



Facultad de Ciencias

Departamento de Biología

Universidade Da Coruña

***DISTRIBUCIÓN DE MICROBIOS ASOCIADOS A PLANTAS EN PANAMÁ CENTRAL:
HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES Y OOMICETOS***

***DISTRIBUCIÓN DOS MICROBIOS ASOCIADOS A VEGETALES NO PANAMÁ
CENTRAL: FUNGOS MICORRIZALES AARBUSCULARES E OOMICETOS***

***DISTRIBUTION OF PLANT-ASSOCIATED MICROBES IN CENTRAL PANAMA:
ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI AND OOMYCETES***

Trabajo Fin de Máster para optar al título de Máster en Biología Celular, Molecular y
Genética

Manuel Moisés Murillo Alcedo

DNI:8-871-1128/PA0218843

Directores:

Dra. Kristin Saltonstall

Co-Director

Dra. María Eugenia de Castro de Antonio

Panamá

06 de septiembre de 2022



Agradecimientos

Debo agradecer a la Doctora Kristin Saltonstall, por aceptar ser mi guía y director durante todo el tiempo de este Trabajo Final. A la magister Marta Vargas y Eyda Gómez por sus consejos, además de brindarme la oportunidad de conocer su Laboratorio y todo el apoyo brindado. A la Doctora María Esperanza Cerdán por su guía desde que inicie este proyecto estudiantil universitaria como el apoyo en todas las coordinaciones de la Práctica Profesional hasta el Trabajo Fin de Máster y a la Doctora María Eugenia de Castro de Antonio por sus buenos consejos y sus guías durante este trabajo final. Por último, a todos los amigos que pude hacer en el Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales de Panamá.



Dedicatoria

A mi esposa Selene que agradezco con todo mi corazón por apoyarme siempre y no dejar que me rindiera. Mi querida Madre Damaris y mi abuela Aura por nunca dejarme atrás, Dr Florido y Sra Fide. Mi Padre Eleuterio, y mi abuela Andrea, mis hermanos y a toda mi familia y amigos.

Esta memoria también se la dedico a mi querido abuelo Ananías Alcedo (Q.E.P.D.) que siempre quiso lo mejor para mí y un día me dijo que la educación es lo más importante en la vida y dio lo que pudo para apoyarme con esta Maestría y sé que esta con regocijo desde el cielo por haber culminado.



Panamá, 06 de septiembre de 2022

A quien concierne:
Tribunal Evaluador
Universidade Da Coruña

Se hace constar que:

La Doctora Kristin Saltonstall Investigadora del Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales de Panamá (STRI), y la Dra. Maria Eugenia de Castro de Antonio, autorizan la presentación del Trabajo Fin de Máster (TFM) "**DISTRIBUCIÓN DE MICROBIOS ASOCIADOS A PLANTAS EN PANAMÁ CENTRAL: HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES Y OOMICETOS**" por el estudiante Manuel Moisés Murillo Alcedo para su defensa ante el tribunal evaluador.

Atentamente,

Dra. Kristin Saltonstall

Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales

Firmado por DE CASTRO
DE ANTONIO, MARIA
EUGENIA (FIRMA) el
día 06/09/2022 con un
certificado emitido

Dra. Maria Eugenia de Castro de Antonio

Docente Investigador de la Universidade

Da Coruña

Manuel Moisés Murillo Alcedo

Alumno Máster Biología Celular Molecular y Genética-UDC

Índice

| | |
|---|----|
| Abreviaturas | 6 |
| Resumen..... | 7 |
| Introducción | 8 |
| El Objetivo General del estudio es: | 10 |
| Los Objetivos específicos son:..... | 11 |
| Materiales y Métodos | 12 |
| Muestras..... | 12 |
| PCR | 13 |
| Preparación de barcoding y normalización..... | 15 |
| Resultados | 17 |
| PCR electroforesis | 17 |
| Visión general de la Secuenciación | 17 |
| Abundancia y Diversidad..... | 18 |
| AMF | 18 |
| Abundancia Relativa de hongos AMF..... | 18 |
| Diversidad alfa de AMF | 19 |
| Diversidad Beta de AMF | 21 |
| Oomicetos | 21 |
| Abundancia Relativa de Oomicetos | 21 |
| Diversidad alfa de oomicetos | 23 |
| Diversidad beta de oomicetos..... | 24 |
| Discusión | 26 |
| Conclusión | 29 |
| Bibliografía..... | 30 |

Abreviaturas

DNA ácido desoxirribonucleico

RNA ácido ribonucleico

PCR Reacción de la cadena de polimerasa

AMF Hongo micorrízico arbuscular

LOCUS región de un gen en específico a estudiar,

ASV secuencia variable de amplicon

NGS Secuenciación de Próxima Generación

Resumen

Las comunidades de los microbios en el suelo son muy diversas y desempeñan un papel esencial en la distribución de la diversidad vegetal. En el presente estudio, se ha llevado a cabo la secuenciación de próxima generación en paralelo (NGS) mediante metabarcoding, tanto de los hongos micorrícicos arbusculares (AMF), que tienen una asociación mutualista con plantas, y de los oomicetos, que son patógenos de las plantas, determinando la abundancia relativa y la diversidad de éstos en todos los suelos de diferentes sitios de Panamá Centro. Por otro lado, estudios previos indican que existen variables ambientales como pH y zona de precipitación que pueden influenciar directamente sobre el comportamiento de estos microorganismos y, a su vez, en la distribución de los bosques tropicales. Se observó que los AMF presentan mayor abundancia y diversidad en aquellas regiones de mayor precipitación (Zona del Caribe de Panamá), mientras que la diversidad de los oomicetos no se ve afectada por las precipitaciones, ya que tan sólo el pH genera cambios significativos en su diversidad.

Summary

Microbial communities in the soil are highly diverse and play an essential role in the distribution of plant diversity. In this project, perform parallel next-generation sequencing (NGS) by metabarcoding of organisms associated with plants, both arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) that have a mutualistic association with plants and oomycetes that are plant pathogens, determining the relative abundance and the diversity of these in all the soils of different sites in Central Panama. On the other hand, previous studies indicate that there are environmental variables such as pH and precipitation zone that directly influence the behavior of these microorganisms and, in turn, the distribution of tropical forests. It was observed that the AMF present greater abundance and diversity in those regions with higher rainfall (Caribbean Zone of Panama), while the diversity of the oomycetes is not affected by rainfall, since only the pH generates significant changes in its diversity.

Introducción

Los suelos albergan grandes cantidades de diversidad microbiana. Estos microorganismos juegan un papel importante en el ecosistema, como el ciclo de nutrientes, la fijación de carbono, la descomposición y pueden asociarse estrechamente con las plantas, a veces teniendo asociaciones positivas (Mangan *et al.*, 2004) y otras veces negativas (Spear y Broders, 2020). Las especies vegetales dentro de un ecosistema se ven afectadas por la abundancia y la diversidad de hongos patógenos, endófitos, saprótrofos y micorrícicos, y también se ha observado que la diversidad de estas especies vegetales igualmente influye en el comportamiento, abundancia y distribución de algunos microorganismos (Morejón, 2022; Saitta *et al.*, 2018).

Dentro del Canal de Panamá, se han encontrado diferencias con relación a los gradientes de precipitación, ya que desde extremo Norte de la Costa Caribeña hacia el otro extremo Sur de la Costa del Pacífico se encuentran en un rango de 1600mm a 3100mm por año, por lo que es variable y no es estable por zonas (Rand y Rand, 1982; Pyke *et al.*, 2001). Una de las investigaciones más importantes en la distribución de los bosques de Panamá Central de Condit *et al.*, (2013) nos muestra que los patrones de lluvia y la química del suelo como por ejemplo, el pH o el contenido en fósforo, son muy importantes para la distribución de árboles en los bosques de Panamá. Por ello nos preguntamos si los microbios del suelo también siguen estos patrones.

Los Hongos Micorrícicos Arbusculares (AMF), son un tipo de endomicorriza (filo Glomeromicota) que se mantiene en el interior de la raíz de una planta y la mayoría de los árboles neotropicales dependen de ellos por su establecimiento y crecimiento (Mangan *et al.*, 2010). Esta relación simbiótica le da carbohidratos al hongo a cambio de mejorar la absorción de agua, fósforo inorgánico y otros nutrientes relativamente inmóviles para la planta, aumentando efectivamente el área de la superficie de la raíz, por lo cual aumentan también el volumen de suelo (Smith *et al.*, 2015; Shappe *et al.*, 2017). Las propiedades de los suelos también pueden ser determinadas por la composición de los hongos micorrícicos. Como indican algunas investigaciones previas,



un tipo de Micorriza arbuscular subfilo *Glomeromycotina* mantiene un 80% de asociaciones con especies de plantas en el mundo, por lo que es importante caracterizar estos microorganismos y se está a la espera de seguir clasificando muchos más (Wang y Qiu 2006; Brundrett, 2009; Shappe *et al.*, 2017). Para ver algunas diferencias significativas de los efectos del suelo como la composición química y la diversidad de árboles tropicales en Panamá Shappe *et al.*, (2017) también se realizaron estudios de identificación de microorganismos presentes.

Por otro lado, los oomicetos son microorganismos eucariotas similares a hongos. Estos microorganismos se mantienen en nichos ecológicos y así mismo la mayoría de ellos son patógenos en plantas y animales. Crecen muy rápido y los métodos de análisis deben ser más precisos para así, buscar nuevas alternativas para su adecuada detección (Robideau *et al.*, 2011). Se ha encontrado información de que estos microorganismos causan patogenicidad a las plantas a través del uso de proteínas involucradas en la ruptura de paredes celulares como las cutinasas (McGowan *et al.*, 2020; Costa y Lopes, 2022).

La información obtenida de la distribución de estos tipos de microorganismos en los bosques neotropicales contribuirá grandemente a nuestra comprensión de la dinámica forestal, ya que las plántulas de árboles dependen en gran medida del crecimiento con ayuda de los AMF y de la supresión causada por los oomicetos patógenos que son a menudo los más mortíferos en esta etapa de vida, haciendo que las interacciones entre estos microorganismos y se vean beneficiadas o no. Por lo que se trata de un filtro ecológico para determinar la composición de los bosques tropicales (Connell *et al.*, 2005).

El metabarcoding o la codificación de barras a partir de ADN ambiental y esta se emplea para conocer la biodiversidad a partir de una muestra ambiental obteniéndose metadatos para evaluar la función con el entorno ecológico (Taberlet *et al.*, 2012; Tedersoo *et al.*, 2022).

Las ventajas del uso de metabarcoding se destaca: (i) sensible, imparcial y amplia detección a comunidades de organismos objetivos, (ii) proporciona variantes por

muestras y alto grado de certeza; (iii) menor tiempo hasta la respuesta desde el muestreo; (IV) mayor cantidad de muestras procesadas por persona y a su vez (V) con relación a los procesos se pueden suspender y continuar por etapas o procesos (Riit *et al.*, 2016; Rossmann *et al.*, 2021).

En los últimos años se ha utilizado la secuenciación de Nueva Generación (NGS) a través de la tecnología de Illumina, utilizando el equipo MiSeq ya que proporciona una disminución de costes significativa y es más informativo para la identificación de hongos. En algunos casos el MiSeq puede proporcionar lecturas más largas y menos errores en comparación con otras técnicas (Salipante *et al.*, 2014; Razzauti *et al.*, 2015; Kryukov *et al.* 2020).

Para la correcta identificación taxonómica se deben llevar a cabo diferentes procesamientos de datos a través de programas bioinformáticos. Al trabajar con la plataforma de Illumina es necesario la depuración de los datos de secuenciación y una de las herramientas altamente utilizado es DADA2 (Callahan *et al.*, 2016) en lenguaje R. Los datos resultantes son variantes de secuencia de amplicón (ASV) ya que los ASV demuestran una sensibilidad como lo es diferencias de un solo nucleótido y así misma especificidad una mejorada sobre la unidad taxonómica operativa (OTU) además de que discriminan patrones ecológicos (Callahan *et al.*, 2016; Callahan *et al.*, 2017; Furneaux *et al.*, 2021). Por otro lado, las estimaciones para determinar la diversidad alfa y beta utilizan tanto ASV como OTU y los estudios con DADA2 con ASV se están aplicando a otras plataformas como Pacbio (Furneaux *et al.*, 2021).

Por todo ello, este trabajo se centrará en la búsqueda de AMF y oomicetes en suelo con el fin de comprender mejor su influencia en la distribución de los bosques tropicales en Panamá.

El Objetivo General del estudio es:

- Determinar abundancia y diversidad de hongos micorrícicos arbusculares y oomicetes en suelos de Panamá Centro mediante metabarcoding.

Los Objetivos específicos son:

- Determinar la abundancia relativa microbiana de hongos micorrícicos arbusculares y oomicetos en suelos de diferentes sitios de bosques de Panamá Centro mediante metabarcoding.
- Analizar la diversidad alfa microbiana de muestras (cantidad asv o secuencias diferentes).
- Analizar la diversidad beta microbiana
- Conocer como las variables gradiente de precipitación y pH del suelo influyen en la abundancia y la diversidad de estos microorganismos.

Materiales y Métodos

Muestras

Las muestras de este estudio fueron tomadas de 56 sitios o plots de bosques dentro de la región de Panamá Central desde la zona del Pacífico hasta la zona del Caribe (Figura No.1) y para ello se recolectaron de unas 5 a 12 muestras de cada sitio siendo en total para este estudio unas 609 muestras. Las muestras son parte de otro estudio y se encontraban previamente extraídas. En la extracción se tomaron 0.25g y se procesaron con el kit DNeasy PowerSoil (QIAGEN) y estos extractos, se conservaron en congelación en el Laboratorio de Genética Evolutiva y Ecología de NAOS del Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales de Panamá. Para estos plots se conocía sus características generales del suelo principalmente pH y Zona de Precipitación mediante otros estudios previos (Pyke *et al.*, 2001; Condit *et al* 2001; Condit *et al.*, 2013; Schappe *et al.*, 2017).

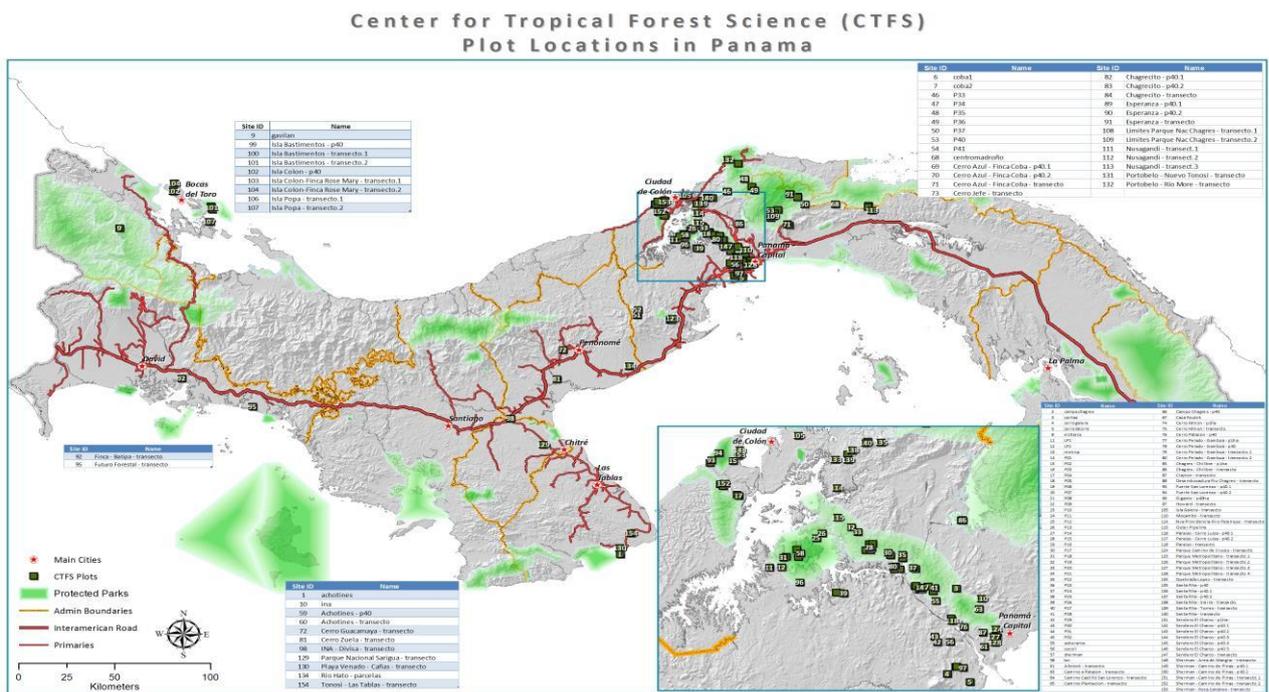


Figura No. 1: Mapa de ubicaciones plots de bosques en la República de Panamá. En el recuadro celeste se observa puntos de recolecta de Panamá Central y se observan todos los plots existentes recuperado de archivos Smithsonian GIS Data Portal (<https://stridata-si.opendata.arccgis.com/documents/ctfs-localization-plots-pdf/explore>)

PCR

A partir de los extractos de ADN, se realizaron dos tipos de amplificaciones basadas en cada una de las regiones específicas, para cada uno de los microorganismos, el cual se llamó PCR1. Para los AMF se utilizó un locus específico, la subunidad pequeña SSU de 18S DNA ribosomal (Figura No. 2), según Van Geel *et al.*, (2014) y se siguieron protocolos establecidos por el laboratorio. Los *primers* fueron AMV4.5NF (cebador directo 5' AAGCTCGTAGTTGAATTTTCG 3') y AMDGR (cebador inverso 5' CCCAACTATCCCTATTAATCAT 3'), que además contenían secuencias con adaptadores de Illumina en el extremo 5'. Asimismo se utilizó *phased primers* (Wu *et al.* 2015). Se preparó la PCR, que contenía: 3.7 µL de agua ultrapura grado molecular, 5 µL de *Platinum Hot Start PCR Master Mix 2X* (Invitrogen-ThermoFisher, Estados Unidos), 0.15 µL de cada primer a 10 mM, y 1 µL de extracto de ADN. Se realizó una preparación para seis placas y medio, de 96 pocillos de PCR, incluyendo controles positivos y negativos de reacción. Se utilizaron los siguientes parámetros: 94°C, por tres (3) minutos para la desnaturalización; seguido de treinta y tres (33) ciclos de 94°C, durante cuarenta y cinco (45) segundos, 56° C, durante 1 minuto y 72° C, durante minuto y medio (1:30) y una extensión final a 72° C por diez (10) minutos. Todas las muestras se corrieron en un termociclador MiniAmp Plus (ThermoFisher, Estados Unidos).

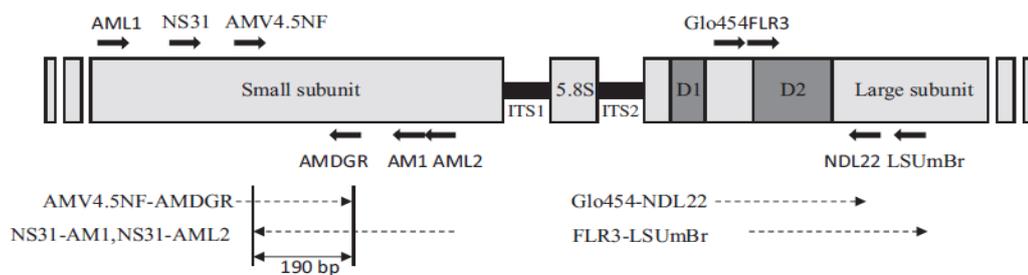


Figura No. 2. Combinación de *primers* para amplificación de región SSU de AMV4.5NF–AMDGR mostrado por Van Geel et al (2014).

En relación con los oomicetos se utilizaron cebadores (*primers*) específicos para oomicetos y con el fin de amplificar la región del espaciador transcrito interno 1 (ITS1) del ADN ribosomal, recomendado por (Robideau *et al.*, (2011) y Riit *et al.*, (2016) (Figura No. 3). Así mismo se utilizó el primer reverse específicos ITS2 para la amplificación de esta

región ITS1 y en combinación se le llamó PCR1 para oomicetos. También, se siguieron los protocolos del laboratorio y se llevó un control de cada plato (White y *et al.*, 1990; Gardes y Bruns, 1993; Riit *et al.*, 2016). Los *primers* fueron ITS1oo (cebador directo 5' GGAAGGATCATTACCACA 3') y ITS2R (cebador inverso 5' GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3'), que además contenían secuencias con adaptadores de Illumina en el extremo 5'. Así mismo se utilizó *phased primers* (Wu *et al.* 2015).



Figura No.3. Mapa de la región ITS1 oomiceto-específico tomado de Riit *et al.*, (2016).

La preparación de PCR contenía 3.7 μ L de agua ultrapura grado molecular, 5 μ L de Platinum Hot Start PCR Master Mix 2X (Invitrogen-ThermoFisher, Estados Unidos), 0.15 μ L de cada primer a 10 mM, y 1 μ L de extracto de ADN. Se preparó una PCR para seis placas y medio, de 96 pocillos, incluyendo controles positivos y negativos de reacción. Se utilizaron los siguientes parámetros: 94° C, por tres (3) minutos para la desnaturalización; seguido de treinta y tres (33) ciclos de 94° C durante cuarenta y cinco (45) segundos, 55° C durante treinta (30) segundos y 72° C durante un (1) minuto y una extensión final a 72° C por diez (10) minutos. Las muestras se corrieron en un termociclador MiniAmp Plus (ThermoFisher Estados Unidos)

En relación con los resultados post-corridas, las muestras se colocaron en una cámara de electroforesis con buffer TAE 0.5X y gel de agarosa al 1.5% marcado con GelRed y a cada una se le agregó Loading Dye 6x (ThermoFisher, Estados Unidos) las muestras una vez utilizadas se congelaron.

Se corrieron las muestras de PCR1 a 50 miliamperios por cuarenta (40) minutos, respectivamente. Las bandas esperadas en un rango de 300pb a 400pb, tanto para AMF, como para ITS1. Las mismas se observaron en un transiluminador UVP GelDoc-IT Imager (AnalytikJena, Alemania), con el software VisionWorks (AnalytikJena, Alemania),

Preparación de barcoding y normalización

En este punto, una vez tenemos las mil doscientas dieciocho (1,218) muestras amplificadas y tipificadas por ambas regiones. Se realizó una mezcla de las PCR1 para cada muestra de ambas regiones, con 5 μ l del PCR1 de AMF y 1 μ l de PCR1 de oomicetos por cada muestra, de acuerdo con los protocolos del laboratorio. Una vez realizada la mezcla, se preparó la placa llamada PCR2 que conlleva los *barcodes* para cada muestra y que contiene adaptadores de Illumina, de acuerdo con protocolos del laboratorio.

La preparación de PCR2 contenía 2 μ L de agua ultrapura grado molecular, 5 μ L de *Platinum Hot Start PCR Master Mix 2X* (Invitrogen-ThermoFisher, Estados Unidos), 1 μ L de cada *barcode* i5 y i7 respectivamente a 2.5 mM, y 1 μ L de ADN de la PCR1. Se registró cada combinación de *barcode* por muestra.

La purificación y normalización se realizó en placas de 96 utilizando *Just a plate™ PCR Purification & Normalization Kit* (Charm Biotech, Estados Unidos), siguiendo instrucciones del fabricante. después de esta limpieza, se mezcló un alícuota de 10 μ l de todas las muestras para construir la librería. Para concentrar esta librería, se utilizó *KAPA Pure Beads* (Roche). La calidad y concentración de la librería fueron verificadas con *Bioanalyzer* (AgilentTechnologies) y así mismo cuantificadas con *QUBIT High Sensitivity DNA Kit* (ThermoFisher).

Secuenciación y procesamiento de datos

La secuenciación se realizó en la plataforma Illumina con el Equipo MiSeq usando un kit de 2x300 ciclos V3 en modo *paired-end*. La plataforma de manejo de datos fue R utilizando Rstudio. Las secuencias no deseadas y los índices fueron eliminados utilizando Cutadapt v4.1 (Martin, 2011). Para las secuencias resultantes se procesaron con DADA2 (Callahan *et al.*, 2016) generando ASVs. Las secuencias se observaron y se quitaron quimeras y se asignaron las secuencias para taxonomía. Con relación a AMF lo comparamos con base de datos de referencia SILVA v. 128 (Quast *et al.*, 2013) y para los oomicetos fue comparado con base de datos nacional con estudios previos (Broders y Saltonstall, 2022). Posteriormente los datos se importaron utilizando la herramienta Phyloseq (McMurdie y Holmes, 2013). Se calculó la abundancia relativa a nivel de género

para AMF y también género y especies para los oomicetos. Se utilizaron las pruebas de Kruskal-Wallis y el análisis discriminante lineal (Lefse) para buscar diferencias clsignificativas en la abundancia relativa entre las variables ambientales. Por último, llevaron a cabo los cálculos para Diversidad Alfa con Shannon y Beta mediante ANOSIM en R (Clarke, 1993) para diferencias de pH y zona de precipitación. Los resultados se graficaron utilizando ggplot2 (Wickham, 2016).

Resultados

PCR electroforesis

Las amplificaciones de PCR1 fueron exitosas por los dos microbios. Sin embargo, algunas muestras no se observaron bandas para los oomicetos. Se obtuvieron bandas como indicaron los autores, entre 300pb a 400pb una banda tanto de las muestras amplificadas para 18S ADNr (AMF; Fig. 4A) y también para la región ITS1 (oomiceto; Fig. 4B).

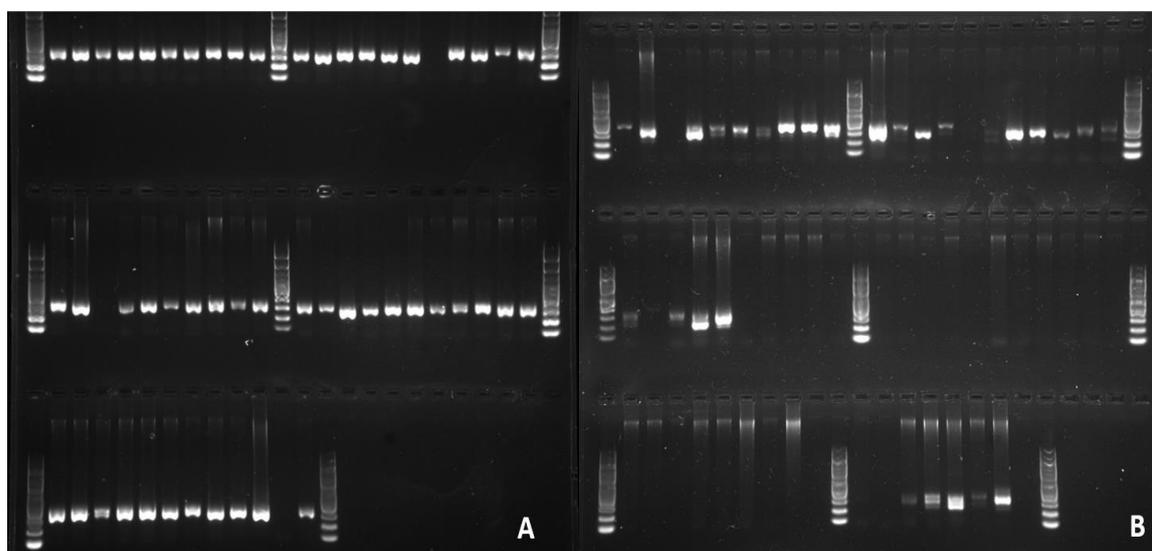


Figura No. 4. Gel de agarosa que muestra bandas de la región SSU 18S ADNr (AMF) (A). Bandas para la región ITS1 de oomiceto (B) Los productos de PCR fueron visualizados utilizando Gel Red con luz ultravioleta. Las columnas 1, 12 y 24 contienen marcador de peso molecular de 100pb. Se incluyeron controles positivos y negativos.

Visión general de la Secuenciación

Se obtuvieron en total 12,379,085 secuencias de AMF y 1,337,212 secuencias de oomicetos. después de la filtración de calidad de DADA2, quedaron 2,183,111 secuencias y 1181 ASVs de AMF. Para oomicetes de 1024697 secuencias y 2342 de ASVs de oomycota.

Abundancia y Diversidad

AMF

Abundancia Relativa de hongos AMF

Los resultados de la abundancia relativa de género de los AMF presentes en muestras de suelos de diferentes sitios de Panamá Centro (Figura No. 5) se observa que el número de géneros identificados fueron cuatro y en mayor representación *Glomus* seguido de *RhizopHagus*, *Sclerocystis* y *Septoglomus* y estos en su mayoría representados en todas las muestras con excepción de *Septoglomus*. Por otro lado, nos indica la mayoría de los ASVs clasificadas como no cultivado o *uncultured*, representado en todos los suelos que no pueden ser identificadas por género y otras solo pueden identificadas hasta Familia que en su mayoría es Familia *Glomeraceae*. Las muestras con mayor prevalencia de ASVs clasificadas como no cultivadas pertenecen a la muestra identificada como Campo Chagres seguido de Cerro Pelado y Clayton.

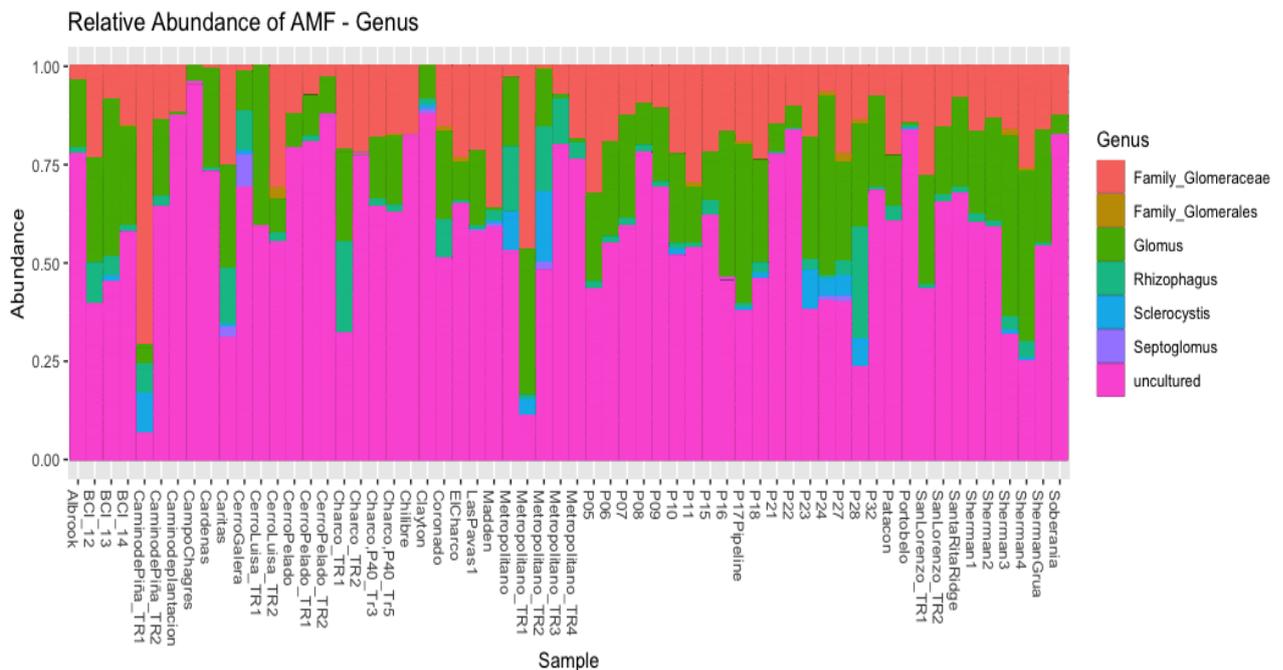


Figura No. 5. Abundancia Relativa del género de AMF en suelos de diferentes sitios de Panamá Centro.

En relación a los datos obtenidos de la abundancia relativa de género de los AMF presentes en suelos de diferentes sitios de Panamá Centro con relación a la zona de precipitación y al pH (Figura No. 6 A,B) podemos observar que de los cuatro géneros *Glomus* seguido de *Rhizophagus*, *Sclerocystis* y *Septoglomus*, con respecto a la zona de precipitación, se mantienen en una abundancia relativa similar entre ellos. Sin embargo, los con respecto a los suelos y la abundancia de *Rhizophagus* su cantidad varía (Figura No. 6A). Los resultados de la abundancia de ASVs identificadas al género *Glomus* y *Rhizophagus* en relación al pH nos indica que son más abundantes en pH neutrales (entre 5.0 – 8.0) que en los suelos más ácidos o alcalinos (LDA 2.0, $p < 0.05$; Figura No. 6B).

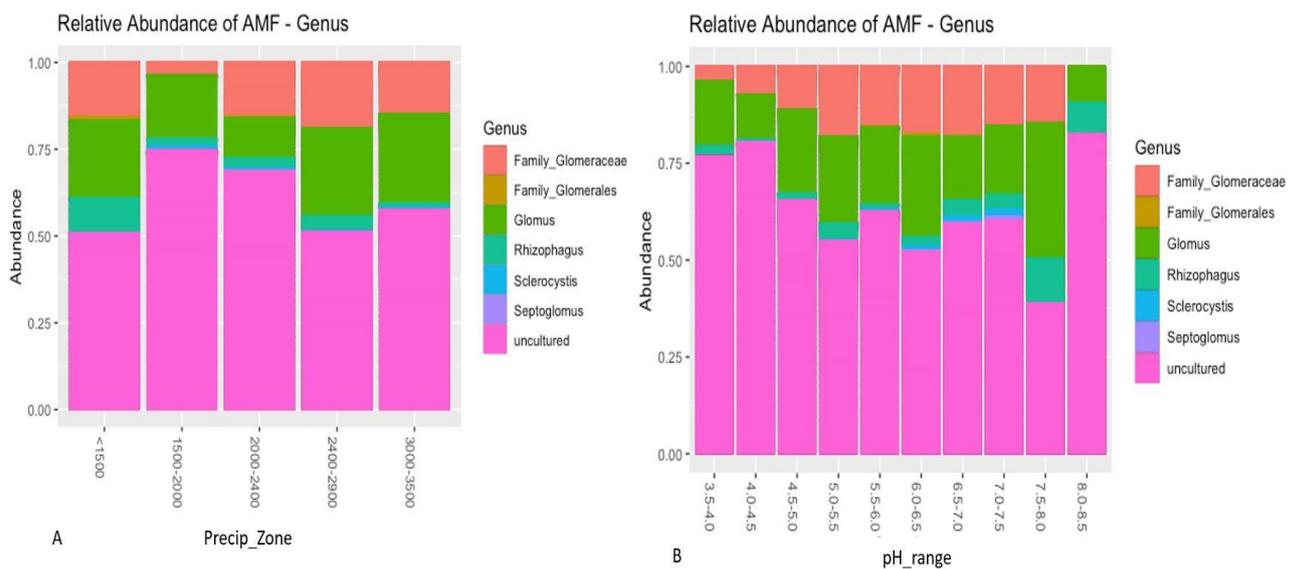


Figura No. 6: Abundancia Relativa del género de AMF en suelos de diferentes sitios de Panamá Centro con relación a (A) la Zona de Precipitación (mm/año) y (B) rango de pH.

Diversidad alfa de AMF

Se determinó que la diversidad alfa varía dentro de las muestras de suelo y que esta diversidad baja a medida que el suelo se vuelve menos ácido. Los suelos más ácidos tienen una diversidad más alta que los otros (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$). Se observa que en el rango de pH 5.5 - 6.0 comienza a tener un efecto significativo en la diversidad (Figura No.7).

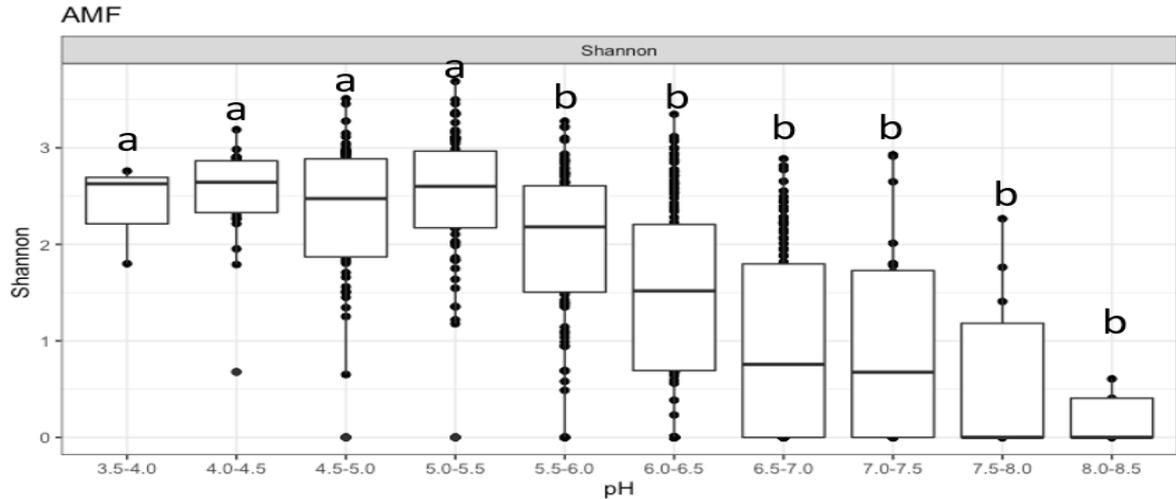


Figura No.7: Boxplot de Diversidad alfa de Shannon con relación a las muestras con el pH. Las letras indican diferencias significativas entre los rangos de pH ($p < 0.05$)

Por otro lado, los resultados obtenidos del boxplot sobre las muestras con relación a la zona de precipitación indican que la diversidad sube con más precipitación (Figura No. 8). Hemos llamado tres grupos (A, B, C) en donde en A no hay diferencias entre ellos sin embargo vemos que en el grupo B hay una diferencia entre la zona de precipitación de 2500-2700 y los otros grupos (Figura No.8).

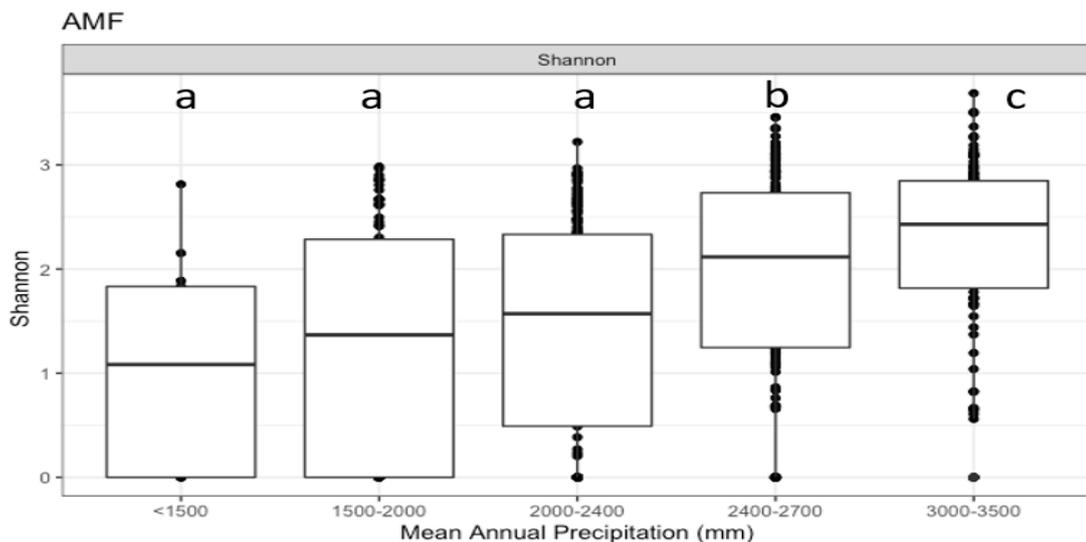


Figura No.8. Boxplot de Diversidad alfa de Shannon con relación de AMF con la cantidad media de precipitación por año. Las letras indican diferencias significativas entre las zonas de precipitación ($p < 0.05$).

Diversidad Beta de AMF

Los resultados obtenidos arrojaron una diferencia significativa para las comunidades de AMF entre dos o más grupos de muestreo mostrando una significancia. Hay diferencia significativa (ANOSIM, $p < 0,05$) entre las muestras de pH y Zonas de precipitación por lo que tanto el pH como la zona de precipitación (MAP) parecen influir en la diversidad de la comunidad. El valor resultante de R es más alto para la evaluación y correlación con el pH ($R=0.3549$) por lo que es probable que tenga más influencia que la Zona de Precipitación (MAP; $R=0.1146$) (Figura No.9).

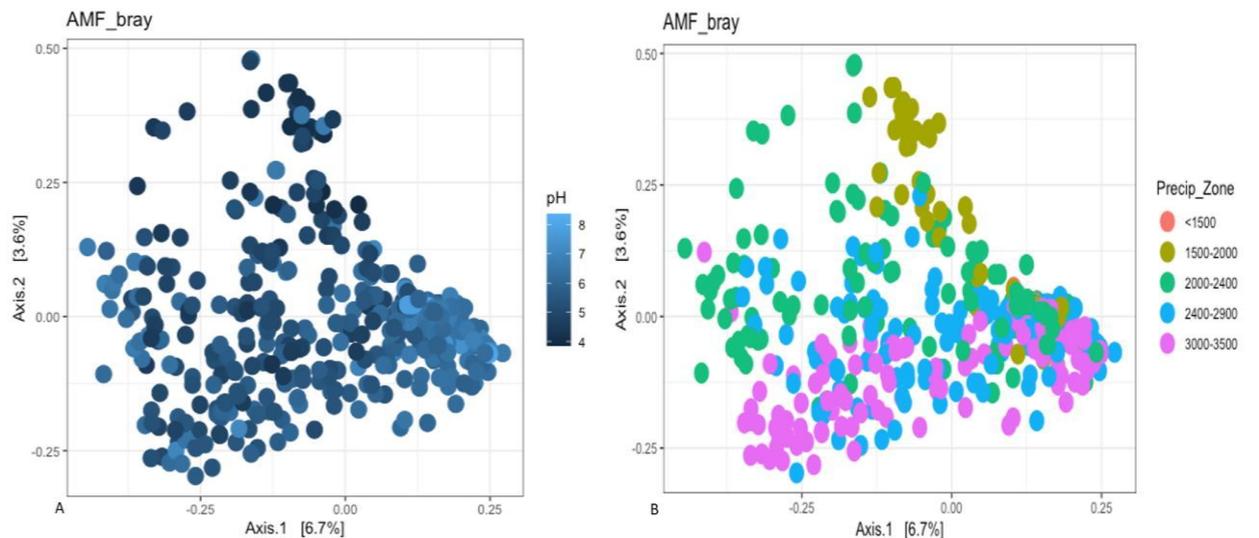


Figura No.9. Análisis de Coordenadas Principales de diversidad Beta de los AMF entre suelos con relación al (A) pH y (B) Zona de precipitación. Cada punto representa una muestra.

Oomicetos

Abundancia Relativa de Oomicetos

En los resultados de la abundancia relativa de especies de los Oomicetos presentes en suelos de Panamá Centro (Figura No. 10) es importante destacar que el número de

géneros abundantes fue de cinco, en su mayoría representados en la mayor parte de los suelos por: *Phytophthium* seguido de *PhytopHthora*, *Phythium*, *Halophytophthora* y *Saprolegnia*. Por otro lado, la mayoría de los ASVs fueron clasificadas hasta Familia, que en su mayoría pertenecen a la Familia *Pythiaceae* y a su vez solamente hasta Clase *Oomycota*.

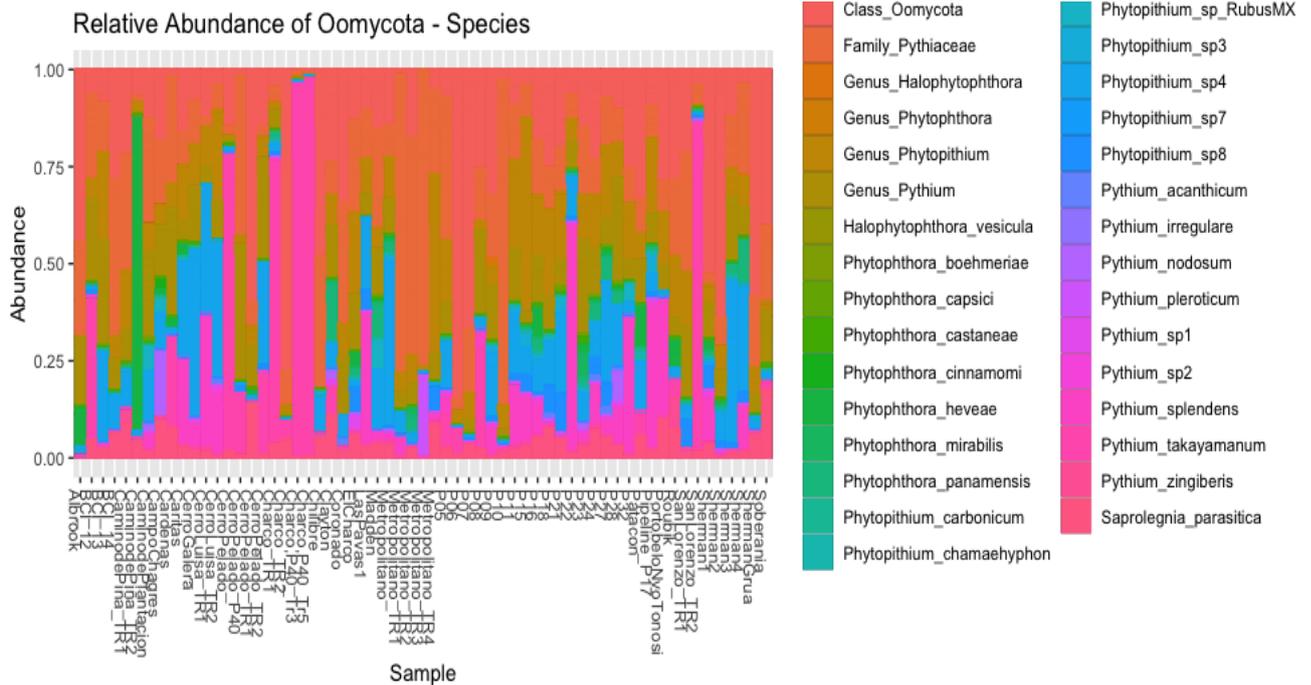


Figura No.10. Abundancia Relativa de género y especies de Oomicetes en diferentes suelos de Panamá Centro.

Los resultados de Zona de Precipitación no arrojaron una variación entre abundancia de muestras (Figura No. 11A.). En esta línea con relación al pH para *Phytophthium* podemos observar que no es tan abundante en todos los suelos con rangos de pH bajos siendo el más favorable de 7.5 a 8.0. Las diferencias y resultados más significativos se observan en relación a los cambios de pH. En general, a menor pH más abundantes son los oomicetes identificados solamente hasta clase y, a medida que aumenta el pH, son menos abundantes y los más abundantes a pH más altos fueron clasificados hasta Familia *Pythiaceae* (Figura No. 11B)

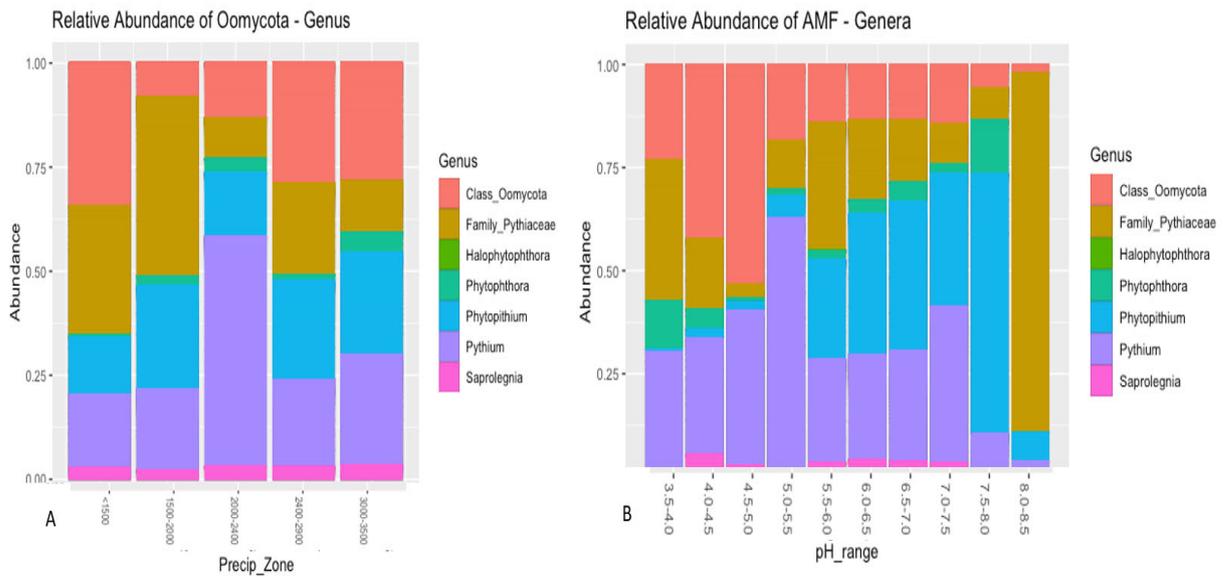


Figura 11: Abundancia Relativa de género de Oomicetes en diferentes suelos de Panamá Centro con relación a (A) la Zona de Precipitación y (B) rango de pH.

Diversidad alfa de oomicetos

La diversidad alfa permite determinar la variabilidad dentro de las muestras de suelo. Se observa que existe menos diversidad con pH más bajos y el pH ideal para ellos ha mostrado ser 5.5-8.0 (; (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$; Figura 12).

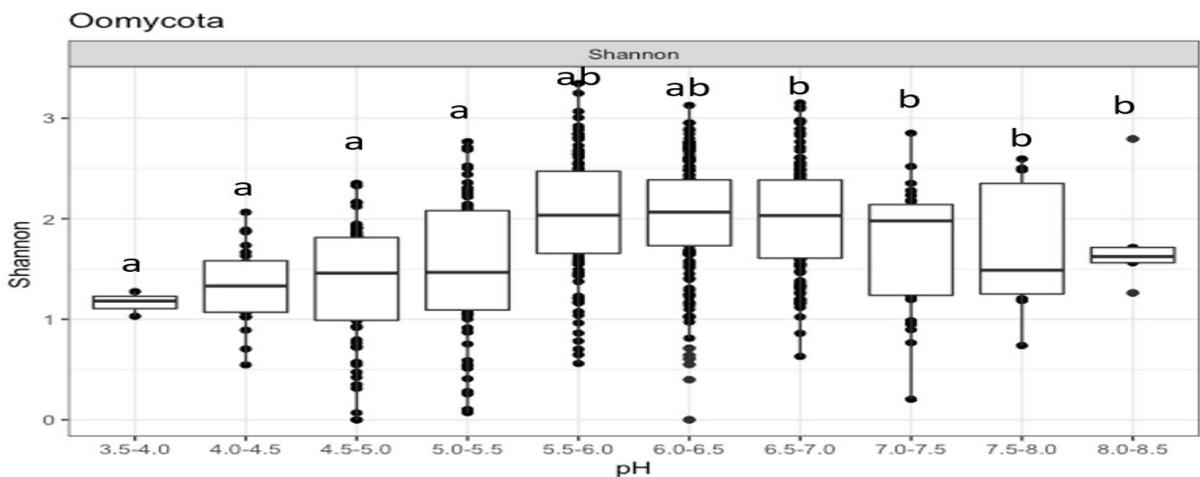


Figura No. 12. Boxplot de Diversidad alfa de Shannon con relación a oomicetos con el pH. Las letras indican diferencias significativas entre los rangos de pH ($p < 0.05$).

Por otro lado, los resultados obtenidos del boxplot sobre las oomicetos con relación a la zona de precipitación indican que la diversidad no se ve afectada por la precipitación (Figura No. 13).

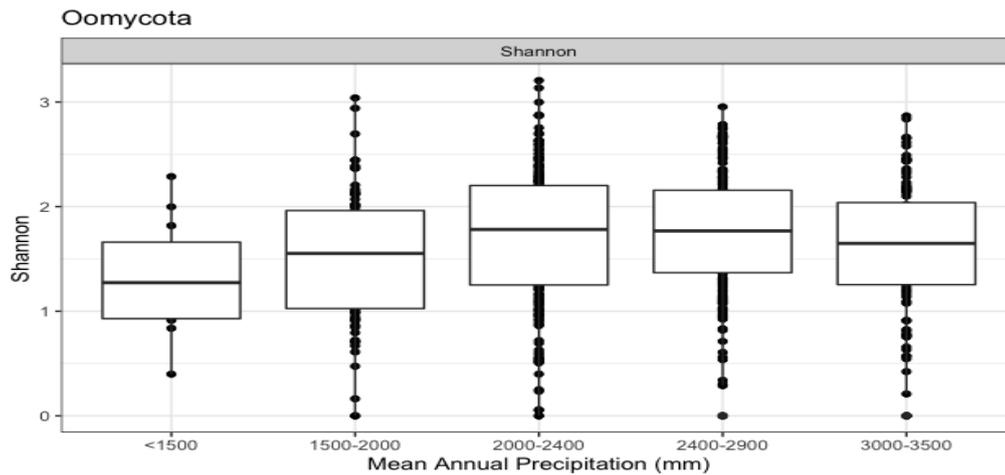


Figura No. 13. Boxplot de Diversidad alfa de Shannon con relación a oomicetos con el promedio de precipitación anual.

Diversidad beta de oomicetos

Los resultados obtenidos arrojaron una diferencia significativa para los oomicetos entre dos o más grupos de muestreo mostrando una significancia de ($p < 0,05$) entre las muestras de pH y Zonas de precipitación por lo que tanto el pH como el las precipitaciones (MAP) parecen influir en la diversidad de la comunidad, aunque el valor resultante de R es más alto para la evaluación y correlación con el pH y parece que tanto el pH como la precipitación influyen en las comunidades. Pero la estadística ANOSIM es más alta para el pH, por lo que tiene más impacto. (Figura 14 A,B).

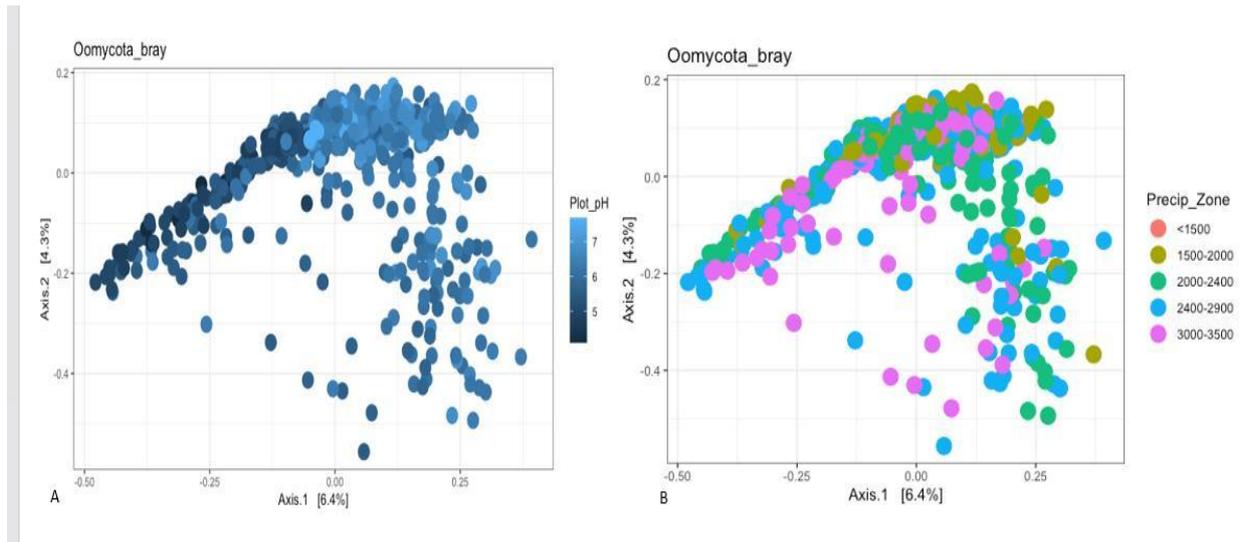


Figura No. 14. Análisis de Coordenadas Principales de diversidad Beta de los oomicetos entre suelos con relación al (A) pH y (B) Zona de precipitación. Cada punto representa una muestra.

Por otro lado, para los oomicetos se llevó a cabo el cálculo Lefse, observándose diferencias en los diferentes grupos taxonómicos. El género *Phytophthium* se distinguió significativamente entre las muestras, encontrándose diferencias entre categorías de pH en el suelo. Los suelos más ácidos (pH 4.0 – 5.0) y más básicos (8.0 – 8.5) tienen menos *Phytophthium* que los pH más neutrales (5.0 – 8.0) (LDA2.0, $p < 0.01$) por lo que sí son significativas las diferencias con respecto al pH (Figura No. 15).

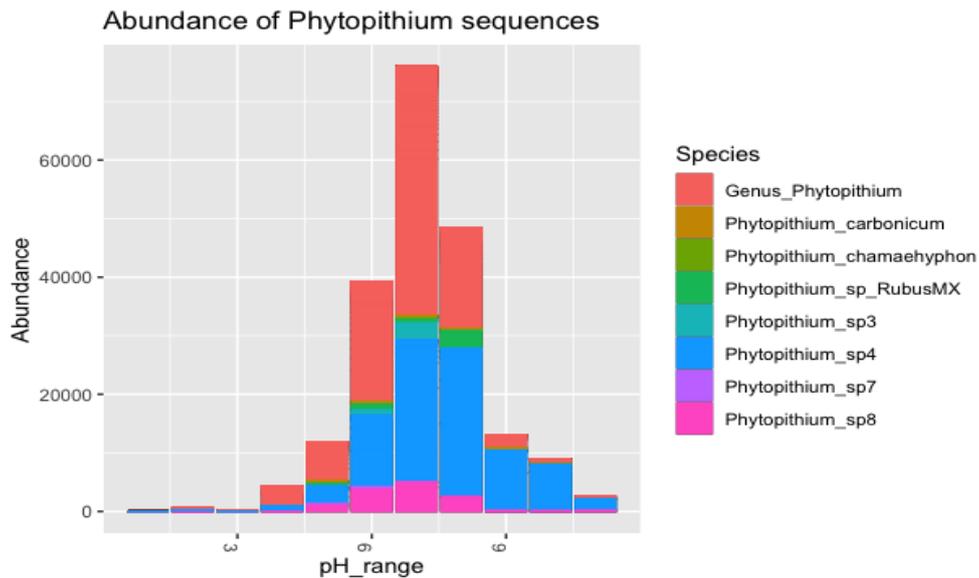


Figura No. 15. Diferencias de género *Phytophthium* con sus especies vs pH

Discusión

Con el estudio logramos caracterizar los microorganismos que no fueron cultivados a partir de muestras de suelos de diferentes sitios de Panamá. Nuestros resultados han arrojado elementos importantes para entender el comportamiento de la biodiversidad, tanto de los árboles neotropicales como la comunidad. Asimismo, contiene información complementaria que se ha arrojado de otras investigaciones como había sido propuesto por Condit *et al.*, (2013) y Schappe *et al.*, (2017).

Los resultados obtenidos sobre la secuenciación por metabarcoding y comparación con bases de datos para las asignaciones taxonómicas nos indican que el protocolo para amplificar la región 18S DNA ribosomal propuesto por Van Geel *et al.*, (2014) y Riit *et al.*, (2016) para los dos microorganismos ha funcionado correctamente, tanto para la región pequeña (SSU) para identificación de hongos micorrícicos arbusculares, como la región del espaciador transcrito interno 1 (ITS1) para los oomicetos. Dentro del estudio incluimos controles positivos y la secuenciación de muestras previamente secuenciadas con otras regiones y se mantenía la observación de que existiría AMF y oomicetos, lo que indica que es altamente reproducible.

El género de AMF con la mayor abundancia relativa en las muestras de suelos de diferentes sitios de Panamá Central corresponde al género *Glomus*, pero también se encuentran en gran abundancia los no cultivados que se observan en muchas de estas muestras. Algunos autores como Öpik *et al.*, (2013) destacan la abundancia de *Glomus* en sus muestras y, por otro lado, verificaron que las comunidades de AMF entre diferentes zonas y las condiciones climáticas conllevan a la variación global de estas comunidades. Los resultados de diversidad alfa obtenidos para los AMF, muestran que en los suelos de pH más bajos hay mayor diversidad que en suelos alcalinos y en pH neutral hay otros factores que aún no podemos predecir porque no fueron parte de este estudio pero que afectan a la diversidad de este grupo. Con relación a la zona de precipitación, hacia la Zona del Caribe los AMF son significativamente más diversos en 101 muestras de: Portobelo, Santa Rita Ridge y Sherman. Estos lugares siguiendo el

patrón de referencia de estudios anteriores y su ubicación, se encuentran en la Zona Norte Caribeña de Panamá y estos manejan una zona de precipitación de 3000-3500mm.

Por otro lado, un aporte significativo es que los estudios de Condit *et al.*, (2013) sustentan la necesidad de establecer más información con parámetros fisiológicos y genéticos que ayuden a entender el mecanismo de diversidad de bosques tropicales y así mismo han mencionado que la presencia de micorrizas ayudan a las plantas en condiciones de estrés y al mantener esta condición las micorrizas tratan de buscar fósforo y más nutrientes del que normalmente las plantas no podrían conseguir solas.

En relación con nuestros resultados los AMF están presentes en todas las condiciones de zonas de precipitación (1500mm a 3500mm) lo que conlleva a establecer que ellos están otorgando un beneficio en los Bosques Tropicales de Panamá.

La mayoría de los oomicetos representados en las muestras de suelos de diferentes sitios de Panamá Central corresponden a *Phytophthium*. *Phytophthium* es un grupo nuevo que está estrechamente relacionado con los géneros *Pythium* y *Phytophthora*, con estructura y biología similares (Tkaczyk, 2020). Podemos mencionar que en estudios de Rossmann *et al.*, (2021) identificaron mayormente el género *Pythium* y *Phytophthora* en sus muestras de suelos hortícolas, sin embargo, en nuestros resultados también logramos identificar estos dos géneros y están representados en la mayoría de las muestras de suelos de diferentes sitios de Panamá. Por otro lado, con relación a *Phytophthium*, observamos que existen diferencias en la abundancia relativa sus especies con relación al pH; es decir a diferentes especies le gustan tanto pH ácido y neutral.

Las muestras que se analizaron en este estudio fueron colectadas en octubre y noviembre, en pleno apogeo de la temporada de lluvia en Panamá. Sería muy interesante realizar las mismas investigaciones en la estación seca y compararlas con las obtenidas en este estudio para comprobar si existen algunas diferencias entre la abundancia y diversidad de los microorganismos basadas en resultados de la diversidad de los árboles por nutrientes de Condit *et al.*, (2013).



Otro importante hallazgo es que pudimos identificar el oomiceto *Saprolegnia parasítica*. Este microorganismo fue identificado en la mayoría de nuestras muestras, pero en poca representación. Se trata del primer oomicete al que se le ha secuenciado todo el genoma Jiang *et al.*, (2013) y, como se ha referenciado, los oomicetes pueden ser patógenos de plantas y animales (Robideau *et al.*, 2011). En este caso, no es nuestro objeto de estudio principal, pero puede representar un dato en futuros estudios y correlación dentro de zonas del Canal de Panamá ya que varios países han identificado ser patógeno en animales como peces y anfibios, pero aún no se conoce que un oomiceto sea patógeno en plantas y animales a su vez, sino que se han adaptado con variantes específicas para lograr estas clasificaciones (Sarowar *et al.*, 2019; Costa y Lopes, 2022).

Conclusión

El uso de metabarcoding para caracterización de AMF y oomicetos es una alternativa para la identificación masiva de microorganismos. Conocer cómo las variables gradiente de precipitación y pH del suelo influyen en la abundancia de AMF y oomicetos nos ha ayudado a comprender el comportamiento de estos microorganismos. En el presente estudio se observa que los AMF muestran mayor tolerancia a suelos con pH bajo que los oomicetos y que la cantidad anual de precipitación afecta a la diversidad de AMF pero no a la de los oomicetos. Los resultados apoyan que la precipitación influye en la composición de la comunidad de oomicetos, aunque no cambia su diversidad, Por el contrario, el pH influye significativamente en la diversidad de los oomicetos de los suelos de Panamá. La abundancia de AMF aumenta con la precipitación y en este caso el pH tiene más influencia en la diversidad, encontrándose mayor diversidad en suelos con pH bajo que en aquellos suelos con pH neutro o alto. Por último, en vista de futuras líneas de investigación, es necesario tener en cuenta que las muestras de suelos son independientemente distintas a las temporadas de recolección por lo que se hace necesario tomar otras muestras en temporada seca y verificar si afecta o no a la abundancia y la diversidad de los AMF y los oomicetos.

Bibliografía

Brundrett, M.C. (2009) Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil*, 320, 37–77.

Broders, K. and K. Saltonstall (2022). In prep. An R-compatible reference database for tropical oomycetes of Panamá.

Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 13:581–3. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME journal*, 11(12), 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>.

Clarke, K. R. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust. J. Ecol.* 18, 117–143 (1993).

Condit, R W. Robinson D, Ibáñez R, Aguilar S, Sanjur A, Raúl Martínez, Robert F. Stallard, García T, George R. Angehr, Petit L, S. Wright J, Robinson T, Heckadon S., (2001) The Status of the Panama Canal Watershed and Its Biodiversity at the Beginning of the 21st Century: Long-term ecological studies reveal a diverse flora and fauna near the Panama Canal, harbored within a corridor of forest stretching from the Caribbean to the Pacific, but deforestation, land degradation, erosion, and overhunting remain threats, *BioScience*, 51 (5), 389–398, [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0389:TSOTPC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0389:TSOTPC]2.0.CO;2)

Condit, R., Engelbrecht, B.M.J., Pino, D., Perez, R. & Turner, B.L. (2013) Species distributions in response to individual soil nutrients and seasonal drought across a community of tropical trees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 110, 5064–5068.

Costa, S., & Lopes, I. (2022). Saprolegniosis in Amphibians: An Integrated Overview of a Fluffy Killer Disease. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland), 8(5), 537. <https://doi.org/10.3390/jof8050537>.

Connell, J. H., I. Debski, C. A. Gehring, L. Goldwasser, P. T. Green, K. E. Harms, P. Juniper, and T. C. Theimer. (2005). Dynamics of seedling recruitment in an Australian tropical rainforest. Pages 486–506 in E. Bermingham, C. W. Dick, and C. Moritz, editors. *Tropical rainforests past, present, and future*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA

Furneaux, B., Bahram, M., Rosling, A., Yorou, N. S., & Ryberg, M. (2021). Long- and short-read metabarcoding technologies reveal similar spatiotemporal structures in fungal communities. In *Molecular Ecology Resources* (Vol. 21, Issue 6, pp. 1833–1849). Wiley. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13387>.

Jiang R.H.Y., de Bruijn I., Haas B.J., Belmonte R., Löbach L., Christie J., van den Ackerveken G., Bottin A., Bulone V., Díaz-Moreno S.M., et al. Distinctive Expansion of Potential Virulence Genes in the Genome of the Oomycete Fish Pathogen *Saprolegnia parasitica*. *PLoS Genet.* 2013;9:e1003272. doi: 10.1371/journal.pgen.1003272.

Kryukov, A. A., Gorbunova, A. O., Machs, E. M., Mikhaylova, Y. V., Rodionov, A. V., Zhurbenko, P. M., & Yurkov, A. P. (2020). Perspectives of using Illumina MiSeq for identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii*, 24(2), 158–167. <https://doi.org/10.18699/VJ19.38-o>.

Mangan, S. A., Herre, E. A., & Bever, J. D. (2010). Specificity between Neotropical tree seedlings and their fungal mutualists leads to plant–soil feedback. *Ecology*, 91(9), 2594–2603.

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17(1), 10–12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.

McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. In M. Watson (Ed.), *PLoS*

ONE (Vol. 8, Issue 4, p. e61217). Public Library of Science (PLoS).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.

McGowan J, Fitzpatrick DA. Recent advances in oomycete genomics. *Adv Genet.* 2020;105:175-228. doi: 10.1016/bs.adgen.2020.03.001. Epub 2020 Apr 25. PMID: 32560787.

Morejón L. (2022) Diversidad fúngica en ecosistemas mediterráneos de Castilla y León. Tesis. Universidad de Valladolid.
<https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/52404/TFM-L555.pdf?sequence=1>.

Rand, A.S., Rand, W.M., 1982. Variation in rainfall on Barro Colorado Island: in Leigh, E.G., Rand, S., and Windsor, D.M., eds., *The Ecology of a Tropical Forest: Seasonal Rhythms and Long-Term Changes*: Smithsonian Institution Press, Washington DC, p. 47–59.

Öpik, M., Zobel, M., Cantero, J.J. et al (2013). Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 23, 411–430.
<https://doi.org/10.1007/s00572-013-0482-2>.

Pyke, C. R., Condit, R., Aguilar, S., & Lao, S. (2001). Floristic Composition across a Climatic Gradient in a Neotropical Lowland Forest. *Journal of Vegetation Science*, 12(4), 553–566.
<https://doi.org/10.2307/3237007>

Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies, J. & Glöckner F.O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl. Acids Res.* 41 (D1): D590-D596.

Razzauti M., Galan M., Bernard M., Maman S., Klopp C., Charbonnel N., Vayssier-Taussat M., Eloit M., Cosson J.-F (2015). A comparison between transcriptome sequencing and 16S metagenomics for detection of bacterial pathogens in wildlife. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9(8):e0003929. DOI 10.1371/journal.pntd.0003929.

Spear ER, Broders KD (2021). Host-generalist fungal pathogens of seedlings may maintain forest diversity via host-specific impacts and differential susceptibility among tree species. *New Phytol.* 231(1):460-474. doi: 10.1111/nph.17379.

- Riit T, Tedersoo L, Drenkhan R, Runno-Paurson E, Kokko H, Anslan S (2016) Oomycete-specific ITS primers for identification and metabarcoding. *MycKeys* 14: 17–30. doi: 10.3897/mycokeys.14.9244
- Robideau, G. P., DE cock, A. W. A. M., Coffey, M. D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D. W., Désaulniers, N., eggertson, Q. A., Gachon, C. M. M., HU, C., Küpper, F. C., Rintoul, T. L., Sarhan, E., Verstappen, E. C. P., Zhang, y., Bonants, P. J. M., Ristaino, J. B., & André Lévesque, C. (2011). DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. In *Molecular Ecology Resources* (Vol. 11, Issue 6, pp. 1002–1011). Wiley. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03041.x>
- Rossmann, S., Lysøe, E., Skogen, M., Talgø, V., & Brurberg, M. B. (2021). DNA Metabarcoding Reveals Broad Presence of Plant Pathogenic Oomycetes in Soil From Internationally Traded Plants. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.637068>.
- Saitta, A., Anslan, S., Bahram, M., Brocca, L., & Tedersoo, L. (2018). Tree species identity and diversity drive fungal richness and community composition along an elevational gradient in a Mediterranean ecosystem. *Mycorrhiza*, 28(1), 39–47. <https://doi.org/10.1007/s00572-017-0806-8>.
- Salipante S.J., Kawashima T., Rosenthal C., Hoogestraat D.R., Cummings L.A., Sengupta D.J., Harkins T.T., Cookson B.T., Hoffman N.G. (2014). Performance comparison of Illumina and ion torrent next-generation sequencing platforms for 16S rRNA-based bacterial community profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(24):7583- 7591. DOI 10.1128/aem.02206-14.
- Sarowar, M. N., Hossain, M. J., Nasrin, T., Naznin, T., Hossain, Z., & Rahman, M. M. (2019). Molecular identification of oomycete species affecting aquaculture in Bangladesh. In *Aquaculture and Fisheries* (Vol. 4, Issue 3, pp. 105–113). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2018.12.003>
- Schappe, T., F. E. Albornoz, B. L. Turner, A. Neat, R. Condit, F. A. Jones. (2017). The role of soil chemistry and plant neighbourhoods in structuring fungal communities in three Panamanian rainforests. *J Ecology* 105: 569–579.

Smith, S.E., Anderson, I.C. & Smith, F.A. (2015) Mycorrhizal associations and phosphorus acquisition: from cells to ecosystems. *Annual Plant Reviews, Phosphorus Metabolism in Plants*, 48, 409–440

Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., & Willerslev, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 21, 2045–2050. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2012.05470.x>.

Tkaczyk, Miłosz. (2020). Phytophythium: origin, differences and meaning in modern plant pathology. *Folia Forestalia Polonica*. 62. 227-232. 10.2478/ffp-2020-0022.

Tedersoo, L., Bahram, M., Zinger, L., Nilsson, R. H., Kennedy, P. G., Yang, T., Anslan, S., & Mikryukov, V. (2022). Best practices in metabarcoding of fungi: From experimental design to results. In *Molecular Ecology* (Vol. 31, Issue 10, pp. 2769–2795). Wiley. <https://doi.org/10.1111/mec.16460>.

Van Geel, M., Busschaert, P., Honnay, O., & Lievens, B. (2014). Evaluation of six primer pairs targeting the nuclear rRNA operon for characterization of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities using 454 pyrosequencing. *En Journal of Microbiological Methods* (Vol. 106, pp. 93-100). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.08.006>

Wang B, Qiu YL (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*.16(5):299-363. doi: 10.1007/s00572-005-0033-6.

Wickham, H. (2016). *Ggplot2: Elegant graphics for data analysis* (2nd ed.) [PDF]. Springer International Publishing.

Wu, L., Wen, C., Qin, Y., Yin, H., Tu, Q., Van Nostrand, J. D., Yuan, T., Yuan, M., Deng, Y., & Zhou, J. (2015). Phasing amplicon sequencing on Illumina Miseq for robust environmental microbial community analysis. In *BMC Microbiology* (Vol. 15, Issue 1). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0450-4>