

UCUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Maestría en Biociencias Aplicadas con mención en Biodescubrimiento

Caracterización de la comunidad de hongos endófitos asociados a la raíz de joyapa (*Macleania rupestris*) y evaluación del efecto de cepas cultivables en el desarrollo de plántulas

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Magíster en Biociencias Aplicadas con mención en Biodescubrimiento.

Autor:

Diana Lorena Curillo Santos

C.I. 0302737929

Correo electrónico: diana82093@gmail.com

Directora:

Blga. Denisse Fabiola Peña Tapia MsC.

C.I. 0102501889

Correo electrónico: denisse.pena@ucuenca.edu.ec

Cuenca, Ecuador

29 de noviembre de 2022

Resumen

Macleania rupestris es una ericácea nativa con alto potencial, en términos de beneficios para la salud y el medio ambiente. Caracterizar las interacciones generalistas o especializadas entre *M. rupestris* y los hongos asociados es clave para apoyar su conservación y domesticación. Sin embargo, se sabe muy poco sobre la relación entre los endófitos promotores del crecimiento vegetal y la planta ericácea *M. rupestris*. Por lo tanto, para aprender más sobre el microbiota asociada a los suelos de *M. rupestris*, analizamos comunidades de endófitos asociados al suelo circundante y rizosférico de la planta. Los cuales presentaron una alta abundancia de géneros tales como *Proteobacteria* y *Actinobacteria*.

Objetivo:

Caracterizar de la comunidad de hongos endófitos asociados a la raíz de joyapa (*Macleania rupestris*) y evaluar del efecto de cepas cultivables en el desarrollo de plántulas.

Metodología:

Se aisló endófitos fúngicos de las raíces de *M. rupestris* para evaluar su actividad promotora del crecimiento sobre plántulas. Esta investigación discute la influencia de los hongos endófitos en el desarrollo de plantas de *M. rupestris*. Se obtuvieron un total de seis hongos cultivables los cuales fueron identificados por la comunidad de hongos aislados se caracterizó mediante marcadores moleculares ITS (interno transcrito espaciador) y LSU (subunidad grande).

Con el fin de investigar el efecto de los endófitos en el crecimiento de las plantas, se seleccionaron los 6 hongos aislados para evaluar su capacidad de promover el crecimiento de las plantas mediante la aplicación de un bioensayo de inoculación de cepas.

Resultados:

Los resultados indicaron que *Clonostachys rosea* y *Trichoderma paravidescens* aislados de las raíces de *M. rupestris* poseen un papel vital para promover el crecimiento de las plantas. Su uso potencial como inoculantes para establecer un sistema de producción de cultivos sostenible y su aplicación en el descubrimiento de compuestos bioactivos debería ser parte de futuras investigaciones.

Palabras clave: Endófito. Promotor de crecimiento. *Macleania rupestris*. Comunidades microbianas

Abstract

Macleania rupestris is a native Ericaceae with high potential in terms of benefits for health and the environment. Characterizing generalist or specialized interactions between *M. rupestris* and associated fungi is key to supporting its conservation and domestication. However, very little is known about the relationship between plant growth promoting endophytes and *M. rupestris*. Therefore, to learn more about the soil-associated microbiota of *M. rupestris*, we analyzed endophyte communities associated with the plant's surrounding soil and rhizosphere. Which presented a great abundance of genera such as *Proteobacteria* and *Actinobacteria*. *rupestris* plants.

Objective:

Characterize the endophytic fungal community associated with the root of joyapa (*Macleania rupestris*) and evaluate the effect of cultivable strains on seedlings development

Methodology:

Fungal endophytes were isolated from the roots of *M. rupestris* to evaluate their growth-promoting activity on seedlings. This research discusses the influence of endophytic fungi on the development of *M. A* total of six cultivable fungi were extracted, which were identified by the community of isolated fungi and characterized by molecular markers ITS (internal transcribed spacer) and LSU (large subunit).

To investigate the effect of endophytes on plant growth, the 6 isolated fungi were selected to evaluate their ability to promote plant growth by applying a strain inoculation bioassay.

Results:

The results indicated that *Clonostachys rosea* and *Trichoderma paravidescens* isolated from the roots of *M. rupestris* have a vital role in promoting plant growth. Their potential use as inoculants to establish a sustainable crop production system and their application in the discovery of bioactive compounds should be part of future research.

Keywords: Endophyte. Growth promoter. *Macleania rupestris*. Microbial communities

AGRADECIMIENTOS.....	7
1 Introducción.....	9
2 Materiales y Métodos.....	10
2.1 Área de recolección de muestras.....	10
2.1.1 Recolección de muestras de suelo.....	10
2.1.2 Extracción de ADN de suelos y secuenciación masiva.....	10
2.1.3 Análisis estadístico.....	11
2.2 Aislamiento de hongos endófitos.....	11
2.2.1 Extracción de ADN de hongos cultivados.....	11
2.2.2 Identificación de las cepas fúngicas aisladas.....	11
2.3 Germinación de semillas y obtención de plántulas.....	12
2.3.1 Inoculación de cepas fúngicas en plántulas de <i>M. rupestris</i>	12
3 Resultados.....	12
3.1 Aislamiento de hongos cultivables.....	12
3.2 Inoculación de hongos endófitos cultivables en plántulas de <i>M. rupestris</i> 13	
3.3 Análisis metagenómico.....	14
3.3.1 Comunidades microbianas presentes en suelo circundante y rizosférico de <i>M. rupestris</i>	14
4 Discusión.....	17
4.1 Inoculación de plantas con hongos aislados.....	17
4.2 Diversidad microbiana presente en suelos rizosférico y circundante de <i>M. rupestris</i>	17
5 Conclusión.....	18
6 Agradecimientos.....	¡Error! Marcador no definido.
7 Bibliografía.....	19
8 Anexos.....	24
8.1 Ensayo Inoculación.....	24
8.2 Índices de diversidad.....	25

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Diana Lorena Curillo Santos en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Caracterización de la comunidad de hongos endófitos asociados a la raíz de joyapa (*Macleania rupestris*) y evaluación del efecto de cepas cultivables en el desarrollo de plántulas”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 29 de noviembre de 2022



Diana Lorena Curillo Santos

C.I: 0302737929

Cláusula de Propiedad Intelectual

Diana Lorena Curillo Santos, autor del trabajo de titulación “Caracterización de la comunidad de hongos endófitos asociados a la raíz de joyapa (*Macleania rupestris*) y evaluación del efecto de cepas cultivables en el desarrollo de plántulas”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 29 de noviembre de 2022



Diana Lorena Curillo Santos

C.I: 0302737929

Agradecimientos

Expreso mi mayor agradecimiento al grupo de investigación del Laboratorio de Biología Molecular y Propagación *in vitro* de plantas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, a Blga. Denisse Peña MsC., Ing. Eduardo Chica PhD., Dr. Antonio Vallecillo PhD por compartir sus conocimientos y por su guía durante el desarrollo proyecto de investigación.

Agradezco también al Ing. Juan Manuel Cevallos PhD., del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador – CIBE, por su confianza y apoyo en la elaboración de la investigación.

Dedicatoria

A Dios por todas las bendiciones y por permitirme seguir cumpliendo mis metas.

A mi hermana Karla, mi ángel, que me cuida siempre y me guía en cada paso de mi vida. Siempre serás la persona más importante en mi vida siempre te llevare en mi corazón.

A mis padres, por todo el apoyo y cariño que me dieron durante toda mi vida.

A mi esposo, por siempre estar a mi lado apoyándome en mis mejores y peores momentos.

A mi familia, les agradezco infinitamente por toda la ayuda durante mi carrera profesional.

CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD DE HONGOS ENDÓFITOS ASOCIADOS A LA RAÍZ DE JOYAPA (*Macleania rupestris*) Y EVALUACIÓN DEL EFECTO DE CEPAS CULTIVABLES EN EL DESARROLLO DE PLÁNTULAS

Diana Curillo ¹, Juan Manuel Cevallos ², Eduardo Chica ¹, Denisse Peña¹

¹ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca

² Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)

1 Introducción

Ericaceae es una gran familia de plantas angiospermas que incluye hierbas, arbustos enanos, arbustos y árboles que se encuentran comúnmente en condiciones de crecimiento ácidas e infértiles (Ștefănescu et al., 2019). Las Ericáceas se consideran la octava familia más grande de plantas con flores, con más de 125 géneros y alrededor de 4100 especies distribuidas en todo el mundo (Schwery et al., 2015). En la región andina del Ecuador existe una gran variedad de Ericáceas usadas por comunidades rurales e indígenas, entre éstas, *Macleania rupestris*, conocida localmente como “joyapa” es una especie de ericácea proveedora de frutos para el consumo humano en comunidades de la región Andina (Durán-Casas et al., 2013; Veloza et al., 2014). Los beneficios para la salud de estas frutas, se atribuyen a los antioxidantes que son altamente efectivos controlando la producción de radicales libres; previenen los efectos indeseables de las especies reactivas de oxígeno y apoyan los mecanismos antioxidantes y desintoxicantes en el organismo (Fuchs et al., 2010; Schwery et al., 2015). La familia Ericácea es una de las más representativas de los bosques andinos, principalmente en los bosques nubosos de montaña, así como en las regiones de páramo y subpáramo, donde desempeña un importante papel ecológico (Luteyn, 2002) como regulador del agua, fuente de alimentos para varias especies de aves y del oso andino y, en algunos casos, fuente de ingresos para los habitantes de la región (Durán-Casas et al., 2013).

Las Ericáceas pueden establecer asociaciones raíz-hongo con varios socios fúngicos pertenecientes a diferentes taxones. Las asociaciones de endofitismo de raíz y micorrízicas son rasgos complejos derivados de hongos que dan forma a la fisiología de las plantas (Hawksworth, 2004; Wang et al., 2017). Sin embargo, estas interacciones aún están en debate, en realidad se sabe muy poco sobre estas asociaciones simbióticas (Hamim et al., 2017). En otras especies de ericáceas, se han examinado varios endófitos por su capacidad para producir metabolitos que promueven su crecimiento, similares a los producidos por sus hospedadores, pero en mayores cantidades (Alurappa et al., 2018; Zhao et al., 2010). Sin embargo, la diversidad de los hongos que colonizan los sistemas radiculares de ericáceas y la importancia de estas asociaciones en el ciclo de vida de estos arbustos, ha sido poco estudiada, por lo que se requieren una caracterización más completa de estas comunidades fúngicas.

El presente estudio es un aporte al conocimiento de las complejas asociaciones que establece, *Macleania rupestris* en los andes del sur del Ecuador. Nos propusimos 1) caracterizar las comunidades endófitas de suelo rizosférico y suelo circundante a plántulas de *Macleania rupestris* en ejemplares colectados en tres localidades de la sierra sur del Ecuador 2) Aislar e identificar parte de la comunidad de hongos endófitos

cultivables a partir de raíces de *Macleania rupestris* y 3) evaluar el efecto de las cepas fúngicas aisladas en el desarrollo inicial de plántulas de *Macleania rupestris* germinadas en condiciones de laboratorio. Los resultados obtenidos aportan conocimientos útiles para una posible domesticación de esta especie vegetal y su posterior uso como fuente de alimento, apoyo a programas de conservación u otros.

2 Materiales y Métodos

2.1 Área de recolección de muestras

Se establecieron 3 puntos de muestreo dentro de la provincia del Azuay, Ecuador, en las parroquias de Baños (2°57'25.1"S 79°05'46.8"W), Sayausí (2°51'12.5"S 79°06'10.4"W) y Sigsig (3°00'51.7"S 78°46'48.0"W), ubicados en altitudes entre los 2900 y 3100 msnm. Las muestras colectadas fueron procesadas en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca como se describe a continuación.

2.1.1 Recolección de muestras de suelo

Las muestras de suelos fueron recolectadas de las raíces de la joyapa, en etapa de plántulas, siguiendo el método de muestreo de (Barillot et al., 2013), que consiste en excavar una profundidad aproximada de 30cm para la obtención de las muestras. En cuanto al suelo circundante se extrajo parte de las raíces de las plántulas de joyapa seleccionadas en campo y estas raíces se agitan vigorosamente por 10 min para recolectar el suelo que se desprende de ellas. Por otra parte, las muestras de suelo rizosférico fueron obtenidas manualmente al sacar el suelo que quedó adherido a las raíces de las plántulas. Las muestras de suelo recolectadas por separado se tamizaron y almacenaron en bolsas de plástico en la oscuridad a 4°C aproximadamente, usando hielo. Las muestras se transportaron al laboratorio y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

2.1.2 Extracción de ADN de suelos y secuenciación masiva

Para la extracción de ADN, se usaron las muestras recolectadas de suelo circundante y rizosférico por cada punto de muestreo. La extracción de ADN se realizó usando 250 mg de suelo congelado, previamente almacenadas a -20 °C. La extracción se realizó con el kit DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen, Hilden, Germany), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, en cuanto a la calidad y concentración de ADN obtenido, estos parámetros se evaluaron mediante el fluorómetro Qubit™ 4.0 (Thermo Fisher Scientific, 2018).

Para caracterizar e identificar la comunidad microbiana asociada con el suelo circundante y rizosférico de *M. rupestris*, se llevó a cabo la secuenciación mediante Nanopore MinION Oxford (Leggett & Clark, 2017). Las bibliotecas para la secuenciación de MinION se prepararon sin corte utilizando el kit de secuenciación de ligadura 1D (SQK-LSK109), y el ADN se codificó con el kit de expansión de código de barras nativo (EXP-NBD103) (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido) (Huang et al., 2021; Srivastava et al., 2020). Se utilizó el flujo de trabajo pipeline EPI2ME (WIMP rev. 3.2.3) de la tubería basada en la nube de Oxford Nanopore Technology (ONT) para recuperar el análisis de información hasta el nivel de género, junto con información detallada sobre las especies e incluso el nivel de especie superior al acceder al archivo llamado base (Srivastava et al., 2020). Cada lectura se clasifica por identidad y porcentaje de cobertura.

2.1.3 Análisis estadístico

La diversidad α de la comunidad se estimó utilizando los índices de diversidad de Shannon, Simpson y Chao1. La diversidad beta se estimó usando la disimilitud de Bray-Curtis, empleando la función `vegdist` del paquete `vegan` en R. Luego, se usó un análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA) para comparar la estructura de la comunidad microbiana entre el suelo circundante y rizosférico; esto se realizó con 999 permutaciones usando la función `adonis` del paquete `vegan` en R.

2.2 Aislamiento de hongos endófitos

Las raíces de *M. rupestris* previamente recolectadas y conservadas a 4 °C, fueron desinfectadas mediante un lavado con agua corriente, luego sumergidas en una solución de etanol al 70 % (v/v) durante 1 min, y posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio al 1,5 % durante 5 minutos, finalmente las raíces se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril (Hamim et al., 2017). Para el aislamiento de los hongos endófitos, en cabina de flujo laminar, un fragmento de aproximadamente 3 cm de la raíz desinfectada fue colocado en una caja Petri estéril, y cortado en fragmentos pequeños con la ayuda de pinzas y bisturí. Sobre los fragmentos obtenidos se agregó medio de cultivo FIM (Fungi Isolation Medium). Las cajas se cerraron y mantuvieron a temperatura ambiente (alrededor de 20 °C) por 96 horas, observando diariamente las hifas emergentes y transfiriéndolas a medio PDA (agar papa dextrosa) para su desarrollo. Los hongos cultivados se agruparon según el color y apariencia (Declerck et al., 2005; Hamim et al., 2017).

2.2.1 Extracción de ADN de hongos cultivados

La extracción de ADN genómico se realizó usando el protocolo modificado de Cenis (1992) que consiste en añadir 500 μ l de tampón TE pH 8,0 a 50 mg de micelio previamente cultivado y recolectado de las cajas de cultivo, luego centrifugar a 15000 rpm durante 5 min y eliminar el tampón TE, añadir 300 μ l de solución de extracción (200 mM Tris HCl pH 8,5; 250 mM NaCl, 25 mM; EDTA 0,5 % SDS). Triturar el micelio en un TissueLyser II (Qiagen) con perlas metálicas por 3 minutos y añadir 150 μ l de acetato de sodio 3 M, pH 5,2. El tubo de ensayo se mantuvo a -80 °C durante 10 minutos. Después se descongeló y centrifugó a 15000 rpm durante 5 min, el sobrenadante se transfirió a otro tubo de ensayo y se le añadió una cantidad igual de isopropanol. Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente, el sobrenadante se centrifugó a 1500 rpm durante 15 minutos con 300 μ l de etanol 70 % para realizar un lavado, este procedimiento se repitió y luego de eliminar el etanol, el ADN se dejó secar en microestufa a 100 °C y se disolvió en 50 μ l de tampón TE (Mořková & Vytřasová, 2011). Para la visualización del ADN extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.5% y se comprobó que el ADN no estaba degradado.

2.2.2 Identificación de las cepas fúngicas aisladas

A partir del ADN extraído se amplificó un fragmento de la región ITS utilizando los cebadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTA TTGATATGC-3') (White et al., 1990) y LR0R. (5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3') y LR3 (5'-CCGTGTTTCAAGACGGG-3') (Vilgalys & Hester, 1990). Los fragmentos amplificados fueron purificados y secuenciados por un proveedor de servicios externo (Macrogen Inc., Corea del Sur) para luego comparar las secuencias en la base de datos GenBank del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica) utilizando BLAST (Altschul, 1997). La identidad de cada aislamiento se asignó en base al porcentaje de similitud con las secuencias encontradas en la base de datos de GenBank.

2.3 Germinación de semillas y obtención de plántulas

Se recolectaron frutos semi-maduros de joyapa entre los meses de enero – marzo. La desinfección de frutos se realizó en una campana de flujo laminar, para ello se sumergieron los frutos en una solución de etanol al 70 % (v/v) durante 1 min, y posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio (3,5 %) durante 10 min, finalmente los frutos fueron enjuagados tres veces consecutivas con agua destilada esterilizada (TURNER et al., 2009). Una vez desinfectados los frutos, en cabina de flujo laminar, se extrajeron las semillas con la ayuda de una jeringa y se colocaron en una solución de AG₃ 2000 ppm por 24 h.

Posteriormente, las semillas se colocaron en una caja Petri de 9cm de diámetro con papel filtro y agua destilada estéril por 8 semanas para su germinación y la obtención de plántulas. Las plántulas obtenidas fueron colocadas en turba estéril para los ensayos de inoculación con los hongos aislados a partir de las raíces de *M.rupestris*.

2.3.1 Inoculación de cepas fúngicas en plántulas de *M. rupestris*

Un total de seis hongos aislados fueron seleccionados para evaluar su efecto en el desarrollo inicial de plántulas de *M. rupestris*. Luego de dos semanas de adaptación de la plántulas en la turba estéril, se realizó la inoculación de las diferentes cepas de hongos aislados, para ello se aplicó una solución preparada con media caja Petri de micelio diluido en 250 ml de agua destilada estéril (Repáč, 2011). El ensayo de crecimiento de plántulas se realizó en condiciones controladas en cuarto de cultivo durante 90 días bajo un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ con 10 plántulas individuales por cada hongo endófito aislado y el grupo control no inoculado. Todas las plántulas fueron tratadas con fertilizante orgánico convencional con una solución nutritiva y luego inoculadas con los hongos aislados excepto el grupo control. El número de raíces y la altura de las plántulas se registró 90 días después de las inoculaciones. La altura de la planta se midió desde la superficie del suelo hasta la punta del tallo. Los datos de crecimiento de las plantas se sometieron a ANOVA de una vía ($\alpha = 0.05$) (Chadha & Varma, 2015).

3 Resultados

3.1 Aislamiento de hongos cultivables

Se aislaron un total de 12 cepas de hongos provenientes de las raíces de *M. rupestris*. En la mayoría de las raíces cultivadas se presentaron hongos con morfotipos similares por lo cual se agruparon según su morfología (color, forma y tiempo de crecimiento), lo que nos llevó a un total de seis morfotipos, que fueron utilizados en la posterior identificación y análisis molecular (figura1)

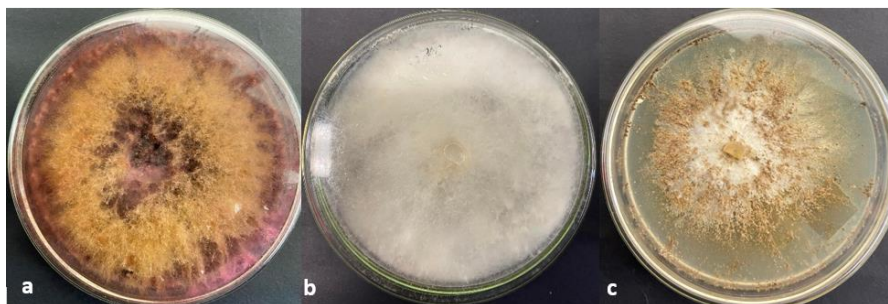


Figura 1. Hongos aislados de las raíces de joyapa. a.) *Fusarium asiaticum* b.) *Trichoderma paraviridescens* c.) *Clonostachys rosea*

De las seis cepas de hongos aislados 3 pertenecieron al género *Trichoderma*, *T. paraviridescens*, *T. viridescens* y *T. atroviridae*; adicionalmente, dos cepas se identificaron dentro del género *Fusarium*, *F. asiaticum* y *F. graminearum* y finalmente se identificó una cepa de *Clonostachys rosea*, todas identificadas a un nivel del 99% de similitud (ver Tabla 1).

ID Fungi	Isolate closest match	Similarity (%)
MS1	<i>Fusarium asiaticum</i>	99
MC2	<i>Clonostachys rosea</i>	99
MC1	<i>Fusarium graminearum</i>	99
JF	<i>Trichoderma viridescens</i>	99
JM	<i>Trichoderma atroviridae</i>	99
JC2	<i>Trichoderma paraviridescens</i>	99

Tabla 1. Coincidencias más cercanas de búsqueda de los hongos aislados en comparación con las bases de datos de NCBI Genbank.

3.2 Inoculación de hongos endófitos cultivables en plántulas de *M. rupestris*

Luego de 90 días de inoculación con los hongos previamente aislados e identificados, los resultados indicaron que las plantas inoculadas con *Clonostachys rosea* presentaron los mejores resultados en su desarrollo, evaluado por el número de hojas y la altura de las plantas, que en promedio, fue de 8 hojas por planta y 6,5 cm de altura, a diferencia del grupo de control, que presentó promedios de 5 hojas por planta y 2 cm de altura. A estos datos le siguieron los obtenidos por las plantas inoculadas con *T. paraviridescens* que registraron 7 hojas y 5 cm de altura promedio. A excepción de *T. viridescens* todas las cepas fúngicas presentaron un efecto en el desarrollo de las plantas, superando en altura al tratamiento control, sin embargo respecto al número de hojas, además de *C. Rosea* y *T. paraviridescens*, solo *T. viridescens*, superó ligeramente al control, sin que ésta diferencia sea estadísticamente significativa ($p > 0.05$), contrario a los resultados obtenidos al usar *C. rosea* y *T. paraviridescens* en donde las diferencias demostraron ser estadísticamente significativas para ambos parámetros evaluados ($p < 0.05$) (Figura 2a y 2b).

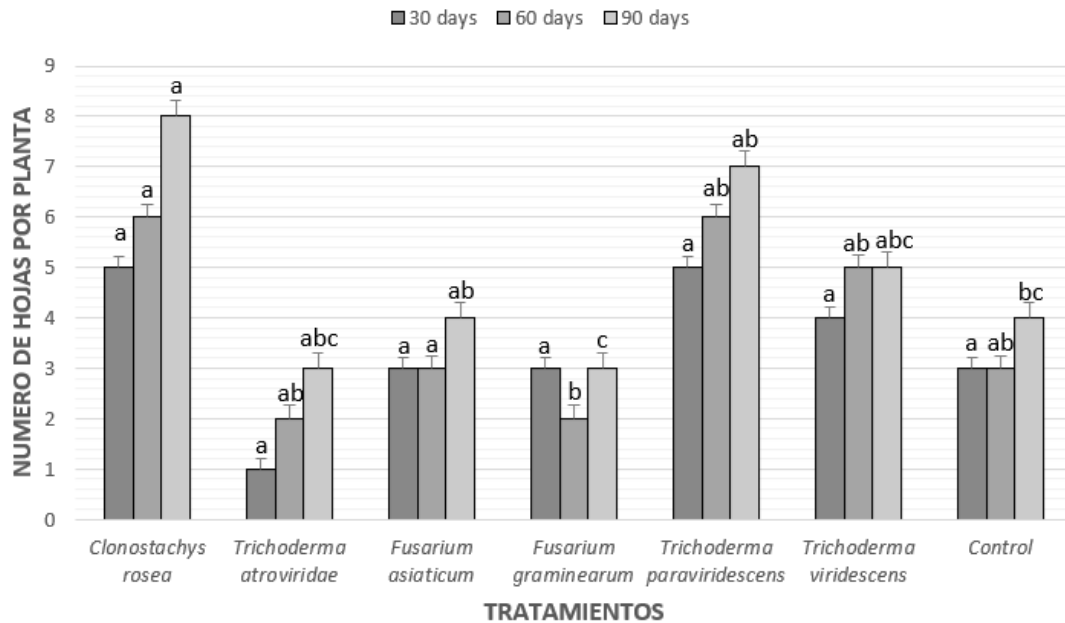


Figura 2a. Numero de hojas por planta por cada aislado

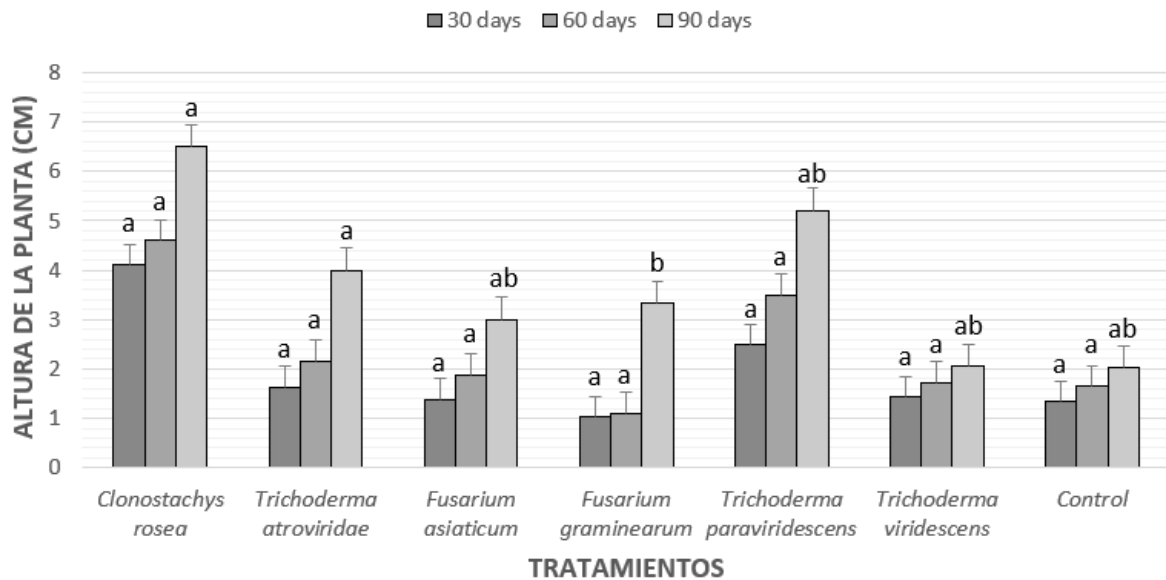


Figura 2b. Altura de las plántulas por cada aislado

3.3 Análisis metagenómico

3.3.1 Comunidades microbianas presentes en suelo circundante y rizosférico de *M. rupestris*

De las dos muestras recolectadas (1 circundante y 1 rizosférico), por cada uno de los 3 puntos de muestreo, se obtuvieron composiciones comunitarias indicando la presencia de 4 reinos, 40 filos, 83 clases, 175 órdenes, 366 familias, 1090 géneros y 3151 especies en las muestras de suelo rizosférico y para el suelo circundante se encontraron 4 reinos, 36 filos, 72 clases, 156 órdenes, 330 familias, 894 géneros y 2432 especies. Se observó que un total de 15 filos, pertenecientes al reino Monera (bacterias) presentaron una

abundancia relativamente alta, superior al 1% en las muestras de suelo rizosférico y circundante. Según los datos obtenidos, el reino de Bacterias fue el más abundante constituyendo el 96% de las lecturas totales de las muestras, mientras que el reino Fungi solo constituye el 4% de los cuales ninguno fue categorizado como endófito.

En cuanto a bacterias, el número total de lecturas dentro de las muestras de suelo rizosférico fue de 61288 constituido principalmente por Proteobacteria (35%), Actinobacteria (10%), Bacteroidetes (2%). Para las muestras de suelo circundante se obtuvo 53,075 lecturas siendo los grupos más representativos los de Proteobacteria (15%), Actinobacteria (4%) y Bacteroidetes (1%). Al analizar diversidad alfa de los filos más abundantes, mediante el índice de diversidad (Shannon), índice de dominancia (Simpson) y el índice de riqueza (Chao1) para las comunidades bacterianas en el suelo circundante y rizosférico, se evidencia mayor diversidad en el suelo rizosférico de *M. rupestris* en comparación con el suelo circundante (Figura 3). También se encontró que la estructura de la comunidad microbiana difirió el tipo de suelo muestreado (rizosférico/circundante) Observándose un aumento en la distancia (Bray – Curtis, $P = 0.03$) entre las muestras de suelo rizosférico y circundante. (PERMANOVA Shannon, $P = 0.05$, PERMANOVA Simpson, $P = 0.02$, PERMANOVA Chao1, $P = 0.01$).

Como se puede observar en la figura 3 a excepción de las muestras de Nero, cuando son analizadas mediante el índice de Simpson, en todos los casos, las muestras de suelo rizosférico presentan mayor diversidad que las muestras de suelo circundante.

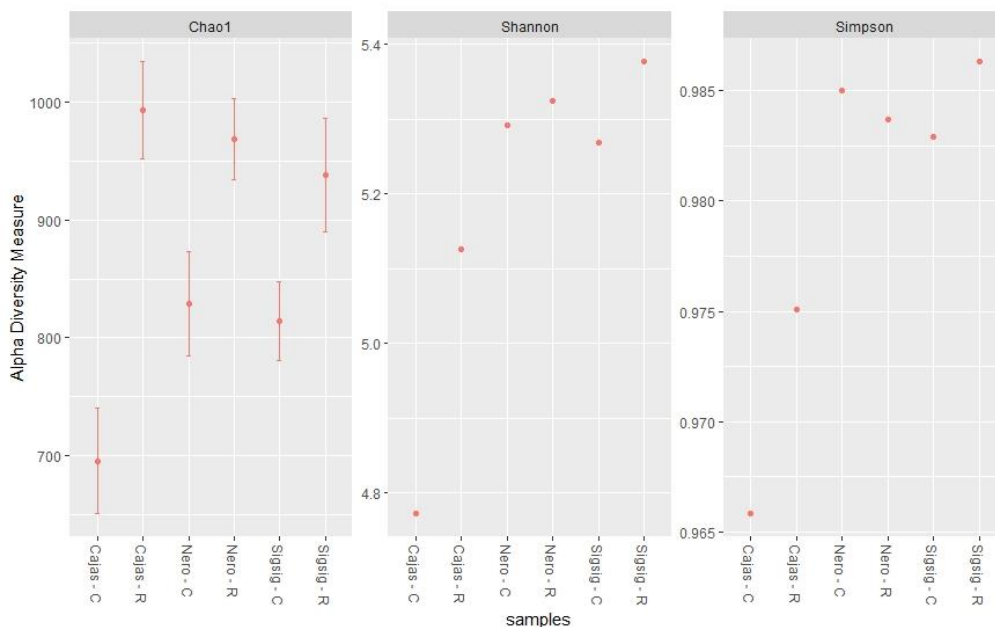


Figura 3. Índices de diversidad alfa (Chao1, Shannon y Simpson)

Comparando las muestras de suelo rizosférico con las muestras de suelo circundante, los géneros dominantes (abundancia relativa promedio > 1 %) en todas las muestras fueron *Bradyrhizobium* (16%), *Pseudomonas* (4.7%), *Sphingomonas* (3.3%), *Mesorhizobium* (3%), *Burkholderia* (2.8%), *Variovorax* (2.5 %), *Paraburkholderia* (2.7 %),) y *Rhodopseudomonas* (1.4%). La abundancia relativa de *Bradyrhizobium* y *Burkholderia* en el suelo de la rizosfera fue similar a la composición del suelo circundante (Figura 4).

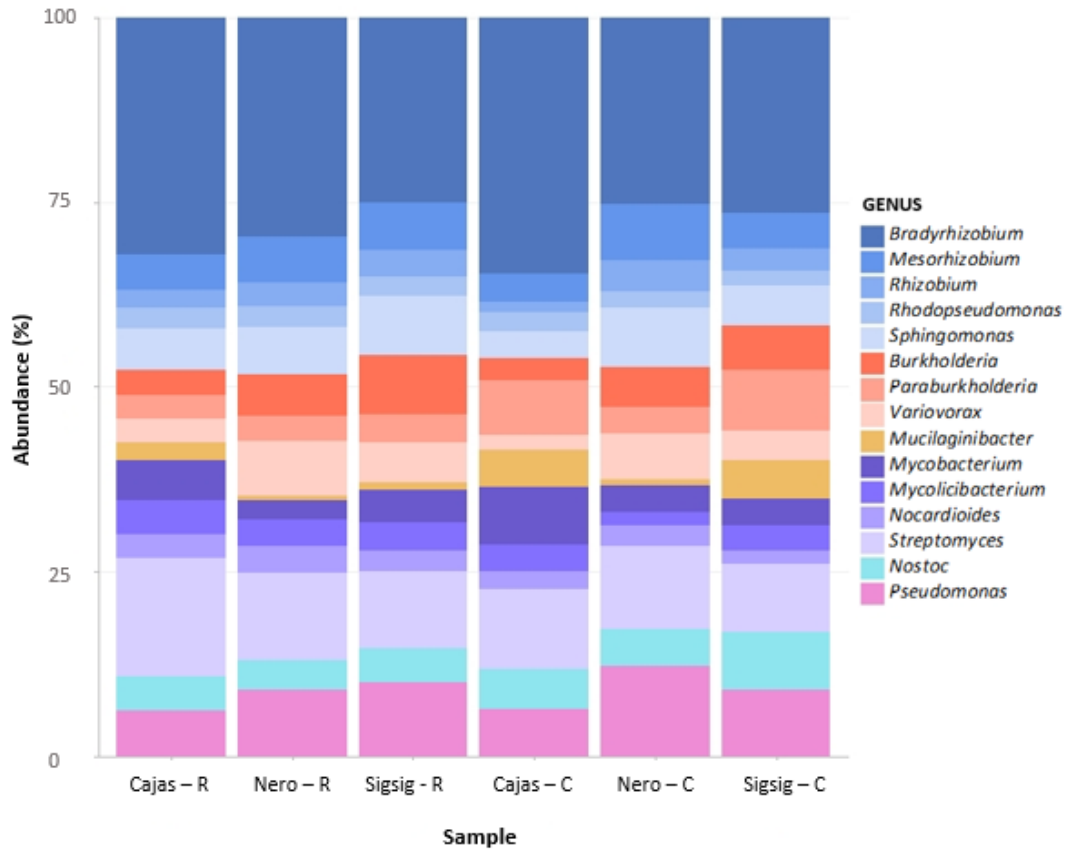


Figura 4. Abundancia relativa de microbiota en el suelo rizosférico y circundante de *M. rupestris*. definidos con una abundancia relativa superior al 0,5 %.

Finalmente se obtuvo diagramas de Venn para comparar la similitud de la composición microbiana basada en géneros compartidos y únicos entre las muestras de suelo circundante (Figura 5a) y suelo rizosférico (Figura 5b). El número de géneros compartidos entre las muestras de suelo circundante es de 327 perteneciendo la mayoría al género *Bradyrhizobium*, *Streptomyces* y *Mycobacterium* mientras que para las muestras de suelo rizosférico el número de géneros compartidos es de 472 de los cuales los dominantes son *Bradyrhizobium*, *Streptomyces* y *Pseudomonas*. El número de géneros único para las muestras de suelo circundante de Cajas, Nero, y Sigsig son de 47, 90 y 158, respectivamente. De igual manera para las muestras de suelo rizosférico de Cajas, Nero, y Sigsig son de 106, 110 y 60, respectivamente.

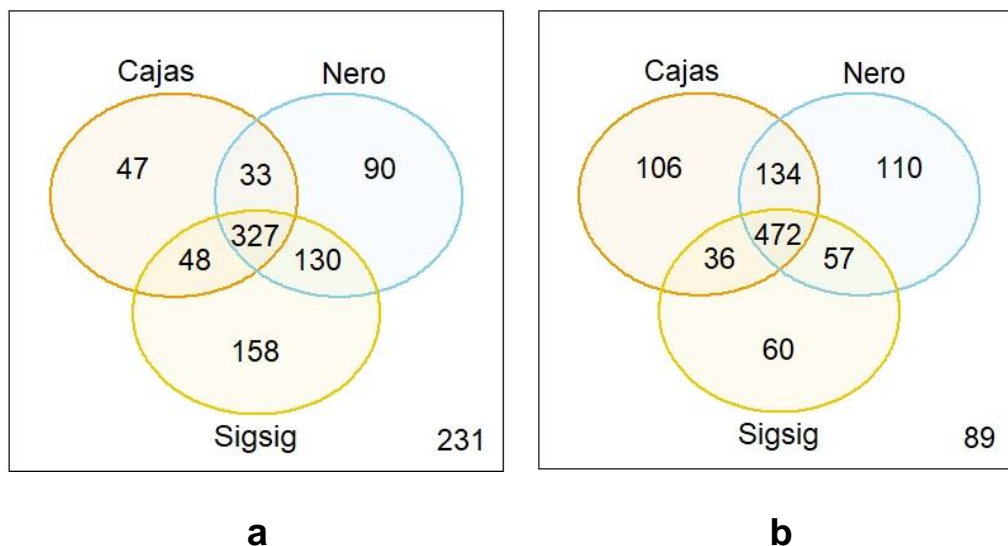


Figura 5. Composición de especies en suelo (a) circundante y (b) rizosférico en *M. rupestris*

4 Discusión

4.1 Inoculación de plantas con hongos aislados

Las interacciones endófitas son una matriz compleja de funciones simbióticas entre la planta huésped y su microbioma. Durante varios años se ha estudiado muchas de las comunidades endófitas y su papel vital en el desarrollo y crecimiento de las Ericáceas. (Vano et al., 2010; Yurgel et al., 2018). En el ensayo de inoculación de hongos endófitos en plantas de *M. rupestris*, *Clonostachys rosea* presentó resultados favorables en cuanto al desarrollo de las plántulas. *C. rosea* es reportado como un hongo endófito para varias plantas como el maíz (Goh et al., 2020), trigo (Nagasawa, 2010) y arándano azul (Sutton et al., 2008). Ha sido reportado como promotor de germinación de semillas y ayuda a las plantas como el aradano a resistir factores ambientales extremos como sequia (Sutton et al., 2008). En el estudio (Nordström, 2014) *C. rosea* fue reportado como controlador biológico de *Botrytis cinérea*, en plantas de tomate.

Entre los hongos aislados también se encontraron 3 especies de *Trichoderma*, las cuales también presentaron resultados favorables en cuanto al número de hojas por planta y a la altura de planta, esto se puede atribuir a que hongos del género *Trichoderma* produce glucanasas, quitanasas y proteasas, enzimas que descomponen los componentes de la pared celular quitina, polisacáridos y β -glucanos, facilitando la obtención de nutrientes para las plantas (Nordström, 2014). *Trichoderma paraviridescens* también son usadas en cultivos como promotores de crecimiento o para germinación de semillas (Zheng et al., 2021).

Los resultados obtenidos muestran que los hongos aislados de las raíces de *M. rupestris* tuvieron efectos en cuanto al desarrollo foliar y la altura de las plantas. *C. rosea* fue uno de los hongos con mayor potencial para ser usado en futuros estudios con *M. rupestris* como promotor de crecimiento.

4.2 Diversidad microbiana presente en suelos rizosférico y circundante de *M. rupestris*

Los microorganismos del suelo juegan un papel fundamental en la regulación de la fertilidad del suelo y la salud de las plantas (Jacoby et al., 2017). Estamos comenzando

a comprender cómo la diversidad microbiana del suelo varía en todo el mundo y cómo esta diversidad se relaciona con las propiedades físicas, químicas y características biológicas de los ecosistemas (Dasgupta & Brahmaaprakash, 2021). El estudio realizado en el suelo circundante y rizosférico de *M. rupestris* demostró que la diversidad de comunidades microbianas puede variar significativamente respecto a la cercanía con la raíz. En el análisis metagenómico de las muestras de suelo circundante y rizosférico, se obtuvo mayor abundancia de comunidades bacterianas en comparación con las comunidades fúngicas. Esto pueden suceder por varios factores como cambios en los tipos y cantidades de carbono orgánico presente en el suelo (Fierer et al., 2007; Goldfarb et al., 2011). Aunque los hongos y otros eucariotas pueden representar una gran parte de la biomasa microbiana contenida en los suelos, su representación en los datos metagenómicos obtenidos fue baja. Se ha observado un patrón similar en conjuntos de datos metagenómicos shotgun comparables obtenidos de otros suelos (Delmont et al., 2012; Fierer et al., 2012) y es muy probable que sea un producto de muchos taxones eucariotas (incluidos los hongos), que tienen una proporción mucho menor de copias del gen rRNA por unidad de biomasa que las células bacterianas (Fierer et al., 2012).

Analizando las comunidades bacterianas obtenidas, encontramos que se ha demostrado previamente que las bacterias que pertenecen a los tres filos principales, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*, son los taxones más abundantes en la rizosfera y la endosfera de las plantas (Hacquard et al., 2015; Yurgel et al., 2018). Por lo cual es normal que los mismos taxones sean los más abundantes en las muestras analizadas.

El suelo rizosférico contiene mayor abundancia microbiana en comparación con el suelo circundante, lo que probablemente se deba a una mayor disponibilidad de sustratos para el crecimiento microbiano a través de la exudación de las raíces (Chaudhary et al., 2012). Esto da como resultado una mayor densidad de población y una estructura comunitaria en la rizosfera que puede ser distinta de la del suelo circundante.

Las actinobacterias son un filo y clase de bacterias Gram-positivas y son el grupo con mayor representación en suelos circundantes y el segundo más representado en suelos rizosférico. Este taxón es particularmente interesante por su amplio potencial biotecnológico (Worthen, 2008). Las actinobacterias en los suelos tienen capacidades de mutualismo, simbiosis y patogénesis (Schrempf, 2013).

En cuanto a los géneros más abundantes dentro de las muestras están *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, y *Sphingomonas*. *Bradyrhizobium spp.* es una bacteria gramnegativa agrónomicamente significativa capaz de formar nódulos en las raíces y fijar nitrógeno atmosférico (Li et al., 2010). Especies de *Bradyrhizobium*, producen auxinas, citoquininas, ácido abscísico, vitaminas y riboflavina, que estimulan el crecimiento de las plantas (Parihar et al., 2022). Las *Pseudomonas* son bacterias importantes en la agricultura y se ha demostrado que promueven el crecimiento, protegen las plantas de patógenos (Adesemoye & Kloepper, 2009) y son parte del microbioma central de muchas plantas (Lally et al., 2017). Estos géneros presentes en las muestras de suelo son de importancia debido a que intervienen en el crecimiento de las plantas lo cual es de suma importancia para la propagación de *M. rupestris*.

5 Conclusión

Este estudio es el primer estudio en analizar la diversidad de comunidades microbianas presentes en el suelo circundante y rizosférico de *M. rupestris* utilizando un análisis metagenómico. Los datos obtenidos proporcionan información sobre la distribución microbiana en las plantas de *M. rupestris* y los géneros dominante presentes en el desarrollo de las plantas siendo los grupos más destacados los de *Bradyrhizobium*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria*. En conclusión, el suelo rizosférico de *M. rupestris* tiene

mayor diversidad microbiana que el suelo circundante y gran parte la comunidad microbiana es recurrente para estas plantas, aunque estas provengan de diferentes sitios, lo que podría indicar una cercana interrelación y/o dependencia entre esta planta y algunos de los microorganismos con los que se asocia

Los tratamientos que fueron inoculados con cepas fúngicas aisladas de raíces de plantas de la misma especie presentaron mayor crecimiento que el tratamiento control y pese a que el efecto respecto al número de hojas no fue superior en todos los casos al tratamiento control, se puede evidenciar la importancia de las asociaciones microbianas en el desarrollo de plantas de *M. Rupestris*, destacándose el efecto de *C. rosea* y *T. paraviridescens*.

6 Bibliografía

- Adesemoye, A. O., & Kloepper, J. W. (2009). Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *85*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2196-0>
- Altschul, S. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, *25*(17), 3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Alurappa, R., Chowdappa, S., Narayanaswamy, R., Sinniah, U. R., Mohanty, S. K., & Swamy, M. K. (2018). Endophytic Fungi and Bioactive Metabolites Production: An Update. En J. K. Patra, G. Das, & H.-S. Shin (Eds.), *Microbial Biotechnology: Volume 2. Application in Food and Pharmacology* (pp. 455-482). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7140-9_21
- Barillot, C. D. C., Sarde, C.-O., Bert, V., Tarnaud, E., & Cochet, N. (2013). A standardized method for the sampling of rhizosphere and rhizoplane soil bacteria associated to a herbaceous root system. *Annals of Microbiology*, *63*(2), 471-476. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0491-y>
- Cenis, J. L. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, *20*(9), 2380-2380. <https://doi.org/10.1093/nar/20.9.2380>
- Chadha, N., & Varma, R. P. and A. (2015). PLANT PROMOTING ACTIVITIES OF FUNGAL ENDOPHYTES ASSOCIATED WITH TOMATO ROOTS FROM CENTRAL HIMALAYA, INDIA AND THEIR INTERACTION WITH PIRIFORMOSPORA INDICA. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, *Volume 6 Issue 1*. <http://ijpbs.net/abstract.php?article=3950>
- Chaudhary, D. R., Saxena, J., Lorenz, N., Dick, L. K., & Dick, R. P. (2012). Microbial Profiles of Rhizosphere and Bulk Soil Microbial Communities of Biofuel Crops Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) and Jatropha (*Jatropha curcas* L.). *Applied and Environmental Soil Science*, *2012*, e906864. <https://doi.org/10.1155/2012/906864>

- Dasgupta, D., & Brahma Prakash, G. P. (2021). Soil Microbes are Shaped by Soil Physico-chemical Properties: A Brief Review of Existing Literature. *International Journal of Plant & Soil Science*, 59-71. <https://doi.org/10.9734/ijpss/2021/v33i130409>
- Declerck, S., Séguin, S., & Dalpé, Y. (2005). The Monoxenic Culture of Arbuscular Mycorrhizal Fungi as a Tool for Germplasm Collections. En S. Declerck, J. A. Fortin, & D.-G. Strullu (Eds.), *In Vitro Culture of Mycorrhizas* (Vol. 4, pp. 17-30). Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/3-540-27331-X_2
- Delmont, T. O., Prestat, E., Keegan, K. P., Faubladier, M., Robe, P., Clark, I. M., Pelletier, E., Hirsch, P. R., Meyer, F., Gilbert, J. A., Le Paslier, D., Simonet, P., & Vogel, T. M. (2012). Structure, fluctuation and magnitude of a natural grassland soil metagenome. *The ISME Journal*, 6(9), 1677-1687. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.197>
- Durán-Casas, S., Veloza Suan, C., Magnitskiy, S., & Lancheros, H. O. (2013). Evaluation of uva camarona (*Macleania rupestris* Kunth A.C. Smith) propagation with air layering. *Agronomía Colombiana*, 31(1), 18-26.
- Fierer, N., Bradford, M. A., & Jackson, R. B. (2007). Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 88(6), 1354-1364. <https://doi.org/10.1890/05-1839>
- Fierer, N., Lauber, C. L., Ramirez, K. S., Zaneveld, J., Bradford, M. A., & Knight, R. (2012). Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *The ISME Journal*, 6(5), 1007-1017. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.159>
- Fuchs, E. J., Ross-Ibarra, J., & Barrantes, G. (2010). Reproductive biology of *Macleania rupestris* (Ericaceae), a pollen-limited Neotropical cloud-forest species in Costa Rica. *Journal of Tropical Ecology*, 26(3), 351-354. <https://doi.org/10.1017/S0266467410000064>
- Goh, Y. K., Marzuki, N. F., Tuan Pa, T. N. F., Goh, T.-K., Kee, Z. S., Goh, Y. K., Yusof, M. T., Vujanovic, V., & Goh, K. J. (2020). Biocontrol and Plant-Growth-Promoting Traits of *Talaromyces apiculatus* and *Clonostachys rosea* Consortium against *Ganoderma* Basal Stem Rot Disease of Oil Palm. *Microorganisms*, 8(8), 1138. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081138>
- Goldfarb, K. C., Karaoz, U., Hanson, C. A., Santee, C. A., Bradford, M. A., Treseder, K. K., Wallenstein, M. D., & Brodie, E. L. (2011). Differential growth responses of soil bacterial taxa to carbon substrates of varying chemical recalcitrance. *Frontiers in Microbiology*, 2, 94. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00094>

- Hacquard, S., Garrido-Oter, R., González, A., Spaepen, S., Ackermann, G., Lebeis, S., McHardy, A. C., Dangl, J. L., Knight, R., Ley, R., & Schulze-Lefert, P. (2015). Microbiota and Host Nutrition across Plant and Animal Kingdoms. *Cell Host & Microbe*, 17(5), 603-616. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.009>
- Hamim, A., Miché, L., Douaik, A., Mrabet, R., Ouhammou, A., Duponnois, R., & Hafidi, M. (2017). Diversity of fungal assemblages in roots of Ericaceae in two Mediterranean contrasting ecosystems. *Comptes Rendus Biologies*, 340(4), 226-237. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.02.003>
- Hawksworth, D. L. (2004). *Fungal diversity and its implications for genetic resource collections*. 10.
- Huang, Z., Liu, B., Yin, Y., Liang, F., Xie, D., Han, T., Liu, Y., Yan, B., Li, Q., Huang, Y., & Liu, Q. (2021). Impact of biocontrol microbes on soil microbial diversity in ginger (*Zingiber officinale* ROSCOE). *Pest Management Science*, 77(12), 5537-5546. <https://doi.org/10.1002/ps.6595>
- Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A., & Kopriva, S. (2017). The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition—Current Knowledge and Future Directions. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.01617>
- Lally, R. D., Galbally, P., Moreira, A. S., Spink, J., Ryan, D., Germaine, K. J., & Dowling, D. N. (2017). Application of Endophytic *Pseudomonas fluorescens* and a Bacterial Consortium to *Brassica napus* Can Increase Plant Height and Biomass under Greenhouse and Field Conditions. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.02193>
- Leggett, R. M., & Clark, M. D. (2017). A world of opportunities with nanopore sequencing. *Journal of Experimental Botany*, 68(20), 5419-5429. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx289>
- Li, C., Li, X., Kong, W., Wu, Y., & Wang, J. (2010). Effect of monoculture soybean on soil microbial community in the Northeast China. *Plant and Soil*, 330(1), 423-433. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0216-6>
- Luteyn, J. L. (2002). Diversity, Adaptation, and Endemism in Neotropical Ericaceae: Biogeographical Patterns in the Vaccinieae. *Botanical Review*, 68(1), 55-87.
- Mořková, P., & Vyřasová, J. (2011). Comparison of Methods for Isolating Fungal DNA. *Czech J. Food Sci.*, 29, 10.
- Nagasawa, A. E. (2010). *Evaluation of Clonostachys rosea for growth enhancement and suppression of fusarium seedling blight in wheat*. Library and Archives Canada = Bibliothéque et Archives Canada.

- Nordström, S. A. (2014). *Endophytic growth of Clonostachys rosea in tomato and Arabidopsis thaliana*. 35.
- Parihar, J., Parihar, S. P., Suravajhala, P., & Bagaria, A. (2022). Spatial Metagenomic Analysis in Understanding the Microbial Diversity of Thar Desert. *Biology*, 11(3), 461. <https://doi.org/10.3390/biology11030461>
- Repáč, I. (2011). Ectomycorrhizal Inoculum and Inoculation Techniques. En M. Rai & A. Varma (Eds.), *Diversity and Biotechnology of Ectomycorrhizae* (Vol. 25, pp. 43-63). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-15196-5_3
- Schrempf, H. (2013). Actinobacteria within soils: Capacities for mutualism, symbiosis and pathogenesis. *FEMS Microbiology Letters*, 342(2), 77-78. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12147>
- Schwery, O., Onstein, R. E., Bouchenak-Khelladi, Y., Xing, Y., Carter, R. J., & Linder, H. P. (2015). As old as the mountains: The radiations of the Ericaceae. *The New Phytologist*, 207(2), 355-367. <https://doi.org/10.1111/nph.13234>
- Srivastava, R., Srivastava, A. K., Ramteke, P. W., Gupta, V. K., & Srivastava, A. K. (2020). Metagenome dataset of wheat rhizosphere from Ghazipur region of Eastern Uttar Pradesh. *Data in Brief*, 28, 105094. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.105094>
- Ștefănescu, B. E., Szabo, K., Mocan, A., & Crișan, G. (2019). Phenolic Compounds from Five Ericaceae Species Leaves and Their Related Bioavailability and Health Benefits. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(11), E2046. <https://doi.org/10.3390/molecules24112046>
- Sutton, J. C., Liu, W., Ma, J., Brown, W. G., Stewart, J. F., & Walker, G. D. (2008). EVALUATION OF THE FUNGAL ENDOPHYTE CLONOSTACHYS ROSEA AS AN INOCULANT TO ENHANCE GROWTH, FITNESS AND PRODUCTIVITY OF CROP PLANTS. *Acta Horticulturae*, 782, 279-286. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.782.34>
- TURNER, S. R., COMMANDER, L. E., BASKIN, J. M., BASKIN, C. C., & DIXON, K. W. (2009). Germination behaviour of *Astroloma xerophyllum* (Ericaceae), a species with woody indehiscent endocarps. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 160(3), 299-311. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.00981.x>
- Vano, I., Sakamoto, K., & Inubushi, K. (2010). *Selection of dark septate endophytes from Ericaceae plants to enhance blueberry (Vaccinium corymbosum L.) seedling growth*. 4.
- Veloza, C., Durán, S., Magnitskiy, S., & Lancheros, H. (2014). Rooting Ability of Stem Cuttings of *Macleania rupestris* Kunth A.C. Sm., a South American Fruit Species.

- International Journal of Fruit Science*, 14(4), 343-361.
<https://doi.org/10.1080/15538362.2014.897889>
- Vilgalys, R., & Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172(8), 4238-4246.
<https://doi.org/10.1128/jb.172.8.4238-4246.1990>
- Wang, Z., Li, T., Wen, X., Liu, Y., Han, J., Liao, Y., & DeBruyn, J. M. (2017). Fungal Communities in Rhizosphere Soil under Conservation Tillage Shift in Response to Plant Growth. *Frontiers in Microbiology*, 8.
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01301>
- White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., Innis, M., Gelfand, D., & Sninsky, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. En *Pcr Protocols: A Guide to Methods and Applications*, (Vol. 31, pp. 315-322).
- Worthen, D. B. (2008). *Streptomyces* in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*, 63(2), 273-274.
<https://doi.org/10.1093/jhmas/jrn016>
- Yurgel, S. N., Douglas, G. M., Dusault, A., Percival, D., & Langille, M. G. I. (2018). Dissecting Community Structure in Wild Blueberry Root and Soil Microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 9.
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01187>
- Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Shan, T., Zhong, L., Liu, X., & Gao, X. (2010). *Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants*. 11.
- Zheng, H., Qiao, M., Lv, Y., Du, X., Zhang, K.-Q., & Yu, Z. (2021). New Species of *Trichoderma* Isolated as Endophytes and Saprobes from Southwest China. *Journal of Fungi*, 7(6), 467. <https://doi.org/10.3390/jof7060467>

7 Anexos

7.1 Ensayo Inoculación



Inicio de inoculación con *Clonostachys rosea*

90 días de inoculación

ANOVA One Way

Altura de la planta * inoculación de hongo aislado

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	29.4416952	6	4.90694921	4.51221623	0.00950371	2.847726
Dentro de los grupos	15.2247333	14	1.08748095			
Total	44.6664286	20				

Numero de hojas por planta * inoculación de hongo aislado

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	49.6190476	6	8.26984127	10.2156863	0.00019404	2.847726
Dentro de los grupos	11.3333333	14	0.80952381			
Total	60.952381	20				

7.2 Índices de diversidad

Índices de diversidad alfa

	<i>inverse_simpson</i>	<i>gini_simpson</i>	<i>shannon</i>	<i>fisher</i>	<i>coverage</i>	<i>Chao1</i>
Cajas - C	29.2467701	0.96580819	4.77213497	159.994223	20	695.3448
Cajas - R	40.1538348	0.97509578	5.12550428	199.53517	31	993.0083
Nero - C	66.7015041	0.98500783	5.29212462	198.120085	40	829.0388
Nero - R	61.3151526	0.98369082	5.32368237	198.001978	38	968.6639
Sigsig - C	58.605508	0.98293676	5.26828027	205.189721	36	814.2121
Sigsig - R	73.160305	0.98633139	5.37663306	204.088679	41	938.3636