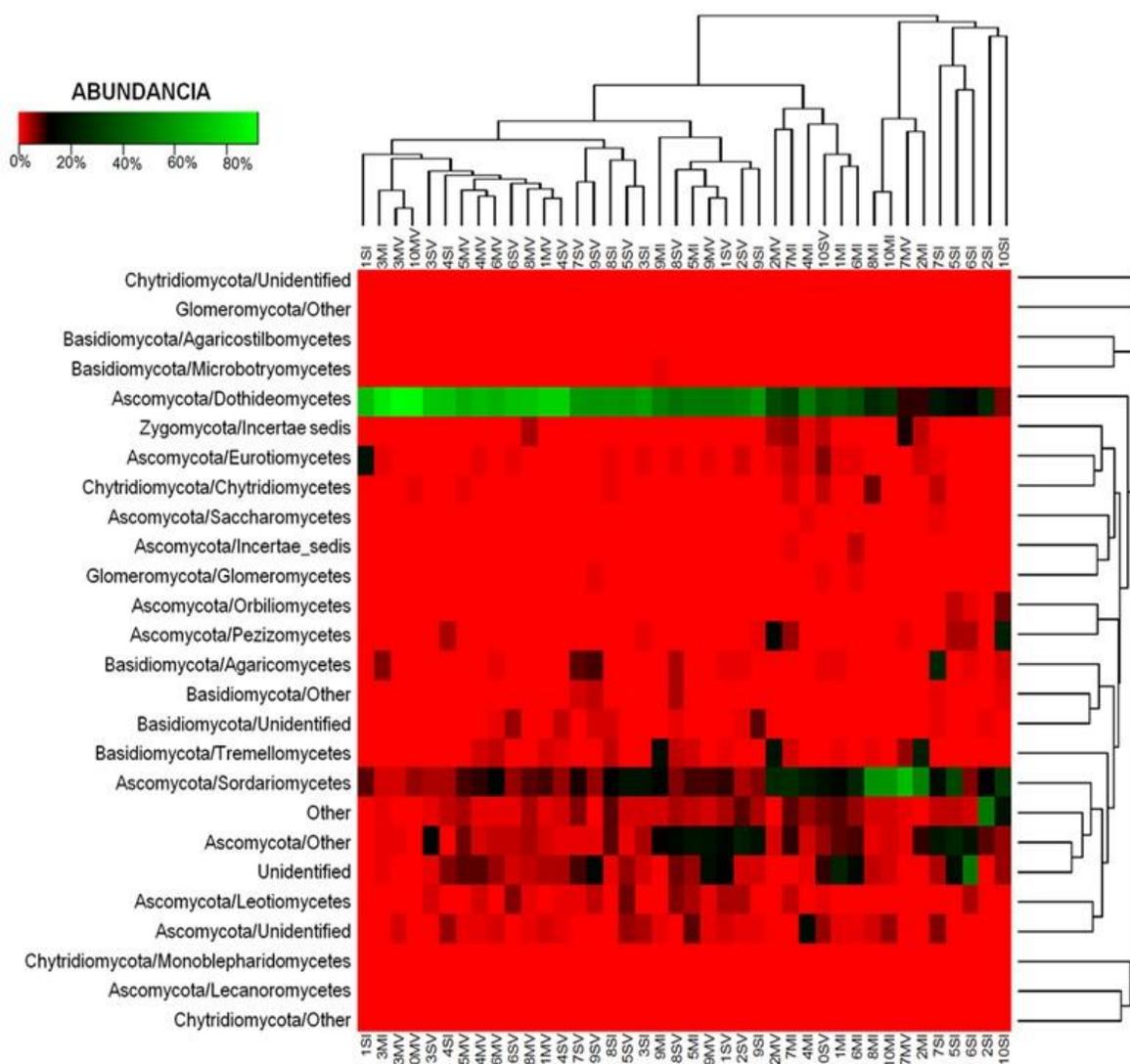


Figura 26. Mapa de calor de la abundancia relativa de clases de hongos en cada muestra analizando la región completa. MV(Madriguera-Verano). SV (Superficie-Verano). MI (Madriguera-Invierno). SI (Superficie-Invierno). Nivel taxonómico: clase. Dendograma superior: Disimilitud entre muestras. Dendograma derecha: Relación de disimilitud de acuerdo a abundancias, no filogenético

De forma similar a lo anterior, en el mapa de calor correspondiente a la región ITS1 (Figura 27), se puede observar que se distinguen dos agrupamientos (*clusters*), uno hacia la izquierda del dendograma que agrupa mayormente muestras de invierno mientras que a la derecha se agrupan (de forma variable) muestras de verano e invierno. En relación a las clases, en los extremos del dendograma se

pueden observar las agrupaciones entre las clases raras o con menor abundancia en relación a las muestras (Ascomycota/Lecanoromycetes, Hongo sin clasificar, Basidiomycota/Exobasidiomycetes, Chytridiomycota/Chytridiomycetes, Ascomycota/Saccharomycetes, Ascomycota/Incertae_sedis y Glomeromycota/Glomeromycetes), mientras que dentro del dendograma se pueden observar las clases más abundantes, las cuales se pueden definir en 2 grupos, uno dominado por hongos del filo Ascomycota (Dothideomycetes, Sordariomycetes, Agaricomycetes, Other y Unidentified), mientras que el segundo grupo presenta una mezcla de hongos del filo Ascomycota (Orbiliomycetes, Eurotiomycetes, Leotiomycetes y Unidentified) y Basidiomycota (Other y Tremellomycetes), donde la clase Eurotiomycetes se presenta como la más abundante en relación a las muestras. Si se observa el grupo de muestras dominado por invierno, se puede observar una mayor abundancia de la clase Sordariomycetes (filo Ascomycota) y una menor abundancia del filo Basidiomycota, mientras que en el grupo de muestras variables de verano e invierno, dominado por las muestras de invierno, hay una mayor abundancia del filo Ascomcomycota con la clase Dothideomycetes y Other.

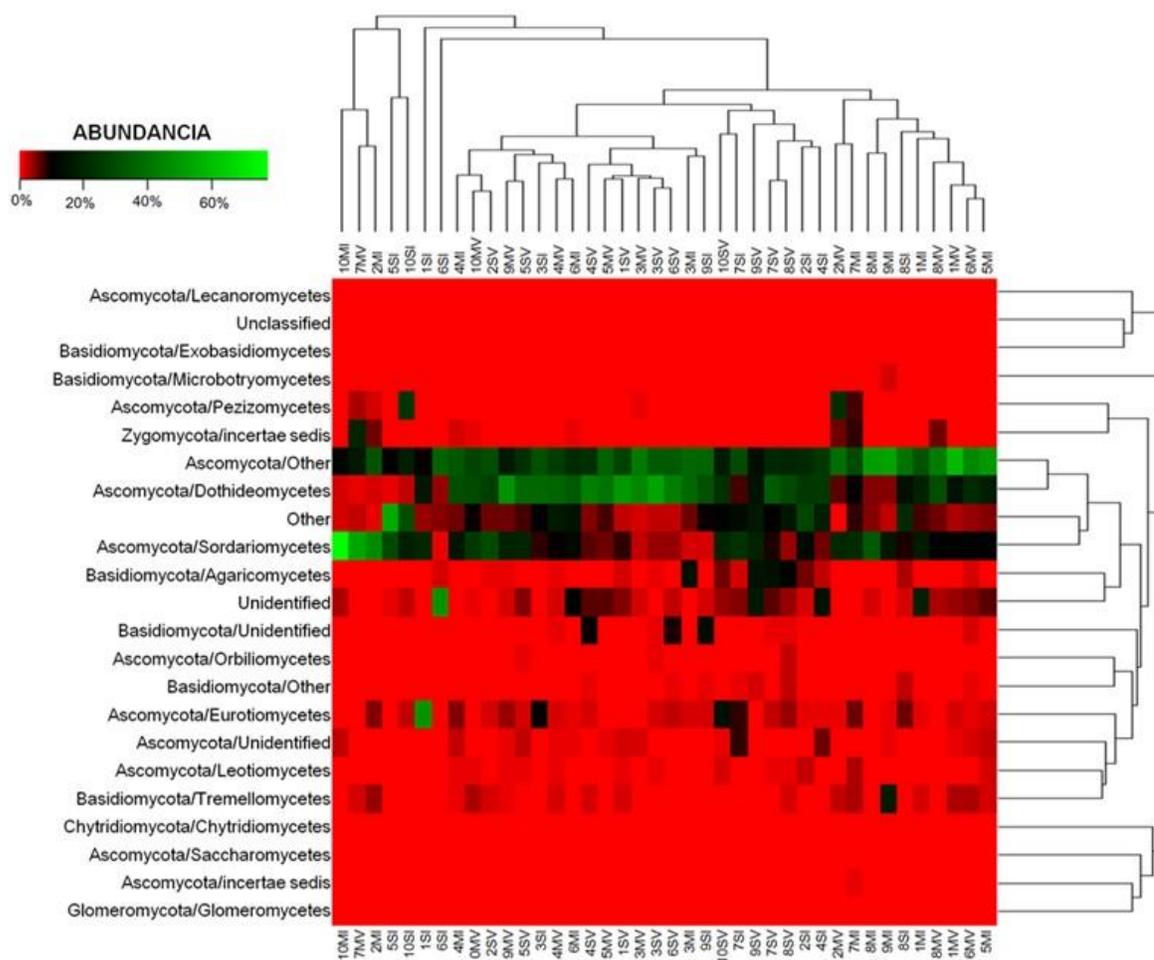


Figura 27. Mapa de calor de la abundancia relativa de clases de hongos en cada muestra analizando la región ITS1. MV(Madriguera-Verano). SV (Superficie-Verano). MI (Madriguera-Invierno). SI (Superficie-Invierno). Nivel taxonómico: clase. Dendograma superior: Disimilitud entre muestras. Dendograma derecha: Relación de disimilitud de acuerdo a abundancias, no filogenético.

Finalmente, en el caso del dendograma de disimilitud entre muestras correspondientes a la región ITS2 (Figura 28), se puede observar que no se distinguen agrupaciones claras entre las muestras. En relación a las clases, en la parte superior del dendograma se pueden observar las agrupaciones entre las clases raras o con menor abundancia: del filo Chytridiomycota (Unidentified y Chytridiomycetes), Ascomycota (Lecanoromycetes, Orbiliomycetes, Saccharomycetes), Basidiomycota (Exobasidiomycetes y Microbotryomycetes) y Glomeromycota (Glomeromycetes). En el centro del dendograma se pueden

observar las clases más abundantes dominadas por el filo Ascomycota (Pezizomycetes, Dothideomycetes, Sordariomycetes, Unidentified y Other), mientras que en el grupo de la parte inferior del dendograma se encuentra representado por hongos del filo Ascomycota y Basidiomycota.

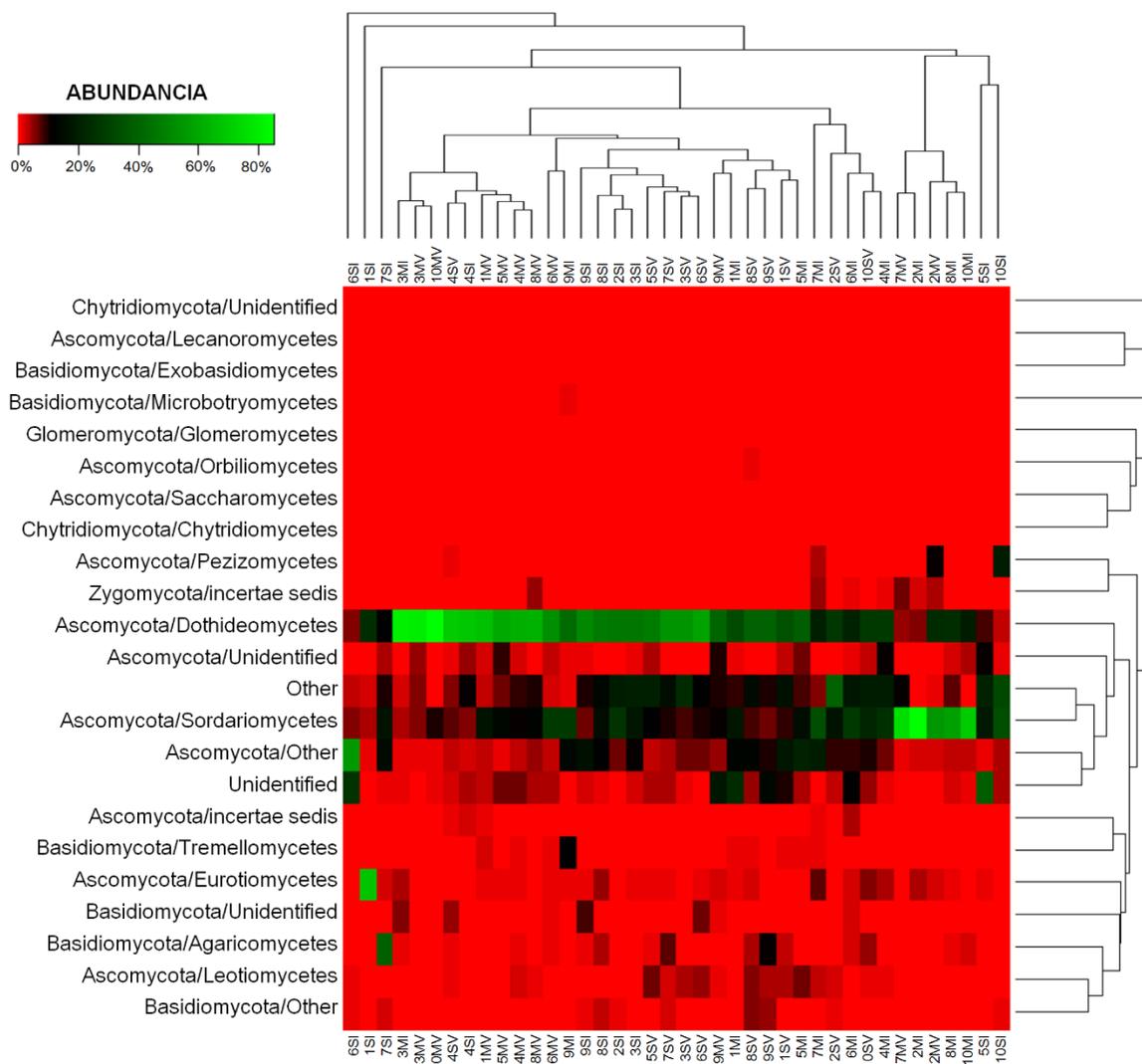


Figura 28. Mapa de calor de la abundancia relativa de clases de hongos en cada muestra analizando la región ITS2. MV (Madriguera-Verano). SV (Superficie-Verano). MI (Madriguera-Invierno). SI (Superficie-Invierno). Nivel taxonómico: clase. Dendograma superior: Disimilitud entre muestras. Dendograma derecha: Relación de disimilitud de acuerdo a abundancias, no filogenético.

3.8.8 Análisis de correlación canónica

El análisis de correspondencia canónica mostró que las variaciones en la distribución fúngica están asociadas con ciertas características físico-químicas del suelo. Se utilizó el primer par de variables canónicas debido a que explican una mayor proporción de la varianza total en relación de las variables físico-químicas del suelo contra la distribución fúngica. La varianza explicada por las variables canónicas (CA1 y CA2 en Tabla 12) fue mayor para la región ITS1 (41.64%), seguido por la RC (39.1%) y la región ITS2 (36.24%) (Tabla 12).

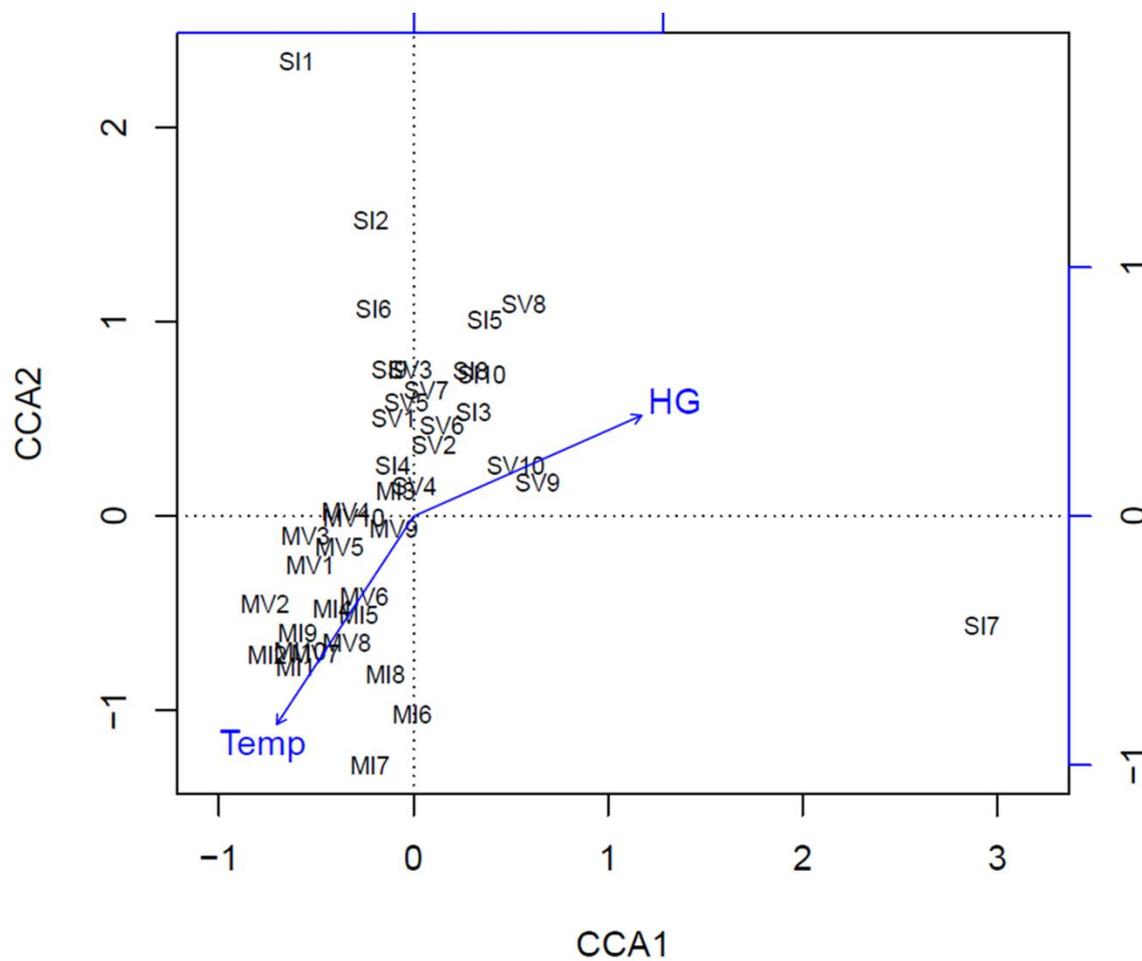
En el caso de la RC, la distribución fúngica mostró una relación estadísticamente significativa con Humedad Gravimetría (HG) y Temperatura (Temp) ($P < 0.05$; Tabla 12). Todas las muestras tipo MI (excepto MI3) y MV, se encontraron positivamente correlacionadas con Temp y negativamente correlacionadas con HG (Figura 29). En el caso de las muestras tipo SV, SI y la muestra MI3, todas excepto SI1 y SI7, estuvieron positivamente correlacionadas con HG y negativamente correlacionadas con Temp (Figura 29); mientras que las muestras SI1 y SI7 no estuvieron correlacionadas directamente con las variables.

En el análisis de la región ITS1, la distribución fúngica también mostró una relación estadísticamente significativa con HG y Temp ($P < 0.05$; Tabla 12). Todas las muestras tipo MI (excepto MI3) y MV, se encontraron positivamente correlacionadas con Temp y negativamente correlacionadas con HG (Figura 30). En el caso de las muestras tipo SV, SI y la muestra MI3, todas excepto SI1 y SI7, estuvieron positivamente correlacionadas con HG y negativamente correlacionadas con Temp (Figura 30), mientras que las muestras SI1 y SI7 no tuvieron una correlación directa con las variables.

Por último en el análisis de la región ITS2, la distribución fúngica mostró una relación estadísticamente significativa solamente con la Temp ($P < 0.05$; Tabla 12). Todas las muestras tipo MI y MV, se encontraron negativamente correlacionadas con Temp (Figura 31), mientras que en el caso de las muestras tipo SV y SI, estuvieron positivamente correlacionadas con Temp (Figura 31).

Tabla 12. Vectores para cada variable de las propiedades físico-química del suelo para el análisis de correlación canónica. (HG) Humedad por gravimetría, (MO) Materia orgánica, (Sal) Salinidad, (HS) Humedad sensor, (Temp) Temperatura, (F) Fósforo, (N) Nitrógeno, (AR) Arena, (ARC) Arcilla, (LIM) Limo. (r^2) Coeficiente de correlación. (Pr(>r)) Significancia estadística. (CA1, CA2) Coeficientes canónicos.

REGIÓN COMPLETA				
	CA1	CA2	r²	Pr(>r)
HG*	0.985	-0.1723	0.4927	0.002
MO	-0.105	-0.9945	0.0863	0.2198
pH	0.9912	0.1326	0.0948	0.2288
Sal	0.9984	0.0572	0.1354	0.2018
HS	0.9972	0.0743	0.2133	0.1219
Temp*	-0.8142	0.5806	0.1959	0.034
AR	0.8714	-0.4907	0.01	0.9211
ARC	-0.9237	0.3831	0.0269	0.9301
LIM	0.9776	-0.2105	0.0075	0.964
Varianza Explicada	22.84%	16.26%		
ITS1				
	CA1	CA2	r²	Pr(>r)
HG*	0.0532	-0.9986	0.4526	0.001
MO	0.9958	-0.0918	0.0934	0.2138
pH	-0.414	-0.9103	0.0633	0.2218
Sal	-0.2983	-0.9545	0.0328	0.4655
HS	-0.2274	-0.9738	0.1873	0.0869
Temp*	-0.4586	0.8886	0.2251	0.002
AR	0.9245	0.3813	0.0021	0.97
ARC	-0.2973	0.9548	0.0107	0.964
LIM	-0.0354	-0.9994	0.0166	0.8641
Varianza Explicada	22.79	18.85		
ITS2				
	CA1	CA2	r²	Pr(>r)
HG	0.9548	-0.2974	0.1397	0.0659
MO	0.4387	0.8987	0.004	0.8941
pH	0.9174	-0.3979	0.0236	0.5574
Sal	-0.4932	0.8699	0.0158	0.7043
HS	0.8055	-0.5926	0.0553	0.3147
Temp*	-0.9261	0.3773	0.1629	0.02
AR	-0.278	-0.9606	0.0274	0.6084
ARC	0.1976	0.9803	0.0818	0.2847
LIM	-0.1179	-0.993	0.0265	0.7652
Varianza Explicada	20.16	16.08		



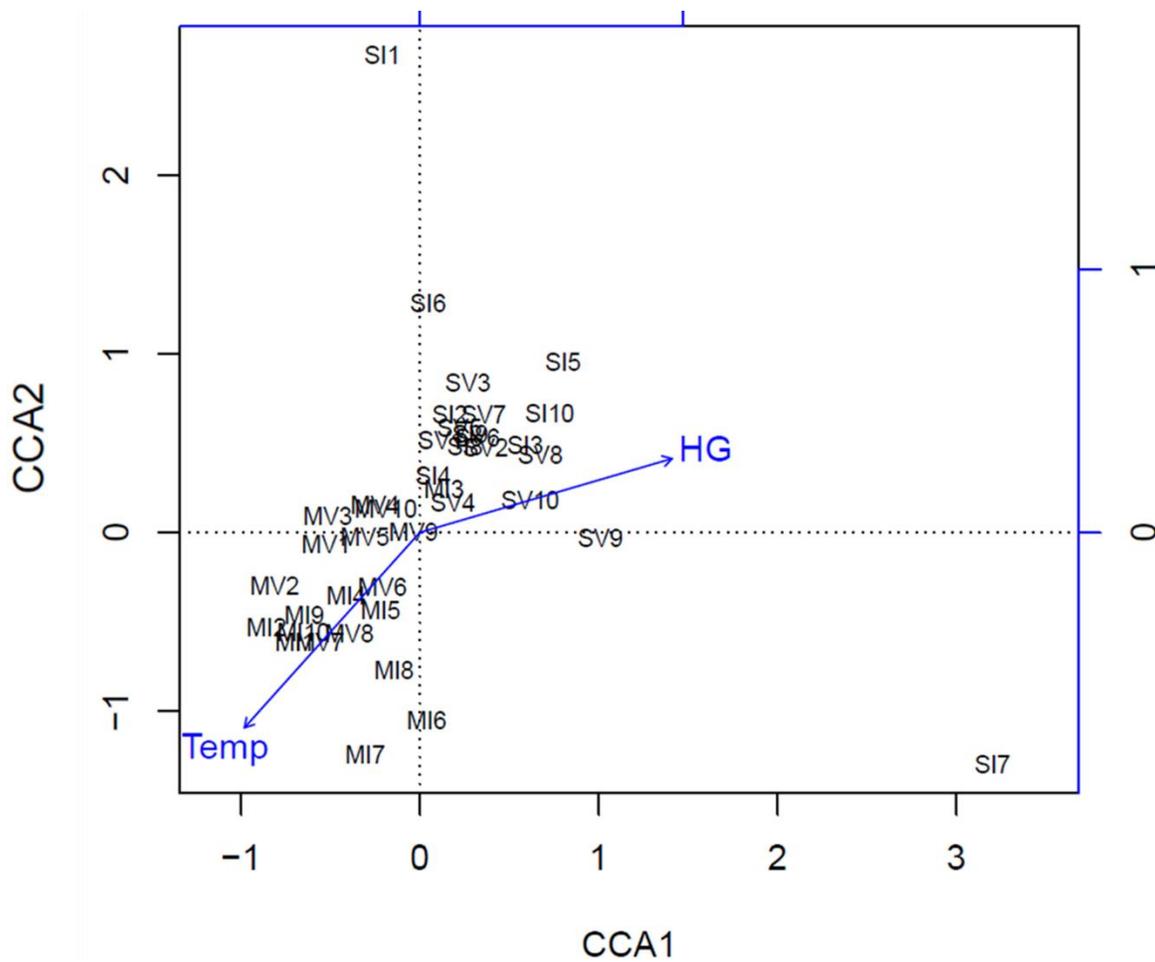


Figura 30. Diagramas de ordenación de los análisis de correspondencia canónica de las variables de características de suelo (ilustrado por vectores) y sitios de muestreo en el análisis de la Región ITS1. (Temp) Temperatura, (HG) Humedad por gravimetría.

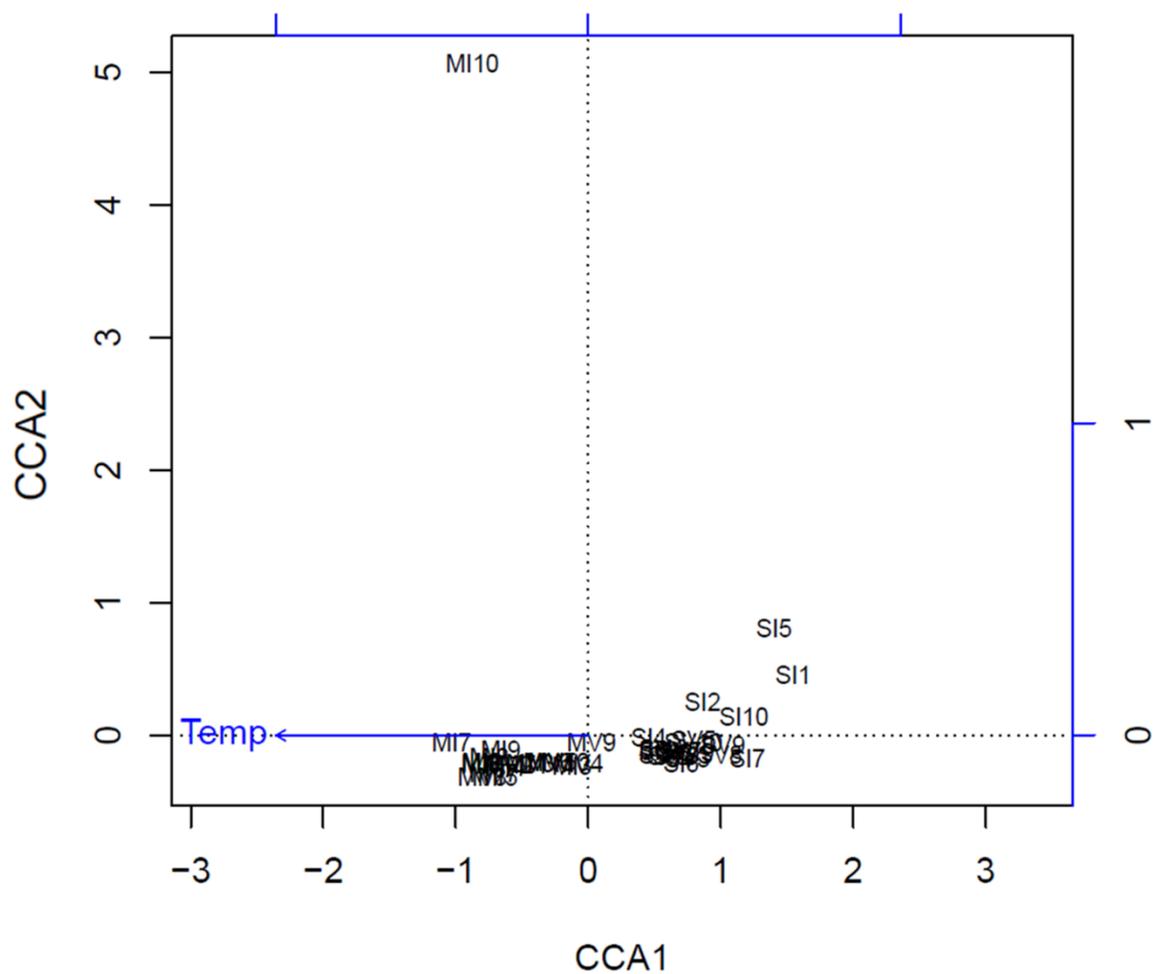


Figura 31. Diagramas de ordenación de los análisis de correspondencia canónica de las variables de características de suelo (ilustrado por vectores) y sitios de muestreo en el análisis de la Región ITS2. (Temp) Temperatura. Región ITS2.

Capítulo 4. Discusión

Se realizó un análisis metagenómico de diversidad fúngica del suelo de VDP, un ecosistema semi-árido con clima mediterráneo, por medio de la secuenciación de la región ITS del rADN a través de la plataforma de pirosecuenciación Roche 454. Las muestras incluyeron dos micro-hábitats: uno influenciado por actividad de roedores (madriguera) y otro sin tal perturbación (superficie) y se analizaron dos estaciones del año (verano e invierno). Además se determinaron las características edafológicas de las muestras.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la hipótesis 1 la cual plantea diferencias entre las características físico-químicas de suelo en dos micro-hábitats (madriguera (M) y superficie (S)), se rechaza, esto debido a que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de micro-hábitats (M y S).

La hipótesis 2 la cual plantea diferencias de las características fisicoquímicas del suelo en dos estaciones (Verano (V) e invierno (I)), se acepta de forma parcial, ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre muestras de las dos estaciones, pero si para las variables de Temperatura (Temp) y Humedad por Gravimetría (HG).

Por su parte, la hipótesis 3 la cual plantea diferencias en la diversidad y composición de comunidades de hongos entre micro-hábitats (M y S) y la influencia en estas diferencias de las características físico-químicas de suelo, se acepta ya que se encontraron diferencias de diversidad y composición entre dos diferentes micro-hábitats (M y S).

Finalmente, de acuerdo a la hipótesis 4 la cual enuncia diferencias entre la diversidad y composición de hongos en el suelo en estaciones del año distintas y las características físico-químicas de cada estación (V e I), se acepta, ya que se encontraron diferencias de diversidad y composición entre estaciones (V e I).

4.1 Características de suelo

En cuanto a las características fisicoquímicas de las muestras, los resultados indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre muestras de MI (Madriguera-Invierno) y SI (Superficie-Invierno) y entre MV (Madriguera-Verano) y SV (Superficie-Verano). Aun así, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) en Temp y HG, a nivel global entre las muestras de verano en relación a las de invierno en ambos micro-hábitats. Estas variables están influenciadas por las condiciones ambientales propias de la estacionalidad de un ecosistema mediterráneo: en verano se registró la temperatura más elevada y la humedad más baja, mientras que en invierno la temperatura fue menor y la humedad en el suelo mayor. Estas diferencias en las condiciones ambientales han sido relacionadas a diferencias de diversidad en otros estudios (e.g. Rajeev *et al.*, 2013).

A pesar de no haber encontrado diferencias estadísticamente significativas, puede existir una heterogeneidad de las variables físico-químicas del suelo (i.e. Figuras 10, 14, 18, 20). Esto está posiblemente influenciado por características geomorfológicas y edáficas del sitio (Fierer & Jackson, 2006), ya que la presencia de elevaciones del suelo puede ayudar a escorrentía de componentes del suelo, siendo estos depositados a las orillas de dicha elevación; las propiedades físico-químicas del suelo también pueden ser influenciadas por la vegetación (Butterfield & Briggs, 2009). Esta heterogeneidad espacial en el sitio de estudio puede influenciar tanto la diversidad como abundancia de los microorganismos en el suelo (Daniel, 2005). Se ha encontrado que la diversidad de los microorganismos se ve influenciada por el tipo de vegetación, así como por factores abióticos como la temperatura (Belnap, 2013; Garcia-Pichel *et al.*, 2013) y la humedad (McGuire *et al.*, 2012).

4.2 Diversidad, abundancia y distribución de hongos en Valle de las Palmas.

La plataforma de pirosecuenciación en nuestro estudio ha dado resultados de diversidad y abundancia de hongos nunca antes obtenidos por métodos tradicionales basados en clonación y secuenciación Sanger.

Estudios previos en Valle de las Palmas (VDP) (Romero-Olivares *et al.*, 2013), utilizando técnicas tradicionales, indicaron una alta diversidad de hongos pertenecientes al subreino Dikarya, así como un alto número de OTUs (18 OTUs en VDP, en comparación con los demás sitios que fueron parte del estudio) siendo la mayoría asignados al filo Ascomycetes de los cuales se definieron 5 clases y 12 órdenes donde los Pleosporales fueron los más abundantes.

En el presente estudio, se obtuvo un número de OTUs dos órdenes de magnitud mayor de 3,822 a 6,974 OTUs (Tabla 11), agrupando entre 148,488 y 340,593 secuencias con un umbral de similitud de 97% (Anexo 10).

Un número de secuencias cercanas a lo mostrado en el presente estudio se han reportado para diferentes ecosistemas; por ejemplo, Buee y colaboradores (2009), analizando sólo la región ITS1, de un total de 166,350 secuencias, identificaron entre 600 a 1000 OTUs (a un 97% de similitud), esto en muestras de suelo de bosques templados. En VDP, analizando la región ITS1, se obtuvo un total de 340,593 secuencias de las cuales se identificaron 2,725 OTUs.

En el presente estudio se evaluó la diversidad fúngica a través del análisis de la RC, así como las regiones ITS1 e ITS2, con el fin de determinar cuál región tiene una mayor cobertura de la diversidad en dos tipos de suelo (madriguera y superficie) en VDP y en dos estaciones del año distintas (verano e invierno).

Los resultados obtenidos de diversidad fúngica sugieren diferencias, tanto espaciales (i.e., madriguera y superficie) como temporales (i.e., verano e invierno). Para las muestras de verano, consistentemente las muestras madriguera presentaron un mayor número de secuencias cuando se analizó la RC, región ITS1 e ITS2 (Figura 23); esto podría resultar en un mayor número de OTUs. Para las muestras de invierno, de la misma manera, las muestras de madriguera tuvieron un

mayor número de secuencias en el análisis de la RC, región ITS1 e ITS2 (Figura 23). El alto número de secuencias dio lugar a que MV tuviera un mayor número de OTUs, en comparación con las demás muestras (Tabla 10), siendo esto consistente en los análisis de la RC, región ITS1 e ITS2.

Pese al gran número de secuencias (Figura 23, Anexo 10) y OTUs (Tabla 11), el estimador no paramétrico Chao 1 (Tabla 10), predice más del doble del número de OTUs para cada muestra, indicando que el esfuerzo de muestreo no fue suficiente para llegar a un estimado asíntotico de la diversidad total del ecosistema analizado. Esto se refleja en las curvas de rarefacción obtenidas (Figura 24), en las que no se alcanzó la asíntota en ninguno de los análisis de las distintas regiones (RC, ITS1 e ITS2). Esto sugiere que si hay un aumento en el número de muestras, el número de OTUs incrementará (Mohamed & Martiny, 2011). Este tipo de resultados concuerdan con otros estudios, donde a pesar de obtener un número relativamente alto de OTUs, no resultaron suficientes para alcanzar la asíntota en las curvas de rarefacción, así como también que el índice de Chao 1 fue consistentemente mayor que el número de OTUs (Buee *et al.*, 2009; Lentendu *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2010; Mohamed & Martiny, 2011).

Los índices de Simpson y Shannon indican una alta abundancia y una alta diversidad respectivamente (Tabla 11). En el caso del índice de Simpson, la muestra con mayor abundancia es MI (Tabla 11), seguido de SI, SV y MV, esto analizando la región completa y la región ITS1, en cuanto al índice de Shannon en los análisis de estas dos regiones, no hay diferencias significativas entre muestras. En el caso de la región ITS2, la muestra con mayor abundancia fue SI (Tabla 11), seguido de SV, MI y MV, cabe destacar, que según indica el índice de Shannon, la muestra SI posee la mayor diversidad, seguido de SV, las muestras MV y MI son estadísticamente iguales en diversidad (Tabla 11). El índice de Shannon en el presente trabajo es comparable con estudios de diversidad fúngica en suelos de bosque, donde valores de hasta 4.51 son obtenidos para este índice (Voříšková *et al.*, 2013).

El análisis comparativo de composición indica la dominancia de los filos Ascomycota y Basidiomycota en todas las muestras (Figura 25), analizando tanto la RC, como las regiones ITS1 o ITS2. Esto es consistente con otro estudio realizado por Orgiazzi y colaboradores (2012) en diferentes tipos de suelo de ecosistemas con clima mediterráneo en donde, analizando las regiones ITS1 e ITS2, obtuvieron 64.5% y 68% del filo Ascomycota, respectivamente, mientras que para Basidiomycota, obtuvieron un 30.3% en la región ITS1 y un 25.4% en la región ITS2.

La clase Dothideomycetes, en el caso de las muestras MV y SV fue más abundante que en las muestras MI y SI, sugiriendo que su abundancia tiende a disminuir durante el invierno (Figura 25-A, B), mientras que para un grupo de hongos sin identificar se encuentra en menor abundancia durante el verano (MV y SV) y aumenta durante el invierno (MI y SI). Se considera común encontrar la clase Dothideomycetes en análisis de diversidad y abundancia de hongos en muestras ambientales, dado que esta representa la clase más grande y diversa del filo Ascomycota con más de 1300 géneros y más de 19,000 especies conocidas, dentro de las cuales se encuentran hongos saprobios, líquenes, así como patógenos de plantas (Rouxel & De Wit, 2012).

En el análisis comparativo de composición de la región ITS2 (Figura 25-C) se observan cambios en la abundancia de Dothideomycetes, que tiende a ser menor en las muestras MV y MI; el cambio más notable en abundancia de la clase Dothideomycetes es en la muestra S, la cual la abundancia de esta clase es mayor durante el verano (SV) y menor en el invierno (SI) (Figura 25-C). Por otro lado, la clase Sordariomycetes se refleja como una de las más abundantes en las muestras, aumentando su abundancia durante el invierno (muestras MI y SI, Figura 25-C). La clase Sordariomycetes es otra de las clases más diversas del filo Ascomycota; ésta incluye poco más de 600 géneros y 3000 especies conocidas, e incluye a la mayoría de los Ascomycota no liquenizados (Ning & Sung, 2008).

Un gran porcentaje de hongos no están identificados (Figura 25); esto puede deberse a la falta de anotación taxonómica y errores de asignaciones taxonómicas

que se encuentran depositadas en la base de datos, siendo esto la mayor limitación en el reconocimiento de especies (Buee *et al.*, 2009).

Romero-olivares y colaboradores (2013), en el estudio de diversidad fúngica de VDP, determinaron la presencia de las clases de hongos Dikarya: Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Pezizomycetes, Leotiomycetes, Agaricomycetes (pertenecientes al filo Ascomycota) y Agaricomycetes (filo Basidiomycota). En el presente estudio, se detectó la presencia de esas mismas clases, además de las clases Saccharomycetes, Orbiliomycetes, Lecanoromycetes y Sordariomycetes (filo Ascomycota), Agaricostilbomycetes, Exobasidiomycetes, Tremellomycetes y Microbotryomycetes (filo Basidiomycota). Lo anterior indica que el acercamiento metagenómico usando NGS permitió ampliar la información sobre la diversidad de hongos en VDP.

Los análisis de correspondencia canónica (CCA) (Figura 29, 30, 31), para la RC, ITS1 e ITS2, mostraron una relación de las muestras (MV, SV, MI, SI) con Temp, sugiriendo una relación de cambios de la distribución fúngica en con respecto a los micro-hábitats. La RC y la región ITS1 mostraron además una relación con la HG, sugiriendo una relación de cambios de la distribución fúngica de las muestras (MV, SV, MI, SI) con respecto a los micro-hábitats. Estas relaciones están ligadas a los cambios de abundancia en las clases (Figura 25) y pueden deberse a las diferencias de disponibilidad hídrica en invierno, así como por cambios de temperatura entre las estaciones, siendo más extremas en verano que en invierno. Las muestras SV y SI pueden estar mayormente influenciadas a los cambios hídricos y menos a los cambios de temperatura, debido a su exposición a la radiación solar, mientras que las muestras MI y MV, pueden llegar a ser más sensibles a cambios en la temperatura, esto podría explicar los cambios en la abundancia específicamente entre un mismo micro-hábitat en diferentes estaciones (Figura 25).

En los mapas de calor y dendogramas de la RC (Figura 26) e ITS1 (Figura 27) se pueden apreciar agrupaciones en relación al verano e invierno, concordando con el CCA (Figura 29, 30), y sugiriendo que la abundancia y distribución fúngica se

encuentra relacionada a los cambios de temperatura y humedad (cambios estacionales entre verano e invierno). En relación a la región ITS2 (Figura 28), en congruencia con el CCA (Figura 31), se encontró un menor agrupamiento de las muestras. A pesar de que se pueden apreciar diferencias de abundancia entre estaciones (Figura 25-C), no se aprecian cambios sustanciales en la diversidad en relación a los micro-hábitats.

La presencia de hongos Ascomycota en este tipo de ecosistemas no es rara ya que las especies que se encuentran dentro de este filo son muy diversas, desde algunos líquenes, los cuales podrían indicar la interacción con BSC (Biological Soil Crust), patógenos de plantas y saprófitos (Schoch *et al.*, 2006). La gran abundancia de este filo durante el verano puede deberse a la naturaleza saprófita de algunas de sus especies, las cuales tienen una actividad mayor a partir de la asimilación de materia orgánica muerta.

La presencia de hongos Lecanoromycetes (filo Ascomycota) no cambia de acuerdo a las estaciones así como entre las muestras, esta clase de hongos es también llamada “hongos liquenizados”, ya que incluye en su mayoría a especies de líquenes (Pöggeler & Wöstemeyer, 2011), su presencia podría indicar homogeneidad en el sitio de esta clase de hongos.

En el presente trabajo se pudieron observar las diferencias y similitudes en el análisis de la RC, ITS1 e ITS2. Usualmente, la RC no se emplea para este tipo de análisis, porque puede haber sesgos al momento de la formación de los OTUs, ya que al contener de forma parcial la región 18S y de forma completa la región 5.8S, las cuales son conservadas (sin gran variabilidad en su secuencia entre grupos taxonómicos), podría provocar que se agruparan secuencias pertenecientes a distintos OTUs, siendo esto causado por a baja resolución de dichas regiones para discriminar especies cercanas (O'Brien *et al.*, 2005); esto se observó en nuestros resultados, en los cuales se obtuvo un menor número de OTUs para la RC en comparación con la región ITS1 e ITS2 (Tabla 9).

Se ha propuesto que los resultados taxonómicos de la región ITS1 e ITS2 son complementarios (Bazzicalupo *et al.*, 2013; Orgiazzi *et al.*, 2012) y que las

diferencias entre la taxonomía que proporciona cada región incrementa conforme a la resolución taxonómica, es decir, hasta nivel de especie (Bazzicalupo *et al.*, 2013). Bazzicalupo y colaboradores (2013), encontraron que la región ITS2 proporcionó un mayor número de OTUs que la región ITS1, siendo esto congruente con nuestros resultados. Además sugirieron que la región ITS2 puede ser más adecuada para revelar la riqueza taxonómica de las comunidades fúngicas, aunque indican que ambas regiones pueden ayudar a responder a preguntas sobre factores que estructuran la comunidad fúngica.

Conclusiones

Las características de suelo, en relación a humedad sensor, pH, materia orgánica y conductividad eléctrica, no fueron estadísticamente diferentes entre micro-hábitats (madriguera y superficie), así como tampoco entre estaciones (verano e invierno), mientras que la humedad por gravimetría (HG) y temperatura, no son estadísticamente diferentes entre micro-hábitats (madriguera y superficie), pero si fueron estadísticamente diferentes entre estaciones (verano e invierno) y son estas las características que denotan las diferencias entre la diversidad y composición fúngica de cada muestra (MV, SV, MI, SI).

Durante el verano, predominó la clase Dothideomycetes (filo Ascomycota) en muestras de suelo madriguera y superficie, aunque la dominancia de clases de hongos Ascomycota durante el verano podría deberse a la disminución de hongos Basidiomycota cuyo desarrollo no es favorable en condiciones de altas temperaturas y poca humedad, pero durante el invierno, cuando ocurre un aumento en la humedad y una disminución en la temperatura, su abundancia aumenta hasta alrededor de un 20%. La abundancia de Basidiomycetes fue mayor en muestras de superficie que en muestras de madriguera, en las dos estaciones del año, aunque sus diferencias tan pequeñas entre muestras podrían indicar homogeneidad de este filo.

Las características estacionales y edafológicas de Valle de las Palmas podrían favorecer el desarrollo de hongos tanto en abundancia como en diversidad. Los resultados claramente indicaron diferencias entre muestras, pero estas diferencias se presentaron de forma estacional (verano e invierno).

El estudio de las diferentes regiones del rADN para la identificación fúngica en el presente estudio indicaron que la RC y la región ITS1 dieron resultados parecidos, aunque se requiere de una mejor resolución (a nivel de especie), es mejor la utilización de la región ITS1 ya que se obtiene mayor variabilidad y existe mayor información en la base de datos.

Referencias bibliográficas

Abarenkov, K., Henrik Nilsson, R., Larsson, K. H., Alexander, I. J., Eberhardt, U., Erland, S., Hoiland, K., Kjoller, R., Larsson, E., Pennanen, T., Sen, R., Taylor, A. F. S., Tedersoo, L., Ursing, B. M., Vralstad, T., Liimatainen, k., Peintner, U. & Kõljalg, U. (2010). The UNITE database for molecular identification of fungi—recent updates and future perspectives. *New Phytologist*, 186(2), 281-285.

Allen, M. F., Swenson, W., Querejeta, J. I., Egerton-Warburton, L. M. & Treseder, K. K. (2003) Ecology of mycorrhizae: a conceptual framework for complex interactions among plants and fungi. *Annual review of phytopathology*, 41 (63), 271-303.

Anderson, I. C. & Cairney, J. W. G. (2004) Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*, 6(8), 769-779.

Arriaga-Ramírez, S., & Cavazos, T. (2010). Regional trends of daily precipitation indices in northwest Mexico and southwest United States. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 115(D14), 1-10.

Baptista-Rosas, R. C., Catalan-Dibene, J., Romero-Olivares, A. L., Hinojosa, A., Cavazos, T., & Riquelme, M. (2012). Molecular detection of *Coccidioides spp.* from environmental samples in Baja California: linking Valley Fever to soil and climate conditions. *Fungal Ecology*, 5(2), 177-190.

Bazzicalupo, A. L., Bálint, M. & Schmitt, I. (2013) Comparison of ITS1 and ITS2 rDNA in 454 sequencing of hyperdiverse fungal communities. *Fungal Ecology*, 6 (1), 102-109.

Belnap, J. (2013) Some like it hot, some not. *Science*, 340 (6140), 1533-1534.

Bidartondo, M. I. & Gardes, M. (2005) Fungal diversity in molecular terms: profiling, identification, and quantification in the environment. In: Dighton, J., White, J. F. & Oudemans, P. (ed.) *The Fungal Community. Its Organization and Role in the Ecosystem*. CRC Press.

Brodie, E., Edwards, S. & Clipson, N. (2003) Soil fungal community structure in a temperate upland grassland soil. *FEMS microbiology ecology*, 45 (2), 105-114.

Buee, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R. H., Uroz, S. & Martin, F. (2009) 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist*, 184 (2), 449-456.

Butterfield, B. J., & Briggs, J. M. (2009). Patch dynamics of soil biotic feedbacks in the Sonoran Desert. *Journal of Arid Environments*, 73(1), 96-102.

Cannon, P. (1999) Options and constraints in rapid diversity analysis of fungi in natural ecosystems. *Fungal Diversity*, 2, 1-15.

Caporaso, J. C., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J. R., Turnbaugh, P. J., Walters, W. A., Widmann, J., Yatsunencko, T., Zaneveld, J. & Knight, R. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5): 335-336.

Chapin III, F. S., Matson, P. A. & Mooney, H. A. (2002) *Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology*. Springer.

Christ, S., Wubet, T. & Buscot, F. (2010) Soil fungal communities along land use gradients of three German biodiversity exploratories: A comparison of classical cloning and sequencing approach with high throughput sequencing. 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World. pp. 131-133.

Coleman, D. C., Crossley, D. A. & Hendrix, P. F. (2004) *Fundamentals of soil ecology*. Elsevier. Recuperado de: http://books.google.com.mx/books?id=pKKDJwu_OlkC&printsec=frontcover&dq=Fundamentals+of+soil+ecology.&hl=es&sa=X&ei=cf45UvScA6iQyAGDxYHQCA&ved=0CC0Q6AEwAA#v=onepage&q=Fundamentals%20of%20soil%20ecology.&f=false

Collins, S. L., Sinsabaugh, R. L., Crenshaw, C., Green, L., Porrás-alfaro, A., Stursova, M. & Zeglin, L. H. (2008) Pulse dynamics and microbial processes in aridland ecosystems. *Journal of Ecology*, 96, 413-420.

Colwell, R.K. (2013). *EstimateS: Statistical Estimation of Species Richness and Shared Species from Samples (Software and User's Guide)*, Version 9. Recuperado de: <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates/>

Crawford, J. W., Harris, J., Ritz, K. & Young, I. M. (2005) Towards an evolutionary ecology of life in soil. *Trends in ecology & evolution*, 20, 7-81.

Daniel, R. (2005) The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology*, 3 (6), 470-478.

Davidson, F. A. (2007) Mathematical modelling of mycelia: a question of scale. *Fungal Biology Reviews*, 21 (1), 30-41.

Diario Oficial de la Federación (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Recuperado de: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=717582&fecha=31/12/2002

Dighton, J. (2003) *Fungi in ecosystems process*. CRC Press.

Durrell, L. W. & Shields, L. M. (1960) Fungi isolated in culture from soils of the Nevada test site. *Mycologia*, 52 (4), 636-641.

Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16), 2194-2200.

Egger, K. N. (1995) Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. *Canadian Journal of Botany*, 73, 1415-1422.

Entsminger, G. L. (2012) *EcoSim Professional: Null modeling software for ecologists*. Versión 7. Acquired Intelligence Inc. & Kesey-Bear. Jericho, VT 05465. Recuperado de: <http://garyentsminger.com/ecosim/>

Fakruddin, M., Chowdhury, A., Hossain, M., Mannan, K. S. B., & Mazumdar, R. M. Pyrosequencing-principles and applications. *International Journal of Life Science & Pharma Research*, 2 (2), 65-76.

Fierer, N., Schimel, J. P. & Holden, P. A. (2003) Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology and Biochemistry*, 35 (1), 167-176.

Fierer, N., & Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3), 626-631.

Gadd, M. G., Watkinson, S. C. & Dyer, P. (2007) *Fungi in the environment*. Cambridge University Press.

Garcia-Pichel, F., Loza, V., Marusenko, Y., Mateo, P., & Potrafka, R. M. (2013). Temperature Drives the Continental-Scale Distribution of Key Microbes in Topsoil Communities. *Science*, 340(6140), 1574-1577.

Gardes, M. & Bruns, T. D. (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*, 2, 113-118.

Giri, B., Giang, P. H., Kumari, R., Prasad, R., Varma, E. (2005) Microbial diversity in soils. In: Buscot, F. & Varma, A. (ed.), *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Springer. Recuperado de: <http://books.google.com.mx/books?id=N96-qTZaXD0C&printsec=frontcover&dq=Microorganisms+in+Soils:+Roles+in+Genesis+and+Functions&hl=es&sa=X&ei=rAQ6UrjZO4OSyAHrroHoCQ&ved=0CC8Q6AEwAA#v=onepage&q=Microorganisms%20in%20Soils%3A%20Roles%20in%20Genesis%20and%20Functions&f=false>

Grishkan, I., Zaady, E., Nevo, E. (2006) Soil crust microfungi along a southward rainfall gradient in desert ecosystems. *European Journal of Soil Biology*, 42, 33-42.

Gotelli, N. & Colwell, R. (2011) Estimating species richness. In: Magurran, A. E., & McGill, B. J. (ed.) *Biological diversity: frontiers in measurement and assessment*. Oxford University Press. Recuperado de: <http://books.google.com.mx/books?id=Q5oURmsTv4wC&dq=Biological+diversity:+frontiers+in+measurement+and+assessment&hl=es&sa=X&ei=GAI6UsSPCcm2yAHV1oH4DQ&ved=0CC0Q6AEwAA>

Hawksworth, D. L. & Rossman, A. Y. (1997) Where are all the undescribed fungi?. *Phytopathology*, 87 (9), 888-891.

Hert, D. G., Fredlake, C. P., & Barron, A. E. (2008). Advantages and limitations of next-generation sequencing technologies: A comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods. *Electrophoresis*, 29(23), 4618-4626.

Huenneke, L. F. & Noble, I. (1996) Ecosystem function of biodiversity in arid ecosystems. In: Mooney, H. A., Cushman, J. H., Medina, E., Sala, O. E., Schulze, E. (ed.) *Functional Roles of Biodiversity: a Global Perspective*. Wiley.

Hillel, D. (2008) *Soil in the environment. Crucible of terrestrial life*. Elsevier.
 Recuperado de:
<http://books.google.com.mx/books?id=rZe0sY3dGFIC&printsec=frontcover&dq=Soil+in+the+environment&hl=es&sa=X&ei=4QE6UpjhEsiGyAHRsYDIBA&ved=0CC8Q6AEwAA#v=onepage&q=Soil%20in%20the%20environment&f=false>

Hunt, J., Boddy, L., Randerson, P. F. & Rogers, H. J. (2004) An evaluation of 18S rDNA approaches for the study of fungal diversity in grassland soils. *Microbial ecology*, 47 (4), 385-395.

Jeewon, R. & Hyde, K. D. (2007) Detection and diversity of fungi from environmental samples: traditional versus molecular approaches. In: Varma A. & Oelmüller, R. (ed.) *Advanced Techniques in Soil Microbiology*. Springer-Verlag. Recuperado de:
<http://books.google.com.mx/books?id=JvNpFo1jhEEC&pg=PA167&dq=Advanced+Techniques+in+Soil+Microbiology&hl=es&sa=X&ei=-Al6Urr3DanYyQGV0IDYBA&ved=0CC8Q6AEwAA#v=onepage&q=Advanced%20Techniques%20in%20Soil%20Microbiology&f=false>

Jones, M. D. M. & Richards, T. A. (2011) Environmental DNA analysis and the expansion of the fungal tree of life. In: Pöggeler, S. & Wöstemeyer, J. (ed). *The Mycota: Evolution of Fungi and Fungal-Like Organisms* (pp. 37-54). Germany, Springer.
 Recuperado de:
<http://books.google.com.mx/books?id=jK8Wz3PSVVoC&printsec=frontcover&dq=The+Mycota:+Evolution+of+Fungi+and+Fungal-Like+Organisms&hl=es&sa=X&ei=SQM6Ure7H-GyyAGinICgCw&ved=0CDEQ6AEwAA#v=onepage&q=The%20Mycota%3A%20Evolution%20of%20Fungi%20and%20Fungal-Like%20Organisms&f=false>

Jumpponen, A., Jones, K. L. & Blair, J. (2010) Vertical distribution of fungal communities in tallgrass prairie soil. *Mycologia*, 102 (5), 1027-1041.

Kanopka, A. (2009) What is microbial community ecology?. *The ISME Journal*, 3, 1223–1230.

Kellogg, C. E. (1951). Soil survey manual. 18. US Gov. Print. Recuperado de: <http://books.google.com.mx/books?id=8JJzAAAAIAAJ&printsec=frontcover&dq=Soil+survey+manual&hl=es&sa=X&ei=pwM6UoiBMqWlyAGRooGQDq&ved=0CDIQ6AEwAA#v=onepage&q=Soil%20survey%20manual&f=false>

Kindt, R., & Coe, R. (2005). Tree diversity analysis: A manual and software for common statistical methods for ecological and biodiversity studies. World Agroforestry Centre.

Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H. & Trevors, J. T. (2004) Methods of studying soil microbial diversity. Journal of Microbiological Methods, 58 (2), 169-188.

Korabecna, M. (2007) The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA gene): its biological meaning and application in medical mycology. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. Formatex. Recuperado de: <http://www.formatex.org/microbio/papers.htm>

Lai, X., Cao, L., Tan, H., Fang, S., Huang, Y. & Zhou, S. (2007) Fungal communities from methane hydrate-bearing deep-sea marine sediments in South China Sea. The ISME journal, 1 (8), 756-762.

Lentendu, G., Zinger, L., Manel, S., Coissac, E., Choler, P., Geremia, A. R. & Melodelima, C. (2011) Fungal Diversity, 49(1), 113-123.

Lim, Y. W., Kim, B. K., Kim, C., Jung, H. S., Kim, B., Lee, J. & Chun, J. (2010) Assessment of soil fungal communities using pyrosequencing. Journal of microbiology, 8 (3), 284-289.

Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F. D., & Knight, R. (2007). Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. Nucleic acids research, 35(18), 1-10.

Luo, C., Tsementzi, D., Kyrpides, N., Read, T., & Konstantinidis, K. T. (2012). Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. PloS one, 7(2), 1-12.

Magan, N. (2007) Fungi of extreme environments. In: Kubicek, C. P., Druzhinina, I. S. (ed.) The Mycota: Environmental and Microbial Relationships. Springer.

Manter, D. K. & Vivanco, J. M. (2007) Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 71, 7-14.

Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9, 387-402.

Mardis, E. R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in genetics*, 24(3), 133-141.

Marsh, S. (2006) *Pyrosequencing Protocols. Methods in Molecular Biology*. Humana Press. Recuperado de: http://books.google.com.mx/books?id=mQGk_MzaOn4C&printsec=frontcover&dq=Pyrosequencing+Protocols.+Methods+in+Molecular+Biology&hl=es&sa=X&ei=EQc6UoTHAoKOyAGj1oCoDQ&ved=0CC8Q6AEwAA#v=onepage&q=Pyrosequencing%20Protocols.%20Methods%20in%20Molecular%20Biology&f=false

Martin, K. J. & Rygiewicz, P. T. (2005) Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC microbiology*, 5 (28), 1-11.

McGuire, K. L., Fierer, N., Bateman, C., Treseder, K. K., & Turner, B. L. (2012). Fungal community composition in neotropical rain forests: the influence of tree diversity and precipitation. *Microbial ecology*, 63(4), 804-812.

Metzker, M. L. (2009) Sequencing technologies—the next generation. *Nature Reviews Genetics*. 11 (1), 31-46.

Millenium Ecosystem Assesment (2005) *Ecosystems and human well-being: desertification synthesis*. World Resources Institute, Washington, DC, Estados Unidos. Recuperado de: <http://www.eoearth.org/view/article/152303/>

Mohamed, D. J., & Martiny, J. B. (2010). Patterns of fungal diversity and composition along a salinity gradient. *The ISME journal*, 5(3), 379-388.

Monard, C., Gantner, S. & Stenlid, J. (2012) Utilizing ITS1 and ITS2 to study environmental fungal diversity using pyrosequencing. *FEMS microbiology ecology*, 84, 165-175.

Montesinos, E., Badosa, E., Bonaterra, A., Peñalver, R. & López, M. (2008) Aplicación de la biotecnología al control biológico de bacterias y hongos fitopatógenos. En: Pallás, V., Escobar, C., Rodríguez-Palenzuela, P. & Marcos, J. F. (Eds.) Herramientas biotecnológicas en fitopatología. Mundi-Prensa.

Moreno, C. E. (2001) Métodos para medir la biodiversidad. Manuales y Tesis Sociedad Entomológica Aragonesa. Recuperado de: <http://entomologia.rediris.es/sea/manytes/mt1.htm>

Moter, A. & Göbel, U. B. (2000) Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of microbiological methods*, 41 (2), 85-112.

Mueller, G. M. & Schmit, J. P. (2007) Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict?. *Biodiversity and Conservation*, 16(1), 1-5.

Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, L., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G. (2003) Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54, 655-670.

Nilsson, R. H., Kristiansson, E., Ryberg, M., Hallenberg, N., & Larsson, K. H. (2008). Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Journal of Evolutionary bioinformatics*, 4, 193.

Nilsson, R. H., Ryberg, M., Abarenkov, K., Sjökvist, E., & Kristiansson, E. (2009). The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiology Letters*, 296(1), 97-101.

Nilsson, R. H., Veldre, V., Hartmann, M., Unterseher, M., Amend, A., Bergsten, J., & Abarenkov, K. (2010). An open source software package for automated extraction of ITS1 and ITS2 from fungal ITS sequences for use in high-throughput community assays and molecular ecology. *Fungal Ecology*, 3(4), 284-287.

Ning, Z. & Sung, G. (2008) Tree of Life web Project. Sordariomycetes. Recuperado 21 de Agosto de: <http://tolweb.org/Sordariomycetes/29050/2008.01.14>.

Nussbaum, R. L., McInnes, R. R. & Willard, H. F. (2008) *Genética en Medicina*. Elsevier. Recuperado de: <http://books.google.com.mx/books?id=gjklctEIEyWC&printsec=frontcover&dq=Gen%C3%A9tica+en+Medicina&hl=es&sa=X&ei=3Qg6Uu-oL6P8yAH17oHICQ&ved=0CC8Q6AEwAA#v=onepage&q=Gen%C3%A9tica%20en%20Medicina&f=false>

O'Brien, H. E., Parrent, J. L., Jackson, J. A., Moncallvo, J. & Vilgalys, R. (2005) Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (9), 5544-5550.

Oliveira, L. G., Cavalcanti, M. A. Q., Fernandes, M. J. S. & Lima, D. M. M. (2013) Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. *Journal of Arid Environments*, 95, 49-54.

Orgiazzi, A., Lumini, E., Nilsson, R. H., Girlanda, M., Vizzini, A., Bonfante, P., & Bianciotto, V. (2012). Unravelling soil fungal communities from different Mediterranean land-use backgrounds. *PloS one*, 7(4), 1-9.

Paul, E. A. & Clark, F. E. (1989) *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press.

Petrosino, J. F., Highlander, S., Luna, R. A., Gibbs, R. A., & Versalovic, J. (2009). Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical chemistry*, 55(5), 856-866.

Pfenning, L. H. & Magalhães de Abreu, L. (2012) Hongos saprofitos y patógenos de plantas. En: Morerira, F., Huising, E. J. & Bignell, D. (Eds.) *Manual de biología de suelos tropicales. Muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo*. Instituto Nacional de Ecología.

Porrás-Alfaro, A., Herrera, J., Natvig, D. O., Lipinski, K. & Sinsabaugh, R. L. (2011) Diversity and distribution of soil fungal communities in a semiarid grassland. *Mycologia*, 103 (1), 10-21.

Pöggeler, S. & J. Wöstemeyer (2011) *Evolution of Fungi and Fungal Like Organisms. The Mycota*. Springer.

Quince, C., Lanzen, A., Davenport, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2011). Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC bioinformatics*, 12(1), 38.

Rajeev, L., da Rocha, U. N., Klitgord, N., Luning, E. G., Fortney, J., Axen, S. D., Shin, P. M., Bouskill, N. J., Bowen, B. P., Kerfeld, C. A., Garcia-Pichel, F., Brodie, E. L., Northen, T. R. & Mukhopadhyay, A. (2013). Dynamic cyanobacterial response to hydration and dehydration in a desert biological soil crust. *The ISME journal*, 1-14.

Romero-Olivares, A. L., Baptista-Rosas, R. C., Escalante, A. E., Bullock, S. H. & Riquelme, M. (2013) Distribution patterns of Dikarya in arid and semiarid soils of Baja California, Mexico. *Fungal Ecology*, 6 (1), 92-101.

Ronaghi, M. (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome research*, 11(1), 3-11.

Rouxel, T., & de Wit, P. J. (2012). Dothideomycete effectors facilitating biotrophic and necrotrophic lifestyles. In: Martin, F., & Kamoun, S. (ed.). *Effectors in Plant-Microbe Interactions*. Wiley. Recuperado de: <http://books.google.com.mx/books?id=0PDy6W3CSCwC&printsec=frontcover&dq=Effectors+in+Plant-Microbe+Interactions&hl=es&sa=X&ei=Qk6UsvnB4nkyAH5g4CACw&ved=0CC8Q6AEwAA#v=onepage&q=Effectors%20in%20Plant-Microbe%20Interactions&f=false>

Rzedowski, J. (1981). *The vegetation of Mexico*. Limusa.

Schoch, C. L., Shoemaker, R. A., Seifert, K. A., Hambleton, S., Spatafora, J. W., & Crous, P. W. (2006). A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. *Mycologia*, 98(6), 1041-1052.

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, A., Chen, W. & Consortium, Fungal Barcoding. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109 (16), 6241-6246.

Scott, R. L., Serrano-Ortiz, P., Domingo, F., Hamerlynck, E. P., Kowalski, A. S. (2012) Commonalities of carbon dioxide exchange in semiarid regions with monsoon and Mediterranean climates, *Journal of Arid Environments*, 84, 71-79.

Shivas, R. G. & Cai, L. (2012) Cryptic fungal species unmasked. *Under the microscope*. 8-9.

Soslau, G. (2004) DNA recombinante y biotecnología. En: Devlin, T. M. (Eds.) Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas. (pp. 284-285).

Souza, V., Escalante, A. E., Noguez, A., Espinosa-Asuar, L., Cerritos, R. & Eguiarte, L. (2004) La Ecología Microbiana: Una nueva ciencia para un nuevo siglo. En: Rosas, I., Cravioto, A. & Ezcurra, E. (Eds.) Microbiología ambiental. Instituto Nacional de Ecología.

Segal-Kischinevzky, C. A. & Ortega-Lule, G. J. (2005) Manual de practicas de biología molecular de la célula 1. Publidisa.

Taylor, D. L., Hollingsworth, T. N., McFarland, J. W., Lennon, N. J., Nusbaum, C. & Rues, R. W. (En prensa) A first comprehensive census of fungi in soil reveals both hyperdiversity and fine- scale niche partitioning. *Ecology*. doi.org/10.1890/12-1693.1. Recuperado de: <http://www.esajournals.org/doi/abs/10.1890/12-1693.1>

Tedersoo, L., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Jairus, T., Sadam, A., Saar, I., Bahram, M., Bechem, E., Chuyong, G. & Kõljalg, U. (2010) 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. *New Phytologist*, 188, 291-301.

Thies, J. E. (2007) Molecular methods for studying soil ecology. In: Paul, E. (ed.) *Soil microbiology and biochemistry*. (pp. 81-115). Burlington, Elsevier.

Thomas, T., Gilbert, J., & Meyer, F. (2012). Metagenomics-a guide from sampling to data analysis. *Microbial informatics and experimentation*, 2(1), 1-12.

Thorn, R. G. & Lynch, M. D. J. (2007) Fungi and Eukaryotic Algae. In: Eldor, A. P. (ed.) *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. (pp. 145-162). Elsevier.

Torsvik, V. & Øvreås, L. (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5 (3), 240–245.

Van Elsas, J. D., Duarte, G. F., Keijzer-Wolters, A. & Smit, E. (2000) Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of microbiological methods*, 43 (2), 133-151.

Van Reeuwijk, L.P. (1993) *Procedures for Soil Analysis*. International Soil Reference and Information Centre (ISRIC). (pp. 1-5) Wageningen. Netherlands.

Voříšková, J., Brabcová, V., Cajthaml, T., & Baldrian, P. (2013). Seasonal dynamics of fungal communities in a temperate oak forest soil. *New Phytologist*.

Voroney, R. P. (2007) The soil habitat. In: Paul, E. A. (ed.) *Soil microbiology and biochemistry*. (pp. 25-49). Burlington, Elsevier.

Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology*, 73(16), 5261-5267.

Wang, Z., Nilsson, R. H., Lopez-Giraldez, F., Zhuang, W., Dai, Y., Johnston, P. R. & Townsend, J. P. (2011) Tasting soil fungal diversity with earth tongues: phylogenetic test of SATé alignments for environmental ITS data. *PloS one*, 6 (4), 1-12.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, Gelfand, M. A., D. H., Sninsky, J. J. & White, J. T., *PCR protocols: a guide to methods and applications*, (pp. 315-322). California, Academic Press.

White, J. R., Maddox, C., White, O., Angiuoli, S. V., & Fricke, W. F. (2013). CloVR-ITS: Automated internal transcribed spacer amplicon sequence analysis pipeline for the characterization of fungal microbiota. *Microbiome*, 1(1), 1-11.

Whitford, W. G. (1996) The importance of the biodiversity of soil biota in arid ecosystems. *Biodiversity & Conservation*, 5, 185-195.

Xu, J. (2006). Invited review: microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. *Molecular Ecology*, 15(7), 1713-1731.

Young, I. M. (2008) Microbial ecology and clay minerals. In: Chesworth, W. (ed.), *Encyclopedia of Soil Science* (pp. 450). Dordrecht, Springer.

Anexos

Anexo 1. Revisión de archivo de mapeo

El script utiliza los siguientes archivos:

- Mapping_File.txt

El script se introdujo de la siguiente forma:

```
check_id_map.py -m Mapping_File.txt -o Analisis/check_id_map_output
```

-m → Archivo de mapeo tipo .txt

-o → Dirección del folder en que se situó el archivo de salida, o archivo producto del script que se utilizó.

Los archivos resultantes de este Script fueron los siguientes:

- a) Mapping_File.html y Mapping_File.log. Archivos de informe sobre los cambios generados en el archivo Mapping File.
- b) Mapping_File_c.txt. Archivo corregido, el cual se usará en análisis posteriores.

Anexo 2. Revisión de archivo de secuencias.

Este script utiliza los siguientes archivos:

- Vargas_2456F.fna (secuencias completas), ITS1.fna (secuencias de la región ITS1) o ITS2.fna (secuencias de la región ITS2).
- Vargas_2456.qual
- Mapping_File_c.txt → archivo corregido proveniente del script: check_id_map.py

El script se introdujo de la siguiente manera (ejemplo de archivo con secuencias completas):

```
split_libraries.py -m Mapping_File_c.txt -f Vargas_2456F.fna -q
Vargas_2456F.qual -b 8 -H 8 -max-ambig 0 -l 510 -L 550 -o
Analisis/Split_Library_Output/
```

-m → Archivo de mapeo tipo .txt

-f → Archivo de secuencias tipo .fasta o .fna

-q → Archivo de calidad tipo .qual

-b → Especificación del tipo de secuencia de identificación que se está utilizando: hamming_8, golay_12, variable_length.

-H → Especificación de la máxima longitud de homopolímeros en las secuencias.

En este caso, se utilizó 8 (White et al., 2013).

--max-ambig → Número de bases ambiguas que se permitieron en las secuencias.

En este caso se utilizó 0 (J. R. White et al., 2013).

-l y -L → Mínimo y máximo de longitud de secuencias:

a) Secuencias completas: 510 pb – 550 pb

b) Secuencias ITS1: 160 pb (Orgiazzi et al., 2012) – 250 pb (Buee et al., 2009).

c) Secuencias ITS2: 110 pb (Orgiazzi et al., 2012) – 170 pb (Nilsson et al., 2010).

-o → Dirección del folder en que se situó el archivo de salida, o archivo producto del script que se utilizó.

Los archivos resultantes de este script son los siguientes:

- a) Folder nombrado Split_Library_Output, el cual contiene los siguientes archivos:
- seqs.fna (secuencias completas), seqs_ITS1.fna (secuencias región ITS1) o seqs_ITS2.fna (secuencias región ITS2). Estos archivos se utilizaron para su análisis en siguientes scripts.
 - split_library_log.txt. Detalles del análisis realizado a las secuencias.

Anexo 3. Agrupamiento de secuencias en OTUs.

Este script utilizó los siguientes archivos de entrada:

- seqs.fna (secuencias completas), seqs_ITS1.fna (secuencias región ITS1) o seqs_ITS2.fna (secuencias región ITS2) → Archivos resultantes del script split_libraries.py

El comando se introdujo de la siguiente manera:

```
pick_otus.py -i Analisis/Split_Library_Output/seqs.fna -m uclust -s 0.97 -o Analisis/uclust_VDP
```

-i → Archivo de secuencias tipo .fasta o .fna (seqs.fna, seqs_ITS1.fna, seqs_ITS2.fna).

-m → método de agrupamiento (uclust)

-s → porcentaje de similitud entre las secuencias (0.97 = 97%)

-o → indicación de folder donde se situó el archivo de salida.

Los archivos resultantes de este script son:

a) Folder nombrado uclust, el cual contiene los siguientes archivos:

- seqs_otus.txt (secuencias completas), seqs_ITS1_otus.txt (secuencias región ITS1) o seqs_ITS2_otus.txt (secuencias región ITS2).

Anexo 4. Selección de secuencias representativas.

Este script utiliza los siguientes archivos:

- seqs_otus.txt, seqs_ITS1_otus.txt o seqs_ITS2_otus.txt → archivos que contienen los OTUs provenientes del script pick_otus.py.
- seqs.fna, seqs_ITS1.fna o seqs_ITS2.fna → archivos de secuencias provenientes del script split_libraries.py.

El comando se introduce de la siguiente manera:

```
pick_rep_set.py -i Analisis/ucust_VDP/seqs_otus.txt -f
Analisis/Split_Library_Output/seqs.fna -m first -o Analisis/rep_set_VDP
```

- i → Archivo de secuencias .txt (seqs_otus.txt, seqs_ITS1_otus.txt o seqs_ITS2_otus.txt)
- f → archivo fasta de las secuencias, este se requiere cuando se realiza un agrupamiento donde no se usan secuencias de referencia.
- m → método de selección de secuencias representativa (first)
- o → indicación de folder donde se situará el archivo de salida.

Los archivos resultantes de este script son:

- a) rep_set.fna, rep_set_ITS1.fna y rep_set_ITS2.fna. Archivos .fasta que contienen las secuencias representativas de cada OTU.

Anexo 5. Asignación de taxonómica.

Este script utiliza los siguientes archivos:

- rep_set_VDP.fna, rep_set_ITS1.fna y rep_set_ITS2.fna. Archivos fasta producto del script pick_rep_set.py.
- Base de referencia UNITE (<http://unite.ut.ee/index.php>):
 Archivo de secuencias representativas: 97_otus.fasta
 Archivo de taxonomía: 97_otu_taxonomy.txt

El comando se introduce de la siguiente manera:

```
assign_taxonomy.py -i Analisis/rep_set_VDP.fna -r
its_12_11/rep_set/97_otus.fasta -t its_12_11/taxonomy/97_otus_taxonomy.txt -o
Analisis/assign_taxonomy_rdp/ - -rdp_max_memory 8000
```

-i → Archivo de secuencias tipo .fasta o .fna (rep_set_VDP.fna, rep_set_ITS1.fna y rep_set_ITS2.fna).

-r → archivo de secuencias de referencia. Base de datos UNITE.

-t → archivo de taxonomía. Base de datos UNITE.

-rdp_max_memory → asignación de memoria en MB.

-o → indicación de folder donde se situará el archivo de salida.

Los archivos resultantes de este script son:

a) Folder assign_taxonomy_rdp. Contiene el siguiente archivo:

- rep_set_VDP_tax_assignments.txt, rep_set_ITS1_tax_assignments.txt o rep_set_ITS2_tax_assignments.txt. Archivos que contienen la taxonomía de las secuencias representativas.

Anexo 6. Construcción de tabla de OTUs

Este script utilizó los siguientes archivos:

- seqs_otus.txt. Archivo proveniente del script pick_otus.py
- rep_set_VDP_tax_assignments.txt. Archivo proveniente de script assign_taxonomy.py

El comando se introduce de la siguiente manera:

```
make_otu_table.py -i Analisis/uclust_VDP/seqs_otus.txt -t
Analisis/assign_taxonomy_rdp/rep_set_VDP_tax_assignments.txt. -o
Analisis/otu_table.biom
```

-i → Archivo producto del script split_libraries.py

-t → Archivo de asignación de taxonomía producto del script assign_taxonomy.py

-o → indicación de folder donde se situará el archivo de salida.

Los archivos resultantes del script son:

- a) otu_table.biom. Tabla de frecuencias de OTUs por muestra y su respectiva taxonomía.
- ✓ Para convertir el archive .biom en un archive .txt (texto) se utiliza el siguiente comando:

```
convert_biom.py -i Analisis/otu_table.biom - -biom_to_classic_table --header_key
taxonomy -o Analisis/otu_table.txt
```

-i → Archivo de entrada.

- -biom_to_classic_table → indicación de la conversión del formato .biom a formato .txt

-o → indicación de folder donde se situará el archivo de salida.

El archivo resultante:

- a) otu_table.txt. Tabla de frecuencias de OTUs por muestra y su respectiva taxonomía.

Anexo 7. Separación de OTUs por tratamiento (QIIME)

Archivos que se necesitan:

- otu_table.biom. Archivo resultante del script make_otu_table.py.
- Mapping_File.txt

El comando se introduce de la siguiente manera:

```
summarize_otu_by_cat.py -c Analisis/otu_table.biom -i Mapping_File_c.txt -m Treatment -o Analisis/otu_table_by_treatment.biom
```

-c y -i → Archivos de entrada.

-m → indicación para la separación de muestras de acuerdo al tratamiento que pertenecen.

-o → indicación de folder donde se situará el archivo de salida.

Archivos de salida:

- a) otu_table_by_treatment.biom. Tabla de OTUs dividida por tratamiento.

Anexo 8. Análisis comparativo de composición

Grupos taxonómicos por muestra (QIIME).

Archivos que se necesitan:

- otu_table_by_treatment.biom. Archivo producto del script summarize_otu_table_by_cat.py

El comando se introduce de la siguiente manera:

```
summarize_taxa.py -i Analisis/otu_table_by_treatment.biom -L 3 -o Analisis/tax_mapping
```

-i → Archivo de entrada

-L → opciones de nivel taxonómico: 2 = Domain 3 = Phylum, 4 = Class, 5 = Order, 6 = Family, and 7 = Genus.

-o → indicación de folder donde se situará el archivo de salida.

Archivo de salida:

- a) otu_table_by_treatment_L3.txt

Gráfica de análisis comparativo de composición (QIIME). Construcción de gráficas de barra mostrando la abundancia de la taxonomía a diferentes niveles por tratamiento o muestra.

(Liga: http://qiime.org/scripts/plot_taxa_summary.html).

Archivos necesarios:

- otu_table_by_treatment_L3.txt. Archivo producto del script summarize_taxa.py

El comando se introduce de la siguiente forma:

```
plot_taxa_summary.py -i Analisis/otu_table_by_treatment_L3.txt -x 4 -y 100  
-l phylum -o Analisis/charts
```

-i → Archivo de entrada.

-x → Ancho del eje X

-y → Altura del eje Y

-o → Indicación de folder donde se situará el archivo de salida.

Archivos de salida:

a) taxonomy_summary_chart.html. Versión html del gráfico de barras

b) taxonomy_summary_chart.pdf. Versión pdf del gráfico de barras

c) taxonomy_summary_chart.jpg. Versión jpg del gráfico de barras

Anexo 9. Análisis de varianza de dos vías aplicado a variables ambientales. (MV) Madriguera-Verano. (SV) Superficie-Verano. (MI) Madriguera-Invierno. (SI) Superficie-Invierno.

		MV	SV	MI	SI
Humedad sensor	MV		0.977	0.216	0.177
	SV	0.977		0.154	0.124
	MI	0.216	0.154		0.999
	SI	0.177	0.124	0.999	
Temperatura	MV		0.125	0.001	0.001
	SV	0.125		0.001	0.001
	MI	0.001	0.001		0.995
	SI	0.001	0.001	0.995	
pH	MV		0.96	0.993	0.999
	SV	0.96		0.874	0.975
	MI	0.993	0.874		0.986
	SI	0.999	0.975	0.986	
Humedad	MV		0.999	0.001	0.001
	SV	0.999		0.001	0.001
	MI	0.001	0.001		0.777
	SI	0.001	0.001	0.777	
Materia orgánica	MV		0.995	0.994	0.09
	SV	0.995		0.999	0.145
	MI	0.994	0.999		0.149
	SI	0.09	0.145	0.149	
Conductividad	MV		0.794	0.484	0.804
	SV	0.794		0.103	0.28
	MI	0.484	0.103		0.949
	SI	0.804	0.28	0.949	

Anexo 10. Número de secuencias por muestras y totales de acuerdo a las regiones analizadas (Región completa, Región ITS1 y Región ITS2).

Muestra	Región completa	Región ITS1	Región ITS2	Muestra	Región completa	Región ITS1	Región ITS2
1MV	41757	55573	25875	1MI	3518	4921	2978
2MV	6526	11102	4282	2MI	1864	3766	660
3MV	2761	3506	921	3MI	2544	1159	1516
4MV	7144	9362	3963	4MI	17225	24347	12859
5MV	16978	21796	9085	5MI	2737	4009	1732
6MV	8519	12449	3297	6MI	7470	10997	5803
7MV	3227	7979	1906	7MI	3589	6416	2765
8MV	4898	6951	1549	8MI	4836	5778	3303
9MV	1994	3135	3057	9MI	1614	2248	1330
10MV	2944	3778	84	10MI	5330	8558	3750
1SV	1036	1992	1003	1SI	1951	6509	946
2SV	1053	2990	1288	2SI	9768	7344	2378
3SV	4842	7032	2593	3SI	7326	10009	4784
4SV	3852	4905	1765	4SI	10208	13395	3001
5SV	3151	4317	1718	5SI	3009	5968	3934
6SV	4510	6254	3194	6SI	3443	7195	3433
7SV	3220	4202	2339	7SI	7166	12676	4999
8SV	2590	3503	1704	8SI	2133	3025	1488
9SV	4339	7105	3306	9SI	3090	4076	2093
10SV	2923	5042	2265	10SI	8776	15224	7542