

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**  
**CAMPUS TECNOLÓGICO LOCAL SAN CARLOS**  
**ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA  
EXTRACCIÓN DE ADN EN MUESTRAS DE SUELO DEL CULTIVO  
DE PIÑA (*Ananas comosus*), EN DISTINTAS FINCAS Y USOS DE  
SUELO DE LA ZONA NORTE, PARA EL ANÁLISIS DE  
MICROBIOMAS**

**Proyecto de Graduación presentado a la Escuela de Agronomía  
como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en  
Ingeniería en Agronomía**

**MARIA MILAGRO CARVAJAL CHACON**



**Carrera de Ingeniería en Agronomía**  
**Campus Tecnológico Local**  
**San Carlos**  
**2019 - 2023**

**2020**

**ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA  
EXTRACCIÓN DE ADN EN MUESTRAS DE SUELO DEL CULTIVO  
DE PIÑA (*Ananas comosus*), EN DISTINTAS FINCAS Y USO DE  
SUELO DE LA ZONA NORTE, PARA EL ANÁLISIS DE  
MICROBIOMAS**

**MARIA MILAGRO CARVAJAL CHACÓN**

**Aprobado por los miembros del Tribunal Evaluador:**

Ing. Biot. Fabián Echeverría Beirute, PhD.

---

Asesor principal

Dra. Ingrid Varela Benavides.

---

Jurado

Biol. José Pablo Jiménez Madrigal, PhD.

---

Jurado

Ing. Agr. Zulay Castro Jiménez, MGA.

---

Coordinadora

Trabajos Finales de Graduación

Ing Agr. Milton Villareal, PhD

---

Director

Escuela de Agronomía

**Santa Clara**

**2020**

## DEDICATORIA

Dedico este logro profesional:

A Dios que me permitió finalizar esta etapa de mi vida con salud en estos momentos y al lado de mis seres queridos.

A mi familia Jorge Arturo Carvajal Garro, Militza Chacón Jiménez y José Daniel Carvajal Chacón y a mi prometido Sergio Alfaro Campos que han sido mi fuerza y apoyo incondicional durante estos años de mi carrera y nunca me dejaron sola en los momentos difíciles.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi principal agradecimiento a Dios que me dio la sabiduría durante mi carrera y me permitió concluir esta etapa.

A mi familia que me dieron la oportunidad, los recursos y el apoyo infinito para alcanzar mis metas.

A mi asesor el Ing. Biot. Fabián Echeverría Beirute, PhD, que me dio la oportunidad de participar en este proyecto, y que ha sido un gran maestro, ejemplo durante esta etapa, gracias por tantas enseñanzas para mi vida.

A la Dra. Ingrid Varela Benavides y el Biol. José Pablo Jiménez Madrigal, PhD, que también han sido parte de este proyecto y de igual manera aportaron su enriquecedor conocimiento.

Al proyecto de investigación de la Vicerrectoría de Investigación y Extensión titulado “Análisis de comunidades biológicas de piña en la región Huetar Norte” por el financiamiento para esta tesis.

## TABLA DE CONTENIDOS

	<b>Página</b>
DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
TABLA DE CONTENIDOS .....	iii
LISTA DE CUADROS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
GLOSARIO.....	x
LISTA DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Justificación.....	3
1.2 Objetivo General.....	4
1.3 Objetivos Específicos.....	4
2 REVISIÓN DE LITERATURA .....	5
2.1 Rizosfera.....	5
2.2 Usos de suelo.....	5

2.2.1 Suelo de bosque.....	5
2.2.2 Suelo de plantaciones.....	6
2.3 Microorganismos del suelo.....	7
2.4 Microbiomas.....	8
2.5 Análisis de microbiomas.....	9
2.5.1 Recolección del suelo.....	10
2.5.2 Conservación del suelo.....	11
2.5.3 Extracción del ADN.....	12
2.5.3.1 Reactivos de extracción.....	14
2.5.3.2 Tiempos y Temperaturas de incubación en la extracción de ADN.....	17
2.5.4 Cuantificación del ADN.....	18
2.5.5 Caracterización del ADN.....	19
2.5.5.1 Electroforesis.....	19
2.5.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	20
2.5.5.3 Secuenciación del ADN.....	21
a) Regiones 16 S:.....	23
b) Regiones ITS:.....	25
2.6 El cultivo de piña ( <i>Ananas comosus</i> ).....	26
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	29

3.1 Ubicación.....	29
3.2 Periodo de Estudio.....	29
3.3 Material de estudio.....	29
3.4 Variables.....	30
3.5 Diseño de muestreo y modelo estadístico.....	30
3.6 Análisis estadístico.....	31
3.7 Materiales y Equipo.....	32
3.8 Metodología utilizada en la estandarización del protocolo de extracción del ADN.....	33
3.8.1 Origen de las muestras del suelo .....	33
3.8.2 Conservación de las muestras del suelo .....	33
3.8.3 Estandarización del protocolo de extracción de ADN .....	34
3.9 Cuantificación del ADN.....	37
4 RESULTADOS .....	38
4.1 Comparación de protocolos para extracción del ADN.....	38
4.2 Comparación de métodos de conservación del suelo.....	44
4.3 Comparación del ADN según uso del suelo.....	46
5 DISCUSIÓN.....	48
6 CONCLUSIONES.....	53
7 RECOMENDACIONES.....	54

8 BIBLIOGRAFÍA.....	55
SECCIÓN V.....	67
ANEXOS .....	67



## LISTA DE CUADROS

Página

<b>Cuadro 1.</b>	Características y funciones de los reactivos utilizados en la extracción de ADN. ....	14
<b>Cuadro 2.</b>	Modificaciones realizadas al protocolo Tanase <i>et al.</i> 2015 para la estandarización de protocolo de extracción de ADN en suelo de piña ( <i>Ananas comosus</i> ). Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020. ....	35
<b>Cuadro 3.</b>	Modificaciones realizadas al protocolo Verma <i>et al.</i> 2017 para la estandarización de protocolo de extracción de ADN en suelo de piña ( <i>Ananas comosus</i> ). Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020. ....	36
<b>Cuadro 4.</b>	Reactivos y cantidades requeridas para la elaboración del buffer de extracción de ADN. Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020. ....	37
<b>Cuadro 5.</b>	Comparación de las medidas de dispersión de la concentración y calidad del ADN extraído del suelo de piña, utilizando tres distintos protocolos de extracción en el Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020. ....	38
<b>Cuadro 6.</b>	Medidas de dispersión para los tratamientos seleccionados de cada variable de clasificación en las modificaciones del protocolo, para la variable concentración de ADN (ng/μl). Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020. ....	39
<b>Cuadro 7.</b>	Medidas de dispersión para los tratamientos seleccionados de cada variable de clasificación en las modificaciones del protocolo, para la variable calidad (260/280). Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020. ....	40
<b>Cuadro 8.</b>	Medidas de dispersión para los tratamientos seleccionados de cada variable de clasificación en las modificaciones del protocolo, para la variable calidad (260/230). Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020. ....	41

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Interacción de los microorganismos con las plantas y el suelo.....	8
<b>Figura 2.</b> Promedio del número de genes en genomas de especies representativas de acuerdo con cada grupo de organismo. En los paréntesis se indica el tamaño de cada genoma y en los corchetes la abundancia de cada microorganismo. ....	9
<b>Figura 3.</b> Estructura helicoidal del ADN, unión de las cadenas por los puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas. El ADN presenta un grupo fosfato, con carga negativa que le da la propiedad hidrofílica.....	13
<b>Figura 4.</b> Funcionamiento del espectrofotómetro por medio del principio de absorbancia.....	19
<b>Figura 5.</b> Ejemplo de la visualización de un análisis de electroforesis.....	20
<b>Figura 6.</b> Etapas de la amplificación del ADN por la Reacción en Cadena de la Polimerasa. ....	21
<b>Figura 7.</b> Esquema de la estructura de las subunidades y macromoléculas que componen el ribosoma bacteriano. ....	24
<b>Figura 8.</b> Región del espaciador transcriptor interno ubicado en el ADN ribosomal.....	25
<b>Figura 9.</b> Suelo de piña conservado en etanol al 96% a temperatura ambiente. La extracción de ADN se realizó de acuerdo con las fases a) únicamente el sedimento, 2) únicamente el etanol al 96% y 3) sedimento + etanol al 96%. Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020. ....	34
<b>Figura 10.</b> Protocolo establecido para la extracción de ADN en suelos de piña ( <i>Ananas comosus</i> ) en el Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020. ....	43
<b>Figura 11.</b> Concentración (ng/μl) (media ± EE) de ADN extraído del suelo de plantación de piña, utilizando dos métodos de conservación. Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020. ....	44
<b>Figura 12.</b> Calidad 260/280 (media ± EE) de ADN extraído del suelo de plantación de piña, utilizando dos métodos de conservación. Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020. ....	45

<b>Figura 13.</b>	Calidad 260/230 (media $\pm$ EE) de ADN extraído del suelo de plantación de piña, utilizando dos métodos de conservación. Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020. ....	46
<b>Figura 14.</b>	Comparación de promedios de Concentración del ADN (ng/ $\mu$ l) (media $\pm$ EE) extraído de distintas fincas con dos usos de suelo (plantación y bosque) en la Zona Norte. Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020. ....	47

## GLOSARIO

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**CTAB:** Cetyltrimethylammonium bromide (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio)

**EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid (ácido etilendiaminotetraacético)

**PCI:** Fenol cloroformo alcohol isoamílico 25:24:1

**PCR:** Polymerase chain reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

**SDS:** Dodecil Sulfato de Sodio

**ITS:** Internal Transcribed Spacer (Espaciador transcrito interno)

**NaCl:** Cloruro de sodio

**dNTPs:** Deoxinucleósido trifosfato

**CaCl<sub>2</sub>:** Cloruro de calcio

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloruro de magnesio

**C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>:** Acetato de sodio

**Vol:** Volumen

**PEG:** Polyethylene glycol (Polietilenglicol)

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Página</b>
<b>Anexo 1.</b> Extracto del protocolo de extracción de ADN reportado por Verma <i>et al.</i> 2017. ....	67
<b>Anexo 2.</b> Extracto del protocolo de extracción de ADN reportado por Tanase <i>et al.</i> 2015. ....	68
<b>Anexo 3.</b> Soluciones de SDS al 10% y buffer de extracción de ADN. ....	69
<b>Anexo 4.</b> Conservación de suelo en bolsas plásticas a -40 °C. ....	70
<b>Anexo 5.</b> Muestra de suelo de piña con el balón, buffer de extracción y SDS .....	71
<b>Anexo 6.</b> Homogenización de la muestra para la lisis celular .....	72
<b>Anexo 7.</b> Separación de las fases de sedimento de suelo, y fase acuosa después de la centrifugación.....	73
<b>Anexo 8.</b> Adición del cloroformo -isoamíl-alcohol (fase inferior transparente) al sobrenadante de la muestra posterior a la centrifugación.....	74
<b>Anexo 9.</b> Homogenización en vortex del sobrenadante y el cloroformo- isoamíl-alcohol. ....	75
<b>Anexo 10.</b> Resultado de la homogenización en vórtex, posterior a la adición de Isopropanol al sobrenadante.....	76
<b>Anexo 11.</b> Precipitación del ADN con el isopropanol, posterior a la centrifugación.....	77
<b>Anexo 12.</b> Secado del precipitado de ADN en centrifuga al vacío a 20 °C durante 20 minutos. ....	78
<b>Anexo 13.</b> Comparación de medias con la prueba LSD-Fisher y p-valor para la concentración de ADN (ng/μl) con los tratamientos de conservación de suelos.....	79
<b>Anexo 14.</b> Comparación de medias para la calidad 260/280 de ADN y p-valor con los tratamientos de conservación de suelos.....	79
<b>Anexo 15.</b> Comparación de medias y p-valor para la calidad 260/230 de ADN con los tratamientos de conservación de suelos.....	80
<b>Anexo 16.</b> Comparación de medias y p-valor para calidad 260/280 de ADN en la interacción finca x uso de suelo (ecosistema). ....	80

<b>Anexo 17.</b>	Comparación de medias y p-valor para calidad 260/230 de ADN en la interacción finca x uso de suelo (ecosistema).....	81
<b>Anexo 18.</b>	Comparación de medias con la prueba LSD Fisher y p-valor para la concentración (ng/μl) de ADN en la interacción finca x uso de suelo (ecosistema).....	82

## RESUMEN

En el suelo se llevan a cabo diversas actividades bioquímicas por parte de la interacción de los microorganismos, las plantas con este mismo. Todo el conjunto de genes de los microorganismos presentes en un ambiente determinado corresponde al microbioma, en este caso el ambiente a estudio es el suelo. Los análisis de microbiomas se realizan con el fin de identificar los microorganismos presentes en un ambiente, sin embargo, para realizar estos análisis es fundamental una extracción de ADN. Este trabajo tuvo como objetivo proponer un protocolo de extracción de ADN del suelo de piña (*Ananas comosus*) de distintas fincas con diferente uso de suelo para el análisis de microbiomas. Para estandarizarlo se evaluaron tres diferentes protocolos de extracción de ADN (Kit comercial y dos protocolos modificados), además se comparó dos diferentes métodos de conservación del suelo (frío -40 °C y etanol al 96% a temperatura ambiente) previo a la extracción, una vez estandarizado el protocolo se extrajo el ADN y se comparó la calidad (260/280 y 260/230) y concentración (ng/μl) de acuerdo a cada finca y cada uso de suelo (bosque versus plantación de piña). En forma general, los resultados del presente estudio demostraron: que el kit comercial de extracción de ADN no fue efectivo para este tipo de suelo, el protocolo más efectivo fue el protocolo modificado de Verma *et al.* (2017), además la conservación del suelo a muy bajas temperaturas (-40 °C) es efectiva para obtener altas concentraciones de ADN. También, en el presente estudio resultó que en los suelos de bosque se encontró mayor concentración (ng/μl) que, en los suelos de cultivo, sin embargo la calidad del ADN no varió de acuerdo con los dos usos de suelo.

**Palabras clave:** ADN ambiental, *Ananas comosus*, calidad (260/280 y 260/230) concentración (ng/μl), análisis de microbiomas.

## ABSTRACT

Many biochemical interactions occur between microorganisms, plants, and soil. The combination of microorganism genes in a given environment is what is known as the microbiome. In this specific study, the examined environment was pineapple (*Ananas comosus*) soil. Microbiome analyses were conducted in order to identify microorganisms present in this specific environment, and DNA extraction was required to complete these analyses. The focus of this study was to establish an effective method of DNA extraction for analyzing the microbiome of pineapple (*Ananas comosus*) soil from specific farms, each with different soil usage. This was done in three phases. First, in order to standardize the process, three different DNA extraction protocols (one commercial kit, and two modified protocols) were evaluated to establish the protocol to be used in this study. Subsequently, two different soil conservation methods were compared (cold -40 °C, and 96% ethanol at room temperature). Lastly, the soil samples were compared based on DNA quality (260/280 and 260/230) and concentration (ng/μl) according to each farm and soil usage (forest vs. pineapple plantation).

The results showed the commercial DNA extraction kit was not an effective method for analyzing this type of soil, the most effective protocol was the modified Verma *et al.* (2017) Soil conservation at very low temperatures (-40 °C) was effective in order to obtain high concentrations of DNA. Also, it was discovered that in forest soil, a higher concentration (ng/μl) of DNA was found compared to cultivated soils. However, the quality of the DNA did not vary between the two soil samples.

**Key words:** environmental DNA, *Ananas comosus*, DNA quality (260/280 and 260/230), DNA concentration, microbiome analyses.



# 1 INTRODUCCIÓN

En la rizosfera del suelo se llevan a cabo gran cantidad de actividades bioquímicas por la presencia de las comunidades de microorganismos, modificando las propiedades físicas y químicas de este. Desde el punto de vista agronómico, cuando estos microorganismos son benéficos, mejoran las condiciones del suelo, sin embargo, ocurre de manera contraria cuando son patógenos y dañan las condiciones del suelo o afecta negativamente las plantas (Martínez-Escudero *et al.* 2018).

La productividad de los cultivos tiene una relación directa con la biodiversidad microbiana de los suelos, ya que estos interactúan con la planta aportando beneficios o de manera contraria perjudicándola (Wakelin *et al.* 2016). De aquí la importancia de conocer dicha biodiversidad presente en el suelo para visualizar la productividad esperada. Actualmente se están desarrollando investigaciones para analizar los microbiomas y así lograr la identificación de los microorganismos presentes y su acción en el suelo (Cadena *et al.* 2016). El conjunto de las comunidades genéticas (genes y metabolitos) de los microorganismos se les llama microbiomas, generalmente los estudios de estos microbiomas permiten conocer el estado de sanidad de un individuo vivo (Fundación Instituto Roche, 2018). Hoy en día se utilizan los análisis de microbiomas como técnica para buscar información de la biodiversidad del ambiente, específicamente el suelo, ya que utilizando las técnicas tradicionales como: 1) aislamiento y cultivo de microorganismos, 2) microscopía, o 3) caracterización biológica, resultan poco eficientes para este tipo de investigación (Cadena *et al.* 2016). Una de las técnicas utilizada para la secuenciación de ADN para caracterizar la biodiversidad ambiental es la del “metabarcoding”, que es la generación de códigos de barras generados de las secuencias de ADN para la identificación de especies (Dopheide *et al.* 2018). El ADN obtenido de una muestra del ambiente ya sea (suelo, agua, heces, entre otras) se le denomina ADN ambiental (eADN), y generalmente es utilizado en estudios para identificar los taxones presentes en este ambiente (Amador-Huerta 2020).

Por lo tanto, para conocer la identidad de la biodiversidad del suelo, es necesario una previa extracción del ADN ambiental. Esto permite analizar mediante secuenciación de las regiones ITS y 16S, la composición de microbiomas (Tanase *et al.* 2015).

El método de extracción del ADN está relacionado directamente con el rendimiento, y calidad de este y su posibilidad de análisis del microbioma. La cantidad (concentración) y los rangos de calidad del ADN extraído son parámetros fundamentales para obtener representatividad y abundancia de las especies de microorganismos presentes. Sin embargo, los suelos representan uno de los sustratos con mayor dificultad para la extracción del ADN debido a la variabilidad de componentes presentes en el mismo, tales como partículas contaminantes, materia orgánica, ácidos húmicos y composición mineral, así como también los diferentes espacios que componen el suelo (agua y aire) (Dopheide *et al.* 2018).

## 1.1 Justificación

El cultivo de piña (*Ananas comosus*) se ha caracterizado por ser una fruta de exportación en grandes volúmenes de producción y comercialización. En Costa Rica su producción representa un 33% de las exportaciones del sector agrícola (PROCOMER 2017). A pesar de su importancia en la economía del país, no se ha desarrollado investigación en tecnologías relacionadas al área de la biología molecular, específicamente en la secuenciación del ADN de los microorganismos existentes en el suelo, su análisis, identificación y clasificación de microbiomas, con miras a encontrar aquellos que pueden ser patógenos o benéficos para el cultivo.

Con la implementación de estas investigaciones, se lograría optimizar las prácticas convencionales que se realizan en los cultivos, i.e. manejo fitosanitario (Cadena *et al.* 2016) ya que debido a la expansión e intensificación del cultivo de piña para cumplir con la demanda internacional, la producción de este cultivo se ha visto comprometida a la utilización de un alto uso de agroquímicos afectando la presencia y abundancia de los microorganismos del suelo, tanto patógenos como benéficos, disminuyendo así la diversidad en el recurso suelo (Montiel 2015).

En la actualidad varias instituciones a nivel nacional, como la Universidad de Costa Rica (UCR), Universidad Nacional (UNA) y el Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC) están desarrollando investigaciones para determinar la presencia de agroquímicos en el suelo y la reducción en el uso de estos como alternativas más sostenibles (UCR 2018). Sin embargo, es necesario incursionar en el desarrollo de investigaciones de microbiomas en el cultivo de piña, ya que no hay suficientes estudios, a pesar de la importancia que amerita identificar estos taxones. Algunos taxones podrían involucrar microorganismos benéficos que contribuyan al desarrollo óptimo de las plantas con el fin de obtener mejores rendimientos, ó bien patógenos que generan efectos contrarios a estos microorganismos benéficos y causando enfermedades al cultivo (Cano 2011).

## **1.2 Objetivo General**

Proponer un protocolo para la extracción de ADN ambiental a partir de muestras de suelo del cultivo de piña (*Ananas comosus*) para el análisis de microbiomas.

## **1.3 Objetivos Específicos**

- Evaluar tres métodos de extracción de ADN ambiental (Kit comercial y dos protocolos modificados) que permitan lograr un adecuado análisis de microbiomas.
- Evaluar métodos para la conservación de las muestras del suelo, previas a la extracción de ADN ambiental.
- Comparar la calidad y cantidad del ADN ambiental extraído, según el uso del suelo (bosque versus plantación).

## 2 REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Rizosfera

En cada estrato del suelo (líquido, gaseoso y matriz mineral y orgánica) se generan diferentes microambientes. La presencia de los microorganismos y los procesos llevados a cabo se dan en la matriz mineral y orgánica del suelo, dependen de las características físicas que este posea, entre ellas: tamaño de partículas, materia orgánica, tipo de agregados del suelo, disponibilidad de agua, oxígeno, composición de arena, limo y arcilla (Soria 2016).

Uno de los estratos más importantes del suelo es la rizosfera, ya que es la parte del suelo donde se lleva a cabo todas las interacciones entre raíces y las plantas. Además, se da el desarrollo, crecimiento de microorganismos y sus dinámicas como lo son la nutrición mineral y el intercambio catiónico (Reyes 2011).

### 2.2 Usos de suelo

Rodríguez-Eraso *et al.* (2010) definen como uso de suelo “al conjunto de actividades que ejerce el ser humano sobre el suelo con fines económicos y sociales”. En relación con esto Trujillo-González *et al.* (2018) mencionan un análisis de las funciones y la capacidad del uso del suelo, en donde lo define como aquellas capacidades que tiene un suelo tanto cualitativas como cuantitativas en función a las actividades productivas por el ser humano o ya sea relacionado con la conservación de la biodiversidad, sostenibilidad y calidad ambiental.

#### 2.2.1 Suelo de bosque

Los suelos de bosque son caracterizados por sus altos porcentajes de biodiversidad, y la dinámica de nutrientes por la considerable biomasa microbiana presente en este, sin embargo, esa biodiversidad se ha visto perjudicada por deforestación, pastoreo, excesivo, y cambios en el uso de suelos (Cruz-Ruiz *et al.* 2012).

Se estima que en los bosques del mundo un 44% del carbono de los ecosistemas se encuentra presente en los suelos como principal reservorio. Esta característica le permite al suelo la capacidad y calidad de ser fuente y almacenamiento de nutrientes (Galicia *et al.* 2016). Campitelli *et al.* (2010) también menciona que la presencia de materia orgánica en suelos representa uno de los principales indicadores de calidad y productividad de estos.

Cruz-Ruiz *et al.* (2012) mencionan en su comparación de caracterización de suelos de bosque, cultivo y pradera; que los suelos de bosque poseen un pH mayor (6.4), mayor porcentaje de materia orgánica, mayor retención de agua y capacidad de intercambio catiónica y otras características edáficas que le permite a los suelos de bosque ser más ricos en calidad.

### **2.2.2 Suelo de plantaciones**

Actualmente los sistemas de producción agrícolas se caracterizan por poseer manejos intensivos para aumentar la productividad y los rendimientos del cultivo. Sin embargo, el suelo es el principal factor afectado, ya que estos manejos implican la preparación excesiva del terreno mediante arados y rastras, además de la aplicación de agroquímicos al cultivo y al suelo ocasionando pérdida de la diversidad de la microbiota y microbioma (Jaurixje *et al.* 2013). Otro de los factores que afecta la intensidad del uso del suelo es la sustracción de nutrientes del suelo ya que alteran el equilibrio de estos y disminuye su fertilidad. Debido a lo anterior, hoy en día se están implementando prácticas de manejo y uso de los nutrientes suelo sosteniblemente para la conservación de la fertilidad del suelo (Cerón *et al.* 2012).

La fertilización en los cultivos se ha considerado una práctica de vital importancia para aumentar los rendimientos de este, sin embargo, también puede generar variaciones en las comunidades microbianas del suelo, como consecuencia cambios en las interacciones suelo-microorganismos-plantas (Ling *et al.* 2016).

Cruz-Ruiz *et al.* (2012) caracterizan a los suelos de cultivos como bajos en materia orgánica consecuencia de la fertilización, además de baja proporciones de Mg, Ca y K y porcentajes de N y C en comparación a los suelos de bosque. Ling *et al.* (2016)

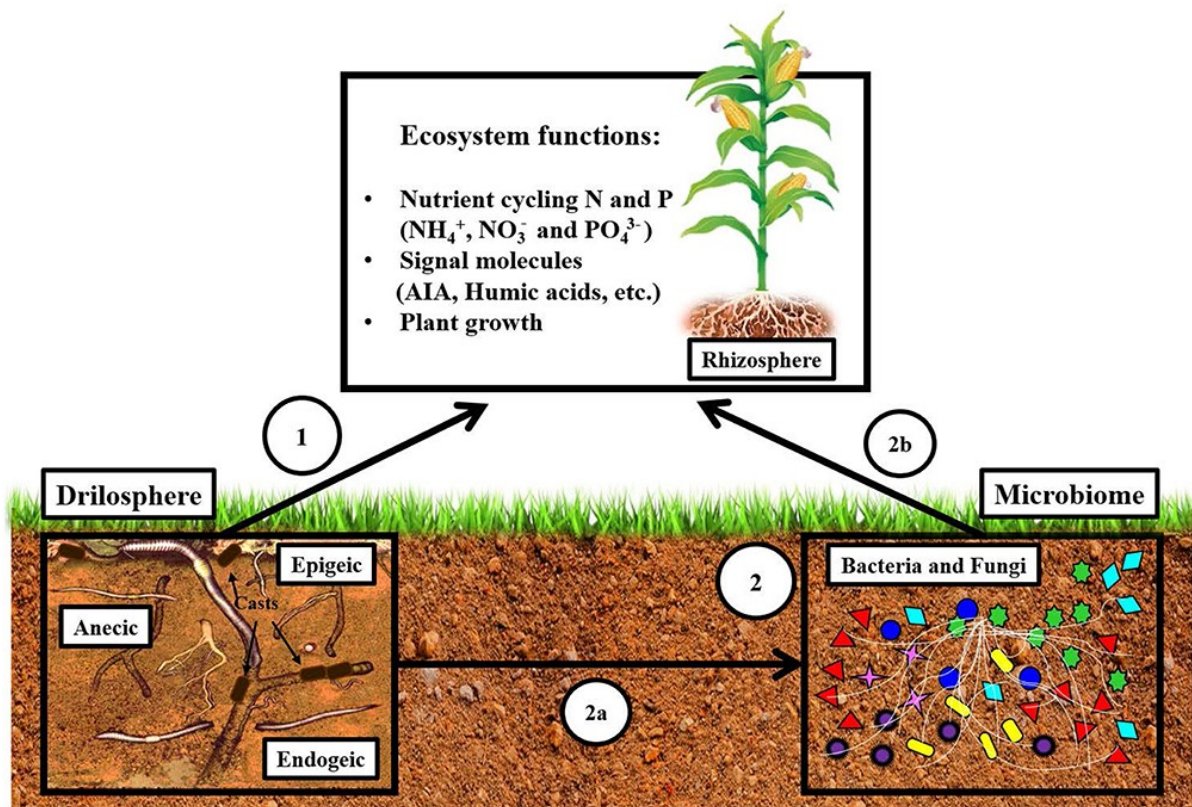
menciona que los suelos que son manejados con fertilización química, estos tienden a variar sus características fisicoquímicas entre ellas la acidez, el pH disminuye y como consecuencia también disminuye la actividad y diversidad microbiana en los suelos.

### 2.3 Microorganismos del suelo

La presencia de comunidades microbianas en el suelo corresponde a la parte orgánica del mismo. Dicha sección tiene una directa relación con la fertilidad, estructura y demás características físicas, químicas y biológicas del mismo, así como, la presencia y desarrollo de plantas (Armado *et al.* 2009). La presencia de microorganismos del suelo permite que se lleven a cabo varias de estas reacciones bioquímicas, como, por ejemplo: la nitrificación, desnitrificación, oxidación, reducción, entre otros (García de Salamore 2011). En el suelo se dan las dinámicas bioquímicas de varios nutrientes entre ellos el carbono, el nitrógeno y el fósforo por medio de su interacción con el ambiente.

Soria (2016) y Illarze *et al.* (2017) mencionan los beneficios de la presencia de microorganismos en el suelo, como aportadores de nutrientes (**Figura 1**). El ciclado de compuestos químicos a través de la nitrificación, desnitrificación, oxidación, reducción entre otros, descomposición de elementos no disponibles para las plantas a elementos disponibles y de fácil absorción a través de sus raíces como lo es el fósforo. Un ejemplo son los hongos micorrícicos arbusculares (HMA), encargados de tomar todo el fósforo presente alrededor de la planta que, en conjunto con los hongos solubilizadores, lo hacen soluble en forma de  $\text{HPO}_4^{-2}$  y  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (Velázquez *et al.* 2017).

La existencia de los microorganismos en la rizosfera no solamente se ve reflejado en la resistencia de las plantas a las condiciones adversas, sino también en la estructura de las partículas del suelo y en su fertilidad que permiten un buen desarrollo y rendimiento de las plantas, gracias al mutualismos de algunos de estos microorganismos (micorrizas) con las raíces de las plantas generando la producción de nutrientes (Freile-Almeida *et al.* 2018).



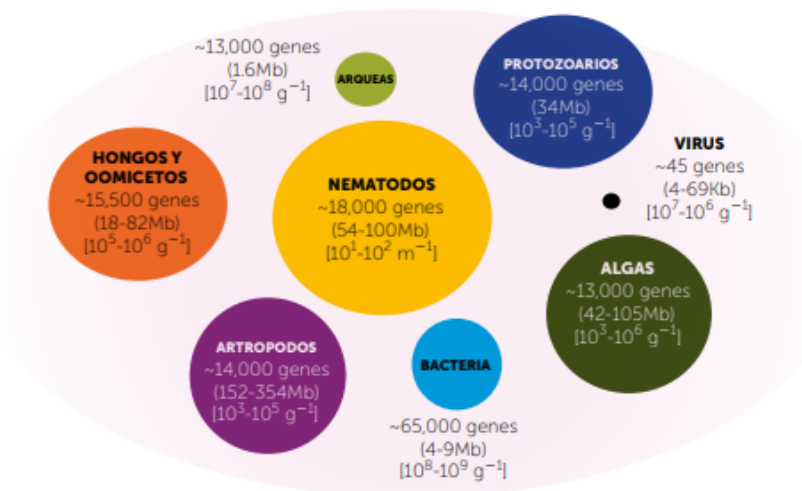
**Figura 1.** Interacción de los microorganismos con las plantas y el suelo. Fuente: Medina-Sauza *et al.* (2019).

## 2.4 Microbiomas

El término microbioma se refiere al conjunto de genes y metabolitos presentes en un hábitat determinado (Cantón *et al.* 2018). Laboratorios de investigación a nivel mundial realizan estudios sobre la biodiversidad de microorganismos del suelo desde su genética y metabolismo (microbioma), con el objetivo de entender su relación con la salud de las plantas y como beneficia o perjudica la productividad de estas (Erice *et al.* 2019). Los microorganismos generalmente se relacionan con los estados patológicos presentes en las plantas (Cantón *et al.* 2018). Sin embargo, se ha demostrado mediante investigaciones que los microorganismos benéficos del suelo tienen el potencial de mejorar las condiciones de este (Erice *et al.* 2019). Actualmente se está trabajando en lo que es la identificación y clasificación de estos microbiomas para formar librerías de estos taxones y que puedan ser utilizados por su posible beneficio que proporcionan a los suelos y plantas (Cadena *et al.* 2016).



La diversidad y distribución del microbioma está relacionada con las condiciones de la planta, entre ellas el genotipo, edad, profundidad de las raíces, etapa fenológica y algunos aspectos abióticos condiciones ambientales y manejo del suelo (Barbero e Hidalgo 2017). Por ejemplo, como lo muestra la **Figura 2** existe gran variedad de microorganismos en el suelo y en diferentes localidades de las plantas entre ellos, virus, bacterias, hongos, nemátodos, algas entre otros, dependiendo de las condiciones climáticas requeridas para su hábitat (Cadena *et al.* 2016). Todos estos microorganismos de la **Figura 2** están presentes en su mayoría en el suelo de las plantas, en donde aprovechan los exudados generados por estas y además participan en el ciclado de nutrientes del suelo y que esté de forma disponible para la absorción de las plantas (**Figura 1**) (Cadena *et al.* 2016; Freile-Almeida *et al.* 2018).



**Figura 2.** Promedio del número de genes en genomas de especies representativas de acuerdo con cada grupo de organismo. En los paréntesis se indica el tamaño de cada genoma y en los corchetes la abundancia de cada microorganismo. Fuente: Cadena *et al.* (2016).

## 2.5 Análisis de microbiomas

La aplicación de técnicas moleculares es fundamental para comprender el comportamiento, calidad y cantidad de las comunidades microbianas presentes en el suelo (Cadena *et al.* 2016). Previamente a estos análisis es necesario estandarizar el método de recolección de la muestra, conservación y extracción o aislamiento del ADN ambiental (Tanase *et al.* 2015).

La caracterización de microbiomas con técnicas moleculares es diferente a los métodos convencionales de caracterización, debido al pequeño tamaño de las moléculas del ADN y/o ARN se requieren equipos de laboratorio y métodos especializados para su amplificación y secuenciación (Cadena *et al.* 2016). Actualmente se estudian diferentes métodos para el análisis de microbiomas, uno de ellos es el mencionado por Hernández-León *et al.* (2010), que se basa en coleccionar la muestra de suelo, aislar el ADN ambiental, amplificar ese ADN por medio de técnicas como lo es el PCR y por último la secuenciación de este para construcción de librerías de microbiomas. Se reporta que uno de los primeros estudios de construcción de librerías metagenómicas fue realizado en el año 1999 (Hernández-León *et al.* 2010).

Los microbiomas son más que genes en el suelo. Pedraza *et al.* (2010) mencionan que se están desarrollando investigaciones que promueven la caracterización de la diversidad genética y bioquímica presente en los microorganismos del suelo, esto con el objetivo de determinar sus interacciones con la rizosfera y los beneficios que aportan.

### **2.5.1 Recolección del suelo**

Para los análisis de las comunidades de microorganismos del suelo se debe recolectar muestras que sean representativas de un área total que se desee someter a investigación. Durante la recolección de las muestras, se debe agregar información básica para su identificación como: Nombre de finca, localización, área muestreada, fecha, profundidad, entre otros. La profundidad recomendada para muestras superficiales es de 0 cm a 10 cm (INTA 2015). La profundidad, así como la distancia de la muestra de suelo, se ve reflejada en la actividad de los microorganismos cercanos o no a las raíces. Se ha demostrado que existe interacciones interespecíficas e intraespecíficas entre las raíces de las plantas, el suelo y los microorganismos presentes en este (Pedraza *et al.* 2010).

Específicamente para el cultivo de piña (*Ananas comosus*), Guzmán-Hernández *et al.* (2013) mencionan una profundidad recomendada de 20 cm para la extracción de muestras de suelo a nivel radical del cultivo. Esta profundidad está relacionada con la presencia de microorganismos del suelo, ya que en los primeros 30 cm de

profundidad de una hectárea de tierra puede contener 25 toneladas de microorganismos (Loaiza 2010).

### **2.5.2 Conservación del suelo**

Esta etapa es fundamental para el análisis de microbiomas, ya que conservar de manera correcta las muestras de suelo permite una estabilidad en la composición del ADN de las comunidades microbianas en un momento y condición determinada. Los métodos de conservación más utilizados son: 1) en frío y 2) alcohol (Sun *et al.* 2019).

Según Vargas (2010) la conservación del ADN en frío va a disminuir el riesgo de contaminación y proliferación bacteriana y fúngica en las muestras para el análisis. Hleap *et al.* (2009) mencionan que los mejores métodos de conservación de muestras previas a la extracción del ADN ambiental son en crioconservación (nitrógeno líquido) o utilizando etanol a temperaturas menores a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , cuando se desea hacer muestreos rápidos, de lo contrario si los muestreos en campo requieren de más tiempo estos métodos no son factibles.

El almacenamiento de ADN en frío ha sido muy utilizado en los métodos de extracción de este, con temperaturas de conservación de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sin embargo, cambios drásticos de estas temperaturas como congelamientos y descongelamientos durante el protocolo de extracción de ADN puede provocar pérdidas de calidad, cantidad e integridad, así como también periodos largos de almacenamiento generando fragmentación de las secuencias más largas del ADN (Duque-Ortiz *et al.* 2017).

Alejos *et al.* (2014) mencionan una ventaja de la conservación del ADN en alcohol relacionado con la estructura de este. La presencia de fosfatos en la estructura del ADN va a generar una repulsión entre ellos, permitiendo su disolución en soluciones acuosas, formando una capa hidratante a su alrededor. Por lo tanto, la conservación del ADN en alcohol va a facilitar la ruptura de esa capa hidratante dejando los grupos fosfatos expuestos, facilitando su unión con los iones  $\text{Ca}^{+}$  para neutralizar las cargas y permitiendo que el ADN se precipite en la solución y así facilitar su extracción.

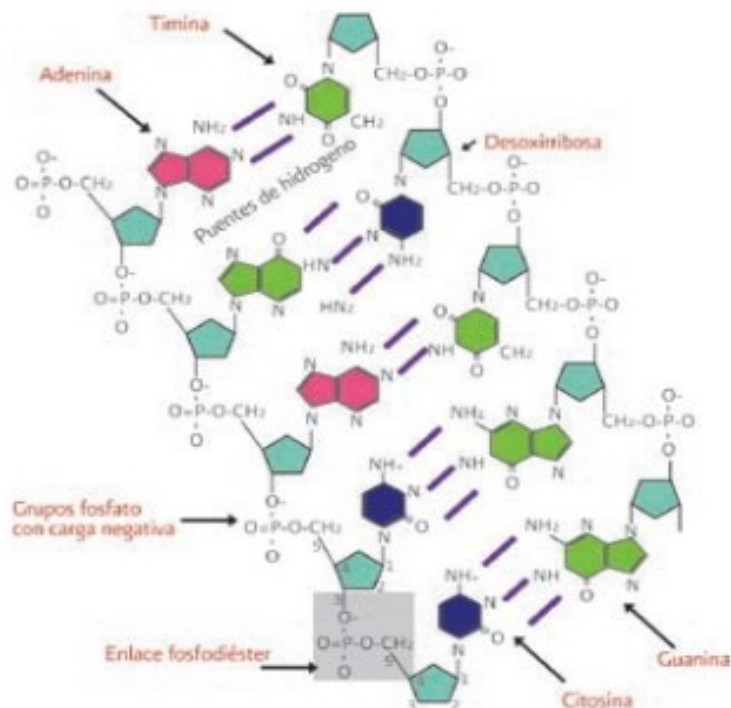
Se ha reportado que la conservación en alcohol es más eficiente que en congelamiento cuando se trata de muestras de insectos, de manera contraria cuando se trata de las demás muestras biológicas. Aunque ambos métodos de conservación funcionen similares en cuanto a la inactivación de endonucleasas, el método de conservación a temperaturas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  se obtiene ADN de mayor concentración y amplificación en PCR (Castaño-Sepúlveda *et al.* 2011).

### 2.5.3 Extracción del ADN

La extracción o aislamiento del ADN suele ser uno de los métodos de mayor cuidado en un protocolo de análisis de microbiomas, debido a que el suelo no solamente está conformado de microorganismos sino también de partículas, contaminantes y otros que dificultan este procedimiento. El método de extracción de ADN debe caracterizarse por ser rápido, simple y además que logre cantidad y calidad, es decir, que este tenga alta concentración y pureza de ácidos nucleicos (Tanase *et al.* 2015).

Uno de los principales retos en los métodos de extracción del ADN es lograr la separación únicamente este con respecto a los contaminantes de la solución como lo son polisacáridos, fenoles y proteínas. Éstos compuestos oxidados se enlazan covalentemente con la estructura del ácido desoxirribonucleico (

**Figura 3)** e imposibilitan su purificación para posteriores estudios como amplificación o secuenciación de este (Cerdeira-Granados y Díaz 2013). Antes de considerar la extracción del ADN es importante conocer su estructura química para identificar cuales reactivos funcionan para su aislamiento y conservación de este durante el proceso.



**Figura 3.** Estructura helicoidal del ADN, unión de las cadenas por los puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas. El ADN presenta un grupo fosfato, con carga negativa que le da la propiedad hidrofílica. Fuente: Alejos *et al.* (2014).

Dentro de las limitaciones que se encuentran para la obtención de ADN proveniente del suelo están la calidad y cantidad necesarios para el análisis de este, además del tiempo que tarda en extraer el ADN (Alejos *et al.* 2014). Una adecuada extracción del ADN permite la disminución de inconsistencias al momento de realizar los análisis de microbiomas afectando directamente a los resultados esperados (Ríos-Sánchez *et al.* 2016). Incluso se ha reportado que el método de extracción de ADN representa uno de los factores que más influyen en la estimación de la biodiversidad de diferentes taxones presentes en el suelo (Dopheide *et al.* 2018).

Actualmente existen diversos kits comerciales en el mercado para la extracción del ADN que facilita y acorta el tiempo del procedimiento. No obstante, existen protocolos para la extracción del ADN que utilizan reactivos como es el Fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico (PCI) entre otros compuestos orgánicos que requieren más tiempo y se caracterizan por su toxicidad. (Ríos-Sánchez *et al.* 2016).

Una de las principales limitantes de los protocolos de extracción de ADN es que no todos son reproducibles según el tipo de muestra y además de la complejidad que requiere aislar el ADN de los compuestos orgánicos (proteínas, lípidos, fenoles, polisacáridos) presentes en la estructura celular (Cerde-Granados y Díaz 2013).

### 2.5.3.1 Reactivos de extracción

En los protocolos de extracción de ADN se utilizan gran variedad de compuestos orgánicos, cada uno con una función específica para lograr obtener un ADN de calidad y cantidad óptima (**Cuadro 1**)

**Cuadro 1.** Características y funciones de los reactivos utilizados en la extracción de ADN. Fuente: Rocha- Salvatierra (2002).

Reactivo	Característica	Función
Tris (Hidroximetil amino metano)	Buffer biológico	Estabilizador de pH
EDTA	Agente quelatante	Atrapar los iones Mg de la solución, evitando la acción de enzimas degradadoras del ADN
Acetato de sodio	Sal	Precipitar el ADN
PCI	Solvente orgánico Tóxico	Desnaturalizar proteínas
Cloroformo-alcohol-isoamílico	Solvente orgánico, tóxico	Desnaturalizar proteínas, remover lípidos y Solubilizar fenoles
SDS	Detergente aniónico	Solubilizar proteínas y membranas
CTAB	Sal	Solubilizar polisacáridos
Etanol	Alcohol	Precipitar el ADN
Isopropanol	Alcohol	Precipitar el ADN

Debido a ello, un protocolo básico de extracción del ADN requiere de varias etapas. La primera etapa consiste en una lisis celular en donde se coloca la muestra con un buffer de extracción (solución con sales, componentes quelatantes, caotrópicos e inhibidores de enzimas degradadoras de la membrana celular) y el SDS, los cuales permiten la ruptura de la membrana celular dejando libre los ácidos nucleicos. El SDS es un detergente que tiene como función disolver la membrana e inactivar la interacción del ADN con otros componentes como enzimas que podrían dañar la integridad. Otro componente importante en la extracción es el agente quelatante EDTA que interactúa con los iones  $Mg^{2+}$  e inactiva la acción de las enzimas que degradan el ADN (DNasas) (Alejos *et al.* 2014). Payarés y Mancilla (2012) mencionan de la importancia de utilizar proteinasa K que inactiva las DNasas que degradan los ácidos nucleicos afectando la calidad del ADN. En función a esto Salazar- Montes *et al.* (2013) indican la eficacia de la inactivación de las nucleasas presentes en el ADN en la calidad de este, ya que estas por medio de su acción enzimática provocan fragmentación del ADN, limitando el proceso de amplificación.

Es importante que en esta etapa de la extracción se utilicen reactivos que tengan el potencial para romper el tejido y la membrana celular para liberar el contenido celular sin que dañe la calidad del ADN. Además del buffer de extracción y el SDS, se requiere la ayuda de un homogenizador mecánico que facilite la ruptura de estos tejidos (Salazar-Montes *et al.* 2013). Un aspecto fundamental al preparar el buffer de extracción es que se encuentre en un pH adecuado con el fin de evitar un cambio o degradación del ADN (Alvis-Arango *et al.* 2015). Un pH muy ácido (0 - 4) provoca la destrucción del ADN mientras que un pH (5 - 6) le confiere la característica de ser insoluble, por lo que un pH óptimo es de ocho para que sea soluble en las soluciones de sales presentes en el buffer de extracción (Rocha-Salvatierra 2002). Salazar-Montes *et al.* (2013) mencionan que el pH puede disminuir 0.2 a 0.3 unidades del índice en la cuantificación de la calidad del ADN (260/280) cuando se encuentra en un medio ácido, y de manera contraria, aumentan cuando se encuentran en medios básicos. Una sal que juega un papel importante en la estabilidad del pH es el Tris-HCl que es el encargado de dar el pH óptimo al buffer de extracción (Nava *et al.* 2015).

La segunda etapa en la extracción del ADN es el aislamiento de este, por lo tanto, se requiere de compuestos orgánicos que tengan la capacidad de separar las proteínas y lípidos del ADN con ayuda de la centrifugación y de la propiedad hidrofílica del ADN por la carga negativa del grupo fosfato en su estructura como se observa en la (

**Figura 3).** El cloroformo-alcohol-isoamílico es uno de los compuestos orgánicos encargados de separar el ADN de las proteínas por medio de la centrifugación, una vez que estos se hayan aislado del ADN este se purifica y se precipita con el etanol y el isopropanol durante la centrifugación (Dhaliwal 2013).

Se ha reportado que el fenol-cloroformo alcohol isoamílico tiene la capacidad de extraer el ADN en rangos óptimos de calidad y con una adecuada integridad en comparación de otros protocolos comerciales en los cuales no se utiliza el reactivo (López *et al.* 2014). Sin embargo, una característica perjudicial de utilizar este reactivo en los métodos de extracción de ADN, es lo dañino para la salud humana y para el ambiente, además de que al extraer ADN, deja residuos de fenoles en el mismo dificultando los análisis posteriores a la extracción como lo son la amplificación y la secuenciación (Rosero *et al.* 2010).

Una vez que las proteínas han sido separadas del ADN con la presencia del cloroformo-alcohol-isoamílico en la solución, se debe proceder a la separación del ADN de esa solución, por lo que se requiere la función de un alcohol en el medio, ya que en este el ADN se vuelve insoluble. El isopropanol actúa sobre los ácidos nucleicos dejando libre las cargas negativas de los fosfatos para que se adionen a las cargas positivas de los iones  $\text{Na}^+$  de las sales (acetato de sodio, cloruro de sodio o acetato de amonio) permitiendo su precipitación durante la centrifugación (Nava *et al.* 2015).

La centrifugación es un procedimiento fundamental en la extracción de ADN, esto porque permite la precipitación de proteínas y lípidos posterior a la separación del ADN. Por la propiedad hidrofílica del ADN, se facilita disolverse en medios acuosos las proteínas y lípidos en solventes orgánicos, por lo que por medio de la centrifuga, se logra la separación de ambas fases por diferencia de densidades (Alejos *et al.*



2014). Una vez que se hayan debilitado las fuerzas de repulsión de los polinucleótidos del ADN unidos a los iones  $\text{Na}^+$ , se favorece la precipitación de este por medio de la centrifugación (Nava *et al.* 2015).

### **2.5.3.2 Tiempos y Temperaturas de incubación en la extracción de ADN**

Las temperaturas juegan un papel fundamental tanto en la conservación del ADN como al momento de extracción de este. Ayala-Ramírez *et al.* (2013) mencionan que la temperatura puede influir en la calidad y estabilidad del ADN. Duque-Ortiz *et al.* (2017) mencionan en su estudio realizado que la temperatura y el tiempo de almacenamiento o incubación del ADN son unos de los principales factores que afectan la integridad, calidad y cantidad del ADN. Ambas variables en condiciones no optimas dañan el ADN fragmentándolo y dificultando su adecuado análisis e identificación.

Los procesos en donde la temperatura afecta la calidad e integridad del ADN son durante el congelamiento y descongelamiento, cuando la temperatura aumenta y la muestra de ADN se descongela, ocurriendo una degradación por las nucleasas (Ayala-Ramírez *et al.* 2013). Las nucleasas se encuentran dentro de las células de los seres vivos y son las encargadas de la degradación de los ácidos nucleicos, impidiendo que estos mantengan su integridad (Piedras-Montilla 2016).

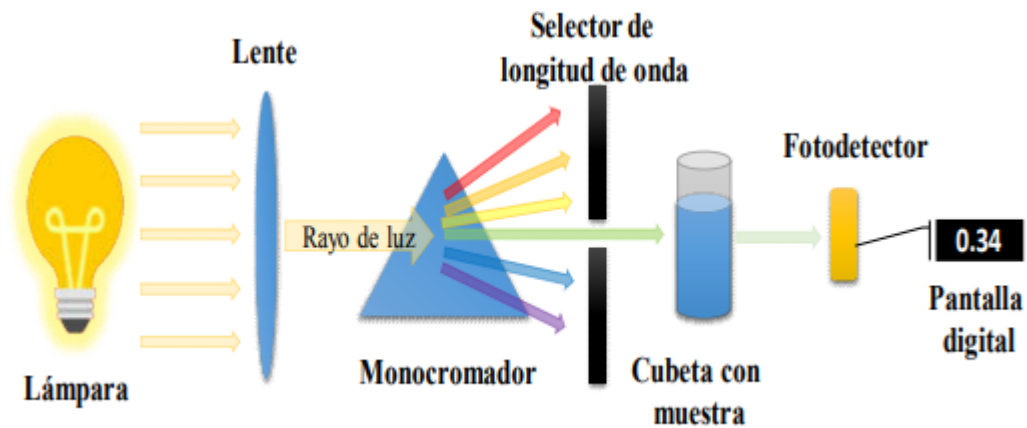
Duque-Ortiz *et al.* (2017) mencionan una alternativa para evitar la conservación en frío, y es almacenar el ADN deshidratado a temperatura ambiente, reduciendo la degradación por cambios de temperaturas y nucleasas, ya que estos son los principales factores de degradación en el ADN.

Los tiempos de incubación tienen un efecto en la concentración del ADN obtenido, sin embargo, no en la calidad del ADN. El tiempo idóneo de incubación en acetato de potasio que genera concentraciones más altas de ADN es de una hora, con respecto a tiempos menores o mayores de una hora. Sin embargo, el tiempo sí es un factor importante al momento de optimizar un protocolo de extracción de ADN ya que a menor tiempo de incubación para que el ADN se precipite, mayor cantidad de muestras se pueden procesar (Rosero *et al.* 2010).

#### 2.5.4 Cuantificación del ADN

Una vez que finaliza la etapa de extracción del ADN, se debe verificar su calidad y cantidad mediante una adecuada caracterización (Ríos-Sánchez *et al.* 2016). Mediante el uso de un espectrofotómetro, los parámetros para cuantificar el ADN son la concentración (ng/ $\mu$ l) y la calidad o pureza, que se estima con dos rangos: 1) 260/280 nm, que corresponde a la proporción de ácidos nucleicos y proteínas; y 2) 260/230 nm, que representa a la proporción ácidos nucleicos y polisacáridos y fenoles, respectivamente (Guzmán-Rodríguez *et al.* 2018).

La espectrofotometría es una técnica muy utilizada en el área de la biología molecular para la caracterización de la calidad y concentración del ADN (Cadena *et al.* 2015). La concentración del ADN generalmente se cuantifica en (ng/ $\mu$ l), mientras que la calidad se cuantifica por proporciones de ADN con otros contaminantes (proteínas, fenoles etc). Los rangos óptimos de la calidad del ADN son 1,8 para la relación de 260/280 nm respectivamente, 2 para la proporción 260/230(Cadena *et al.* 2016). La espectroscopia funciona bajo el fundamento de la Ley de Lambert Beer de absorbancia. En la **Figura 4** se muestra cuando una longitud de onda incide sobre un elemento y su radiación disminuye por la absorción de la longitud de onda por el elemento. Este principio se mide con el siguiente algoritmo:  $A = \log (I_0 / I)$ , donde  $A$ =absorbancia,  $I$ = Intensidad de radiación que emite la muestra y  $I_0$ = Intensidad de radiación que incide en la muestra (Rocha 2004).



**Figura 4.** Funcionamiento del espectrofotómetro por medio del principio de absorbancia. Fuente: García (2018).

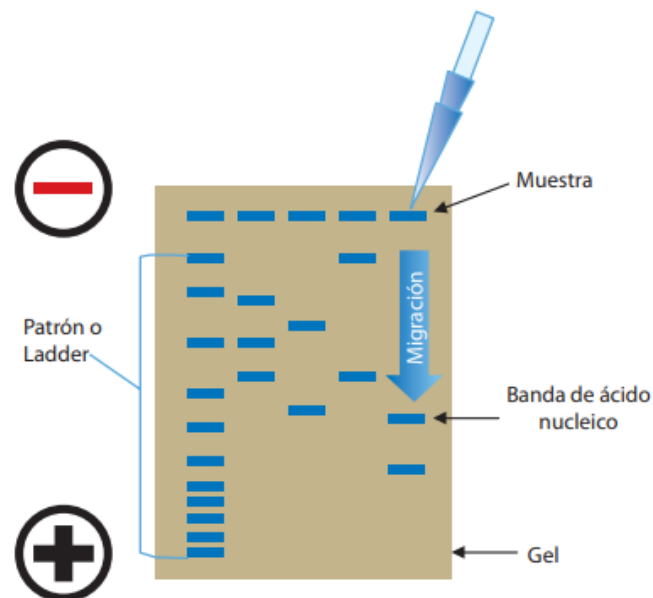
## 2.5.5 Caracterización del ADN

### 2.5.5.1 Electroforesis

La electroforesis es un método para determinar la integridad del ADN una vez que se haya cuantificado la calidad y cantidad por la espectrofotometría (Alejos *et al.* 2014). Esta metodología ha sido utilizada en muchos estudios relacionados al ADN, y por medio de esta, se logran separar fragmentos de ácidos nucleicos dependiendo según el tamaño de estos. Los mismos pueden ser visualizados por medio de una tinción en luz UV y posteriormente lograr seleccionar el ADN de interés en cuanto a calidad, cantidad e integridad para posteriores aplicaciones (Fierro-Fierro 2014).

Su funcionamiento se visualiza en la **Figura 5** y se basa en un campo de fuerzas eléctricas (cátodo y ánodo) en donde el ADN por su carga negativa va a moverse hacia la carga positiva, y los fragmentos de este van a migrar de acuerdo con su tamaño: los fragmentos pequeños se van a mover de manera más rápida, sucediendo lo contrario con los fragmentos más grandes (Fierro-Fierro 2014). Se utiliza una cámara de electroforesis que es donde se va a llevar a cabo el campo eléctrico generado en función a las fuerzas eléctricas y un buffer o solución amortiguadora que permite esa transmisión eléctrica, además, se utiliza un gel (agarosa o poliacrilamida) que funciona de soporte por su apariencia gelatinosa a temperatura ambiente, y formando una malla o microporos en donde el ADN del

marcador molecular (como punto de comparación de las muestras) van migrar de acuerdo a su peso molecular Salazar-Montes *et al.* (2013).



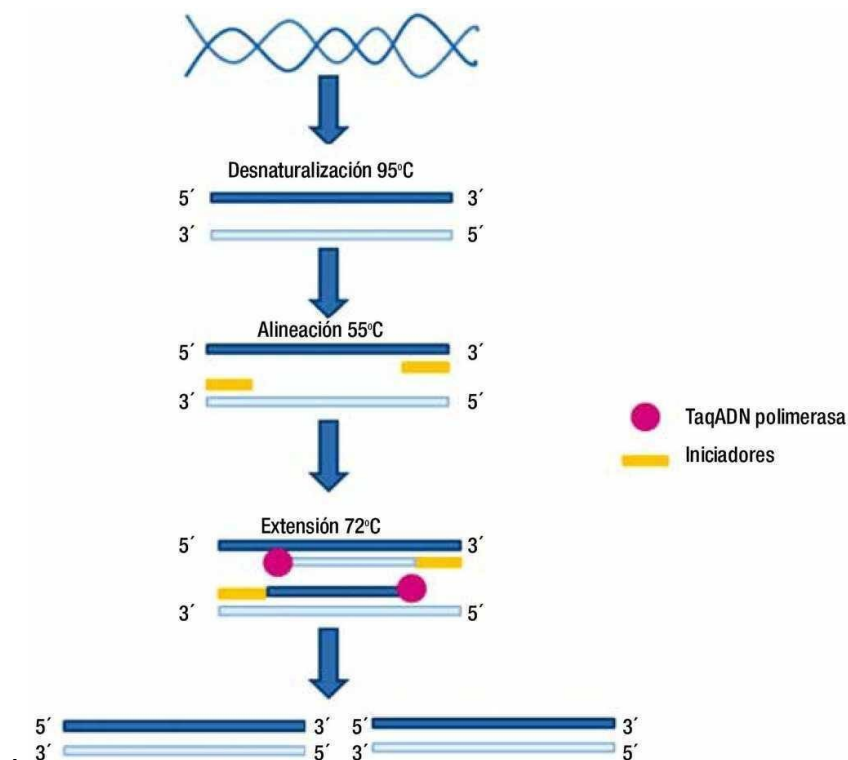
**Figura 5.** Ejemplo de la visualización de un análisis de electroforesis. Fuente: Salazar-Montes *et al.* (2013).

### 2.5.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica de biología molecular fue creada por el bioquímico estadounidense Kary Mullis en 1985, y consiste en la amplificación *in vitro* de secuencias específicas de ADN. Mullis se basó en el principio de la replicación del ADN de las eucariotas llevado a cabo por las enzimas ADN polimerasa, que llevan a cabo la síntesis en sentido 5´a 3´ (Mas *et al.* 2016).

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica que amplifica y detecta al mismo momento y funciona por medio de ciclos. Cada ciclo se divide en tres etapas: **Figura 6:** 1) la desnaturalización o desdoblamiento de la doble cadena de ADN a altas temperaturas (94 °C - 95 °C): la separación de las cadenas se da por el rompimiento de los puentes de hidrógeno del ADN; 2) la hibridación o alineación: sucede cuando los cebadores se agregan a las cadenas complementarias; para que ocurra esta etapa se requiere de temperaturas bajas a (50 °C - 70 °C) y ; 3) la extensión o elongación: se da a una temperatura de 72 °C y sucede cuando la enzima polimerasa copia la

secuencia del gen o cebador agregado hasta formar una nueva cadena de ADN (Ramírez-Pacheco *et al.* 2013).



**Figura 6.** Etapas de la amplificación del ADN por la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Fuente: Ramírez-Pacheco *et al.* (2013).

### 2.5.5.3 Secuenciación del ADN

La secuenciación del ADN es una técnica que consiste en determinar el orden de los nucleótidos en las moléculas de ADN. Gracias a la existencia de esta técnica se ha podido desarrollar los estudios filogenéticos para determinar la taxonomía de las especies por medio de su ADN (López de Heredia 2016).

Rojas-Domínguez (2018) mencionan la importancia de la secuenciación del ADN. Gracias a esta técnica, se ha logrado la identificación de más de 200 000 genomas que actualmente se encuentran guardadas en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information). Esta misma base de datos no solo posee gran cantidad de datos sino variedad de estos, por lo que se ha dividido en seis categorías (Literatura, salud, genomas, genes, proteínas y químicos), siendo así de gran aporte

en la investigación ya que permite el libre acceso a investigaciones (NCBI Resource Coordinators 2018).

Para lograr la secuenciación del ADN es necesario conocer la existencia de las regiones específicas del ácido desoxirribonucleico que permiten la identificación de los microorganismos (Valenzuela-González *et al.* 2015).

Existen diferentes métodos de secuenciación de ADN: 1) el método de secuenciación Sanger clásico que pertenece a la primera generación y se caracteriza por utilizar ddNTPs (didesoxinucleóticos trifosfato) ubicados en las terminaciones de la cadena de ADN. De manera que cuando se realiza el análisis de la muestra esta se divide en cuatro reacciones por separado de secuenciación conteniendo los cuatro desoxinucleótidos estándar (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) además de una ADN polimerasa y por último la separación de los fragmentos por electroforesis en gel (Rojas-Domínguez 2018). Otro método de secuenciación de primera generación corresponde a: 2) secuenciación de Sanger automatizado también considerado de primera generación, se elaboró con el fin de facilitar el procedimiento a menor costo, se mejoró con la implementación de terminadores fluorescentes (ddNTPs), la sustitución del ADN polimerasa por la Taq-polimerasa además de la separación de fragmentos por medio de electroforesis capilar en lugar de la electroforesis en gel (Rojas-Domínguez 2018).

Con la necesidad de disminuir el costo y aumentar los procesos a un menor tiempo, surgió la secuenciación de nueva generación, algunos ejemplos de estos son: 3) Roche Pirosecuenciador 454 bajo el principio de pirosecuenciamiento esta técnica de secuenciamiento se basa en una síntesis y se originó en el 2005, su funcionamiento se basa en que cada vez que un nucleótido se incorpora en la nueva cadena de ADN se libera un pirofosfato y es detectado por el secuenciador, la fragmentación del ADN se da al azar y luego cada fragmento secuenciado es amplificado por aparte. Por otra parte, como método de segunda generación también 4) Illumina/ Solexa GA funciona con el método de síntesis el principio de amplificación en un puente sobre una celda de flujo por último la secuenciación de los nucleótidos generados por terminación reversible. (Kchouk *et al.* 2017).

Actualmente se han desarrollado métodos de secuenciación de tercera generación que tienen la ventaja de secuencias genomas complejos, a bajo costo y de manera más rápida, un tipo de secuenciación de esta generación es la 5) técnica de nanoporos de Oxford que tiene la capacidad de secuenciar por medio de un nanoporo de proteína sintético, cuando el fragmento de ADN pasa por el poro, genera una corriente iónica que se registra en un gráfico para posteriormente ser interpretado para la identificación de la secuencia (Kchouk *et al.* 2017).

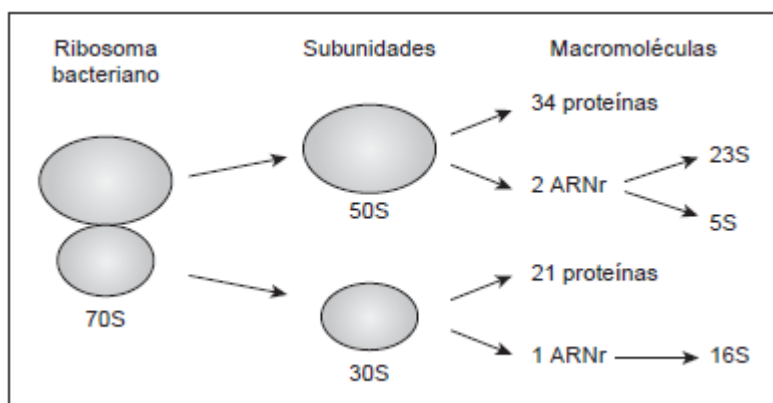
### a) Regiones 16 S:

Carl Woese de la Universidad de Illinois en la década de 1970 propuso la aplicación de la región 16S como cronómetro molecular. Esta macromolécula es utilizada en los estudios de filogenética y taxonomía para la identificación de organismos bacterianos (Rodicio y Mendoza 2004).

El gen 16S o también conocido como ADN ribosomal 16S, es un polirribonucleótico utilizado como marcador molecular por su característica de estar presente en todos los organismos conocidos y además por su larga permanencia en el tiempo, además, este gen posee nueve regiones conservadas que son útiles para la identificación de taxones, ya que a partir de esta se diseñan de iniciadores universales para la amplificación de regiones de ARNr (Valenzuela-González *et al.* 2015).

Rodicio y Mendoza (2004) mencionan que los análisis moleculares realizados a partir de la región codificada por el gen ARN 16 S han logrado sustituir otras técnicas de identificación convencionales por sus características de rapidez y precisión. Como se observa en la **Figura 7** esta macromolécula se encuentra presente en el ARNr de las subunidades del ribosoma bacteriano.

Aunque actualmente existe gran diversidad de marcadores moleculares para la identificación de microorganismos, el 16S se destaca por ser una macromolécula muy antigua que ha sido estudiada, generando una gama universal para la identificación de microorganismos. Además, su tamaño es de (1.500 nucleótidos) favoreciendo los análisis estadísticos por su disminución en errores (Valenzuela-González *et al.* 2015).



**Figura 7.** Esquema de la estructura de las subunidades y macromoléculas que componen el ribosoma bacteriano. Fuente: Rodicio y Mendoza (2004).

Actualmente el gen 16S ha sido utilizado en diversos estudios. Uno de ellos para la identificación de tres distintas especies de garrapatas, resultando muy útil para análisis filogenéticos a escalas moleculares; además, en este estudio también se logró obtener distancias interespecíficas e interespecíficas entre los genes analizados para obtener comparaciones, lo que resultó que el gen 16S presenta más sitios informativos variables en comparación a otros genes, también es útil en la separación de especies esto por su baja variabilidad genética intraespecífica (Paternina *et al.* 2016).

González-García *et al.* (2013) mencionan la aplicación de las regiones 16S en la identificación de bacterias (*Lactobacillus* spp). Estos microorganismos son de vital importancia en distintos tejidos del organismo humano, sin embargo, existen especies que no se pueden cultivar en el laboratorio mientras que otras sí son cultivables, estas últimas no se han logrado identificar por métodos convencionales. Es por eso por lo que las regiones 16S han permitido su adecuada identificación para la elaboración de árboles filogenéticos de los (*Lactobacillus* spp).

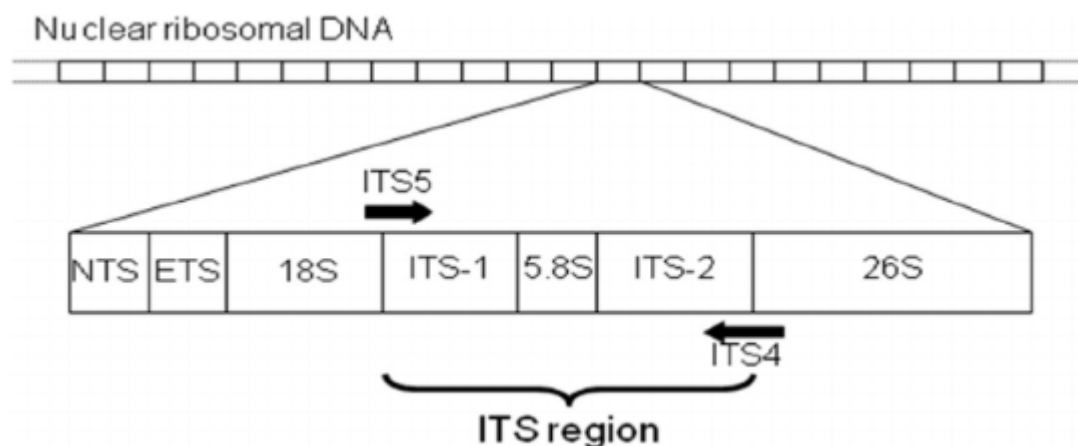
Ling *et al.* (2016), menciona en su estudio realizado en donde utiliza las regiones 16S de ADN extraído de suelos para comparar la diversidad y biomasa microbiana de dos suelos con distintos manejos, uno con enmienda orgánica y otro con fertilizantes químico.



## b) Regiones ITS:

Internal Transcribed Spacer (ITS, por sus siglas en inglés), corresponden a una región del ARN ribosomal que puede ser amplificado mediante PCR para identificar microorganismos (específicamente hongos), son también llamados marcadores moleculares (Shittu *et al.* 2016).

Estas regiones son importantes para la identificación taxonómica de especies de microorganismos. Son utilizados en el área de fitopatología para el diagnóstico molecular de especies que afectan a los cultivos (García 2006). Las regiones ITS se caracterizan por su facilidad de amplificar, su tamaño pequeño, alta capacidad de mutación y además de su función de espaciador para separar genes (18S, 28S, 5S y 5.8S) (**Figura 8**) (Avendaño-Sánchez *et al.* 2015).



**Figura 8.** Región del espaciador transcriptor interno ubicado en el ADN ribosomal.

Fuente: Hidayat *et al.* (2016).

Existen distintas aplicaciones de las regiones ITS, como por ejemplo en cultivos, industria, microbiología entre otras. Avendaño-Sánchez *et al.* (2015) trabajó en una de las aplicaciones de estas regiones ITS para determinar la similitud de la planta madre y su progenie en el maíz por medio de estos espaciadores ITS, obteniendo que las plantas provenientes de poliembrionía tenían 100% similitud de sus plantas madre, de manera contraria sucedió con las plantas dobles (dos plantas provenientes de una sola semilla) no presentaron similitud. Segura *et al.* (2010), menciona las aplicaciones

de estos genes en el sector de la industria alimentaria, por ejemplo, para el análisis de distintas cepas de levaduras utilizadas en el proceso de fermentación. De acuerdo con las investigaciones mencionadas anteriormente las regiones ITS son de gran utilidad como marcadores moleculares para la identificación de microorganismos, en hongos es donde existe mayor cantidad de investigaciones de estas regiones.

## **2.6 El cultivo de piña (*Ananas comosus*)**

El cultivo de piña (*Ananas comosus*) representa en Costa Rica uno de los cultivos de gran importancia por su acelerada expansión en el territorio nacional (Montiel 2015). CANAPEP (2016) menciona que anteriormente el cultivo de piña se destinaba únicamente para consumo local del país, sin embargo, a partir del año 2000, la producción se fue expandiendo con el objetivo de posicionarse en mercados internacionales por medio de las exportaciones. Actualmente, la piña ocupa el tercer lugar de las exportaciones a nivel nacional generando un total de \$941.5 millones por las exportaciones a Europa y América del Norte como sus principales clientes (UCR 2018).

La piña es un fruto tropical de gran importancia en el mercado nacional e internacional. Se empezó a cultivar en Costa Rica hace más de 50 años en la Zona Norte y Zona Sur del país. Su mercado fue inicialmente para el consumo nacional, pero con el paso del tiempo, el área cultivada se fue incrementando y creando así la oportunidad de exportación (Montiel 2015). Actualmente la producción se destina la exportación en su mayoría a países europeos y Estados Unidos, significando un 33% de las exportaciones agrícolas del país (PROCOMER 2017). A nivel nacional, la producción en el 2018 alcanzó una cifra de 989.56 millones de dólares en la exportación de fruta fresca. Además, este cultivo es importante no solamente por su venta a nivel internacional, sino por la generación de empleos en el país. PROCOMER (2017) reporta que el sector piñero genera 32 000 empleos directos, ya que existen 145 empresas exportadoras de piña y 58 plantas empacadoras de la fruta.

El cultivo de piña se ha caracterizado por ser un monocultivo enfocado en obtener altos rendimientos, ya que su principal manejo del suelo es intensivo, debido a esto se requiere un uso excesivo de aplicaciones de insecticidas, fungicidas y herbicidas

por la susceptibilidad del cultivo a plagas y enfermedades en el suelo provocando la degradación de este recurso, así como otros daños (Mogollón *et al.* 2015). Además de la degradación de suelo por aplicación de agroquímicos, se da también por la preparación excesiva de terreno antes de cada siembra ya que su cosecha se realiza de manera escalonada, generando problemas en el suelo como erosión, compactación, pérdida de la actividad microbiológica (Cubero y Sandí 2014).

A pesar de ello, el sistema de manejo del cultivo es diferenciado, con productores que presentan manejos convencionales, así como no convencionales. Por ejemplo, algunas instituciones públicas están incentivando a los productores de piña a implementar alternativas que ayuden a mitigar el uso de agroquímicos y sustituirlos por opciones sostenibles, con por ejemplo controladores biológicos y los microorganismos benéficos, que mejoran las condiciones del suelo y combaten las plagas y enfermedades (UCR 2018).

El cultivo de piña conocida como (*Ananas comosus* (L) pertenece a la familia Bromeliácea, originaria de América de clima tropicales. Las principales variedades que se comercializan en el país son La Criolla, Cayena Lisa y algunos cultivares como Champaka F-153 y MD2 (Quesada-Jiménez 2013). Además, la piña se caracteriza morfológicamente tener un hábito de crecimiento herbáceo y perenne. Posee un promedio altura promedio 1.5 m, con un tallo central compuesto de hojas envolventes lanceolados, rígidas y fibrosas, el número de estas puede variar (40-80) (Garcidueñas-Paz 2013). Quesada-Jiménez (2013) menciona que el sistema radicular de la piña es fibroso muy superficial no mayor a los 60 cm. La inflorescencia de la piña se desarrolla en el meristemo apical y puede tener de 50 a 200 flores individuales, el fruto es múltiple compuesto por muchos ovarios que cuando maduran conforman la parte comestible (Garcidueñas-Paz 2013).

La piña se desarrolla bajo las siguientes características edafoclimáticas: temperaturas entre 24 °C - 27 °C, precipitaciones entre 1200-2000 mm, suelos con texturas francos, permeables y con buena aireación, con pH entre 5-6 (Méndez-González 2010). Los principales suelos destinados a la producción de piña son los Ultisoles, son suelos viejos y meteorizados y representan el 21% de los suelos de

Costa Rica, se caracterizan por ser suelos ácidos, de baja fertilidad y con problemas de toxicidad de Al y Mn y, además, poseen baja acumulación de materia orgánica (Henríquez *et al.* 2014).

Las principales plagas que se desarrollan en los suelos del cultivo de piña son los caracoles (*Opeas pumilum* y *Ceciliodes aperta*), el nematodo *Meliodogyne* sp que son transmisores de virus, sífilidos (*Hanseniella unguiculata* (Hans), *Symphylella tenella* Scheller y *Scutigereella sakimurai*); algunas de las enfermedades del suelo de mayor importancia en este cultivo son (*Phytophthora* sp, *Erwinia* sp, *Fusarium* sp, *Pseudomonas* sp) que provocan daños en el sistema radicular de la planta de piña y como consecuencia dañando el fruto y su rendimiento (Quesada-Jiménez 2013).

No obstante, hay deficiencias en el reporte de investigaciones de secuenciación y análisis de microbiomas en el cultivo de piña que permitan identificar la presencia de taxones benéficos de microorganismos en el suelo de este cultivo para lograr disminuir el uso de agroquímicos a futuro.

### **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Ubicación**

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular perteneciente a la Escuela de Ciencias Naturales y Exactas del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Campus Tecnológico Local San Carlos, y en las fincas productoras de piña con dos usos de suelo (bosque y plantación) y con manejo convencional y manejo alternativo (mínima labranza, agroquímicos reducidos, aplicación de compost) ubicadas en la Zona Norte del país.

San Carlos presenta un clima tropical (estación seca y lluviosa), la estación seca va desde marzo a mayo y la lluviosa se prolonga desde mayo a enero o febrero. La temperatura promedio presente en esta zona es de 21,8 °C. La precipitación varía de 3000 a 3600 mm/año. Se caracteriza por ser una zona muy húmeda con un promedio de humedad relativa de 82,2% (IMN 2019).

#### **3.2 Periodo de Estudio**

El periodo de estudio se realizó durante los meses de abril a diciembre del 2019 y enero a marzo 2020. Los meses de abril-agosto 2019 se procedió a la recolección de muestras, agosto-diciembre 2019 se realizó pruebas de dos protocolos para extracción de ADN y se realizó algunas modificaciones de sus procedimientos. Por último, los meses enero y marzo 2020 se estandarizó el protocolo y se procesó las muestras de suelo extraídas de diferentes fincas con distintos usos de suelo (plantación y bosque) y distinto manejo.

#### **3.3 Material de estudio**

El material de estudio que se utilizó fue el suelo del cultivo de piña con dos usos de suelo (plantación y bosque) y con distintos manejos (convencional, mínima labranza, zona reforestada sin sotobosque, seis meses de plantación, cuatro meses de plantación, con compost, sin compost, plantación de teca, bosque inundable) provenientes de diez fincas de la Zona Norte (Piñas cultivadas CR, Piña Alegre SA, Las Brisas, Euclides Barrantes, Dagoberto Arias, Finca Dos, Upala Agrícola, Tierra

Fértil SA, Tremedal e Inversiones Yarinacocha). Por cada finca se utilizaron tres repeticiones de cada uso de suelo.

### 3.4 Variables

Las variables de clasificación utilizadas para la estandarización del protocolo fueron: volumen de buffer de extracción (en microlitros ( $\mu\text{l}$ )), volumen de SDS (en microlitros ( $\mu\text{l}$ )), volumen de Cloroformo-alcohol-isoamílico, volumen de PCI previo, volumen de PCI, tiempo de incubación (en minutos), tiempo de centrifugación (en minutos), temperatura de centrifugación (en grados Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ )), volumen de acetato de sodio 3 M y NaCl 5 M (en microlitros ( $\mu\text{l}$ )).

Las variables de respuesta utilizadas fueron: 1) concentración ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ), 2) calidad 260/280 nm (ácidos nucleicos y proteínas), y 3) calidad a 260/230 nm (ácidos nucleicos y polisacáridos y fenoles). Se utilizaron en la selección del método de conservación de muestras del suelo y la comparación de ADN ambiental según el uso de suelo.

### 3.5 Diseño de muestreo y modelo estadístico

La recolección de muestras de suelo se realizó bajo un diseño de muestreo simple al azar estratificado. Las variables de respuesta obtenidas en este muestreo se analizaron bajo el modelo matemático de un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial (Finca x Uso del suelo) para evaluar las variables de respuesta. El modelo estadístico para el análisis del ADN de bosque y plantación fue el siguiente:

$$Y_{i(j)} = \mu + F_i + U_j + (F*U)_{ij} + E_{i(j)}$$

**Donde:**

$Y_{ij}$  = Variable respuesta observada en la i-ésima finca del j-ésimo uso del suelo

$\mu$  = media general

$F_i$  = El efecto observado en la i-ésima finca

$U_j$  = El efecto observado en la j-ésimo uso del suelo

F\*U= Interacción Finca\* Uso de suelo

$E_{ij}$  = error aleatorio del i-ésima finca del j-ésima uso del suelo

Para los métodos de conservación de suelo se estableció un diseño completamente al azar (DCA), el modelo estadístico para el análisis de calidad y cantidad de ADN según método de conservación del suelo fue el siguiente:

$$Y_i = \mu + C_i + E_i$$

**Donde:**

$Y_i$  = Variable respuesta observada en la i-ésima tratamiento de conservación

$\mu$  = media general

$C_i$  = Efecto observado en el i-ésima tratamiento de conservación

$E_i$  = error aleatorio del i-ésima tratamiento de conservación

### 3.6 Análisis estadístico

Se utilizó el programa InfoStat/P (Di Rienzo *et al.* 2019) versión 2019 para el análisis estadístico. Para la selección del protocolo, se realizó medidas de dispersión (medias, límites de confianza inferior y superior y error estándar) los límites de confianza utilizados fueron al 95% esto para cada variable de clasificación (las modificaciones al protocolo) con el fin de estimar con cual tratamiento de cada procedimiento del protocolo se obtuvo mejor relación de calidad (260/280 y 260/230) y además mayor concentración (ng/ $\mu$ l).

Se realizó una comparación de medias mediante Modelos Lineales Generalizados (MLGM) y una prueba de comparación múltiple LSD-Fisher en los casos en los que se encontraron diferencias significativas, para la variable concentración (ng/ $\mu$ l), en los

métodos de conservación de suelo de la misma manera para los usos de suelo (bosque y plantación de piña) de cada finca, con un nivel de significancia de 0,05.

### 3.7 Materiales y Equipo

Para la realización del presente estudio fue requerido del siguiente equipo, materiales y reactivos.

- Bolsas
- Hieleras
- Frascos de vidrio
- Puntas para micropipetas
- Balines
- Tubos para centrifugar
- PCI
- Cloroformo-alcohol-isoamílico
- Isopropanol
- dodecilsulfato sódico (SDS)
- etanol al 96%
- EDTA
- Agua Ultra Pura (Grado Biología Molecular)
- Espectrofotómetro Thermo Scientific Nanodrop 8000
- Centrifuga eppendorf Mini Spin plus
- Vortex Scientific Industries Genie 2
- Congelador (-20 °C) Sanyo Biomedical Freezer y (-40 °C) Thermo Scientific EM 08211
- Refrigerador 4 °C Abarca Refrigeración Comercial
- Micropipetas Thermo Scientific Kit Finnpiette (0-10µl) (10-100 µl) (100-1000 µl)



### 3.8 Metodología utilizada en la estandarización del protocolo de extracción del ADN

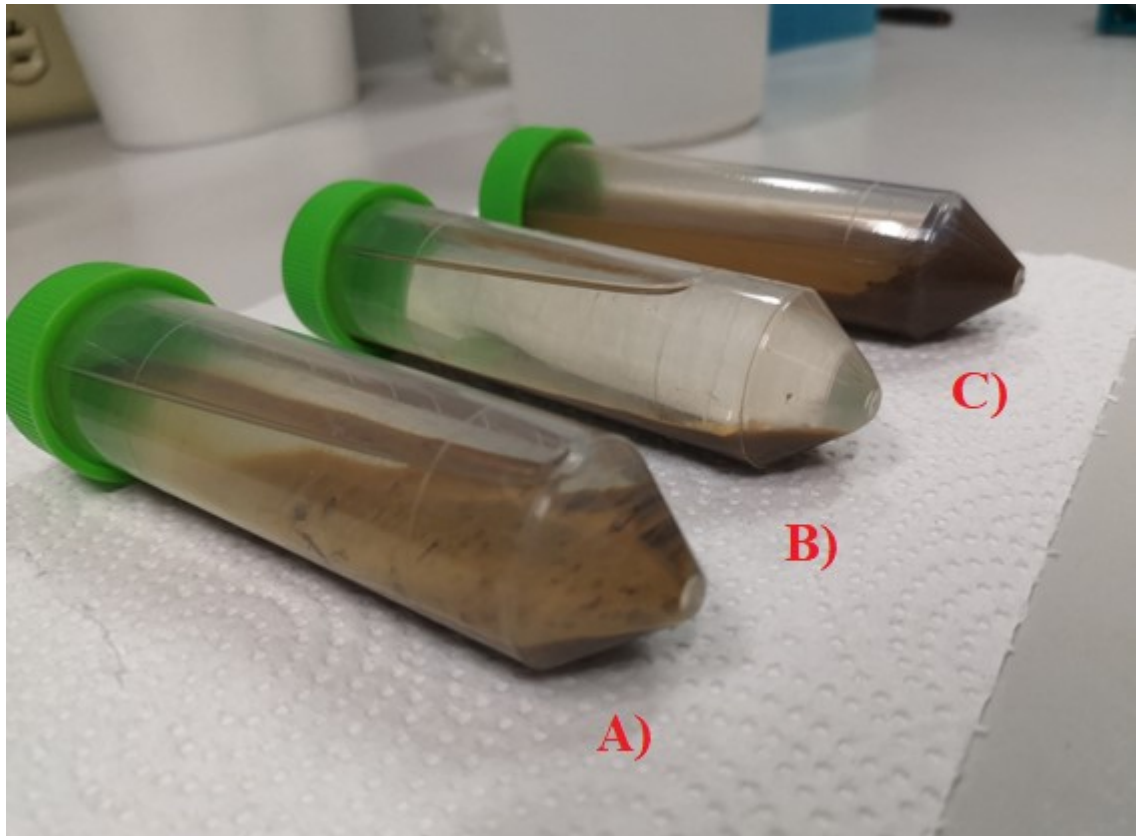
#### 3.8.1 Origen de las muestras del suelo

Las muestras fueron colectadas en el marco del proyecto (Análisis de comunidades biológicas de piña en la región Huetar Norte). Se colectaron tres repeticiones por cada uso de suelo en cada finca piñera. Cada repetición se tomó de tres diferentes puntos de muestreo cada uno de un kilogramo, estas fueron mezcladas y cuarteadas para obtener una submuestra de 200 g, sin ser manipuladas directamente con las manos para evitar contaminación. Durante la colecta de muestras las herramientas fueron limpiadas con agua y alcohol entre cada uso. En las siguientes 24 horas después de la colecta y fueron almacenadas inmediatamente, por último, las muestras se empacaron en bolsas, cada una rotulada, y se trasladaron en hieleras al Laboratorio de Biología Molecular, las mismas fueron almacenadas a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### 3.8.2 Conservación de las muestras del suelo

La misma muestra obtenida del suelo de piña fue conservada con dos métodos:

- En frío  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ : se colocaron las muestras en bolsas plásticas debidamente etiquetadas en una hielera con suficiente hielo para mantener el frío, una vez trasladadas al laboratorio de biología molecular se almacenaron en un congelador a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- En etanol al 96% a temperatura ambiente: se colocaron 20 g de suelo de piña dentro de Tubos de centrifuga de 50 ml con etanol al 96% (**Figura 9**) y fueron almacenadas dentro del laboratorio de biología molecular a temperatura ambiente ( $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).



**Figura 9.** Suelo de piña conservado en etanol al 96% a temperatura ambiente. La extracción de ADN se realizó de acuerdo con las fases a) únicamente el sedimento, 2) únicamente el etanol al 96% y 3) sedimento + etanol al 96%. Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020.

### 3.8.3 Estandarización del protocolo de extracción de ADN

En los primeros meses de estudio abril-agosto 2019 se realizaron extracciones de ADN utilizando el kit comercial DNeasy PowerSoil de la casa comercial Qiagen. Durante los meses de agosto-diciembre 2019 se realizaron distintas modificaciones en cada etapa de extracción a dos diferentes protocolos de extracción Tanase *et al.* (2015) y Verma *et al.* (2017). Finalmente se seleccionó el protocolo con el cual se logró extraer ADN con los rangos más cercanos al óptimo de calidad (1.8 para 260/280 y 2 para 260/320), y mayor cantidad de ADN > 300 (ng/μl). Los **Cuadro 2** **Cuadro 3** resumen las modificaciones empleadas.

**Cuadro 2.** Modificaciones realizadas al protocolo Tanase *et al.* 2015 para la estandarización de protocolo de extracción de ADN en suelo de piña (*Ananas comosus*). Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020.

Tratamientos del Buffer de extracción (µl)	Tratamientos del SDS(µl)	Combinaciones de tratamientos del Buffer de extracción, SDS y etapas del protocolo
300	300	0,75g S - 1 vol C - 0 vol PCI p -1vol PCI - 0 µl NaCl- 0 vol AS- 30 min TI- 10 TiC -15 °C TC
300	100	0,75g S - 1 vol C - 0 vol PCI p -1vol PCI - 0 µl NaCl- 0 vol AS- 30 min TI- 10 TiC-15 °C TC
600	0	0,75g S - 1 vol C - 0 vol PCI p -0,5vol PCI - 0 µl NaCl- 0 vol AS- 30 min TI- 10 TiC- 15 °C TC

S= Suelo, C=Cloroformo, PCI= Fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico, PCI p=PCI previo, NaCl=Cloruro de sodio, AS=Acetato de sodio, TI= Tiempo Incubación, TiC= Tiempo de Centrifuga, TC= Temperatura de Centrifuga, Vol= volumen, min= minutos, µl= microlitros, g=gramos.

En los **Cuadro 2** y **Cuadro 3** se muestra las modificaciones realizadas en las etapas de los protocolos, las variables de Buffer de extracción (µl) y SDS (µl) fueron en los que se utilizaron mayor cantidad de variaciones (tratamientos) en comparación a las demás etapas con las que se combinaron.

Las variaciones realizadas en las extracciones con el PCI fueron utilizando diferentes volúmenes (**Cuadro 2**) en diferente etapa de extracción: 1) en el buffer de extracción (PCI previo), 2) después del buffer de extracción antes de la adición de cloroformo alcohol-isoamílico. Las variaciones realizadas con el cloroformo-alcohol-isoamílico fueron con respecto al volumen, en proporción con el volumen del sobrenadante obtenido (**Cuadro 3**).

**Cuadro 3.** Modificaciones realizadas al protocolo Verma *et al.* 2017 para la estandarización de protocolo de extracción de ADN en suelo de piña (*Ananas comosus*). Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020.

Tratamientos del Buffer de extracción (µl)	Tratamientos del SDS(µl)	Combinaciones de tratamientos del Buffer de extracción, SDS y etapas del protocolo
600	200	0,75g S - 1 vol C - 0 vol PCI p -1vol PCI- 100 µl NaCl - 0.1 vol AS – 60 min TI – 15 min TiC – 4 °C TC
	300	0,75g S - 1 vol C -0 vol PCI p -1vol PCI - 0 µl NaCl - 0.1 vol AS- 60 min TI – 15 min TiC – 4 °C TC
750	250	0,5g S - 1 vol C - 0 vol PCI p -1-0 vol PCI - 0 µl NaCl – 0 vol AS- 30 min TI – 20 min TiC – 4 °C TC
	375	0,5g S - 1 vol C - 0 vol PCI p -1vol PCI - 100 µl NaCl – 0,1 vol AS- 60 min TI – 15 min TiC – 4 °C TC
250	125	0,25 g S - 1 vol C -0 vol PCI p -1-0 vol PCI – 0 µl NaCl – 0 vol AS- 30 min TI – 20 min TiC – 20 °C TC
	250	0,25 g S - 1 vol C -0 vol PCI p -0 vol PCI – 0 µl NaCl – 0 vol AS- 30 min TI – 20 min TiC – 20 °C TC
500	500	0,5 g S -1 vol C -0 – 0,125-0,25 vol PCI p -0 vol PCI – 0 µl NaCl – 0 vol AS- 30 min TI – 20 min TiC – 20 °C TC
	250	0,25 g S - 0 vol C -0 vol PCI p -0 vol PCI – 0 µl NaCl – 0 vol AS- 30 min TI – 20 min TiC – 20 °C TC
1000	50	0,5 g S - 1 vol C -0 vol PCI p -1 vol PCI – 0 µl NaCl – 0,1 vol AS- 60 min TI – 15 min TiC – 4 °C TC
	500	0,5 g S - 1-0,5-1,5 vol C -0 vol PCI p -1 vol PCI – 100 µl NaCl – 0,1 vol AS- 30 min TI – 20 min TiC – 4 °C TC

S= Suelo, C=Cloroformo, PCI= Fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico, PCI p=PCI previo, NaCl=Cloruro de sodio, AS=Acetato de sodio, TI= Tiempo Incubación, TiC= Tiempo de Centrifuga, TC= Temperatura de Centrifuga, Vol= volumen, min= minutos, µl= microlitros, g=gramos.

El buffer de extracción utilizado contenía los reactivos observados en el (**Cuadro 4**), lo que varió fueron los volúmenes en ( $\mu\text{l}$ ). De igual manera el SDS utilizado fue al 10% y los tratamientos fueron los diferentes volúmenes ( $\mu\text{l}$ ) (**Cuadro 3**).

**Cuadro 4.** Reactivos y cantidades requeridas para la elaboración del buffer de extracción de ADN. Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020. Fuente: Verma *et al.* (2017).

Reactivo	Concentración		Mol	g/l	g/250 ml
	Requerida	Unidad			
Tris-HCl	100	mM	0,1	15,76	3,94
EDTA	100	mM	0,1	37,23	9,31
Fosfato sodio (Monobásico)	100	mM	0,1	13,79	3,45
NaCl	1,5	M	1,5	87,67	21,92
CaCl <sub>2</sub>	100	mM	0,1	14,7	3,68

### 3.9 Cuantificación del ADN

Esta etapa del protocolo se realizó para verificar las dos variables de importancia en el ADN, la calidad y cantidad. Una vez que se obtuvo el precipitado de ADN, posterior a la extracción, se realizó una disolución con 50  $\mu\text{l}$  de Agua Ultra Pura. La cuantificación se realizó con un espectrofotómetro Nanodrop® y 2  $\mu\text{l}$  de la disolución de ADN, para cada muestra se registraron las ratios 260/280, 260/230 y la concentración (ng/ $\mu\text{l}$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Comparación de protocolos para extracción del ADN

Como lo muestra el **Cuadro 5** el protocolo Verma *et al.* 2017 modificado fue el que obtuvo mayores medias en concentración y los rangos de calidad más cercanos al óptimo en comparación con el kit Comercial y el protocolo de Tanase *et al.* 2015 modificado.

**Cuadro 5.** Comparación de las medidas de dispersión de la concentración y calidad del ADN extraído del suelo de piña, utilizando tres distintos protocolos de extracción en el Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020.

Protocolo	Variable	Media	Error estándar	Límite de Confianza Inferior	Límite de Confianza Superior
DNeasy PowerSoil	Concentración (ng/ul)	116,83	41,34	3,54	373,80
	Calidad 260/280	1,39	0,08	1,20	2,00
	Calidad 260/230	0,87	0,10	0,34	1,22
Tanase <i>et al.</i> 2015 (modificado)	Concentración (ng/ul)	197,73	132,33	51,33	461,87
	Calidad 260/280	1,28	0,43	0,82	2,13
	Calidad 260/230	0,65	0,46	0,17	1,56
Verma <i>et al.</i> 2017(modificado)	Concentración (ng/ul)	1408,67	137,03	1153,00	1622,00
	Calidad 260/280	1,45	0,03	1,40	1,50
	Calidad 260/230	0,95	0,15	0,80	1,10

En el **Cuadro 6** se observó las mayores medidas de dispersión obtenidas para cada variable de clasificación que corresponden a cada modificación a los procedimientos del protocolo establecido para la extracción de ADN. Para la variable buffer de extracción el mejor tratamiento para obtener la mayor concentración (ng/μl) fue de 750 μl, sin embargo, no fue el mismo para las variables calidad que en ambas el mejor tratamiento fue 500 μl (**Cuadro 7 y Cuadro 8**). Para la variable SDS fue diferente el tratamiento que daba mejor calidad y cantidad de ADN por lo que se eligió 250 μl por la constancia del tratamiento en obtener mejores concentraciones. Para las variables PCI y PCI previo ambas en los tratamientos de bajos volúmenes se

alcanzó altas concentraciones y mejores calidades del ADN, por lo que se omitió la adición de este reactivo porque era un paso más del proceso y no generó resultados mejores consistentes a los ya obtenidos.

**Cuadro 6.** Medidas de dispersión para los tratamientos seleccionados de cada variable de clasificación en las modificaciones del protocolo, para la variable concentración de ADN (ng/μl). Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020.

Variable Clasificación	Tratamiento	Media	Error Estándar	Límite de Confianza Inferior	Límite de Confianza Superior
Buffer extracción (μl)	750	696,96	106,28	1,00	1599,70
SDS (μl)	250	701,74	108,08	1,00	1654,00
Volumen Cloroformo-alcohol-isoamílico	1	541,04	5,58	1,00	1744,30
Volumen PCI previo	1,25	1377,55	363,45	1014,10	1377,55
Volumen PCI	1	760,10	115,17	3,70	1744,00
Tiempo Incubación (min)	30	528,04	63,71	1,00	1744,30
Tiempo Centrifuga (min)	20	528,04	63,71	1,00	1744,30
Temperatura Centrifuga °C	4	538,06	68,24	19,20	1741,00
Volumen Acetato de sodio (3 M)	0	643,38	69,19	1,00	1744,30
NaCl μl (5 M)	0	628,60	64,77	1,00	1744,30
Cantidad de suelo (g)	0,5	539,11	70,63	19,20	1744,30

De igual manera para las variables Volumen de acetato de sodio (3 M) y NaCl μl (5M) el tratamiento de cero volumen permitió las concentraciones más altas (**Cuadro 6**) y calidad (260/230) (**Cuadro 8**) más alta con respecto a las demás, sin embargo, para la variable calidad (260/280) (**Cuadro 7**) no fueron esos tratamientos sino 0,1 Volumen de acetato (3 M) y 100 μl NaCl (5M), es decir utilizando esas cantidades se

obtuvo menos contaminación de proteínas en el ADN ya que el acetato de sodio favorece a la purificación del ADN (Escalante-Pin 2019).

Con respecto al volumen del Cloroformo-álcohol-isoamílico se observó un comportamiento similar en las tres variables de respuesta, el tratamiento con el que se obtuvo mayores concentraciones y calidad (260/280) (260/230) fue utilizando 1 volumen en ( $\mu$ l).

**Cuadro 7.** Medidas de dispersión para los tratamientos seleccionados de cada variable de clasificación en las modificaciones del protocolo, para la variable calidad (260/280). Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020.

Variable Clasificación	Tratamiento	Media	Error Estándar	Límite de Confianza Inferior	Límite de Confianza Superior
Buffer extracción ( $\mu$ l)	500	1,40	0,01	1,10	1,50
SDS ( $\mu$ l)	500	1,40	0,01	1,00	1,50
Volumen Cloroformo-álcohol-isoamílico	1	1,37	0,02	0,20	2,13
Volumen PCI previo	0, 25	1,38	0,02	1,30	1,40
Volumen PCI	0	1,41	0,02	1,20	1,60
Tiempo Incubación (min)	60	1,38	0,02	1,22	1,44
Tiempo Centrifuga (min)	20	1,38	0,02	0,20	1,60
Temperatura Centrifuga $^{\circ}$ C	4	1,39	0,01	1,00	1,50
Volumen Acetato de sodio (3 M)	0,1	1,38	0,02	1,00	1,50
NaCl $\mu$ l (5 M)	100	1,39	0,02	1,00	1,50
Cantidad de suelo (g)	0,5	1,40	0,01	1,00	1,50

En la variable tiempo de incubación si hubo variación con respecto a los tratamientos utilizados para la concentración (ng/ $\mu$ l) (**Cuadro 6**) y las calidades (260/280-260/230) (**Cuadro 7 y Cuadro 8**). Los tiempos de incubación que permitió mejores concentraciones fueron 60 min y 30 min, por lo que para el protocolo se estandarizó a 30 min.



En el procedimiento de centrifuga, se obtuvo las mejores calidades y concentraciones utilizando bajas temperaturas de la centrifuga a 4 °C, y un tiempo de centrifuga de 20 min.

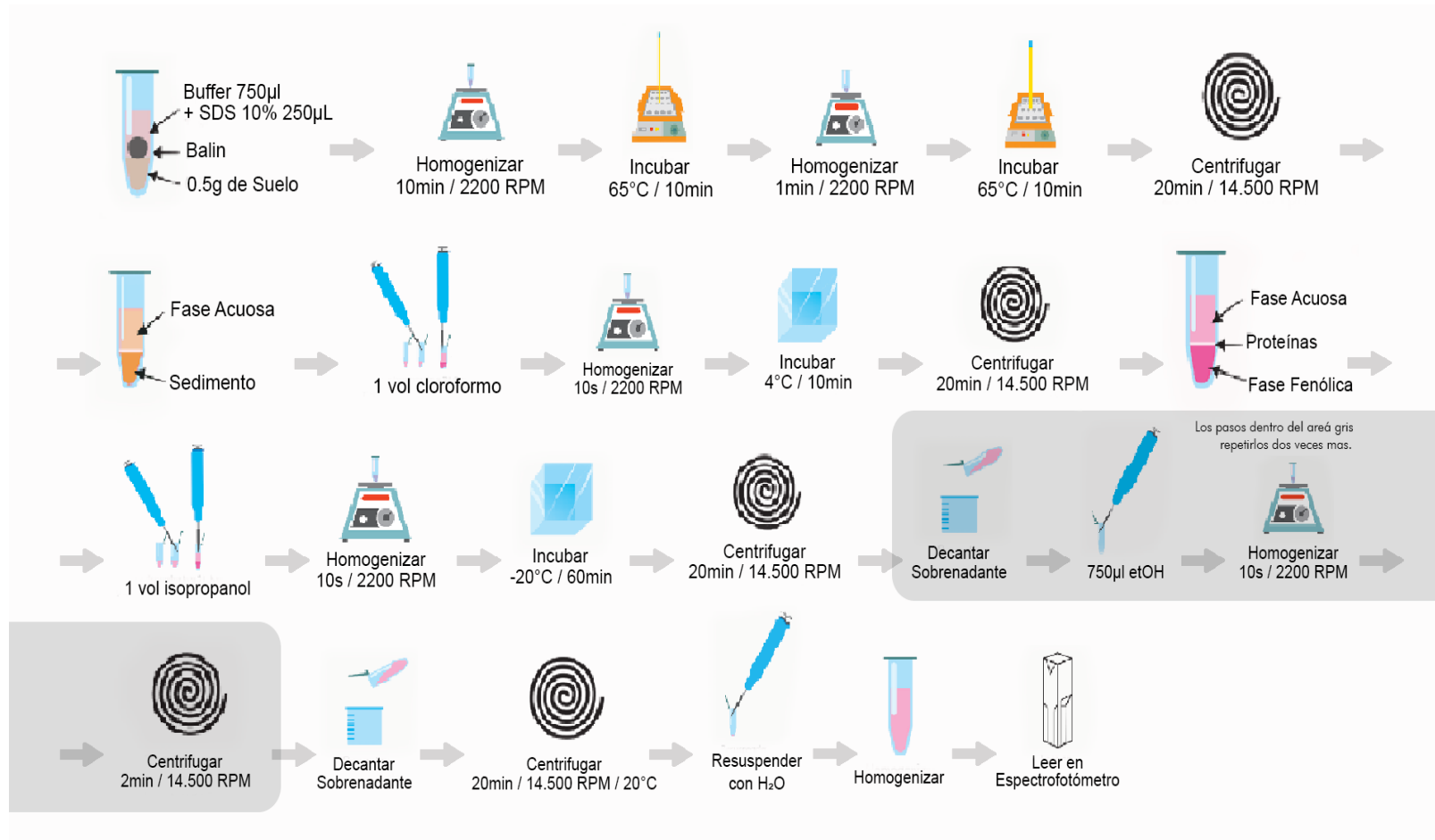
Por último, para la variable cantidad de suelo, el tratamiento que generó más concentración (ng/μl) y mejor calidad 260/280 fue utilizando 0,5 g de suelo para la variable 260/230 la cantidad de suelo que generó mejor calidad fue 0,25 g de suelo.

**Cuadro 8.** Medidas de dispersión para los tratamientos seleccionados de cada variable de clasificación en las modificaciones del protocolo, para la variable calidad (260/230). Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020.

Variable Clasificación	Tratamiento	Media	Error Estándar	Límite de Confianza Inferior	Límite de Confianza Superior
Buffer extracción (μl)	500	0,79	0,05	0,30	1,70
SDS (μl)	250	0,80	0,03	0,40	1,10
Volumen Cloroformo-alcohol-isoamílico	1	0,77	0,03	0,17	1,70
Volumen PCI previo	0	0,76	0,03	0,17	0,80
Volumen PCI	0	0,84	0,05	0,50	1,70
Tiempo Incubación (min)	30	0,75	0,03	0,17	1,70
Tiempo Centrifuga (min)	20	0,77	0,03	0,30	1,70
Temperatura Centrifuga °C	4	0,74	0,03	0,30	1,50
Volumen Acetato de sodio (3 M)	0	0,79	0,04	0,17	1,70
NaCl μl (5 M)	0	0,80	0,03	0,17	1,70
Cantidad de suelo (g)	0,25	0,78	0,04	0,40	1,10

De acuerdo con las modificaciones que se realizaron a los protocolos, se estableció un protocolo de extracción de ADN en suelos de piña (**Figura 10**). En detalle, el protocolo contiene los siguientes pasos: En un tubo de microcentrifuga de 2ml se colocó 0.5 g de suelo con un balín de 1g (0,5 mm diámetro), 750 μl de buffer de extracción y 250 μl de SDS al 10%, se homogenizó en un vórtex durante 10 min a 200 rpm. Posteriormente se colocó en incubación a 65 ° C durante 10 min, se

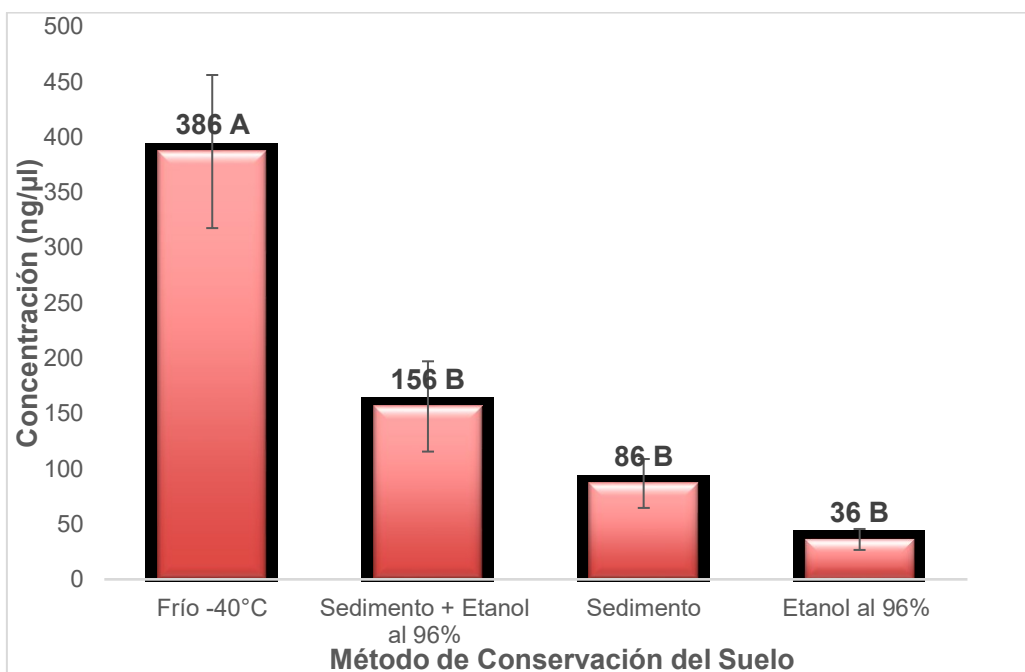
homogenizó 1 min en vortex a 2 200 rpm y colocó nuevamente a incubar otros 10 min a 65 °C y se centrifugó a 14 500 rpm durante 20 min. Se transfirió sobrenadante inmediatamente en dos nuevos tubos de microcentrífuga rotulados y se agregó 1 Volumen de Cloroformo-alcohol-isoamílico, se homogenizó en vortex a 2 200 rpm durante 10 segundos y se incubó a 4 °C durante 10 min. Luego se centrifugó a 14 500 rpm 20 min y se transfirió el sobrenadante inmediatamente en dos nuevos tubos de microcentrífuga rotulados y se descartan los anteriores con el sedimento, se agregó 1 Volumen de isopropanol y se homogenizó en vortex a 2 200 rpm durante 10 seg y se incubó a -20 °C durante 1h. Después de la incubación se centrifugó a 14 500 rpm durante 20 min se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 750 µl de etanol 75% homogenizar en vortex 10 seg a 2 200 rpm y se centrifugó 1 min a 14 500 rpm (se repitió el procedimiento anterior dos veces más) por último se secó el precipitado en una centrifuga al vacío durante 20 min a 30 °C para posteriormente cuantificar por espectrometría.



**Figura 10.** Protocolo establecido para la extracción de ADN en suelos de piña (*Ananas comosus*) en el Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020.

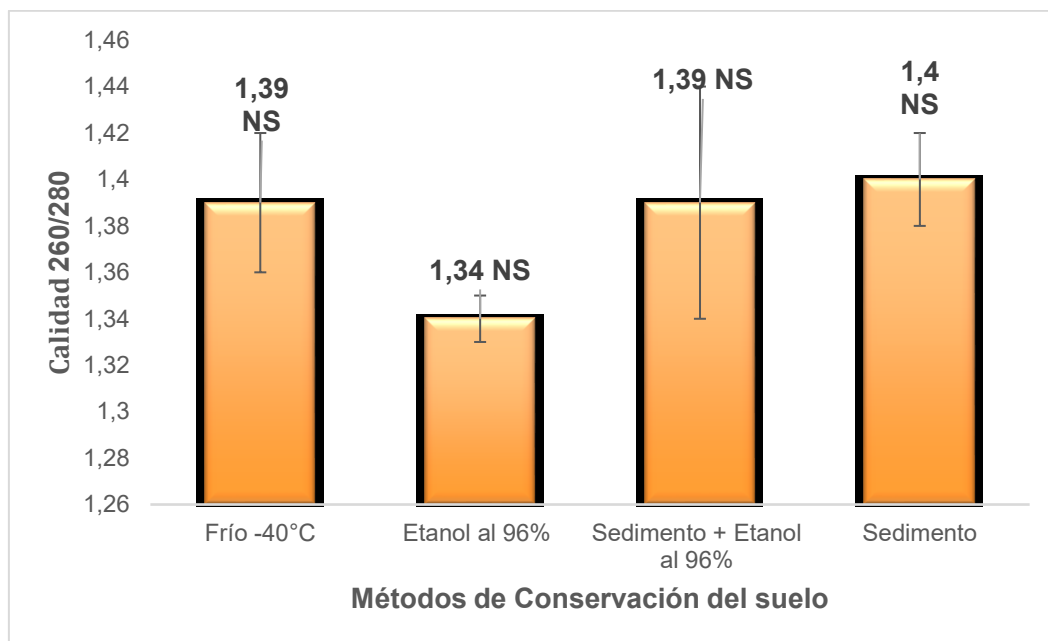
## 4.2 Comparación de métodos de conservación del suelo

Se compararon dos métodos de conservación del suelo de piña (en frío  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  y en etanol al 96% a temperatura ambiente), para determinar cual obtuvo mejores resultados en cuanto a calidad y cantidad de ADN extraído. El método de conservación en alcohol al momento de realizar la extracción de ADN se realizó tomando la muestra según las siguientes fases: 1) el sedimento + alcohol, 2) únicamente el sedimento, y 3) únicamente el etanol al 96% (**Figura 9**). Se encontró diferencias significativas en los dos métodos de conservación utilizados ( $p=0,0001$ ), siendo en frío a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  el que obtuvo mayor concentración de ADN extraído ( $386,92 \pm 169,58\text{ ng}/\mu\text{l}$ ). El método que dio menor efectividad en concentración fue en etanol al 96% utilizando solo la fase líquida para la extracción de ADN, que obtuvo una concentración ( $36,10 \pm 23,21\text{ ng}/\mu\text{l}$ ) (**Figura 11**).



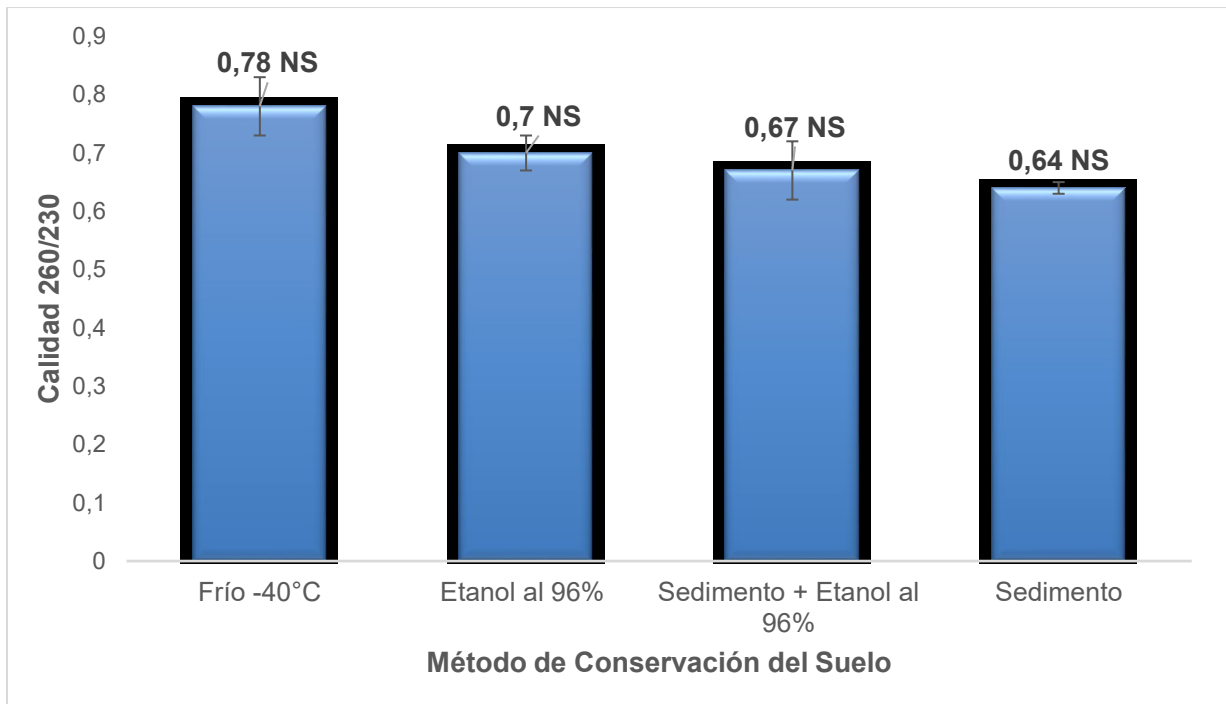
**Figura 11.** Concentración ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) (media  $\pm$  EE) de ADN extraído del suelo de plantación de piña, utilizando dos métodos de conservación. Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020. Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí, LSD Fisher ( $p<0,05$ )

Para la variable calidad de ADN 260/280, no se encontró diferencias significativas ( $p=0,5472$ ) en cuanto a los métodos de conservación del suelo (**Figura 12**).



**Figura 12.** Calidad 260/280 (media  $\pm$  EE) de ADN extraído del suelo de plantación de piña, utilizando dos métodos de conservación. Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020.

Tampoco se observó diferencias significativas ( $p=0,0908$ ) en los métodos de conservación en cuanto a la variable calidad 260/230, que corresponde a la proporción de ácidos nucleicos y contaminantes con polisacáridos y fenoles (**Figura 13**). Se obtuvo  $0,78 \pm 0,13$  con el método de conservación en frío  $-40^{\circ}\text{C}$  resultando este el mejor método, de manera contraria el etanol al 96% se obtuvo rangos de calidad más bajos  $0,64 \pm 0,03$  en la fase sólida del sedimento.

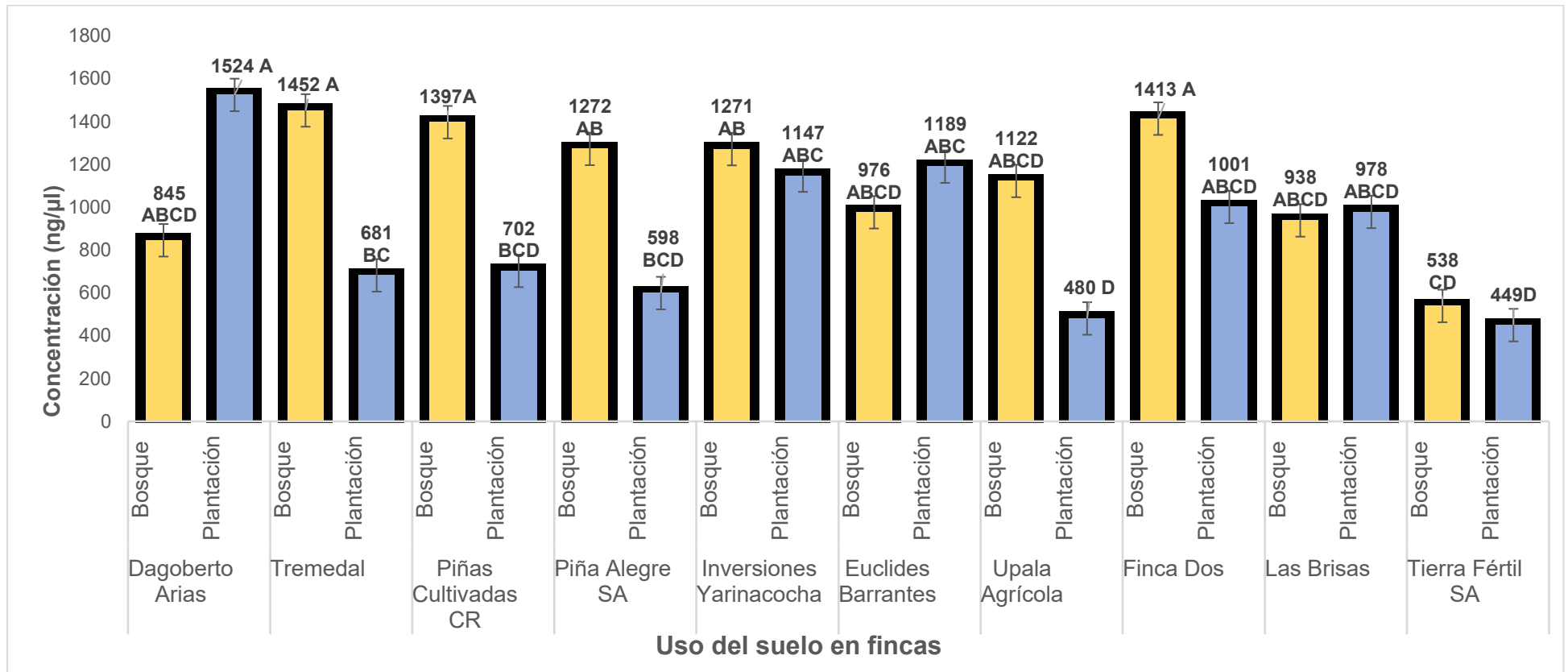


**Figura 13.**Calidad 260/230 (media  $\pm$  EE) de ADN extraído del suelo de plantación de piña, utilizando dos métodos de conservación. Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020.

#### 4.3 Comparación del ADN según uso del suelo

La comparación del ADN extraído de suelo de diez fincas de la Zona Norte con diferentes usos de suelo (bosque versus plantación), se determinó que sí existen diferencias significativas ( $p=0,0368$ ) (**Figura 14**) en la interacción finca x uso de suelo para la variable concentración ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ), para las variables de calidad no se encontraron diferencias significativas reportándose un ( $p=0,3831$ ) para calidad 260/280 (**Anexo 16**) y ( $p=0,6704$ ) para la variable calidad 260/230 (**Anexo 17**).

Se pudo observar que la mayoría de los suelos de los bosques de las fincas estudiadas presentaron concentraciones más altas en comparación a los suelos de plantaciones. Sin embargo, para las fincas Dagoberto Arias, Euclides Barrantes y Las Brisas, el comportamiento fue contrario.



**Figura 14.** Comparación de promedios de Concentración del ADN (ng/μl) (media ± EE) extraído de distintas fincas con dos usos de suelo (plantación y bosque) en la Zona Norte. Laboratorio de Biología Molecular Campus Tecnológico Local San Carlos, 2020. Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí LSD Fisher (p<0,05)

## 5 DISCUSIÓN

Para lograr un adecuado análisis de microbiomas, es de vital importancia que el protocolo de extracción de ADN sea el óptimo, para obtener buena calidad y rendimiento, ya que estos rangos se pueden ver afectados por factores como lisis incompleta de la célula, extracción de ácidos húmicos presentes en el suelo y degradación del ADN posterior a su extracción (Fatima *et al.* 2014).

De acuerdo con la comparación de los protocolos DNeasy PowerSoil, Tanase *et al.* (2015) modificado y Verma *et al.* (2017) modificado, utilizando este último protocolo se obtuvo las concentraciones más altas y los mayores rangos de calidad de manera contraria al Kit Qiagen DNeasy PowerSoil, del cual se obtuvieron valores muy limitados en cuanto a calidad y concentración de ADN ambiental (**Cuadro 5**). Baena-Del Valle *et al.* (2013) en su estudio reporta resultados de la comparación de tres métodos de extracción de ADN de tejidos parafinados: 1) Extracción de ADN por salting – out utilizando NaCl 5 M, 2) Protocolo de extracción modificado de (Sambrook, 2001) utilizando fenol y cloroformo: alcohol isoamílico, y 3) Kit comercial, en donde reporta que todos los métodos obtuvieron cantidad suficiente para amplificar PCR (>100ng/μl), sin embargo, el protocolo 1 y 2 obtuvo mayor concentración que el Kit Comercial de extracción, el cual de igual manera al presente estudio, resultó poco eficiente. Cáceres *et al.* (2012) reporta que el uso de Kits Comerciales para la extracción de ADN en suelo no genera altos rendimientos de ADN ni buena calidad de este, ya que la principal limitante es que no elimina completamente los ácidos húmicos presentes en el suelo.

El buffer de extracción es un factor fundamental en los protocolos de extracción de ADN, ya que es una solución que tiene la función de estabilizar el pH al momento de la extracción de ADN con el objetivo de que este no se fragmente en su aislamiento (Alvis-Arango *et al.* 2015). Rocha-Salvatierra (2002) menciona que el ADN en presencia de pH ácidos es insoluble, además se fragmenta, pero un pH de 8 le confiere solubilidad, es por eso por lo que los buffers de extracción deben tener un pH ajustado. Verma *et al.* (2017) reportan en su comparación de métodos de extracción de ADN, que la presencia del CaCl<sub>2</sub> durante la lisis celular en el buffer es



importante ya que evita la oxidación de las sustancias húmicas generando quinonas que se enlazan con el ADN evitando su amplificación.

El cloroformo-isoamil-alcohol tiene la capacidad de separar compuestos orgánicos (proteínas, fenoles, lípidos) del ADN, por lo tanto, su efectividad va a visualizarse más en la calidad que en la cantidad, de esta manera lo reportan Cerda-Granados y Díaz (2013) en su estudio que este compuesto logra separar el ADN de contaminantes como proteínas y polisacáridos, permitiendo obtener ADN de alta calidad. En este estudio se obtuvo resultados similares a los reportados por Cerda-Granados y Díaz (2013) (**Cuadro 7** y **Cuadro 8**) utilizando 1 Volumen de cloroformo-isoamil-alcohol, se obtuvo rangos más altos de calidad (260/280) y (260/230) respectivamente, de igual manera utilizando el mismo volumen se alcanzó las concentraciones más altas. Esto comprueba que efectivamente este compuesto logra separar los compuestos orgánicos de los ácidos nucleicos de manera eficiente obteniendo ADN de mayor calidad.

En los **Cuadro 6**, **Cuadro 7** y **Cuadro 8** donde se presentan las medidas de dispersión de las modificaciones a los protocolos, se evidenció que la presencia de PCI en el protocolo de extracción de ADN no favoreció la concentración ni la calidad del ADN ambiental. Maturrano *et al.* (2012) mencionan sobre el uso recomendable de este reactivo en extracciones de ADN en muestras de tejido o sangre, sin embargo, es poco eficiente cuando se trata de muestras con alto contenido de contaminantes como lo utilizó en su estudio con muestras de heces de vicuña.

Escalante (2019) menciona resultados similares al obtenido en este estudio con respecto a la utilización de NaCl (5M) y acetato de sodio (3M). En su estudio logró bajas concentraciones de ADN, pero rangos óptimos en la calidad 260/280. Como se observa en el **Cuadro 6** ni el NaCl ni el acetato de sodio favorecieron a obtener concentraciones altas de ADN, únicamente utilizando 0,1 Vol de acetato de sodio (3M) y 100µl de NaCl (5M) permitió obtener las calidades (260/280) más altas.

Los tiempos de incubación que generaron mejores concentraciones y calidad del ADN en este estudio fueron 30 min y 60 min. Rosero *et al.* (2010) en su investigación de extracción de ADN en mosquitos anofelinos, reportan tiempos de incubación

similares a los de este estudio, los mejores rendimientos de concentración los obtuvo a los 60 min de incubación y el mejor rango 260/280 a los 30 min. *Alvis-Arango et al.* (2015) recomiendan que los periodos cortos de incubación durante la digestión del ADN se logra obtener mejores rendimientos y calidades de ADN. Por otra parte, el tiempo y la temperatura de centrifugación que resultó más eficiente en calidad del ADN del suelo piña fue a 20 min a 4 °C. *Rosero et al.* (2010) de igual manera reportan los mismos tiempos y temperaturas en su protocolo de extracción. *Hernández-Sánchez* (2014) de igual manera reporta temperaturas de 4 °C adecuadas para obtener ADN de buena calidad para amplificar en PCR ya que las altas temperaturas durante periodos largos de tiempo afectan la integridad del ADN provocando degradación de este como consecuencia su fragmentación.

Una vez estandarizado el protocolo, se realizó la extracción de ADN de todas las muestras de suelo de bosque y de plantación. De acuerdo con el análisis de la **Figura 14**, se visualiza que en el suelo de bosque existe mayor concentración (ng/μl) de ADN en comparación con el suelo de cultivo en forma general. La concentración de ADN se puede ver perturbada por el manejo que se realiza en las plantaciones o cultivos ya que la presencia de los microorganismos disminuye. *Maldonado-Mendoza et al.* (2013) en su estudio comparan el microbioma del suelo de dos solanáceas, pero con diferentes usos de suelo: una plantación de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) con manejo convencional y la otra de Toloache (*Datura stramonium*, L.) creciendo de manera silvestre en una reserva. Dicho estudio demuestra que el microbioma presente en suelo silvestre presenta mayor diversidad y cantidad que el suelo perturbado por un cultivo.

*Silva-Parra et al.* (2017) reportan resultados similares a los encontrados en este estudio, donde comprara la diversidad microbiana de cuatro tipos de suelo: 1) bosque secundario, 2) monocultivo de arroz, 3) sistema agroforestal, y 4) monocultivo de piña. Las diferencias fueron significativas en todos los tipos de suelo, siendo el bosque secundario donde se encontró la mayor población microbiana y el monocultivo de piña la menor población microbiana.

Ling *et al.* (2016) realizaron un estudio comparativo de microbiomas de suelos con distinto manejo, en donde de igual manera comprueban que suelos con aplicaciones de fertilizantes estos tienen la capacidad de acidificar el suelo, siendo esto el principal factor que afecta negativamente la presencia de comunidades microbianas en el suelo. Ortiz-Miranda (2013) menciona que los suelos de piña generalmente Ultisoles, se caracterizan por altos niveles de acidez, afectan las características físicas como biológicas del mismo, como resultado una baja presencia de la actividad microbiana.

Por otra parte, Castillo-Monroy *et al.* (2016) reportan que uno de los principales contaminantes de los suelos de bosque u orgánicos es la presencia de ácidos húmicos que genera fenoles (generan color oscuro durante la extracción), y los cuales no permite la efectividad del PCR ya que desnaturaliza las proteínas por la formación de amidas. Además, la oxidación de los fenoles forma quinonas que son las responsables de inactivar la polimerasa y la amplificación del ADN.

De acuerdo con la **Figura 11**, se determinó que el método de conservación de suelo más eficiente para la extracción de ADN fue en frío a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Amador-Huerta (2020) menciona en su investigación que el método de conservación de muestras previo a la extracción del ADN es de gran importancia en el éxito de la cantidad y calidad de ADN en cualquier tipo de muestra ambiental. Sin embargo, la conservación en frío es la que permite la utilización sin que se degrade o fragmente el ADN. Además, el mismo autor reporta en su estudio que una temperatura a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  funciona en periodos cortos de utilización (14 días), pero para periodos largos de conservación de la muestra, la temperatura ideal es  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Castaño-Sepúlveda *et al.* (2011) comparan la calidad y cantidad del ADN bajo diferentes métodos de conservación previa a la extracción, probando: 1) etanol absoluto, 2)  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 3) etanol 70%, 4)  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y 5) silica gel. Los autores reportan que los métodos de conservación en frío generan mejor concentración que los de etanol y silica. Sin embargo, para la calidad el mejor método fue el de etanol al 70% seguido de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

En forma general, los resultados del presente estudio demostraron: que los kits comerciales de extracción de ADN no siempre son efectivos para todo tipo de suelos como fue el caso de este, además que la conservación del suelo a muy bajas temperaturas (-40 °C) es efectiva para obtener altas concentraciones ADN. También, en el presente estudio resultó que en los suelos de bosque se encontró mayor concentración (ng/μl) que, en los suelos de cultivo, sin embargo la calidad del ADN no varió en los dos usos de suelo.

## 6 CONCLUSIONES

- El protocolo de extracción de ADN modificado de Verma *et al.* 2017, logró obtener alta concentración (ng/μl) de ADN, sin embargo, no logró el rango óptimo de calidad de ADN (1.8 y 2) para las calidades 260/280 y 260/230 respectivamente.
- El PCI no fue eficiente en extracciones de muestras de suelo o con alto contenido de contaminantes como es el caso del suelo de piña.
- El cloroformo-isoamil-alcohol fue eficiente en mejorar la calidad del ADN y en obtener altas concentraciones de ADN.
- El NaCl (5 M) y acetato de sodio (3 M) favorecieron para mejorar calidad del ADN, sin embargo, no ayudó a aumentar la concentración (ng/μl).
- Se definió que el método más adecuado para la conservación de las muestras del suelo de piña para extracción de ADN fue en frío a -40 °C de manera contraria el método menos adecuado de conservación fue en etanol al 96% a temperatura ambiente.
- El suelo de bosque presentó en la mayoría de las fincas, concentraciones más altas de ADN con respecto al suelo de cultivo, sin embargo, ambos usos de uso no presentan diferencias significativas con respecto a la calidad.

## 7 RECOMENDACIONES

- Verificar con anterioridad que los reactivos a utilizar en la extracción de ADN estén en óptimas condiciones para evitar el riesgo por contaminación o degradación.
- Modificar el método de rotulación de las muestras de suelo para la conservación en frío, ya que la cinta se desprende de la bolsa al enfriarse.
- Evaluar una precipitación del ADN posterior a la de isopropanol con PEG y acetato de sodio para obtener ADN más puro.
- Realizar pruebas de una preparación previa a la extracción del ADN con el buffer de extracción y dejar en reposo por diferentes periodos de tiempo, con el fin de permitir que se dé una mejor lisis celular.
- Una posible modificación del protocolo en próximas investigaciones adicionar proteinasa K, para inactivar las DNasas y obtener ADN de mejor calidad.
- Se sugiere al momento del muestreo, seleccionar muestras de fincas que en sus plantaciones tengan los mismos manejos, esto con el fin de poder hacer comparaciones no solamente del ADN a nivel de fincas sino también de manejo.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

Alejos, LP; Aragón, M C; Cornejo, A. 2014. Extracción y Purificación del ADN (en línea). Herramientas moleculares aplicados en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Consultado 20 Julio 2019. Disponible en <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/extraccion.pdf>

Alvis-Arango, AA; Giraldo-Vásquez, LE. 2015. Evaluación de los métodos fenol-cloroformo y columnas de sílice para extracción de ADN partir de tejido óseo. Colombia Forense 2 (1):71-74.

Amador-Huerta, V. 2020. Aplicaciones de las técnicas de ADN ambiental en ciencias ambientales. Facultad de ciencias el mar y ciencias ambientales. Universidad de Cádiz.35 p.

Armado, AJ; Contreras, F; García-Lugo, P. 2009. Fraccionamiento químico de carbono orgánico y su relación con la actividad microbiológica, biomasa microbiana y cantidad de ADN en suelos cacaoteros venezolanos. Sociedad Química del Perú. 75(1):44-53.

Avendaño-Sánchez, M; Espinoza-Velásquez, J; Gutiérrez-López, A; Flores-Gallego, C; Rodríguez-Herrera, R. 2015. Secuencias nucleotídicas de la región ITS en familias S1 y PL de maíces poliembriónicos. Revista Mexicana Ciencias Agrícolas 6 (3):509-521.

Ayala-Ramírez, PA; Gonzalez-Ropero, LA; García-Robles, R. 2013. Temperatura de almacenamiento y cantidad de ARN extraído de plasma. (en línea) Univ. Scientiarum. 18(2):181-187. Consultado 4 dic 2019. Disponible en <http://www.scielo.org.co/pdf/unsc/v18n2/v18n2a06.pdf>

Baena-Del Valle, JA; Ramos-Moreno, AJ; Gómez-Alegría, CJ; Gómez-Camargo, DE. 2013. Comparación de métodos de extracción de ADN en tejidos parafinados y utilidad para amplificación por PCR. Revista Colombiana de Biotecnología 15(1):172-179.

Barbero, D; Hidalgo, E. 2017. Aportaciones de las Nuevas Técnicas Moleculares Metagenómica y qPCR a la Vitivinicultura. Grado en Enología. Valladolid, España, Universidad de Valladolid. 38 p.

Cadena, JD; Martínez-Peña, MD; Guzmán-Rodríguez, LF; Arteaga-Garibay. R.I. 2016. Aplicación de secuenciación masiva para el estudio y exploración de diversidad microbiana y su aprovechamiento biotecnológico. Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Boulevard de la Biodiversidad. Agroproductividad. 9(2):70-83.

CANAPEP. 2016. Historia de la Piña. Disponible en <https://canapep.com/historia/>

Cano, MA. 2011. Revisión de la Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. U.D.C.A Actualidad. y Divulgación Científica 14(2):15–31.

Cantón, R; Del Campo, R; Mira, A; Monsó, E. 2018. Informes Anticipado del Microbioma. (en línea). Observaciones de Tendencia de Medicina Personalizada de Precisión, Madrid, España. Consultado jul. 2019 Disponible en [https://www.institutoroche.es/static/archivos/Informe\\_anticipando MICROBIOMA\\_digital.pdf](https://www.institutoroche.es/static/archivos/Informe_anticipando_MICROBIOMA_digital.pdf)

Campitelli, P; Aoki, A; Gudelj, O; Rubeacker, A; Sereno, R. 2010. Selección de indicadores de calidad de suelo para determinar los efectos del uso y prácticas agrícolas en un área piloto de la Región Central de Córdoba. Ciencias del Suelo Argentina. 28(2):223-231.

Cáceres, P; Cordero, C; González, G; Quiroz, K; Bobadilla, JC; Bravo, C; Caligari, P.D.S; Carrasco, B; García-Gonzales, R. 2012. Efficient protocols for the extraction of microbial DNA from the rhizosphere of hydrophilic forests in Chile. Ciencia e Investigación Agraria 39(3):585-592.

Castaño-Sepúlveda, T; Sánchez-Zapata, P; Viana-Guerra, L; Correa-Ochoa, M; Gutiérrez-Builes, L; Zapata-Tamayo, M. 2011. Comparación de los métodos de



preservación de especímenes *Anopheles* (Diptera: *Culicidae*) para la extracción de ADN. Salud Uninorte 27 (1):36-48.

Castillo-Monroy, AP; Sánchez-Rodríguez,A; Cueva, A; Orellana-Ordóñez,M. 2016. Puesta a punto de una técnica molecular para el estudio de hongos y bacterias totales de suelo en ecosistemas tropicales del Sur de Ecuador. Ciencias del Suelo. 34(1):145-154.

Cerón, LE; Aristizabal, FA. 2012. Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. Revista Colombiana de Biotecnología 14(1):285-295.

Cerda-Granados, DA; Díaz, V. 2013. Optimización de un protocolo de extracción de ADN genómico para *Pinus tecunumanii*. Encuentro 94:82-92.

Cruz-Ruiz,E ; Cruz-Ruiz, A; Aguilera-Gómez,LI; Norman-Mondragón, HT; Velázquez,RA; Nava-Bernal, G; Dendooven, L ; Reyes-Reyes, BG. 2012. Efecto de las características edáficas de un bosque templado por el cambio de uso de suelo. Terra Latinoamericana 38(2):189-197.

Cubero-Fernández, D; Sandí-Meza, V.2014. Técnicas agroambientales para el manejo del cultivo de piña. INTA. San José, Costa Rica. 93 p.

Di Rienzo, JA.; Casanoves, F.; Balzarini, M.; González, L.; Tablada, M.; Robledo, C. 2018. InfoStat versión 2019. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba.

Dhaliwal, A. 2013. Extracción y Purificación de ADN (en línea). Labome: The world of laboratories, New Jersey, United States; 14 Mar. 2020. Disponible en [/dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.191](https://dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.191).

Dopheide, A; Xie, Dong, Buckley, T; Drummond, A J; Newcomb, R D. 2018. Impacts of DNA extraction and PCR on DNA metabarcoding estimates of soil biodiversity. Methods in Ecology and Evolution 2019(10):120-133.

Duque-Ortiz, A; Relova-Vento, D; Pérez-Castillo, A; Burger-Pulgarón, Y; Lobo-Rivero, E. 2017. Estabilidad del ADN deshidratado de *Mycoplasma gallisepticum*. Salud Animal 39(3):1-7.

Erice, P; Bonini, V; Cirino, G; Colla, Y; Ruzzo, M. 2019. Influencia del microbioma del suelo en el rendimiento del cultivo de pimiento. Phytoma 309.

Escalante-Pin Kiura, M. 2019. Efecto de la temperatura en la amplificación del gen 18s ARNr de dos microalgas a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Facultad de las Ciencias del Mar. La Libertad, Ecuador. Universidad Estatal de la Península de Santa Elena. 52 p.

Fatima, F; Pathak, N; Verma, SR. 2014. An Improved Method for Soil DNA Extraction to Study the Microbial Assortment within Rhizospheric Region. Hindawi Publishing Corporation. Molecular Biology International. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/518960>

Fierro-Fierro, F .2014. Herramientas Moleculares aplicadas en Ecología: Aspectos teóricos y prácticos. 1era ed.

Fundación Instituto Roche. 2018. Informe Anticipado de Microbioma. Observatorio de Tendencias de Medicina Personalizada de Precisión. Madrid, España. Consultado jul. 2019. Disponible en [www.institutoroche.es](http://www.institutoroche.es)

Freile-Almeida, JA; Morgado-Martínez, M; Pérez-García, GA; Alemán-Pérez, RD; Domínguez-Brito, J. 2018. Soil microorganisms and plant diseases associated to cocoa (*Theobroma cacao* L.) genotypes in the Ecuadorian Amazon. Acta Agronómica 67(1):23-29.

Galicia, L; Gamboa-Cáceres, AM; Cram, Silke; Chavez-Vergara, B; Peña-Ramírez, V; Saynes, V; Siebe, C. 2016. Almacén y dinámica del Carbono orgánica del suelo en bosques templados de México. Tierra Latinoamérica 34:1-29.

García, C. 2006. Identificación de especies de nematodos fitopatógenos de los géneros *globodera* spp. y *meloidogyne* spp. por medio de dos técnicas moleculares. Cartago, Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 57 p.

García, RD. 2018. Instrumentos que revolucionaron la química: la historia del espectrofotómetro. *Avances en Química*. 3(3):79-82.

García de Salomere, IE. 2011. Microorganismos del suelo y sustentabilidad de los agroecosistemas. *Revista Argentina de Microbiología* 43 (1):1-3.

Garcidueñas-Paz, JA. 2013. Caracterización Morfológica y Molecular de piña (*Ananas comosus* (L)) Híbrido MD-2 y su establecimiento in vitro. Chapingo, México, Universidad Autónoma de Chapingo.

González-García, LN; López-Venegas,MC; Riaño, Pachón, DM. 2013. Comparación entre el potencial de las regiones variables del 16S rDNA para la identificación de *Lactobacillus* spp. (Lactobacillaceae). *Acta Biológica Colombiana*. 18(2):349-364.

Guzmán-Hernández, TJ; Durán-Mora, J; Montero-Carmona, W; Vargas-Céspedes, H; Castro-Jiménez, Z; Carvajal-Vargas, DE; León-Arias, D. 2013. Diagnóstico y dinámica poblacional de nematodos fitoparásitos en dos sistemas de cultivos de piña en Costa Rica. San Carlos, Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 81 p.

Guzmán-Rodríguez, LF; Córtes-Cruz, MA; Arteaga-Garibay, RI. 2018. Comparación de protocolos de aislamiento de DNA a partir de semilla de soya. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 9(8): 1691-1701.

Henríquez, C; Cabalceta, G; Bertsch, F; Alvarado, A. 2014. Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo: Principales Suelos de Costa Rica. MAG, Costa Rica. Consultado 21 jul. 2020. Disponible en [http://www.mag.go.cr/biblioteca\\_virtual\\_ciencia/suelos-cr.html](http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/suelos-cr.html).

Hernández-León, R; Velázquez-Sepúlveda, I; Orozco-Mosqueda, MC; Santoyo, G. 2010. Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades

biotecnológicas. Revista Internacional de Botánica Experimental. Michoacan, México. 79:133-139.

Hernández-Sánchez, CR. 2014. Efecto del tiempo y la temperatura viabilidad del ADN en la perfilación genética de muestras de sangre. Archivos de Criminología, Seguridad Privada y Criminalística 4(14):11-12.

Hidaya, T; Priyandoko, D; Yunita, PY; Islami, KD. 2016. Molecular Phylogenetic Screening of *Withania somnifera* Relative From Indonesia Based on Internal Transcribed Spacer Region. Hayati Journal of Biosciences. 23(2):92-95.

Hleap, JS; Cárdenas, H; García-Vallejo, F. 2009. Preservación no criogénica de tejido y extracción de ADN: una aplicación para peces cartilaginosos. Cali Colombia. Panamericana de Ciencias Acuáticas 4(4): 545-555

Illarze, G; Del Pino, A; Ricetto, S; Irisarri, P. 2017. Emisión de óxido nitroso, nitrificación, desnitrificación y mineralización de nitrógeno durante el cultivo del arroz en 2 suelos de Uruguay. Revista Argentina de Microbiología 50(1):97-104.

INTA. 2015. Análisis microbiológico de suelos. San José, Costa Rica. 2 p.

IMN. 2019. Instituto Meteorológico de Costa Rica, San José, Costa Rica. Consultado may.2019. Disponible en <https://www.imn.ac.cr/estaciones-automaticas>.

Jaurixje, M; Torres, D; Mendoza, B; Henríquez, M; Contreras, J. 2013. Propiedades físicas y químicas del suelo y su relación con la actividad biológica bajo diferentes manejos en la zona de Quíbor, Estado Lara. Bioagro 25(1):47-56.

Kary, Mullis. 1985. Reacción en Cadena de la Polimerasa. California, Estados Unidos.

Kchouk, M; Gibrat, JF; Elloumi, M. 2017. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. Biology and Medicine. 9(3):1-8.

Ling, N; Zhu, C; Xue, C; Chen, H; Duan, Y; Peng, C; Guo, S; Shen, Q. 2016. Insight into how organic amendments can shape the soil microbiome in long-term field experiments as revealed by network analysis. China. *Soil Biology y Biochemistry* 99:137-149.

Loaiza, J C. 2010. El recurso suelo. *Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo*. 41(2):6-18.

López de Heredia, U. 2016. Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. Universidad Politécnica de Madrid. Grupo de Investigación de Genética. *Munibe, Ciencias naturales* 64:7-31.

López, M; Rivera, MG; Viettri, M; Lares, M; Morocoima, A; Herrera, L; Ferrer, E. 2014. Comparación de dos protocolos de ADN de *Trypanosoma cruzi* cultivadas en medio axénico. *Perú Experimental Salud Publica* 31(2): 222-7.

Maldonado-Mendoza, IE; López-Rivera, R; Cordero-Ramírez, JD. 2014. Estudio de la microflora de los suelos de la zona de preservación ecológica 'La Uva' (Sinaloa) con vegetación de selva baja caducifolia empleando taxonomía molecular. Informe Final del Proyecto CONABIO IE001. Sinaloa, México, Instituto Politécnico Nacional. 119 p.

Martínez-Escudero, L. E, Melgoza-Castillo, A, Pérez-Leal, R; Villalobos Pérez, E. 2018. Actividad inhibitoria de bacterias aisladas de la rizosfera de árboles frutales, en contra de *Phymatotrichopsis omnívora* in vitro. *Acta Universitaria*, 28 (5): 66-71.

Mas, E; Poza, J; Ciriza, J; Zaragoza, P; Osta, R; Rodellar, C. 2016. Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *AquaTIC* 15.

Maturrano, L; Aguilar, JM; Krüger, P; Chavez, J; Rosadio, R; Wheeler, JC. 2012. Optimización de una técnica para la extracción de ADN de heces de vicuña (*vicugna mensalis*). *Investigación Veterinaria Perú* 23(3):369-376.

Medina-Sauza, R.M; Álvarez-Jiménez, M; Delhal,A; Reverchon,F; Blouin, M; Guerrero-Analco, JA; Cerdán, CR; Guevara, R; Villain, L; Barois, I. 2019. Earthworms Building Up Soil Microbiota. *Frontiers Environment Science* 7(81):1-20.

Méndez- González, G. 2010. Evaluación preliminar de la floración natural del cultivo de piña (*Ananas comosus*) Híbrido MD-2, de acuerdo con cuatro zonas altitudinales en la Región Huetar Norte de Costa Rica. Tesis Bach. San Carlos, Costa Rica. 38 p.

Mogollón, JP; Vera, MC; Martínez, A. 2015. Efecto de los plaguicidas sobre la calidad química y biológica del suelo en sistemas de producción de hortalizas del semiárido venezolano. *Química Viva* 14(1):69-89.

Montiel, MA. 2015. Uso de agroquímicos en la producción intensiva de piña en Costa Rica. *Pensamiento Actual* 15(25):183-193.

Nava, A; Albany, N; Vilchez, J. 2015. Protocolo de extracción de ADN para *Aloe barbadensis* Mill. *Facultad Agronómica Luz* 32:231-251.

NCBI Resource Coordinators. 2018. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*. 46

Ortiz-Miranda, RI. 2013. Evaluación de Dosis y Fuentes de Enmiendas calcáreas en la fertilidad del suelo y el crecimiento de piña en finca Tres Amigos, Pital, San Carlos. Tesis. Lic. San Carlos, Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 94 p.

Paternina, LE; Verbel-Vergara, D; Bejarano, EE. 2016. Comparación y utilidad de las regiones mitocondriales de los genes 16S y COX1 para los análisis genéticos en garrapatas (*Acari: Ixodidae*). *Biomédica* 36:295-302.

Payarés, N; Mancilla, L. 2012. ADN de alta calidad a partir de sangre total almacenada por largo tiempo para amplificación. *Ciencia y Salud* 1(1):29-34.

Pedraza, RO; Teixeira, KRS; Fernández-Scavino, A; García de Salamone, I; Baca, BE; Azcón, R; Baldani, VLD; Bonilla, R. 2010. Microorganismos que mejoran el

crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 11(2):155-164.

Piedras-Montilla, P. 2016. Actividad nucleasa en judía y su relación con la síntesis de ureidos durante la germinación y senescencia. Tesis. PhD. Córdoba, Colombia, Universidad de Córdoba.

PROCOMER, 2017. Estadísticas de Comercio Exterior. Procomer, San Jose, Costa Rica; Consultado 5 jun.2019. 249 p. Disponible en [https://procomer.com/downloads/estudios/estudio\\_estadistico\\_2017/Estadisticas2017.pdf](https://procomer.com/downloads/estudios/estudio_estadistico_2017/Estadisticas2017.pdf)

Quesada-Jiménez, JD. 2013. Desarrollo de Procedimientos estandarizados de Operación (PEO) para el Manejo Integrado de plagas y enfermedades del cultivo de piña *Ananas comosus* (L.) merr en la región huetar norte de Costa Rica. Tesis Bach, San Carlos, Costa Rica, Tecnológico de Costa Rica. 189 p.

Ramírez-Pacheco, A; Moreno-Guerrero, SS; Medina-Sanson, A. 2013. Herramientas moleculares y su utilidad en el cáncer pediátrico. *Gaceta Mexicana de Oncología* 12 (3):162-173.

Reyes, I. 2011. La micorriza arbuscular (MA) centro de la rizosfera: comunidad microbiológica dinámica del suelo. *Contacto* 81:17-23.

Rodicio, MR; Mendoza, MC. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Microbiológicas Clínicas* 22(4):238-245.

Rodríguez-Eraso, N; Pabón-Caicedo, JD; Bernal-Suárez, NR; Martínez-Collantes, J. 2010. Cambio climático y su relación con el uso del suelo en los Andes colombianos. Bogotá, Colombia. 79 p.

Ríos-Sánchez, E; Calleros, E; González-Zamora, A; Rubio, J; Martínez, O; Martínez, A; Hernández, S; Pérez-Morales, R. 2016. Análisis comparativo de

diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana. *Acta Universitaria* 26(4):56-65.

Rocha, F. 2004. Estrategias para aumento de sensibilidad em espectrofotometria uv-vis. *Química Nova*. 27(5):807-812.

Rocha-Salvatierra, PJ. 2002. Teoría y práctica para la extracción y purificación de palma de aceite. *Palmas* 23(03):9-16.

Rojas-Domínguez, P. 2018. Seminario de Mejoramiento Genético de Plantas I. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina.

Rosero, DA; Gutiérrez, LA; Cienfuegos, AV; Jaramillo, LM; Correa, MM. 2010. Optimización de un procedimiento de extracción de ADN para mosquitos anofelinos. *Colombiana de Entomología* 36(2):260-263.

Salazar-Montes, A; Sandoval-Rodríguez, A; Armendáriz-Borunda, J. 2013. *Biología Molecular: Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. 1era ed. DF, México. McGraw Hill education. 388 p.

Sambrook, J. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Nueva York, Estados Unidos. p 2344.

Segura, LE; Kirchmayr, MR; Flores, EP; Gschaedle, AC. 2010. PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas. *Guadalajara, México. e-Gnosis* 8(2):1-12.

Shittu, OB; Adelaja, OM; Obuotor, TM; Sam-Wobo, S O; y Adenaike, AS. 2016. PCR-Internal Transcribed Spacer (ITS) genes sequencing and phylogenetic analysis of clinical and environmental *Aspergillus* species associated with HIV-TB co infected patients in a hospital in Abeokuta, southwestern Nigeria. *African health sciences* 16(1):141–148.



Silva- Parra, A; Mogollón-Ortiz, AM; Delgado-Huerta, H. 2017. Soil microbiota: Influence of different land use patterns and soil management factors at Villavicencio Oxisol, East Colombia. *Biota Colombiana* 18(2):1-10.

Soria, MA. 2016. ¿Por qué son importantes los microorganismos del suelo para la agricultura? *Química Viva* 1(15):3-10.

Sun, X; Wang, M; Guo, L, Shu, C; Zhang, J; Geng, L. 2019. Guanidine thiocyanate solution facilitates sample collection for plant rhizosphere microbiome analysis. *Peer J* 7:6440.

Tanase, AM; Mereuta, I; Chiciudean, I; Ionescu, R; Milea, L; Petruta-Cornea, C; Vassu, T; Stoica, I. 2015. Comparison of total DNA Extraction Methods for Microbial Community Form Polluted Soil. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 6:616-622.

Trujillo-González, JM; Mahecha-Pulido, JD; Torres-Mora, MA.2018. El recurso suelo: Un análisis de sus funciones y capacidad de uso e indicadores de calidad. *Investigación Agraria y Ambiental* 9(2):30-37.

Universidad de Costa Rica. 2018. UCR investiga y aporta soluciones a polémico cultivo en Costa Rica (en línea). San José Costa Rica. Consultado 20 jul. 2019. Disponible en <https://www.ucr.ac.cr/noticias/2018/06/21/ucr-investiga-y-aporta-soluciones-a-polemico-cultivo-en-costa-rica.html>.

Valenzuela-González, F; Casillas-Hernández, R; Villalpando, E; Vargas-Albores, F y Harris, C. 2015. El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias marinas*. 41(4):297-313.

Vargas, R. 2010. La valoración de la prueba científica de ADN en el proceso penal. *Prolegómenos - Derechos y Valores* 8(25):127-146.

Velázquez, MS; Cabello, MN; Eliades, LA; Russo, ML; Allegrucci, N; Schalamuk, S. 2017. Combinación de hongos movilizadores y solubilizadores de fósforo con rocas

fosfóricas y materiales volcánicos para la promoción del crecimiento de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). Revista Argentina de Microbiología 49(41):349-355.

Verma, SK; Singh, H; Sharma, PC. 2017. An improved method suitable for isolation of high-quality metagenomic DNA from diverse soils. Biotech 7:171.

Wakelin , SA; Cave, VM; Dignam, BE; D´Ath, C; Tourna, M; Condrón, LM; Zhou, J; Van Nostrand, JD; O´Callaghan, M. 2016. Analysis of soil eDNA functional genes: potential to increase profitability and sustainability of pastoral agriculture. New Zealand Journal of Agricultural Research 59(4):333-350.

## ANEXOS

*Standardization of metagenomic DNA extraction protocol*

5 g soil samples (triplicate) from each of the five soil types were mixed with 10 ml of extraction buffer [100 mM Tris/HCl (pH 8.0), 100 mM EDTA (pH 8.0), 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0), 1.5 M NaCl, 1% (w/v) CTAB, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mg proteinase K/ml and 10 mg lysozyme/ml] in oakridge tubes and incubated at 37 °C for 1 h in incubator shaker at 200 rpm. After adding 2 ml of 20% (w/v) SDS, the mixture was incubated in water bath at 65 °C for 2 h with invert mixing after every 10–15 min. The tubes were centrifuged at 7000g for 20 min at 4 °C to collect the supernatant. The soil pellets were further extracted twice by adding 4.5 ml of extraction buffer and 0.5 ml of 20% (w/v) SDS, followed by incubation at 65 °C

for 15 min. The supernatants of three extractions were pooled and mixed with equal volume of chloroform/isoamylalcohol (24:1, v/v). The tubes were centrifuged again at 14,000g for 20 min at 4 °C to collect the upper aqueous phase. The crude DNA was precipitated by adding 0.1 volume 3 M sodium acetate along with 0.4 volume 30% (w/v) PEG-8000 (poly ethylene glycol) to the aqueous phase and incubated at –20 °C. After 2 h, the crude DNA was pelleted by centrifugation at 14,000g for 15 min at 4 °C, washed once with 70% (v/v) ethanol (room temperature) and air dried. The dried pellets were dissolved in 1 ml of 1× TE buffer and mixed with equal volume chloroform/isoamylalcohol (24:1, v/v). The aqueous phase was collected by centrifugation at 14,000g for 15 min at 4 °C and DNA was precipitated using 0.7 volume isopropanol followed by overnight incubation at –20 °C. The DNA was pelleted again by centrifugation at 14,000g for 15 min at 4 °C. The pellets were washed with 5 M NaCl, followed by 70% (v/v) ethanol and air dried. The dried pellet was dissolved in 200 µl 1× TE buffer.

**Anexo 1.** Extracto del protocolo de extracción de ADN reportado por Verma *et al.* 2017.

## 2.2. DNA Extraction Procedures

Five methods of DNA extraction (Table 1) were tested in order to choose the most suitable for specific soil samples. DNA was extracted from three technical replicates for each method, after several procedures of homogenizing, starting from the same 500mg of soil and resuspending the DNA pellets in 50µl water endonuclease free, for an easier evaluation procedure. The most important step in these procedures is represented by the cell lysis that can be obtained with various treatments of soil samples, e.g. with liquid nitrogen, microwaves or different size of glass or ceramic beads. We used two sizes of glass beads (Table 1) in order to detach the cells from soil matrix and in the same time to obtain the cell lysis.

Soil (0.5g) was homogenized on a vortex mixer (S8A Stuart) at 2200rpm for 5min with 600µl of extraction buffer (50mM Na-phosphate buffer [pH 8], 50mM NaCl, 500mM Tris-HCl [pH 8], and 5% SDS) and 300µl of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1 v/v) and 0.5g sterile glass beads 0.5-mm diameter, for S and SP protocol.

Resulted lysate was centrifuged at 16000g for 2 minutes. The supernatant was mixed with the same volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1 v/v) and centrifuged at 6,000g for 5min. The upper layer was transferred and mixed with an equal volume of chloroform-isoamyl alcohol (24:1 v/v) and centrifuged at 16,000g for 5 min for S protocol, and prior to this step at SP protocol, we added a 100µl proteinase K stock solution, and incubated for 30min at 37 °C. The supernatant was then precipitated with 1 volume of ice-cold isopropanol, and

incubated at -20 °C for 20min. In S-CTAB protocol the proteinase step was replaced by a 30 min incubation time at 65°C after adding 100 µl CTAB/NaCl solution.

ISOM procedure is a modified version by Plassart et al. (2012) named GnS-GII. Soil 0.5 g of was added to a tube containing 0.5 g of glass beads of 0.5 mm and, respectively, 0.1mm diameter. Soil sample was first mixed with 800µl of extraction buffer of 100mM Tris (pH 8.0), 100mM EDTA (pH 8.0), 100 mM NaCl and 2% (w/v) sodium dodecyl sulfate. Tubes were then shaken horizontal for 5 minutes at 2200 rpm on a vortex mixer (S8A Stuart) and incubated for 30 min at 65°C, before centrifugation at 14,000 g for 1 min. The supernatant was removed carefully and treated with 1/10 volume of 3M potassium acetate for proteins precipitation, followed by an incubation at -20 °C for 15 min. The precipitated proteins were removed by centrifugation at 14,000g for 5min at 4°C. Finally, nucleic acids were precipitated by adding 1 volume of ice-cold isopropanol. The DNA pellets obtained after centrifugation 14,000 g for 5min at 4°C were resuspended in the same volume for all methods, respectively 50 µl of endonuclease-free water. Sample aliquots of 0.5 g soil were added directly to Powerbead tubes of Soil DNA Isolation Kit Norgen Biotek along with 60 µL of Lysis Solution and isolated DNA was further purified according to the manufacturer's instructions.

Visualization of DNA amount was made in 1% agarose gel with TBE1X (Tris/Borate/EDTA) buffer and then stained with ethidium bromide. The visual estimations from the gel were then correlated to the spectrophotometric measurements at 260nm made by the NanoVuePlus HG Healthcare Life Science spectrophotometer. Soil DNA extraction was carried out in triplicate (n = 3) and DNA quantification for each extract was carried out in triplicates and DNA yields were estimated as average value with standard deviation (g DNA/g soil). Absorption ratios  $A_{260}/A_{280}$ ,  $A_{260}/A_{330}$  were calculated in order to characterize the DNA extracts, and presented also as mean value (Table 2).

## **Anexo 2.** Extracto del protocolo de extracción de ADN reportado por Tanase *et al.* 2015.



**Anexo 3.** Soluciones de SDS al 10% y buffer de extracción de ADN.



**Anexo 4.** Conservación de suelo en bolsas plásticas a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Anexo 5.** Muestra de suelo de piña con el balín, buffer de extracción y SDS

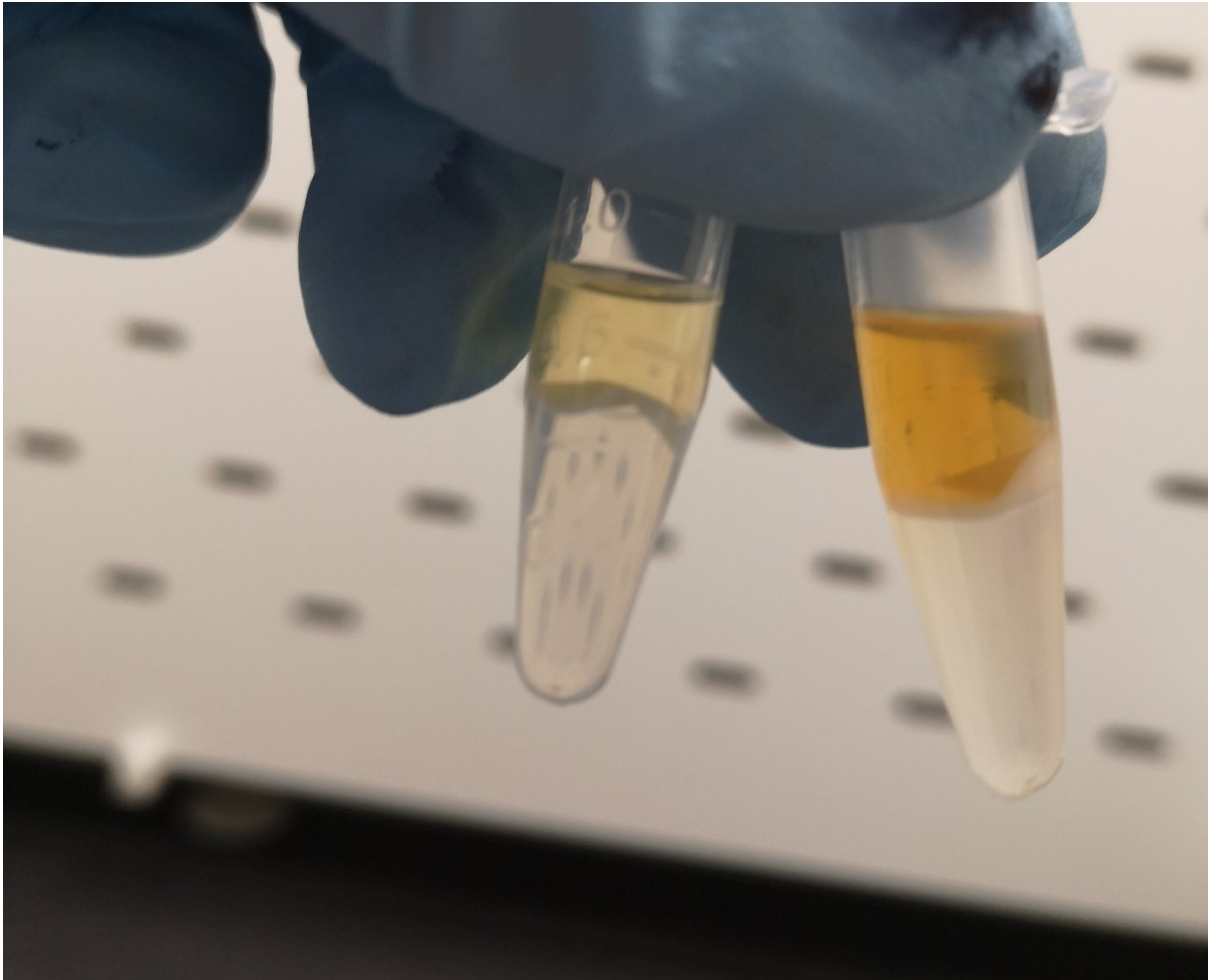


**Anexo 6.** Homogenización de la muestra para la lisis celular

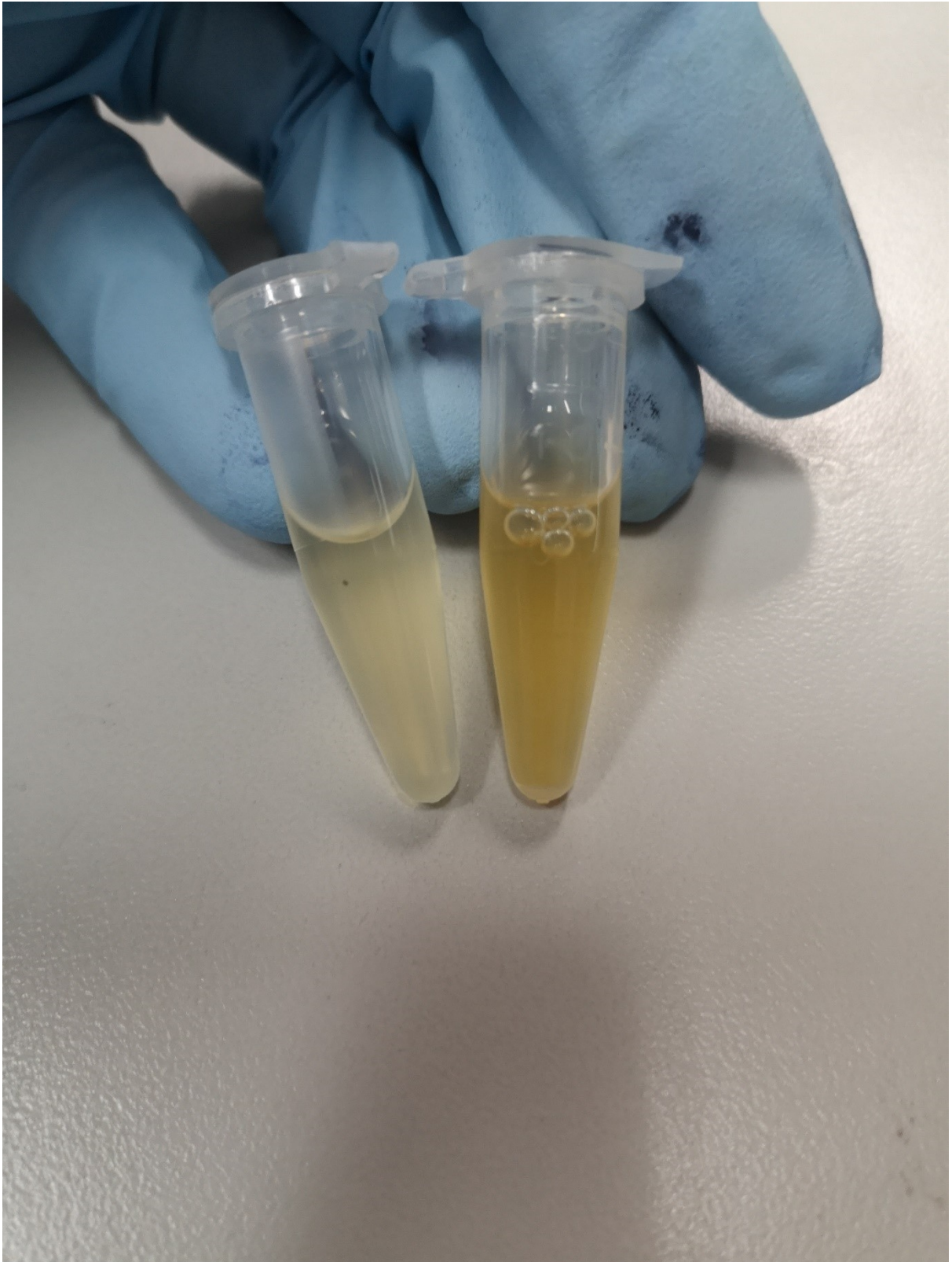




**Anexo 7.** Separación de las fases de sedimento de suelo, y fase acuosa después de la centrifugación



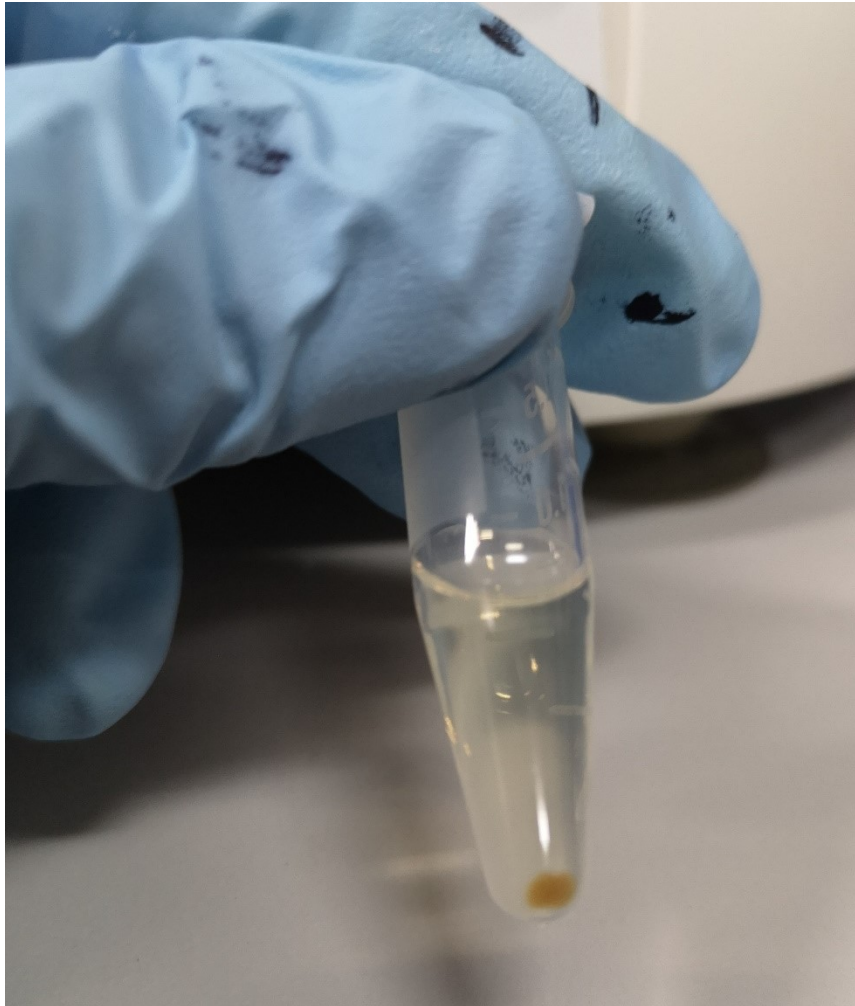
**Anexo 8.** Adición del cloroformo -isoamíl-alcohol (fase inferior transparente) al sobrenadante de la muestra posterior a la centrifugación.



**Anexo 9.** Homogenización en vortex del sobrenadante y el cloroformo-isoamílico.



**Anexo 10.** Resultado de la homogenización en vórtex, posterior a la adición de Isopropanol al sobrenadante.



**Anexo 11.** Precipitación del ADN con el isopropanol, posterior a la centrifugación.



**Anexo 12.** Secado del precipitado de ADN en centrifuga al vacío a 20 °C durante 20 minutos.

#### Marginal hypothesis testing

Source	numDF	denDF	F-value	p-value
Trat.conservacion	3	20	13,65	<0,0001

#### ng.µl - Adjusted means and standard error for the levels of Trat.conservacion

LSD Fisher (Alpha:=0,05)

p-value correction procedure: Bonferroni

Trat.conservacion	LinPred	S.E.	Mean	S.E.	
Sólido congelado	386,92	41,95	386,92	41,95	A
Sedimento+Alcohol	156,39	41,95	156,39	41,95	B
Sedimento	86,74	41,95	86,74	41,95	B
Alcohol	36,10	41,95	36,10	41,95	B

Means with a common letter are not significantly different ( $p > 0,05$ )

**Anexo 13.** Comparación de medias con la prueba LSD-Fisher y p-valor para la concentración de ADN (ng/µl) con los tratamientos de conservación de suelos.

#### Marginal hypothesis testing

Source	numDF	denDF	F-value	p-value
Trat.conservacion	3	20	0,73	0,5472

#### C280.260 - Adjusted means and standard error for the levels of Trat.conservacion

LSD Fisher (Alpha:=0,05)

p-value correction procedure: Bonferroni

Trat.conservacion	LinPred	S.E.	Mean	S.E.	
Sedimento	1,40	0,03	1,40	0,03	A
Sedimento+Alcohol	1,39	0,03	1,39	0,03	A
Sólido congelado	1,39	0,03	1,39	0,03	A
Alcohol	1,34	0,03	1,34	0,03	A

Means with a common letter are not significantly different ( $p > 0,05$ )

**Anexo 14.** Comparación de medias para la calidad 260/280 de ADN y p-valor con los tratamientos de conservación de suelos.

### Marginal hypothesis testing

Source	numDF	denDF	F-value	p-value
Trat.conservacion	3	20	2,48	0,0908

### C260.230 - Adjusted means and standard error for the levels of Trat.conservacion

LSD Fisher (Alpha: =0,05)

p-value correction procedure: Bonferroni

Trat.conservacion	LinPred	S.E.	Mean	S.E.	
Sólido congelado	0,78	0,04	0,78	0,04	A
Alcohol	0,70	0,04	0,70	0,04	A B
Sedimento+Alcohol	0,67	0,04	0,67	0,04	A B
Sedimento	0,64	0,04	0,64	0,04	B

Means with a common letter are not significantly different ( $p > 0,05$ )

**Anexo 15.** Comparación de medias y p-valor para la calidad 260/230 de ADN con los tratamientos de conservación de suelos.

### Marginal hypothesis testing

Source	numDF	denDF	F-value	p-value
Finca	9	58	0,71	0,6936
ecosistema	1	58	2,40	0,1266
Finca:ecosistema	9	58	1,09	0,3831

### C280.260 - Adjusted means and standard error for the levels of Finca

LSD Fisher (Alpha:=0,05)

p-value correction procedure: Bonferroni/

Finca	LinPred	S.E.	Mean	S.E.	
Las Brisas	1,46	0,02	1,46	0,02	A
Inversiones Yarinacocha	1,45	0,03	1,45	0,03	A
Euclides Barrantes	1,45	0,03	1,45	0,03	A
Upala Agrícola	1,43	0,02	1,43	0,02	A
Piñas Cultivadas CR	1,42	0,02	1,42	0,02	A
Dagoberto Arias	1,42	0,03	1,42	0,03	A
Tierra Fértil SA	1,42	0,03	1,42	0,03	A
Tremedal	1,41	0,02	1,41	0,02	A
Finca Dos	1,40	0,02	1,40	0,02	A
Piña Alegre SA	1,40	0,03	1,40	0,03	A

Means with a common letter are not significantly different ( $p > 0,05$ )

**Anexo 16.** Comparación de medias y p-valor para calidad 260/280 de ADN en la interacción finca x uso de suelo (ecosistema).



### Marginal hypothesis testing

Source	numDF	denDF	F-value	p-value
Finca	9	58	0,84	0,5792
ecosistema	1	58	2,53	0,1173
Finca: ecosistema	9	58	0,74	0,6704

### C260.230 - Adjusted means and standard error for the levels of Finca

LSD Fisher (Alpha: =0,05)

p-value correction procedure: Bonferroni

Finca	LinPred	S.E.	Mean	S.E.
Las Brisas	0,83	0,04	0,83	0,04
Finca Dos	0,82	0,04	0,82	0,04
Piña Alegre SA	0,79	0,04	0,79	0,04
Tremedal	0,77	0,04	0,77	0,04
Tierra Fértil SA	0,77	0,04	0,77	0,04
Piñas Cultivadas CR	0,76	0,03	0,76	0,03
Dagoberto Arias	0,76	0,04	0,76	0,04
Euclides Barrantes	0,74	0,04	0,74	0,04
Inversiones Yarinacocha	0,74	0,04	0,74	0,04
Upala Agrícola	0,73	0,04	0,73	0,04

Means with a common letter are not significantly different ( $p > 0,05$ )

**Anexo 17.** Comparación de medias y p-valor para calidad 260/230 de ADN en la interacción finca x uso de suelo (ecosistema).

#### R specification of the model

```
glmm.model.000 ng.ul REML<-glm(ng.ul~1+Finca+ecosistema+Finca:ecosistema
, family=myFamily
, na.action=na.omit
, data=glmm.modelR.data00)
```

#### Fit measurements

n	AIC	BIC	logLik	deviance	df.resid
78	1183,51	1233,00	-570,75	10360596,91	58,00

Smaller AIC and BIC is better

#### Family

Family	link
gaussian	identity

#### Marginal hypothesis testing

Source	numDF	denDF	F-value	p-value
Finca	9	58	1,75	0,0993
ecosistema	1	58	6,00	0,0173
Finca:ecosistema	9	58	2,18	0,0368

**Anexo 18.** Comparación de medias con la prueba LSD Fisher y p-valor para la concentración (ng/μl) de ADN en la interacción finca x uso de suelo (ecosistema).