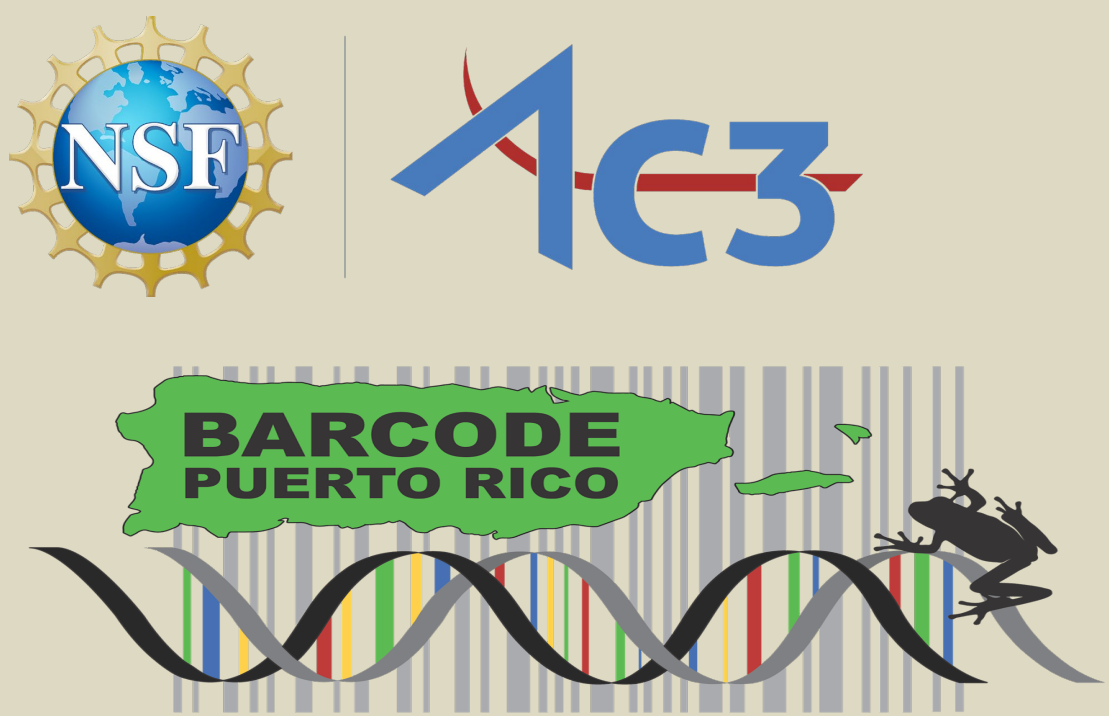




EFFECTO DE LA HUMEDAD SOBRE LA DIVERSIDAD Y COMPOSICIÓN DE COMUNIDADES FÚNGICAS EN BOSQUES CONTRASTANTES DE PUERTO RICO MEDIANTE CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN

Anaiha L. Blanco, Mónica Medina, Nathan Lopez & Prof. Venus T. Vargas Lamboy
Centro Residencial de Oportunidades Educativas de Mayagüez (CROEM)



RESUMEN

Este proyecto tiene como objetivo investigar cómo la humedad influye en el crecimiento y la diversidad de los hongos en ecosistemas contrastantes de Puerto Rico. La motivación principal surge del interés en comprender de qué manera las condiciones ambientales afectan la distribución de las especies fúngicas. Para ello, se recolectarán muestras en un bosque seco y en un bosque húmedo, las cuales serán sometidas a un método estándar de aislamiento de ADN y posterior análisis de secuencias genéticas mediante la técnica de DNA barcoding para su identificación. Se espera encontrar una mayor diversidad y abundancia de hongos en el bosque húmedo en comparación con el bosque seco, debido a la mayor disponibilidad de agua y materia orgánica. Los resultados de esta investigación contribuirán al conocimiento de la biodiversidad fúngica en Puerto Rico y al entendimiento del efecto de la humedad sobre estos organismos. En nuestra hipótesis se plantea que el Bosque Estatal De Maricao presentará una mayor diversidad y abundancia de hongos en comparación con el Bosque Estatal Seco De Guánica debido a que las mayores condiciones de precipitación y humedad. También la disponibilidad de materia orgánica en los bosques húmedos favorecen el crecimiento, desarrollo y distribución de las comunidades fúngicas.

INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos eucariotas descomponedores esenciales para el reciclaje de la materia orgánica y la fertilidad del suelo, cuyo crecimiento y distribución dependen de factores ambientales como la humedad, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes. En Puerto Rico, los ecosistemas húmedos tienden a presentar mayor diversidad fúngica que los secos; sin embargo, esta biodiversidad aún está poco documentada en estudios comparativos. Por ello, esta investigación analiza cómo la humedad influye en la diversidad y abundancia de hongos al comparar un bosque seco y uno húmedo mediante la técnica de DNA barcoding. En este contexto, la pregunta de investigación es:

¿Cómo influye la humedad en la diversidad y abundancia de hongos entre un bosque seco y uno húmedo en Puerto Rico?



MATERIALES & MÉTODOS

La metodología utilizada fue la siguiente. Primero, se toma una pequeña porción de tejido (aprox. 10 mg) usando instrumentos limpios para evitar contaminación entre muestras. El tejido se coloca en un tubo Eppendorf rotulado y se le añade una solución de lisis para romper las células. Luego, el tejido se tritura dentro del tubo y se incuba a 65 °C durante 10 minutos para facilitar la liberación del ADN. Después, la muestra se centrifuga para separar los residuos sólidos del líquido. Se transfiere el sobrenadante (líquido claro que contiene el ADN) a un tubo limpio, evitando mover los desechos del fondo. A este líquido se le agrega resina de sílica, la cual se une al ADN. Tras mezclar e incubar, se centrifuga nuevamente para que la resina con el ADN forma un sedimento. Posteriormente, se realizan dos lavados con un buffer frío para limpiar impurezas, centrifugando y retirando el líquido cada vez sin perturbar el sedimento de sílica. Luego, se añade agua destilada (o buffer Tris-EDTA) y se incuba para liberar el ADN de la sílica. Finalmente, se centrifuga otra vez y se transfiere el líquido claro que ahora contiene el ADN purificado a un tubo nuevo. La muestra debe mantenerse en hielo o a -20 °C para evitar que enzimas degradan el ADN antes de su uso en reacciones de PCR.

RESULTADOS

El análisis de DNA barcoding mostró que las muestras de los Bosques de Guánica y Maricao presentan similitudes genéticas considerables. Aunque se observaron varios grupos genéticos dentro de las muestras analizadas, estos grupos no correspondieron completamente a la separación geográfica entre el bosque seco de Guánica y el bosque húmedo de Maricao. Algunas muestras de ambos bosques se agruparon juntas en el árbol filogenético, como ATC-006 de Guánica y ATC-020-F de Maricao, lo que indica una estrecha relación genética. Por otro lado, la muestra ATC-009 de Guánica mostró la mayor divergencia genética respecto a las demás. Estos resultados sugieren que las diferencias ambientales entre ambos bosques no se reflejan claramente en el marcador de DNA barcoding utilizado y que los hongos analizados comparten linajes genéticos relacionados a pesar de provenir de ecosistemas distintos.



TABLAS & FIGURAS

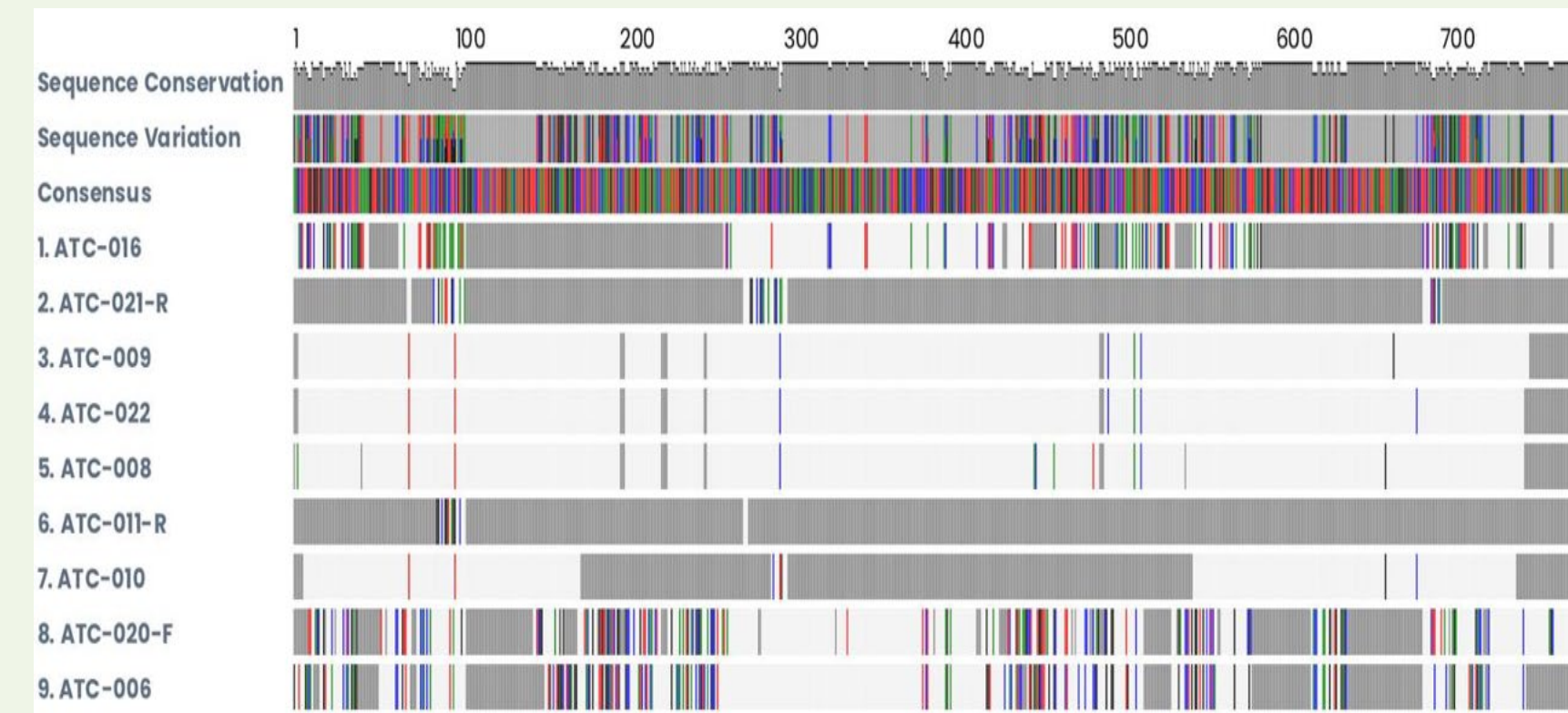
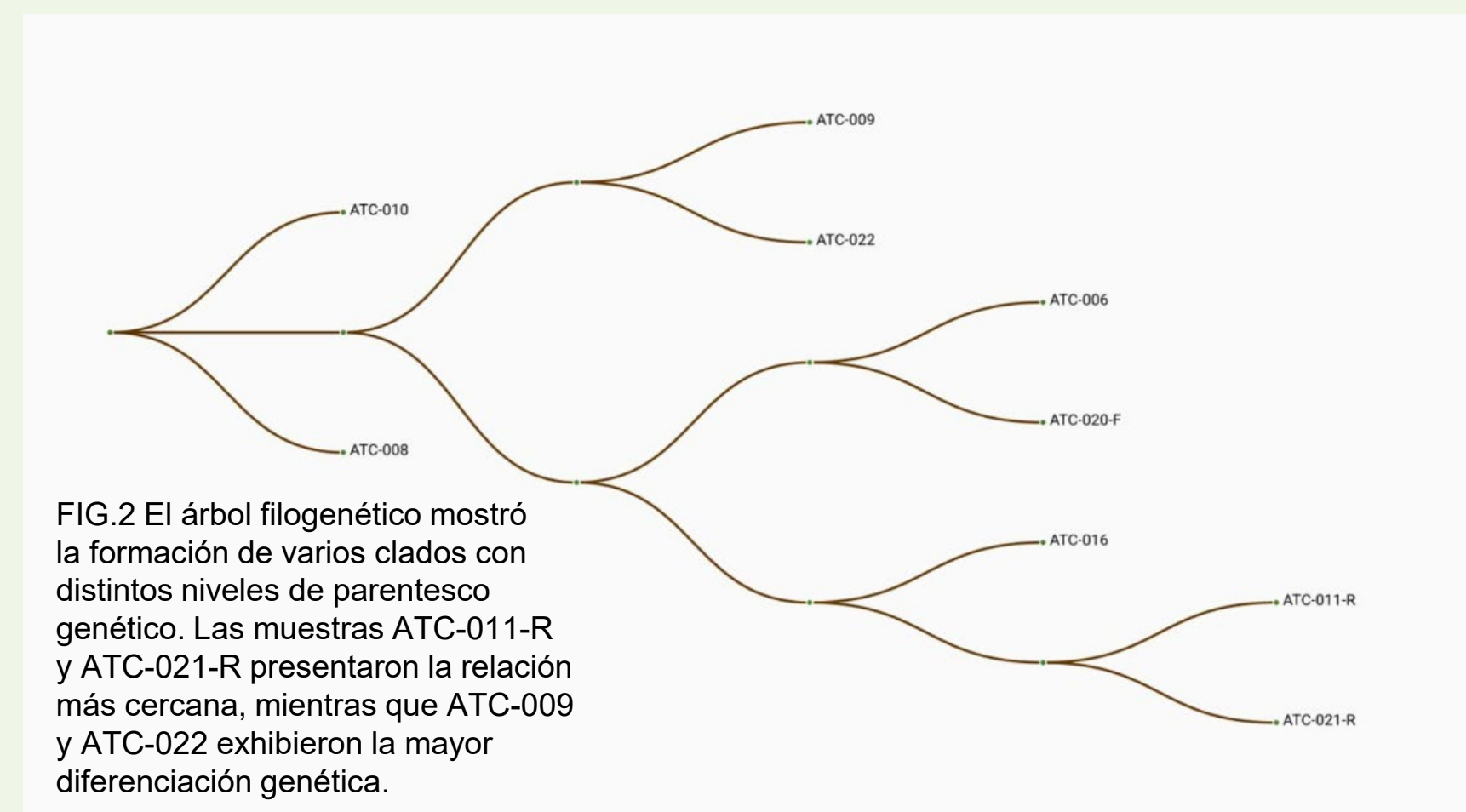
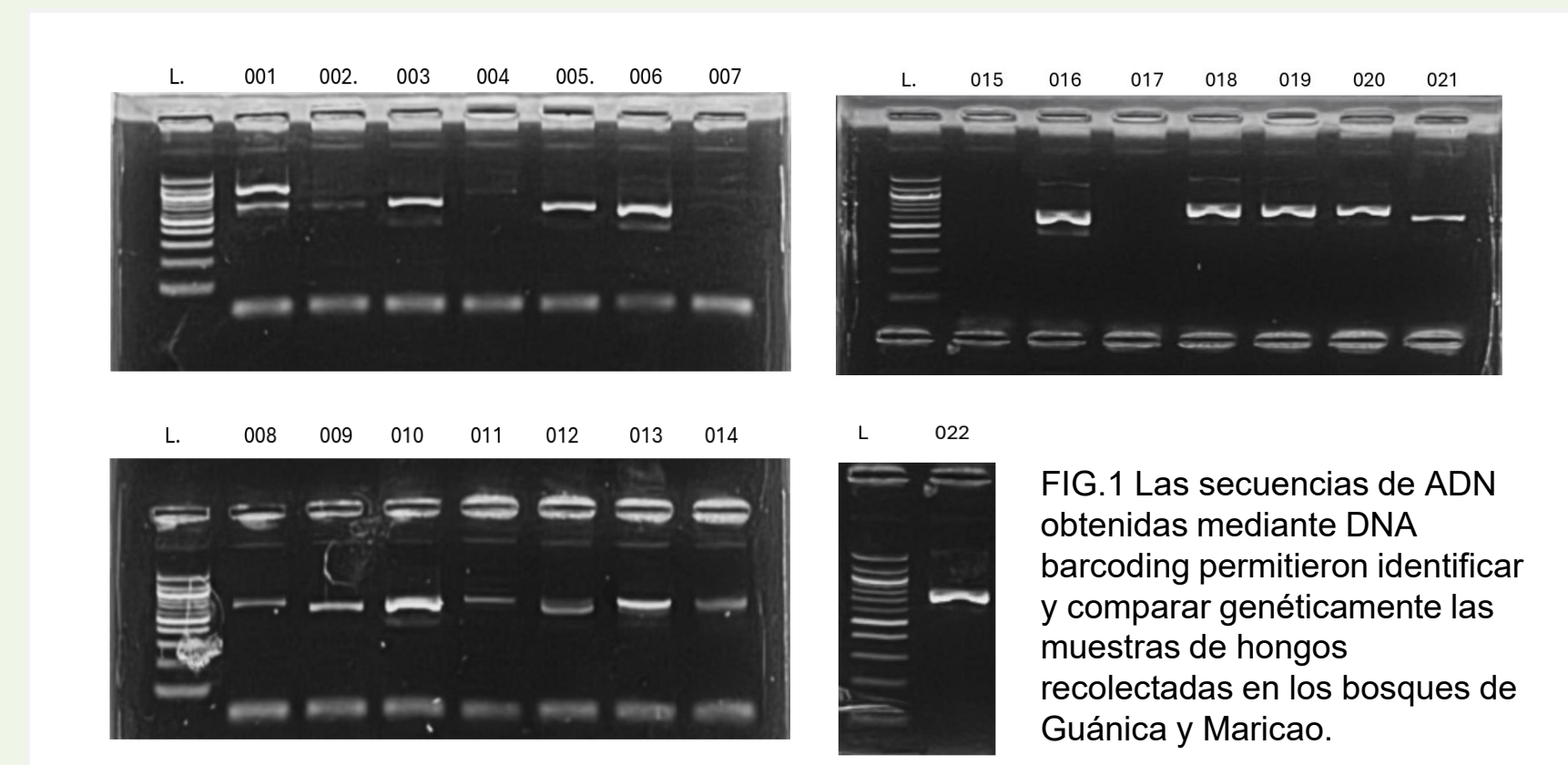


TABLA.1 El alineamiento de las secuencias de ADN evidenció una alta conservación genética entre las muestras analizadas, con regiones específicas de variación que permitieron distinguir diferentes grupos de hongos. Las diferencias observadas sugieren distintos grados de divergencia evolutiva entre las muestras.



DISCUSIÓN

Lamentablemente, nuestros resultados fueron inconclusos, ya que pudimos obtener veintidós muestras; sin embargo, solamente seis de ellas fueron válidas. Se teoriza que la pérdida del resto se debió a la etapa de amplificación y secuenciación (blasting /amplifying sequencing) dentro del procedimiento. Durante el proceso de electroforesis, las muestras que se podían distinguir con claridad fueron las siguientes: ATC-003, ATC-005, ATC-011, ATC-012, ATC-013, ATC-019, ATC-020 y ATC-021. El resto no podía visualizarse o no presentaba la claridad suficiente para continuar con el proceso. Las muestras con las que sí se pudo avanzar fueron las siguientes: ATC-006, ATC-008, ATC-009, ATC-010, ATC-016 y ATC-022. No obstante, ninguna de estas muestras era perfecta, ya que las secuencias obtenidas mediante el ADN barcoding presentaban algunos defectos; aun así, se determinó que su calidad era suficiente para continuar utilizándolas en el experimento. En cuanto a la biodiversidad observada y confirmada, se obtuvieron los siguientes resultados: Bosque Seco de Guánica, la muestra ATC-006 fue identificada como el hongo *Trametes menziesii*, el cual solamente fue encontrado en ese bosque. Por otro lado, Lentinula raphanica fue identificado en las muestras ATC-008, ATC-009 y ATC-010, las cuales fueron recolectadas en el Bosque Estatal de Maricao. Se concluye que la repetición de la etapa de amplificación y secuenciación podría contribuir a la obtención de resultados más claros, precisos y concluyentes.



REFERENCIAS

- Blackwell, M. (2011). The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98(3), 426–438. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000298>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & de Waard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Peay, K. G., Kennedy, P. G., & Talbot, J. M. (2016). Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. *Nature Reviews Microbiology*, 14(7), 434–447. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.59>

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestra Prof. Venus T. Vargas Lamboy, la Prof. Yadira Ortiz, a AC3, a la doctora Cristina Fernandez-Marco y al Cold Spring Harbor Laboratory DNA Barcoding Center por su apoyo y colaboración en la realización de esta investigación.