



**PROPUESTA DE ESPECIES DE HONGOS MICORRÍDICOS ARBUSCULARES CON
POTENCIAL PARA SER APLICADAS EN FUTUROS PROCESOS DE RESTAURACIÓN
AMBIENTAL DE ECOSISTEMAS XEROFÍTICOS DE LA REGIÓN DE VALPARAÍSO.**

TRABAJO DE TITULACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO AMBIENTAL

AUTORA: KALAJAN BELÉN BARRIOS MATUS
PROFESOR GUÍA: JAVIER ARANCIBIA FORTES
PROFESOR CO-GUÍA: RODRIGO ORTIZ MANSILLA

VALPARAÍSO, 2024

RESUMEN

El objetivo principal de esta investigación fue proponer especies de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) recolectados del Santuario de la Naturaleza Federico Santa María para su uso en futuros procesos de restauración ecológica de ecosistemas xerofíticos costeros. Se plantearon tres objetivos específicos: cultivar HMA a partir de raíces de flora xerofítica recolectadas, identificar las especies de HMA mediante técnicas de biología molecular y secuenciación, seleccionar las especies de HMA más competentes según su abundancia relativa y velocidad de crecimiento.

Durante dos visitas a los Acantilados Federico Santa María, se recolectaron segmentos de raíz de individuos de ocho especies de plantas xerofíticas. Estas muestras fueron procesadas en duplicado y cultivadas en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) bajo condiciones estériles. Se monitoreó el crecimiento de colonias fúngicas, aislando y subcultivando individualmente cada colonia hasta obtener cultivos puros. En total, se lograron aislar 49 potenciales especies de HMA.

Las especies aisladas fueron identificadas mediante técnicas de biología molecular y secuenciación, lo que permitió determinar su identidad taxonómica y evaluar su potencial para la restauración ecológica. Los criterios de selección incluyeron la abundancia relativa de cada especie y su velocidad de crecimiento. Las actividades de laboratorio fueron documentadas meticulosamente, incluyendo el uso de una variedad de equipos y técnicas especializadas.

El estudio identificó un conjunto de especies de HMA con potencial para ser utilizadas en la restauración de ecosistemas xerofíticos costeros. Se concluye que los HMA aislados podrían desempeñar un papel crucial en mejorar la resiliencia y sostenibilidad de estos ecosistemas. Adicionalmente, se estimaron los costos asociados a las actividades de recolección, cultivo, aislamiento e identificación de los hongos, proporcionando una base económica para futuros estudios y aplicaciones.

Las limitaciones del estudio incluyeron la imposibilidad de evaluar el efecto real de la inoculación de los HMA en las plantas y las restricciones de tiempo, presupuesto y materiales disponibles, que afectaron la optimización de algunos protocolos. A pesar de estas limitaciones, los resultados obtenidos son prometedores y sientan las bases para investigaciones futuras y aplicaciones prácticas en la restauración ecológica.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Generalidades	1
1.2	Antecedentes del lugar de estudio	2
1.2.1	Singularidad del área desde el punto de vista de la flora de categoría Escasas, Vulnerables y Raras.	2
1.2.2	Singularidad desde el punto de vista de la fauna, como un refugio de especies amenazadas.	3
1.2.3	Importancia desde el punto de vista de la conservación de la biodiversidad, como sitio prioritario de conservación.	3
1.2.4	Valores complementarios.	3
2	PROBLEMA	7
3	OBJETIVOS	8
3.1	Objetivo general	8
3.2	Objetivos específicos	8
4	MATERIALES Y MÉTODOS	9
4.1	Descripción del lugar de estudio	9
4.2	Breve Descripción de las plantas de estudio	5
4.2.1	Achupalla (<i>Eryngium paniculatum</i>)	5
4.2.2	Pata de guanaco (<i>Cistanthe grandiflora</i>)	5
4.2.3	Vinagrillo (<i>Oxalis megalorrhiza</i>)	5
4.2.4	Quisquito rosado (<i>Eriosyce subgibbosa</i>)	5
4.2.5	Quisquito rojo (<i>Eriosyce curvispina</i>)	5
4.2.6	Quisco costero (<i>Leucostele litoralis</i>)	5
4.2.7	Chagual (<i>Puya chilensis</i>)	6
4.2.8	Puya (<i>Puya berteroniana</i>)	6
4.3	Descripción de los materiales y métodos	11
4.3.1	Materiales y métodos asociados al primer objetivo específico	11
4.3.2	Materiales y métodos asociados al segundo objetivo específico	21
4.3.3	Materiales y métodos asociados al tercer objetivo específico	31
5	RESULTADOS	32
5.1	Resultados asociados al primer objetivo específico	32
5.1.1	Ubicación y recolección de las muestras	32
5.1.2	Cultivo y aislamiento de HMA	36
5.1.3	Registros fotográficos	37
5.2	Resultados asociados al segundo objetivo específico	39
5.2.1	Identificación preliminar por características morfológicas	39

5.2.2	Identificación molecular por secuenciación	84
5.3	Resultados asociados al tercer objetivo específico.....	87
5.3.1	Especies con mayor abundancia relativa.....	87
5.3.2	Especies con mayor velocidad de crecimiento.....	87
6	DISCUSIÓN	92
6.1	Papel de los HMA en procesos de restauración ecológica.....	92
6.2	Restauración de suelos degradados.....	92
6.3	Reforestación y agricultura sostenible.....	92
6.4	Potencial de los HMA en Chile y la zona central	93
6.5	Proyecciones	93
7	CONCLUSIÓN	94
8	BIBLIOGRAFÍA.....	95
9	ANEXOS.....	97
9.1	ANEXO 1: Protocolos de laboratorio	97
9.1.1	Protocolo PCR	97
9.1.2	Protocolo Electroforesis	104
9.1.3	Protocolo de extracción de ADN genómico – HMA.....	108
9.2	ANEXO 2	110
9.2.1	Registros fotográficos de la recolección de muestras	110

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.1: Coordenadas geográficas referenciales en UTM (19H) de los Acantilados Federico Santa María.	9
Tabla 4.2: Especies de flora xerofítica presentes en los AFSM y su estado de conservación.	32
Tabla 4.3. Principales materiales y equipos utilizados en el cultivo de los HMA.	12
Tabla 4.4. Principales materiales y equipos utilizados en la extracción del ADN de los HMA	21
Tabla 4.5. Programa de amplificación configurado en el termociclador.....	28
Tabla 5.1: Ubicación de las plantas de las cuales se recolectaron muestras de raíz.....	35
Tabla 5.2: Códigos de identificación para cada HMA aislado.....	36
Tabla 5.3. Identificación preliminar placa 1.	43
Tabla 5.3: Códigos de muestras enviadas a secuenciar de HMA.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 4.1: Imagen referencial de los Acantilados Federico Santa María.	9
Figura 4.2: Mapa del Santuario de la Naturaleza Acantilados Federico Santa María.	10
Figura 4.3: Imagen referencial de las placas Petri con medio de cultivo PDA.....	16

LISTADO DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

AFSM: Acatilados Federico Santa María.

MMA: Ministerio del Medio Ambiente de Chile.

SNFSM: Santuario de la Naturaleza Federico Santa María.

GLOSARIO

Formación xerofítica: formación vegetal, constituida por especies autóctonas, preferentemente arbustivas o suculentas, de áreas de condiciones áridas o semiáridas ubicadas entre las Regiones I y VI, incluidas la Metropolitana y la XV y en las depresiones interiores de las Regiones VII y VIII (Ministerio de Agricultura, 2008).

Micorrizas: Las micorrizas son asociaciones simbióticas entre las raíces de las plantas y ciertos tipos de hongos, en las cuales ambos organismos se benefician mutuamente. En esta relación, los hongos micorrícicos colonizan las raíces de las plantas, formando estructuras llamadas "hifas" que se extienden en el suelo, aumentando la superficie de absorción de nutrientes y agua. A cambio, las plantas proporcionan alimento en forma de carbohidratos a los hongos. Esta simbiosis es altamente beneficiosa para ambas partes involucradas. Los hongos micorrícicos ayudan a las plantas a absorber nutrientes como fósforo, nitrógeno y minerales que son a menudo limitados en el suelo. Además, los hongos mejoran la resistencia de las plantas al estrés ambiental, como la sequía y la salinidad, al tiempo que facilitan la comunicación entre las plantas y otros microorganismos en el suelo y a su vez estos se benefician de los fotosintetizados por las plantas como el carbono, entre otros.

Restauración ambiental: O también conocida como restauración ecológica, corresponde a una intervención humana intencionada que tiene como objetivo principal guiar la recuperación de un ecosistema degradado hacia un estado histórico de referencia, que refleja su condición original antes de sufrir perturbaciones naturales o causadas por el ser humano. Esta práctica busca detener las causas que originaron la degradación, promover la regeneración de la vegetación y fauna nativa, acelerar el proceso de sucesión ecológica y fomentar la capacidad de autorregeneración del ecosistema para asegurar su sostenibilidad a largo plazo. En esencia, la restauración busca fortalecer la resiliencia del ecosistema, es decir, su capacidad de mantener su estructura, composición de especies y procesos ecológicos en respuesta a cambios ambientales, al tiempo que se integra de manera armoniosa en un paisaje más amplio y se adapta a su entorno (MMA, s.f.).

Santuario de la Naturaleza: Sitios terrestres o marinos que ofrecen posibilidades especiales para estudios e investigaciones geológicas, paleontológicas, zoológicas, botánicas o de ecología, o que posean formaciones naturales, cuya conservación sea de interés para la ciencia o para el Estado.

Servicios Ecosistémicos: Contribución directa o indirecta de los ecosistemas al bienestar humano (MMA, 2020).

1 INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

La restauración ecológica ha emergido como una herramienta fundamental para contrarrestar la degradación ambiental y la pérdida de biodiversidad en todo el mundo (González *et al.*, 2024). Ante la presión continua de actividades humanas, como la urbanización, la deforestación y la contaminación, muchos ecosistemas naturales se han visto comprometidos, lo que resulta en la pérdida de hábitats, la disminución de especies, la alteración de procesos ecológicos cruciales, entre otros. Así pues, esta disciplina busca revertir los impactos negativos de dichas actividades, promoviendo la recuperación de ecosistemas saludables y funcionales (Murcia & Guariguata, 2014).

La restauración ecológica implica una intervención deliberada en ecosistemas que se han degradado, dañado o destruido, para restablecer procesos ecológicos, mejorar la biodiversidad y recuperar sus funciones naturales históricas (SER, 2004). Además de su importancia en términos de conservación de la biodiversidad, la restauración también puede tener beneficios significativos para las comunidades humanas al proporcionar mejoras en la calidad del aire y agua, servicios ecosistémicos valiosos, nuevas oportunidades económicas, suelos más fértiles y mayor protección contra amenazas naturales (González *et al.*, 2024), por nombrar algunos.

Por su parte, la biodiversidad de Chile, en cuanto a la diversidad de paisajes, ecosistemas y especies presenta un alto endemismo, que se expresa en diversos ambientes, bajo múltiples condiciones climáticas y geográficas, desde las más inhóspitas para el ser humano, hasta las más abundantes y generosas en riquezas naturales (MMA, 2018). Entre estos, los ecosistemas xéricos se caracterizan por su adaptación a condiciones extremadamente secas por los escasos recursos hídricos presentes en estos medios. Los ecosistemas adaptados a condiciones áridas y semiáridas de Chile cubren más del 45% de la superficie terrestre del país, y albergan una gran diversidad biológica adaptada a condiciones extremas, incluyendo cactus, suculentas y otras plantas especializadas, lo cual es de alta utilidad considerando el contexto climático actual población (Lozano *et al.*, 2020).

Sin embargo, los ecosistemas xerofíticos son particularmente vulnerables a las perturbaciones ambientales, como, por ejemplo, el cambio climático y la creciente presión sobre los recursos hídricos que amenazan estos ecosistemas únicos, especialmente en la zona central de Chile, donde se concentra la mayor parte de la población (Lozano *et al.*, 2020). De hecho, uno de los ecosistemas más degradados son las formaciones xerofíticas, donde más del 20 % de su superficie se encuentra degradada (Squeo *et al.* 2007). Las formaciones xerofíticas se encuentran constituidas por especies autóctonas, preferentemente arbustivas o suculentas, y según los modelos predictivos de cambio climático, serían uno de los sistemas más sensibles y afectados por los *procesos* de desertificación (Fardella, 2014). La degradación de suelos, la urbanización, la expansión agrícola y el consecuente cambio de uso de los suelos, entre otros, pueden tener impactos significativos en estas áreas frágiles (Arriaga, 2009). Dada su importancia única y su sensibilidad a los cambios, la restauración ecológica en ecosistemas xerofíticos adquiere una relevancia crucial para preservar su biodiversidad y su función ecológica. Además, la restauración de estos ecosistemas puede desempeñar un papel fundamental en la conservación de especies en categorías críticas y en la protección de nichos ecológicos únicos tanto en Chile como en el mundo (Parra, 2020).

El estudio de los hongos micorrícicos adquiere una importancia central en la búsqueda de soluciones efectivas para la restauración ambiental de la flora xerofítica en ambientes desafiantes y considerando a su vez la emergencia climática que se atraviesa a nivel mundial. Estos hongos, que establecen relaciones simbióticas con las raíces de las plantas, poseen el potencial de marcar la diferencia en futuras propuestas de restauración (Carillo *et al.*, 2022). Su papel como intermediarios en la captación de nutrientes y la resistencia al estrés otorga a las plantas la capacidad

de enfrentar las condiciones adversas inherentes a los ecosistemas xerofíticos. La comprensión profunda de estas asociaciones y su implementación estratégica en proyectos de restauración no solo podría mejorar la propagación y supervivencia de las especies de flora adaptadas a la aridez, sino también revitalizar la salud y la funcionalidad de estos ecosistemas fragilizados (Becerril *et al.*, 2022; Fajardo *et al.*, 2011).

En esta dirección, se despliega una oportunidad interesante de aprovechar la colaboración simbiótica de hongos y plantas en pos de la recuperación y conservación de estos valiosos entornos. Así pues, la identificación de las especies de hongos micorrícicos asociadas a la flora xerofítica en los Acantilados Federico Santa María constituye una base para investigaciones futuras más exhaustivas. Este es un primer paso esencial, pues al conocer con las posibles especies de hongos involucradas en estas interacciones simbióticas, se sentarán los cimientos para comprender sus roles específicos y sus contribuciones a la adaptación y resiliencia de las plantas en entornos xerofíticos. Esta información no solo enriquecerá la comprensión de la complejidad de estos ecosistemas, sino que también dirigirá la atención hacia posibilidades concretas de aplicación en futuras estrategias de restauración ambiental.

1.2 ANTECEDENTES DEL LUGAR DE ESTUDIO

En la localidad de Laguna verde, Región de Valparaíso, se encuentran los Acantilados Federico Santa María. Estos acantilados junto al resto del Fundo Quebrada Verde fueron donados en 1915 al Estado por la Junta de Beneficencia de Valparaíso. Esta obra fue promovida por don Federico Santa María, empresario chileno, filántropo y benefactor de la Universidad que lleva su nombre. Se pensaba en esta época proyectar un gran parque de descanso y recreación ciudadana. Tal proyecto no se concretó y los terrenos pasaron por propiedad de diversos organismos públicos, siendo el último el Fondo Nacional de Salud (FONASA), dependiente del Ministerio de Salud (Consejo de Monumentos Nacionales, s.f.).

Durante el gobierno de Michelle Bachelet, el día 30 de mayo del 2006, el ministro de educación Martín Zilic Hrepic, firma el Decreto N°699, en donde se declara como Santuario de la Naturaleza los Acantilados Federico Santa María protegidos por la Ley 17.288 de Monumentos Nacionales, ubicados en la localidad de Laguna Verde, comuna y Provincia de Valparaíso, región de Valparaíso, considerando lo siguiente:

1.2.1 Singularidad del área desde el punto de vista de la flora de categoría Escasas, Vulnerables y Raras.

El área constituye un refugio de especies de ambientes más húmedos como Yerba del Pasma (*Francoa eppendiculata*), Lun (*Escallonia resoluta*); de ambientes precordilleranos como Oreganillo (*Viviana crenata*), *Menonvillea linearis*; de especies exclusivas de ambientes costeros como: Pircún (*Anisomeria litoralis*), Pata de Guanaco (*Cistanthe grandiflora*), *Salicornia fruticosa*, Achupalla (*Eryngium paniculatum*), *Ochagavia litoralis*, Orquídea del Campo (*Bipinnula fimbriata*), Quisquito rosado (*Eriosyce subgibbosa*), Quisco costero (*Leucostele litoralis*), Lirio de Campo (*Alstromeria peregrina*). Es, además, el límite sur de distribución de las especies Tupa (*Lobelia polyphylla*) y el límite norte de distribución de *Pasma* y *Menonvillea linearis* var. *Virgata* (Decreto N°699, 2006).

A su vez, corresponde a una zona de concentración de especies con problemas de conservación a nivel nacional según el Libro Rojo de CONAF (Decreto N°699, 2006), como se indica:

1.2.1.1 Escasas

Centella (*Anemone decapellata*), Tabaco Cimarrón (*Salpiglossis sinuata*), Flor del Minero (*Centaurea chilensis*), Cheilante (*Cheilantes hypoleuca*), Lun, Orquídea (*Gavilea longibracteata*), Orquídea del Monte (*Chloraea cristata*) y Orquídea Gavilú (*Chloraea gavilu*) (Decreto N°699, 2006).

1.2.1.2 Vulnerables

Quisco Costero, Orquídea del Campo (*Chloraea disioides*), Orquídea del Monte, Violeta o Tahay (*Calydorea xiphoides*), Añañuca (*Phycella bicolor*), Culantrillo (*Adiantum excisum*), Chagual o Cardón (*Puya berteroniana*, *Puya chilensis*), Lirio del Campo, Papayo Silvestre (*Carica chilensis*) y Lúcumo chileno (*Pouteria splendens*) (Decreto N°699, 2006).

1.2.1.3 Raras

Arrayán de Hoja Roja (*Myrceugenia rufa*), Petrillo (*Myrceugenia correaefolia*) y Huillipatagua o Naranjillo (*Citronella mucronata*) (Decreto N°699, 2006).

1.2.2 Singularidad desde el punto de vista de la fauna, como un refugio de especies amenazadas.

El área constituye un refugio de especies amenazadas, tales como Coipo (*Myocastor coypus*), Zorro Chilla (*Pseudalopez griseus*), Degú (*Octodon degus*), Culebra de Cola Larga (*Phylodrias tachymenoides*), todas catalogadas como Vulnerables; y Chungungo (*Lontra felina*), Güiña (*Oncifelis guigna*) y Torcaza (*Columba araucana*), catalogadas como En Peligro. Asimismo, el lugar presenta una gran riqueza y cantidad de aves Passeriformes como Chincol (*Zonotrichia capensis*), Chirigüe (*Sicalis luteola*), Comesebo (*Pygarrhichas albogularis*), Diuca (*Diuca diuca*) y Semillero (*Catanemia anales*) (Decreto N°699, 2006).

1.2.3 Importancia desde el punto de vista de la conservación de la biodiversidad, como sitio prioritario de conservación

Se trata de un lugar de importancia para la conservación de la biodiversidad, según el Libro Rojo de los Sitios Prioritarios para la Conservación de la Diversidad Biológica en Chile y definido como sitio prioritario para la conservación de la biodiversidad en la región de Valparaíso, de acuerdo a la Estrategia Nacional para la Conservación de la Biodiversidad (Decreto N°699, 2006).

1.2.4 Valores complementarios

En el decreto se proyecta que los AFSM poseen un gran futuro para el uso recreativo, social y cultural, permiten el desarrollo del turismo y contienen un importante potencial para la investigación científica (Decreto N°699, 2006).

Así pues, el conjunto de todas estas características convierte a los Acantilados Federico Santa María en un hotspot de la biodiversidad a nivel regional y también mundial, es decir, concentran un alto endemismo (especies de flora y fauna que solamente existen en este lugar del planeta (Leyton, 2022)). Sin embargo, en cuanto a la diversidad fúngica allí presente, no existen estudios o investigaciones al respecto y, por ende, tampoco sobre los hongos micorrícicos asociados a la flora xerofítica existente.

1.3 ASOCIACIONES XEROFÍTICAS PRESENTES EN LOS AFSM

En cuanto a la flora de interés presente en los AFSM, se tiene que, el santuario está formado por un complejo de quebradas y acantilados donde crecen varios tipos de comunidades de vegetación. Se reconocen, tanto matorrales xerofíticos, principalmente en sus laderas, como bosques esclerófilos o higrófilos en los fondos de las quebradas.

De las 5 asociaciones identificadas 3 se conforman por especies de flora xerofítica, las cuales son las siguientes:

1. Asociación de *Adesmia confusa* - *Colliguaja odorifera*. (Matorral costero alto de espinillo y colliguay):

Esta es una asociación de tipo matorral dominada por arbustos como *Colliguaja odorifera*, *Adesmia confusa* y *Flourensia thurifera*, donde participan suculentas como *Trichocereus* ssp. *litoralis* y la bromeliácea *Puya chilensis*. También aparece entre las dominantes la gramínea bambusoide (*Chusquea cumingii*). En el estrato herbáceo abundan *Nassella chilensis*, *Adiantum thalictroides* var. *hirsutum*; acompañados por especies arbóreas achaparradas como bajas como *Lithraea caustica* (forma achaparrada), *Escallonia pulverulenta*; arbustos como *Lobelia polyphylla*, *Baccharis vernalis*; y hierbas como *Phycella cyrtanthoides* y *Dichondra sericea* (Ramírez & Villaseñor, 2016).

2. Asociación de *Retanilla ephedra* - *Chusquea cumingii* (Matorral costero alto de retamilla y colihue):

Matorral formado por arbustos altos; las especies características son *Retanilla ephedra* y *Chusquea cumingii*; las acompañantes, *Bahia ambrosioides*, *Lobelia pollyphylla*, *Eryngium paniculatum* y *Caceolaria corymbosa*. *Puya chilensis*, *Kageneckia oblonga* y *Adiantum thalictroides* var. *hirsutum*, son especies electivas. Es una comunidad con una alta cobertura de arbustos, entre el 90% y 100%, y con alturas de entre 2 y 3,5 m. El estrato herbáceo es pobre, con *Alstroemeria angustifolia*, *Alstroemeria marticorenae*, *Pasithea coerulea* y *Tecophilaea violiflora* y con baja cobertura. la asociación se distribuye en las laderas de exposición sur y suroeste, en terrenos con pendientes fuertes. La mayor parte de las especies tiene un caracter de tipo xeromórfico y algunas son esclerófilas (Ramírez & Villaseñor, 2016).

3. Asociación de *Puya bertoniana* - *Trichocereus chiloensis* ssp. *litoralis* (Puyal con suculentas, variante con quisco del litoral).

Comunidad xerófila bien desarrollada en las laderas de exposición norte donde *Puya berteroniana* la especie dominante le confiere un aspecto y color característicos. En esta variante litoral destacan especies litorales xerófilas como *Trichocereus chiloensis* ssp. *litoralis*, *Neoporteria subgibbosa*, *Adesmia microphylla*, acompañados por algunas especies esclerofilas en las partes altas de los acantilados, el resto de la composición florística es similar a la del *Puya-Trichocereetum chilensis* clásico que se encuentra en las laderas de exposición norte de la zona central, hasta los 800 m de altitud (Ramírez & Villaseñor, 2016).

1.4 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS PLANTAS DE ESTUDIO

1.4.1 Achupalla (*Eryngium paniculatum*)

Especie perenne, arbustiva de hasta 50 [cm] de altura por 50 [cm] de diámetro con hojas en roseta basal, tallo floral de hasta 1,50 [m] de altura, flores blancas, florece en primavera, sus frutos maduran en verano. Perteneciente a la familia de las Apiáceas, nativa de Chile, se distribuye desde la IV a la V región, principalmente en laderas de exposición norte, en suelos degradados, secos con roqueríos o planicies (Riedemann & Aldunate, 2014).

1.4.2 Pata de guanaco (*Cistanthe grandiflora*)

Especie bianual o perenne, herbácea de tamaño variado, en la costa florece todo el año y en el interior durante la primavera, sus flores son de color rosado-fucsia con varas florales de hasta 50 [cm] de altura, hojas carnudas y ovaladas. Perteneciente a la familia de las Montiacáceas, endémica de Chile, se distribuye desde la IV a la VII región, en zonas costeras rocosas a orillas del mar hasta el interior en zonas precordilleranas, generalmente en laderas bajas a pleno sol (Riedemann & Aldunate, 2014).

1.4.3 Vinagrillo (*Oxalis megalorrhiza*)

Herbácea perenne de hasta 20 [cm] de altura, con raíz reservante, hojas trifoliadas carnosas con inflorescencias amarillentas, pentámeras. Florece de mediados de invierno a mediados de primavera. Endémica de Chile, se distribuye desde la I a la VIII región por el litoral (Riedemann & Aldunate, 2014).

1.4.4 Quisquito rosado (*Eriosyce subgibbosa*)

Cactácea de cuerpo globular inclinado hacia el norte, de longitudes variadas hasta 1 [m] de altura por 50 [cm] de diámetro. Florece desde fines de invierno hasta el verano, en corona con muchas flores tubulares rosadas con tonos blanco-amarillento, el fruto es una vaina rojiza, hueca cuando esté maduro en otoño. Endémico de Chile, se distribuye desde la III a la VIII región por el litoral (Riedemann & Aldunate, 2014).

1.4.5 Quisquito rojo (*Eriosyce curvispina*)

Cactácea de cuerpo globoso hasta 30 [cm] de altura por 30 [cm] de diámetro, florece en primavera y verano, flores rojas con borde y centros amarillos, su fruto una vaina rojiza que al madurar queda hueca, semillas sueltas en el interior, madura en otoño. Endémico de Chile, se distribuye desde la III a la VIII región, con subespecies y variedades que crecen desde la Cordillera de Los Andes hasta el litoral (Riedemann & Aldunate, 2014).

1.4.6 Quisco costero (*Leucostele litoralis*)

Cactácea columnar, alcanza hasta los 2 [m] de altura por 1,5 [m] de diámetro, se ramifica desde la base, tallos rastreros y erguidos hacia el ápice, florece en primavera con flores blancas tubulares cercanas al ápice, su fruto es una baya verde. Es endémica de Chile y crece en el litoral desde la IV a la VI región (Riedemann & Aldunate, 2014).

1.4.7 Chagual (*Puya chilensis*)

Perenne, pertenece a la familia de las Bromeliáceas con hojas en roseta basal, alcanza hasta 5 [m] de altura, incluyendo la inflorescencia que crece en espiga compuesta densa con múltiples flores de color verde de 5 a 7 [cm] de largo, florece en primavera, el fruto maduro es una capsula con 3 valvas, con numerosas semillas dentro que al secarse se abren y son dispersadas por el viento. Es endémica de Chile y crece desde la IV a la VIII región, en laderas soleadas de cerros de la Cordillera De La Costa, sobre acantilados o planicies costeras (Riedemann & Aldunate, 2014).

1.4.8 Puya (*Puya berteroniana*)

Perenne, pertenece a la familia de las Bromeliáceas con hojas en roseta basal, alcanza hasta 5 [m] de altura, inflorescencia numerosas y densas de color verdeazulado, floración en primavera. Endémica de Chile se distribuye desde la IV a la VII región (Riedemann & Aldunate, 2014).

2 PROBLEMA

La degradación de los ecosistemas xerófitos en Chile plantea un desafío crítico que demanda una atención urgente y estratégica. La interacción compleja de múltiples factores antropogénicos y ambientales ha conducido a una disminución alarmante en la resiliencia y funcionalidad de dichos entornos naturales. Los cambios de usos de suelo, motivados por la constante urbanización y la expansión agrícola, han desencadenado una fragmentación y un deterioro significativo de hábitats naturales, afectando de manera directa la integridad de los ecosistemas xerófitos. Paralelamente, la recurrencia de incendios forestales devastadores, junto con la contaminación resultante de las actividades humanas y la falta de una inversión adecuada en la conservación de la biodiversidad por parte del estado, han debilitado aún más la capacidad de estos ecosistemas para resistir y recuperarse de las presiones externas.

Estos desafíos se ven agravados por el contexto global de emergencia climática y la persistente sequía que ha afectado a Chile desde ya más de una década. La disminución de las precipitaciones y el aumento de las temperaturas han exacerbado la fragilidad inherente de estos ecosistemas adaptados a condiciones áridas y semiáridas, poniendo en peligro la supervivencia de sus especies endémicas o nativas y la estabilidad de los sistemas naturales. Pese a sus adaptaciones frente a las condiciones árida, la falta de agua y la sequía persistente han impactado negativamente estos ecosistemas, debilitando la capacidad que poseen para mantener su equilibrio ecológico y proporcionar servicios ecosistémicos de importancia para la vida humana y la salud del planeta en su conjunto.

Ante este complejo panorama, se hace evidente la urgente necesidad de implementar estrategias efectivas de conservación y restauración ambiental que permitan contrarrestar la degradación acelerada de los ecosistemas xerófitos y garantizar la preservación a largo plazo de la biodiversidad única que albergan. La protección y rehabilitación de estos entornos naturales no solo son fundamentales para mantener la salud y la resiliencia de los ecosistemas locales, sino que también desempeñan un papel crucial en la mitigación de los impactos del cambio climático y la sequía, contribuyendo así a la adaptación y sostenibilidad de las comunidades locales y al bienestar general del planeta.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Proponer especies de hongos micorrícicos arbusculares asociados a especies de flora xerofítica presentes en los Acantilados Federico Santa María de Laguna Verde en la región de Valparaíso, para ser utilizados en futuros procesos de restauración ecológica de ecosistemas xerofíticos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cultivar hongos micorrícicos arbusculares a partir de muestras recolectadas de raíces de especies de flora xerofítica presentes en los Acantilados Federico Santa María.
2. Identificar las especies de hongos micorrícicos arbusculares asociados a las muestras de raíces recolectadas mediante técnicas de biología molecular.
3. Seleccionar especies de HMA mediante dos criterios: la abundancia relativa de cada potencial especie de HMA y la velocidad de crecimiento de cada una de éstas en el medio de cultivo sólido.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 DESCRIPCIÓN DEL LUGAR DE ESTUDIO

El Santuario de la Naturaleza Acantilados Federico Santa María, se encuentra al sur de la comuna de Valparaíso, en la localidad de Laguna Verde. Este sitio está formado por un acantilado rocoso que se levanta verticalmente junto a la línea de costa, alcanzando una altura de 300 m.s.n.m. Debido a la difícil accesibilidad de la pared rocosa, se convierte en un refugio aislado que alberga diversas especies de flora y fauna silvestre (Consejo de Monumentos Nacionales, s.f.), parte de los acantilados puede apreciarse en la figura 4.1 que sigue:



Figura 4.1: Imagen referencial de los Acantilados Federico Santa María.

Fuente: <https://www.mhnv.gob.cl/cartelera/estudio-floristico-y-vegetacional-de-los-acantilados-federico-santa-maria>

La ubicación geográfica referencial de los AFSM en coordenadas UTM con datum WGS1984 19H, se presenta en la tabla 4.1 que está a continuación:

Tabla 4.1: Coordenadas geográficas referenciales en UTM (19H) de los Acantilados Federico Santa María.

Coordenada Norte	Coordenada Este
6337720,80	251961,60

Se mencionan como coordenadas referenciales, puesto que dicha área protegida comprende una superficie aproximada de 295,5 [ha], lo cual puede observarse en la figura 4.2 que sigue a continuación:

Propuesta Santuario de la Naturaleza Acantilados Federico Santa María



Figura 4.2: Mapa del Santuario de la Naturaleza Acantilados Federico Santa María.

Fuente: https://www.monumentos.gob.cl/sites/default/files/planos/00984_SN_05101_POp_D699_2006.JPG

4.2 DESCRIPCIÓN DE LOS MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo entre agosto del 2023 y junio del 2024. La parte práctica se realizó principalmente en las instalaciones del Laboratorio de Biodegradación y Biodeterioro de Materiales (LBBM), perteneciente al Laboratorio de Suelos y Materiales de la Escuela de Construcción Civil de la Universidad de Valparaíso, a excepción de la colecta de muestras, que se efectuó en el Santuario de la Naturaleza Federico Santa María.

4.2.1 Materiales y métodos asociados al primer objetivo específico

4.2.1.1 Recolección del material biológico

Dichas especies se seleccionaron, por ser parte de las formaciones xerofíticas que se encuentran en los AFSM, también por su facilidad de acceso en cuanto a la recolección de sus raíces, algunas por su estado de conservación y por no encontrarse mayormente estudiadas en cuanto a su asociación con hongos micorrícicos arbusculares en la zona central de Chile.

4.2.1.1.1 Materiales

Los materiales que fueron requeridos para la colecta de muestras fueron los siguientes:

- Tubos Falcon estériles
- Termómetro
- Guantes
- Tijeras de acero inoxidable
- Alcohol al 70%
- Rastrillo
- Dispositivo móvil con geolocalización
- Rotulador y cinta de papel
- Caja térmica de poliestireno expandido
- Bolsas de gel refrigerante

4.2.1.1.2 Método


Se recolectaron 2 muestras de cada una de las 8 especies durante dos visitas a tres sitios del santuario AFSM. El método para la recolección de las raíces consistió en los siguientes pasos: primero, usando los guantes, se desinfectaron con alcohol al 70% el rastrillo, las tijeras y las pinzas a utilizar. Luego, de cada individuo de las especies seleccionadas, se extrajeron segmentos de aproximadamente 10 [cm] de la raíz, a una profundidad no mayor a 20 [cm]. Estos segmentos se rotularon con una descripción que incluía la especie a la que correspondía, la altura y temperatura a la que fue tomada la muestra. Posteriormente se almacenaron de inmediato en un tubo Eppendorf y se conservaron en una caja térmica con geles de hielo para mantener las muestras a una temperatura de alrededor de 4 [°C] hasta que fueran transportadas al laboratorio. Finalmente, se volvían a desinfectar los materiales y se repetía el proceso para el resto de los individuos, procurando alterar lo menos posible el resto de las raíces de la planta e incorporando nuevamente el suelo removido en la superficie correspondiente.




4.2.1.2 Cultivo de los hongos micorrícicos arbusculares

Se debe considerar que para cada procedimiento se hizo uso de los elementos de protección personal pertinentes y que, a su vez, todos éstos se realizaron en condiciones estériles, a modo de evitar contaminación de las muestras, el laboratorio, hacia el personal, entre otros.

Tabla 4.3. Principales materiales y equipos utilizados en el cultivo de los HMA.

Materiales/Equipos	Descripción	Imagen referencial
Autoclave	<p>Esterilizar el medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar) y todo el material de laboratorio que se usará en el proceso, para asegurar que estén libres de cualquier contaminación microbiana.</p> <p>El responsable del manejo de este equipo fue Manuel Ortiz, que cuenta con la certificación de competencia como Operador de autoclave según la autoridad sanitaria mediante el registro N° 230522159 y resolución N° 2305419198 del 29/08/2023 cumpliendo con los requisitos establecidos en el DS N°10/2012.</p>	
Balanza de Precisión	<p>Medir con precisión las cantidades de reactivos necesarios para preparar el medio de cultivo PDA, asegurando la exactitud en las proporciones y la calidad del medio.</p>	
Cámara de Flujo Laminar	<p>Proporcionar un ambiente estéril durante la preparación y vertido del medio de cultivo PDA en las placas Petri, así como durante la inoculación de las muestras para evitar la contaminación externa.</p>	

Materiales/Equipos	Descripción	Imagen referencial
Elementos de protección personal	Proteger al personal de laboratorio de posibles riesgos biológicos y químicos. Incluyen guantes, batas, mascarillas, entre otros.	
Estufa	Secar y calentar los instrumentos y materiales de laboratorio, como el vidrio y los utensilios, asegurando que estén libres de humedad antes de su uso.	
Incubadora	Mantener las placas Petri inoculadas con las muestras de HMA a unas condiciones constantes para favorecer el crecimiento óptimo de los hongos.	
Instrumental de Laboratorio	<p>Herramientas necesarias para la manipulación de las muestras y el medio de cultivo. Tales como:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Matraces • mechero Bunsen • Vasos de precipitado • Indicador Químico de Esterilización • Tubos Eppendorf • Parafilm • Botellas de borosilicato • Asas • Sacabocado • Piseta • Bisturí • Pinzas de metal 	

Materiales/Equipos	Descripción	Imagen referencial
<p>Materiales de Oficina</p>	<p>Sirven para documentar y etiquetar las muestras y reactivos utilizados durante el proceso. Dentro de los cuales se destaca:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Marcador permanente • Tijeras • Masking tape • Transportador 	
<p>Placas Petri Plásticas</p>	<p>Proveen un espacio adecuado y estéril para el crecimiento de los hongos en el medio de cultivo PDA.</p>	
<p>Reactivos Químicos</p>	<p>Ingredientes necesarios para preparar el medio de cultivo PDA y otras soluciones requeridas en el proceso de cultivo y aislamiento de HMA, tales como:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Agar • Extracto de levaduras • Peptona • Fosfato de potasio (KH_2PO_4) • Sulfato de magnesio (MgSO_4) • Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) • Yoduro de potasio (KI) • Sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) • Ácido bórico (H_3BO_3) • Cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) • Sulfato ferroso (FeSO_4) • Cloranfenicol ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$) 	

4.2.1.2.1 Preparación del medio de cultivo sólido PDA

4.2.1.2.1.1 Materiales

Los materiales requeridos para la preparación de 1 [L] del medio de cultivo sólido de Papa-Dextrosa-Agar (PDA) fueron los siguientes:

- 200 [g] de papa
- 10 [g] de dextrosa
- 15 [g] de agar
- 1 [L] de agua destilada

Ahora bien, dado que los hongos micorrícicos son simbioses obligados y necesitan de una planta para poder completar su ciclo de vida, es que se enriqueció el medio de cultivo PDA, con los siguientes reactivos:

- 1 [g] de extracto de levaduras
- 1 [g] de peptona
- 1,7 [g] de fosfato de potasio (KH_2PO_4)
- 0,5 [g] de sulfato de magnesio (MgSO_4)
- 0,4 [g] de cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 0,08 [g] de yoduro de potasio (KI)
- 0,08 [g] de sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- 0,06 [g] de ácido bórico (H_3BO_3)
- 0,025 [g] de cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- 0,02 [g] de sulfato ferroso (FeSO_4)
- 0,25 [g] de cloranfenicol ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$)

4.2.1.2.1.2 Procedimiento

- Pelar y cortar las papas en trozos pequeños.
- Hervir las papas en agua destilada hasta que estén blandas.
- Filtrar el extracto de papa con gasa y ajustar el volumen a 1 litro.
- Añadir la dextrosa, el agar y resto de reactivos (excepto el cloranfenicol) al extracto de papa.
- Esterilizar la mezcla en autoclave a 121 [°C] durante 20 minutos y dejar enfriar.
- Incorporar el cloranfenicol cuando el extracto de papa alcance alrededor de 60 [°C] de temperatura.
- Verter el medio en placas de Petri bajo condiciones estériles (bajo la cámara de flujo laminar, con el mechero encendido e instrumental estéril) y dejar solidificar.
- Apartar y conservar las placas a 4 [°C] en el refrigerador del laboratorio hasta su uso.

A modo de ilustración, se tiene en la figura 4.3, una representación gráfica de lo que se obtendría como producto final de este procedimiento, medios de cultivo sólido de PDA en placas Petri de plástico.



Figura 4.3: Imagen referencial de las placas Petri con medio de cultivo PDA

Fuente: https://www.mycosfera.cl/collection/medios-de-cultivo?limit=9&with_stock=0&order=id&way=ASC

4.2.1.2.2 Cultivo de los HMA

4.2.1.2.2.1 Preparación de las placas Petri

- Dibujar una línea diametral en la base de las placas Petri, ésta la divide en dos secciones iguales. Una de las secciones corresponde al compartimiento proximal, la cual se rotula con la sigla CP, que es donde se deposita la raíz y, la otra sección correspondiente al compartimiento distal, la cual se rotula con la sigla CD, que solo contiene el medio de cultivo.

4.2.1.2.2.2 Preparación de las muestras de raíces

- Verter la muestra en una placa y seleccionar las raíces que se vean más homogéneas y/o cuenten con presencia de hongos.
- Cortar con bisturí las raíces en segmentos de aproximadamente 3 a 5 [cm].

4.2.1.2.2.3 Inoculación

- Colocar uno o dos segmentos de raíz de cada muestra sobre el medio de cultivo en el compartimiento proximal de la placa, lo más cercano al borde de la placa del CP.
- Repetir el paso anterior con la misma muestra para obtener su duplicado.
- Rotular con un marcador permanente y un trozo de cinta de papel, los datos relevantes de dicha muestra tales como la especie, la fecha de inoculación con la raíz, y el medio de cultivo utilizado.
- Sellar con doble papel Parafilm las placas.

4.2.1.2.2.4 Incubación

- Introducir las placas inoculadas y rotuladas a 20 [°C] y 60% de humedad en la incubadora.
- Observar y registrar el crecimiento de colonias fúngicas diariamente durante al menos 5 días hábiles.

4.2.1.2.3 **Aislamiento de HMA**

4.2.1.2.3.1 Observación y selección de colonias

- Evaluar las colonias fúngicas que crecen en las placas de PDA.
- Diferenciar las colonias basadas en la morfología (color, forma y tamaño) y características de crecimiento.

4.2.1.2.3.2 Subcultivo de colonias seleccionadas

- Transferir las colonias con características distintivas a nuevas placas de PDA para obtener cultivos puros.
- Sacar un replique de cada colonia con la ayuda del sacabocado.
- Utilizar un asa de inoculación estéril para transferir el fragmento de la colonia a una nueva placa con PDA.
- Incubar las placas de subcultivo a 20 [°C] y 60% de humedad y monitorear el crecimiento.
- Repetir el subcultivo si es necesario para asegurar un cultivo puro del hongo.

4.2.1.2.3.3 Almacenamiento

- Almacenar los cultivos puros en condiciones a 4 [°C] en el refrigerador para su posterior utilización.

4.2.1.2.4 **Traspaso de los HMA aislados del medio de cultivo sólido a líquido.**

La transferencia de los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) de un medio de cultivo sólido (PDA) a un medio líquido (PD), es crucial para poder comenzar con el proceso de extracción de material genético de los HMA, ya que, facilita la manipulación y recolección de la biomasa fúngica y, además, la ausencia de agar en el medio líquido elimina posibles interferencias en el proceso de extracción del material genético.

4.2.1.2.4.1 Materiales

- Alcohol al 70%
- Bisturí esterilizado
- Cámara de flujo laminar
- Incubadora
- Matraz Erlenmeyer esterilizado de 150 [ml].
- Mechero Bunsen
- Medio de cultivo líquido PD (sin agar).
- Pinzas esterilizadas.
- Placas Petri con los hongos aislados y cultivados.
- Sacabocado
- Tapones de algodón
- Cinta de papel

4.2.1.2.4.2 Procedimiento

Preparación del Medio Líquido PD

- Se prepara 1000 ml de medio de cultivo PD siguiendo el procedimiento estándar, asegurándose de no incluir el agar.
- Se esteriliza el medio líquido PD en la autoclave a 121 [°C] por 15-20 minutos.
- Se deja enfriar a temperatura ambiente.
- Se añade el cloranfenicol.
- Se sella la botella con Parafilm y se conserva en el refrigerador.

Preparación de Réplicas del Hongo Aislado

- Se enciende el mechero Bunsen para crear una zona de trabajo estéril.
- Se abre cuidadosamente una placa Petri con el medio sólido PDA y el HMA aislado.
- Usando el sacabocado, se cortan 10 repliques por muestra.

Inoculación en el Medio Líquido

- Se abre el matraz Erlenmeyer esterilizado, quitando cuidadosamente el tapón, se flamea la boca de éste y se vierten 100 [ml] del medio líquido PD en su interior.
- Con la ayuda del asa y/o las pinzas estériles se transfieren los 10 repliques del hongo aislado desde la placa PDA al matraz con medio líquido y se vuelve a flamear la boca del matraz.
- Se cierra el matraz con su tapón de algodón y Parafilm para evitar la entrada de contaminantes.
- Se rotula con los datos correspondientes.

Incubación

- Se coloca el matraz en la incubadora ajustada a 20 [°C] y 60% de humedad.

Monitoreo

- Se revisa periódicamente el matraz para observar el desarrollo del hongo en el medio líquido.

4.2.1.2.5 Filtración y secado de la masa fúngica

4.2.1.2.5.1 Materiales:

- Estufa ajustada a 45 [°C]
- Mechero Bunsen
- Papel aluminio perforado
- Pinzas
- Placas Petri pequeñas de vidrio
- Solución de lavado (solución salina)
- Vaso de precipitado

4.2.1.2.5.2 Métodos

Preparación del Filtro

- Se toma un vaso de precipitado y se cubre la parte superior con papel aluminio, el cual con la ayuda de una aguja estéril se perfora de manera que solo permita el paso del medio líquido, reteniendo la masa fúngica y las réplicas de agar.
- Se asegura el papel aluminio en su lugar para que no se desplace durante el proceso de vertido.

Filtración del Medio Líquido y el Hongo

- Se vierte el contenido del matraz Erlenmeyer (medio líquido más hongo) sobre el papel aluminio perforado colocado en el vaso de precipitado.
- Se permite que el medio líquido pase a través del papel aluminio, quedando la masa fúngica y las réplicas de agar retenidas en el filtro.

Remoción de Réplicas de Agar

- Con ayuda de pinzas esterilizadas, se retiran cuidadosamente las réplicas de agar del filtro, dejando únicamente la masa fúngica.
- Se desechan las réplicas de agar de manera apropiada en un contenedor de residuos biológicos.

Lavado de la Masa Fúngica

- Se vierte una cantidad adecuada de solución de lavado estéril sobre la masa fúngica contenida en el filtro de papel aluminio.
- Se agita suavemente para asegurar que la solución de lavado pase a través de la masa fúngica, removiendo cualquier residuo del medio líquido.
- Se retira lo máximo posible del líquido residual permitiendo que drene a través del papel aluminio.

Secado de la Masa Fúngica

- Se transfiere la masa fúngica lavada a una placa Petri pequeña de vidrio utilizando pinzas.
- Se coloca la placa Petri con la masa fúngica en una estufa ajustada a 45 [°C].
- Se deja secar durante al menos 48 horas, asegurándose de mantener la estufa a la temperatura constante especificada.

Monitoreo y Almacenamiento

- Se verifica periódicamente la masa fúngica durante el proceso de secado para asegurar que se mantengan las condiciones adecuadas.
- Una vez transcurrido el tiempo de secado, se retira la placa Petri de la estufa y se deja enfriar a temperatura ambiente.
- La masa fúngica seca se almacena en condiciones apropiadas para su posterior uso.

4.2.1.2.6 Molienda de la masa fúngica

4.2.1.2.6.1 Materiales

- Mechero Bunsen
- Mortero de porcelana
- Mano de mortero de porcelana
- Bisturí
- Tubos Eppendorf
- Rotulador
- Placa Petri pequeña de vidrio con la masa fúngica seca

4.2.1.2.6.2 Métodos

Transferencia de la Masa Fúngica

- Se coloca la placa Petri pequeña de vidrio con la masa fúngica seca sobre la superficie de trabajo.
- Con la ayuda de un bisturí, se desprende cuidadosamente la masa fúngica seca de la placa Petri, transfiriéndola al mortero de porcelana.
- Se asegura que toda la masa fúngica, incluyendo los fragmentos pegados a la placa, se transfieran al mortero de porcelana.

Molienda de la Masa Fúngica

- Se utiliza la mano de mortero para moler la masa fúngica, se aplica una presión constante y movimientos circulares para triturar la masa fúngica hasta obtener un polvo fino y homogéneo.
- Se continúa la molienda hasta que no queden grumos visibles y la consistencia del polvo sea uniforme.

Transferencia al Tubo Eppendorf

- Una vez obtenida la molienda fina, se transfiere cuidadosamente el polvo al tubo Eppendorf.
- Se utiliza una espátula estéril o la propia mano de mortero para facilitar la transferencia completa del polvo al tubo.

Rotulado y Almacenamiento

- Se rotula el tubo Eppendorf con la identificación adecuada, es decir, con el código numérico asociado a la especie.
- Se asegura que el tubo Eppendorf esté bien cerrado para evitar derrames o contaminaciones.
- Se almacena el tubo Eppendorf en condiciones apropiadas para su posterior uso.




4.2.2 Materiales y métodos asociados al segundo objetivo específico

4.2.2.1 Extracción del ADN





Para la extracción del ADN de los hongos se siguió un protocolo adaptado al cual se le realizaron ciertas modificaciones a fin de mantener la integridad física y bioquímica del ADN, incrementar sus rangos de pureza y concentración (Ortiz, 2024), así como también adecuarlo a los recursos disponibles en el laboratorio.

Los principales materiales y equipos que se utilizaron para la consecución del segundo objetivo específico de la presente investigación, que guarda relación con la identificación de las especies de hongos micorrícicos asociados a las especies de flora xérica presentes en el SNFSM, se observan en la tabla 4.4 que sigue:

Tabla 4.4. Principales materiales y equipos utilizados en la extracción del ADN de los HMA

Materiales/Equipos	Función	Imagen referencial
Autoclave	Esterilizar los materiales utilizados en la extracción del ADN, tales como el medio de cultivo, los matraces y entre otros instrumentales de laboratorio, eliminando cualquier contaminación microbiana. Operador responsable: Manuel Ortiz, vía resolución sanitaria N° 2305419198 del 29/08/2023.	
Balanza de Precisión	Medir con precisión la masa de los reactivos químicos necesarios para la extracción del ADN, asegurando la exactitud en la preparación de las soluciones requeridas.	
Cámara de Electroforesis y fuente de poder	Visualizar los fragmentos de ADN obtenidos durante la extracción, mediante la técnica de electroforesis. La fuente de poder proporciona la corriente eléctrica necesaria para mover los fragmentos de ADN a través del gel de agarosa.	

Materiales/Equipos	Función	Imagen referencial
Cámara de Flujo Laminar	Proporcionar un ambiente estéril y protegido para manipular las muestras de ADN, evitando la contaminación externa de los materiales y reactivos utilizados en la extracción.	
Centrífuga	Separar los componentes de la muestra de ADN, como proteínas y otros materiales celulares, mediante la aplicación de fuerza centrífuga.	
Elementos de protección personal	Proteger al personal de laboratorio de posibles riesgos durante el manejo de reactivos químicos y muestras biológicas, incluyendo guantes, batas, mascarillas, etc.	
Instrumental de Laboratorio	Proporcionar herramientas necesarias para realizar procedimientos específicos durante la extracción del ADN, como pipetas, tubos Eppendorf, microcentrífugas, asas, pinzas, entre otros.	

Materiales/Equipos	Función	Imagen referencial
<p>Materiales de Oficina</p>	<p>Documentar y etiquetar las muestras y reactivos utilizados durante el proceso de extracción del ADN.</p> <p>Dentro de los cuales se destaca:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Marcador permanente • Tijeras • Masking tape 	
<p>Microscopio Óptico - Microscopio trinocular Olimpus CX31</p>	<p>Permite observar y describir las características microscópicas de los hongos, a partir de las cuales se puede realizar una identificación preliminar de cada muestra aislada</p>	
<p>Micropipetas</p>	<p>Medir con precisión volúmenes pequeños de los reactivos, durante la preparación de las soluciones</p>	
<p>Porta y Cubreobjetos</p>	<p>Preparar las muestras de hongos para su observación microscópica y evaluar su morfología antes de la extracción del ADN</p>	

Materiales/Equipos	Función	Imagen referencial
Puntas (1000ul, 200ul y 10ul)	Transferir volúmenes precisos de líquidos durante la manipulación de muestras y reactivos en diferentes escalas, según las necesidades del protocolo de extracción del ADN	
Reactivos Químicos	<p>Proporcionar los compuestos químicos necesarios para la lisis celular, precipitación de ADN y otras etapas del proceso de extracción del ADN. Por ejemplo:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Buffer de lisis • Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v) • Acetato de sodio 3M (pH 5.2) • Isopropanol frío • Alcohol absoluto al 70% • Agua desionizada de alta pureza (H₂O-MQ) 	
Termociclador	Realizar ciclos de temperatura controlados durante la amplificación del ADN por PCR	
Vórtex	Mezclar y homogeneizar las muestras de ADN con los reactivos, promoviendo la eficiente lisis celular y extracción de ADN	

4.2.2.2 Protocolo de extracción de ADN genómico

La integridad física y bioquímica del ADN de los hongos micorrícicos arbusculares, es crucial para obtener altos niveles de pureza y concentración (Ortiz, 2024). El siguiente protocolo, adaptado y modificado a partir de diversas fuentes es una guía detallada para la extracción de ADN genómico de hongos micorrícicos.

4.2.2.2.1 Materiales y reactivos

- Tubos Eppendorf de 1,5 [ml]
- Buffer de lisis (2% CTAB, 1% PVP, 50 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris base pH 8.0, 500 mM NaCl)
- Baño termostático
- Vórtex
- CTAB al 10%
- Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v)
- Acetato de sodio 3M (pH 5.2)
- Isopropanol frío
- Alcohol absoluto al 70%
- Termoblock
- Agua desionizada de alta pureza (H₂O-MQ)

4.2.2.2.2 Procedimiento

1. Precalentar el buffer de lisis a 65 [°C] en el baño termostático.
2. Colocar de 50 a 100 [mg] de hongo micorrícico en un tubo Eppendorf de 1,5 [ml], el cual fue previamente molido en un mortero hasta obtener un polvo fino.
3. Adicionar 800 [μl] del buffer de lisis precalentado. Homogeneizar suavemente antes de que el contenido se descongele completamente.
4. Homogeneizar y luego incubar a 90 [°C] durante 20 minutos en un baño termostático, mezclando con un vórtex a los 10 minutos de iniciado el proceso.
5. Sacar las muestras del baño y adicionar 100 [μl] de CTAB al 10%. Homogeneizar e incubar por otros 20 minutos a 65 [°C] en el baño termostático.
6. Dejar enfriar la muestra a temperatura ambiente. Adicionar 0.5 volúmenes de la mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v), homogeneizar y centrifugar a 13,000 rpm por 15 minutos.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y agregar 100 [μl] de acetato de sodio 3M (pH 5.2) y 0.5 volúmenes de la mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v). Homogeneizar y centrifugar a 13,000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente.
8. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y adicionar 640 [μl] de isopropanol frío. Mezclar en vórtex incubar a 20 [°C] por 2 horas.
9. Centrifugar a 13,000 rpm por 21 minutos a temperatura ambiente.
10. Eliminar todo el líquido y preservar el precipitado. Agregar 350 [μl] de alcohol absoluto al 70% y centrifugar a 13,000 rpm por 5 minutos.
11. Eliminar todo el sobrenadante con cuidado de no perder el pellet (precipitado). Secar el pellet a 60 [°C] en un termoblock durante 10 minutos.
12. Una vez seco, resuspender el pellet en 50 [μL] de H₂O-MQ. Conservar la muestra adecuadamente para su posterior análisis.

4.2.2.3 Técnicas de biología molecular utilizadas

4.2.2.3.1 Electroforesis

4.2.2.3.1.1 Materiales y reactivos

- Botella borosilicato de 100 [ml]
- Vaso precipitado de 100 [ml]
- Micropipetas de 2 [μl], 10[μl], 200 [μl] y 1000 [μl].
- Placa orbital magnética
- Cámara de electroforesis horizontal
- Balanza analítica
- Agarosa
- Buffer TAE 0.5X
- Buffer de Carga
- Marcador de DNA de100pb
- GelRed®
- Transiluminador

4.2.2.3.1.2 Preparación del gel de agarosa

Para preparar 50 [ml] de gel de agarosa al 1%, se deben seguir los siguientes pasos:

- Calentar 50 [ml] del buffer TAE 0,5X a 70 [°C] en el baño termostático.
- Pesar 0,5 [g] de agarosa.
- Disolver la agarosa en los 50 [ml] del buffer TAE 0,5X previamente calentado.
- Verter la solución en una botella de borosilicato (o un matraz) en una placa magnética hasta obtener una mezcla homogénea y traslúcida, evitando la ebullición violenta de la ésta.
- Agregar 6 [μl] de GelRed® al gel de agarosa, mientras la solución de gel aún está caliente y dejar que se disuelva completamente en la mezcla.
- Vaciar con cuidado la solución caliente de agarosa/buffer en la bandeja de la cámara, evitando formar burbujas.
- Colocar un peine en el extremo correspondiente de la bandeja antes de que el gel se solidifique, el peine puede ser insertado por el lado que contiene 8 pozos o por el que contiene 16 pozos, dependiendo de la cantidad de muestras a correr.
- Dejar enfriar la mezcla hasta que el gel polimerice.

4.2.2.3.1.3 Carga de las muestras

- Disponer 6 [μl] del marcador de peso molecular o ladder en el primer pocillo del gel.
- Cargar 10 [μl] de las muestras de la extracción de ADN con el buffer de carga, en cada uno de los siguientes pocillos disponibles utilizando la micropipeta.
- Disponer 10 [μl] del control positivo y negativo en los últimos pocillos del gel.
- Conectar la fuente de poder a la corriente eléctrica, luego configurar a 90 [V] y 45 o 60 minutos, para iniciar la electroforesis.

- Cuando termina de correr el gel, se retira de la cámara y se procede a su observación en un transiluminador con luz ultravioleta estándar a 260-280 [nm] para el posterior análisis de los resultados de la extracción del DNA, y de este modo poder visualizar la integridad del ADN de cada muestra.

Notas adicionales:

El tiempo y voltaje de corrida del gel de agarosa dependerá del objetivo específico del análisis. Si el gel se corre inicialmente para verificar la calidad del proceso de extracción del ADN, se recomienda un tiempo de 45 minutos a 90 [V]. En cambio, si la electroforesis se realiza para verificar la purificación del material genético vía PCR, el tiempo recomendado es de 60 minutos a los mismos 90 [V]. Esto permite obtener resultados óptimos acorde a cada etapa del análisis genético.

4.2.2.3.2 PCR

4.2.2.3.2.1 Materiales y equipos

- H₂O-MQ
- Pipetas
- Puntas estériles
- Tubos Eppendorff de 1,5 [ml]
- Tubos de PCR de 0,2 [ml]
- Lápiz o marcador
- Vórtex
- Termociclador
- Cámara de Electroforesis

4.2.2.3.2.2 Procedimiento

Lo primero que se debe realizar es la Mezcla de Reacción o el también conocido como MIX. Cada muestra debe contener los siguientes componentes

- Buffer 10X ----- 5 [μL]
- Oligo ITS1 (10μM) ----- 2 [μL]
- Oligo ITS4 (10μM) ----- 2 [μL]
- dNTP (10mM) ----- 1 [μL]
- MgCl₂ (25mM) ----- 0,3 [μL]
- Paq (5U/μL) ----- 3 [μL]
- ADN molde ----- 5 [μL]

Este MIX se debe aforar a un volumen final de 50 [μL] con H₂O-MQ. En este caso, se tiene un total de 13,3 [μL] del MIX de reacción y 5 [μL] del ADN molde de la muestra, por lo cual, se deben agregar 31,7 [μL] de H₂O-MQ, tal como se puede observar a continuación:

$$13,3 \text{ [}\mu\text{L]} \text{ (MIX)} + 5 \text{ }\mu\text{L (ADN molde)} + 31,7 \text{ [}\mu\text{L]} \text{ (H}_2\text{O-MQ)} / \text{Volumen total} = 50 \text{ [}\mu\text{L]}$$

Así pues, dependiendo de la cantidad de muestras a amplificar, será la cantidad proporcional del MIX a preparar.

Condiciones de amplificación

Con respecto a las condiciones de amplificación, se configuró el termociclador con los parámetros contenidos en la tabla 4.5 que sigue:

Tabla 4.5. Programa de amplificación configurado en el termociclador

Etapa del proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94°C	5 minutos	1
Amplificación	95°C	30 segundos	45
	59°C	30 segundos	
	72°C	45 segundos	
Extensión Final	72°C	10 minutos	1
Enfriamiento	4°C	∞	1

Cabe mencionar que en cada serie de PCR se incluyeron controles positivos y negativos para validar las condiciones de la amplificación y así como también, para detectar posibles contaminaciones en los reactivos utilizados.

Finalmente, para detectar el producto de la PCR, se corre un gel de electroforesis siguiendo la metodología correspondiente. Posteriormente, se visualiza el gel en el transiluminador para observar la integridad y calidad del ADN amplificado y se conservan a 4 [°C] las muestras que resulten con ADN íntegro.

4.2.2.4 Secuenciación de las muestras

Los productos del PCR fueron enviados, para su análisis mediante el servicio de secuenciación estándar de MacroGen Inc, a Corea del Sur. Los primers designados que fueron utilizados en la amplificación del ADN de cada muestra, fueron ITS1 e ITS4, se enviaron las cadenas forward del segmento de ADN obtenido de cada muestra y la secuenciación fue realizada utilizando el secuenciador ABI 3730xl System.

Preparación de las Muestras para el envío:

- Concentrar los productos de PCR en una cantidad adecuada, siguiendo las especificaciones proporcionadas por el servicio de secuenciación de MacroGen.
- Aliquotar el ADN extraído de cada muestra, en tubos Eppendorf estériles etiquetándolos claramente.

Envío de las Muestras

- Empaquetar los tubos con los productos de PCR en un contenedor apropiado para transporte internacional, asegurándose de que estén bien protegidos.
- Incluir toda la documentación requerida por MacroGen para la secuenciación, detallando las muestras enviadas y los primers utilizados.

Secuenciación en MacroGen

- Enviar las muestras a MacroGen en Corea del Sur.
- MacroGen llevará a cabo la secuenciación utilizando el sistema ABI 3730xl, siguiendo sus procedimientos estándar para la secuenciación de ADN.

Recepción y revisión de los resultados de la secuenciación:

- Recibir los resultados de secuenciación de MacroGen, que incluirán las secuencias de nucleótidos obtenidas para cada muestra, y revisar que todas las muestras estén etiquetadas con sus respectivos códigos. Además, comprobar que la cantidad total de muestras coincida con las enviadas y revisar otros aspectos relevantes para asegurar la integridad de los datos.

4.2.2.5 Identificación de las muestras

Este apartado tiene como objetivo identificar las especies de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) a partir de los productos de PCR previamente obtenidos. Para ello, se emplea la base de datos de GenBank y herramientas bioinformáticas. El proceso de identificación inicia con la recepción de los resultados de secuenciación proporcionados por MacroGen. Luego, se lleva a cabo el análisis y comparación de las secuencias obtenidas con las de referencia disponibles. Finalmente, se procede a la identificación de las especies de HMA correspondientes, garantizando una clasificación taxonómica precisa.

4.2.2.5.1 Materiales

- Acceso a la base de datos GenBank.
- Herramientas bioinformáticas para el análisis y comparación de secuencias (por ejemplo, BLAST).
- Resultados de secuenciación proporcionados por MacroGen.
- Computadora con acceso a internet y software para análisis bioinformático.

4.2.2.5.2 Métodos

4.2.2.5.2.1 Análisis preliminar de secuencias

- Importar las secuencias recibidas en un software de bioinformática adecuado (por ejemplo, BioEdit o Geneious).
- Realizar una limpieza de las secuencias para eliminar cualquier base errónea o ambigua.

4.2.2.5.2.2 Comparación con la base de datos GenBank

- Acceder a la base de datos GenBank a través del sitio web del National Center for Biotechnology Information (NCBI).
- Utilizar la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para comparar cada secuencia obtenida con las secuencias disponibles en GenBank.
- Registrar los resultados obtenidos para cada secuencia, prestando especial atención a las coincidencias más significativas y a los puntajes de e-value y de identidad.

4.2.2.5.2.3 Alineación de Secuencias

- Seleccionar las secuencias de referencia más relevantes y representativas de las especies candidatas identificadas mediante BLAST.
- Realizar una alineación de múltiples secuencias utilizando software como ClustalW o MUSCLE para confirmar la similitud entre las secuencias obtenidas y las de referencia.

- Revisar manualmente las alineaciones para asegurar una correspondencia precisa de pares de bases y corregir cualquier discrepancia.

4.2.2.5.2.4 Interpretación de los resultados

- Interpretar los resultados de la alineación y determinar la especie correspondiente para cada secuencia obtenida, basándose en el porcentaje de identidad y la cobertura de la secuencia.
- Asignar una identificación de especie a cada muestra secuenciada.

4.2.2.5.2.5 Verificación y Validación

- Validar la identificación de las especies mediante la comparación con secuencias adicionales si es necesario y utilizando análisis filogenéticos para corroborar la precisión de las identificaciones.
- Documentar todo el proceso de identificación, incluyendo los criterios utilizados para la asignación de especies y cualquier observación relevante sobre la calidad de las secuencias.

4.2.2.6 Identificación vía características micro y macroscópicas

Por otro lado, a modo de contar con una identificación preliminar de las especies de hongos, se realizaron observaciones macro y microscópicas, con el objetivo de tener identificaciones parciales de las especies que no puedan ser identificadas vía secuenciación.

Se realizan vía tinción, se usó tanto azul

4.2.3 Materiales y métodos asociados al tercer objetivo específico

En cuanto a la selección de las especies se consideraron dos criterios, la abundancia de cada especie de hongo en las placas cultivadas de las distintas especies y, por otro lado, la velocidad de crecimiento de cada una de estas

4.2.3.1 Materiales

- Placas Petri con las cepas de los hongos cultivados aislados
- Cámara fotográfica

4.2.3.2 Métodos

4.2.3.2.1 Criterio 1: Abundancia Relativa

- Cuantificar el número de individuos de cada especie de hongo micorrícico por cada especie de planta muestreada.
- Determinar la abundancia relativa de cada especie de hongo micorrícico en relación con el total de individuos presentes en todas las muestras de las raíces.

4.2.3.2.2 Criterio 2: Velocidad de Crecimiento

- Determinar el número de días que le toma a cada colonia de hongo aislado, el alcanzar el radio máximo de la placa Petri.

4.2.3.2.3 Selección de Especies

- Comparar la abundancia relativa y la velocidad de crecimiento de cada especie de hongo micorrícico.
- Seleccionar las especies de hongos que presenten la mayor abundancia relativa y la mayor velocidad de crecimiento, o aquellas que cumplan con un equilibrio óptimo entre ambos criterios.

5 RESULTADOS

5.1 RESULTADOS ASOCIADOS AL PRIMER OBJETIVO ESPECÍFICO


5.1.1 Ubicación y recolección de las muestras




Durante las dos visitas que se realizaron a los Acantilados Federico Santa María, se recolectaron dos muestras de raíces por cada individuo de las ocho especies de plantas xerofíticas en estudio.



En cuanto a las especies de flora xerofítica que se encontraron en los acantilados, se escogieron ocho especies, las cuales se presentan junto a su nombre común, nombre científico y estado de conservación en la tabla 4.2 de a continuación:



Tabla 4.2: Especies de flora xerofítica presentes en los AFSM y su estado de conservación.

Fuente: <https://clasificacionespecies.mma.gob.cl>

Nombre común	Nombre científico	Categoría de conservación	Imagen referencial
Achupalla	<i>Eryngium paniculatum</i>	No clasificada/evaluada (NE)	

Nombre común	Nombre científico	Categoría de conservación	Imagen referencial
Quisco costero	<i>Leucostele litoralis</i>	Vulnerable (VU)	
Quisquito rosado	<i>Eriosyce subgibbosa</i>	Casi amenazada (NT)	
Quisquito colorado	<i>Eriosyce curvispina</i>	Casi amenazada (NT)	

Nombre común	Nombre científico	Categoría de conservación	Imagen referencial
Pata de guanaco	<i>Cistanthe grandiflora</i>	No clasificada/evaluada (NE)	
Vinagrillo	<i>Oxalis megalorrhiza</i>	No clasificada/evaluada (NE)	

Nombre común	Nombre científico	Categoría de conservación	Imagen referencial
Chagual	<i>Puya chilensis</i>	Vulnerable (VU)	
-	<i>Puya berteroniana</i>	Vulnerable (VU)	

En la Tabla 5.1 se presenta la ubicación de cada individuo, la altura a la que se encontraba la planta y la temperatura del suelo del cual se extrajo la muestra:

Tabla 5.1: Ubicación de las plantas de las cuales se recolectaron muestras de raíz en coordenadas en UTM (19H)

Especie	Sitio de recolección	Ubicación		Altura [msnm]	Temperatura [°C]	Fecha
		E	N			
<i>Eryngium paniculatum</i>	Sitio 2	251940.544	6339713.305	193,0	15,7	01-09-23
	Sitio 2	251946.504	6339675.906	260,8	12,8	01-09-23
<i>Leucostele litoralis</i>	Sitio 1	251678.954	6336839.52	251,3	15,8	27-08-23
	Sitio 1	251731.087	6336922.062	222,1	19,2	27-08-23
<i>Eriosyce subgibbosa</i>	Sitio 1	251701.055	6336896.981	235,8	19,5	27-08-23
	Sitio 1	251542.099	6336947.317	243,6	20,2	27-08-23
<i>Eriosyce curvispina</i>	Sitio 1	251890.127	6337170.756	263,5	22,2	27-08-23
	Sitio 1	251891.151	6337173.588	263,9	20,4	27-08-23
<i>Cistanthe grandiflora</i>	Sitio 1	251731.041	6336916.48	223,4	22,2	27-08-23
	Sitio 1	251758.845	6336926.881	197,0	24,7	27-08-23
<i>Oxalis megalorrhiza</i>	Sitio 1	251884.272	6337163.218	257,4	18,1	27-08-23
	Sitio 1	251881.475	6337159.231	248,2	17,9	27-08-23
<i>Puya chilensis</i>	Sitio 1	251731.926	6336921.086	221,1	18,5	27-08-23
	Sitio 2	251949.517	6339220.987	184,2	15,1	01-09-23
<i>Puya berteroniana</i>	Sitio 2	251940.221	6339713.702	187,9	14,3	01-09-23
	Sitio 2	251935.412	6339713.019	190,1	13,5	01-09-23

5.1.2 Cultivo y aislamiento de HMA

A partir de las raíces recolectadas, se cultivaron los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) utilizando el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). Se procesaron un total de 16 muestras, con dos muestras por cada una de las ocho especies de plantas muestreadas y trabajadas en duplicados (a) y (b).

Durante la incubación, se monitoreó el crecimiento de las colonias fúngicas. Dependiendo de la presencia de una o más colonias distintas de hongos en las placas, se procedió a su aislamiento individual. Este proceso se repitió varias veces hasta obtener cultivos puros.

De las muestras procesadas, se logró cultivar y aislar un total de 49 potenciales especies de hongos micorrícicos arbusculares. Los códigos para cada una de estas especies se presentan en la Tabla 5.2 que sigue a continuación:

Tabla 5.2: Códigos de identificación para cada HMA aislado

Nro. ID	Código de ID
1	Vinagrillo 1 (b) [1]
2	E.Curvisp. 1 (b) [1]
3	L.Litoralis 2 (b) [2]
4	E.Curvisp. 2 (a) [3]
5	P.Chilensis 1 (b) [1]
6	E.Subg. 1 (b) [2]
7	Achupalla 1 (b) [2]
8	P.Chilensis 1 (a) [1]
9	P.Bert. 2 (b) [1]
10	P.Bert. 1 (a) [1]
11	Achupalla 1 (a) [1]
12	C.Grand. 3 (a) [1]
13	P.Bert. 2 (a) [2]
14	P.Bert. 1 (b) [1]
15	C.Grand. 2 (b) [1]
16	C.Grand. 1 (b) [2] [1]
17	C.Grand. 1 (b) [1]
18	C.Grand. 2 (a) [2]
19	Achupalla 2 (b) [1]
20	P.Bert. 2 (a) [1]
21	Achupalla 1 (b) [1]
22	L.Litoralis 2 (a) [1] [1]
23	E.Curvisp. 2 (b) [1]
24	C. Grand. 1 (a) [2]
25	L.Litoralis 2 (a) [4] [1]
26	L.Litoralis 2 (b) [1]
27	C.Grand. 1 (a) [1]
28	L.Litoralis 1 (b) [1]
29	E.Curvisp. 2 (a) [2]
30	Achupalla 1 (b) [1]
31	Vinagrillo 1 (b) [3]
32	C.Grand. 2 (a) [1]
33	E.Subg. 1 (a) [1]
34	Achupalla 2 (a) [1]
35	L.Litoralis 2 (a) [1] [2] [2]
36	L.Litoralis 1 (a) [1]

Nro. ID	Código de ID
37	L.Litoral 2 (a) [3] [1] [4]
38	L.Litoral 2 (a) [3] [1] [3]
39	L.Litoral 2 (b) [1]
40	C.Grand. 2 (a) [2]
41	E.Curvisp. 2 (a) [2] [1]
42	P.Chilensis 1 (b) [2] [1]
43	E.Curvisp. 1 (a) [1]
44	Vinagrillo 1 (a) [1] [1] [1]
45	Vinagrillo 1 (a) [1] [1] [2]
46	L.Litoral 1 (a) [2] [1]
47	L.Litoral 1 (b) [2] [1]
48	E.Subg. 1 (b) [1]
49	L.Litoral 2 (a) [3] [1] [5]

Cabe recordar que los cultivos se llevaron a cabo en condiciones controladas. A medida que se iban desarrollando, se observaron diferentes características morfológicas de las colonias fúngicas, como variaciones en color, textura y forma de crecimiento, lo cual permitió clasificar los aislamientos preliminares. Durante el proceso de cultivo, se observó que la mayoría de los hongos aislados presentaron un crecimiento significativo en un rango de 3-5 días de incubación.

5.1.3 Registros fotográficos

5.1.3.1 Recolección de muestras en campo.

En el Anexo 2, se pueden encontrar algunos registros fotográficos de los individuos de plantas muestreados.

5.1.3.2 Inoculación de muestras en medio de cultivo

En la Figura 5.1, se pueden observar los resultados de la inoculación de la muestra “L. Litoral 2” en el medio de cultivo sólido PDA, donde la primera placa corresponde a la copia (a) y la segunda placa a la copia (b).

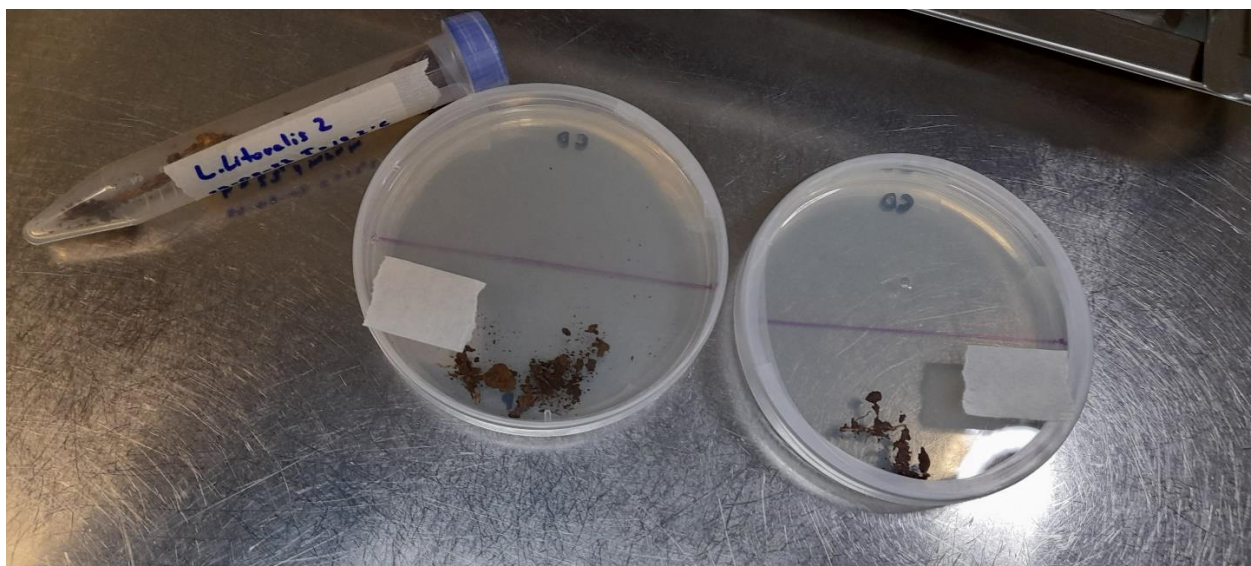


Figura 5.1: Ejemplo de muestra en medio de cultivo PDA.



Figura 5.2: Muestras de raíces en medio de cultivo PDA.

5.1.3.3 Incubación de las colonias fúngicas

La figura 5.3 muestra el crecimiento de hongos luego de dos semanas desde su inoculación.

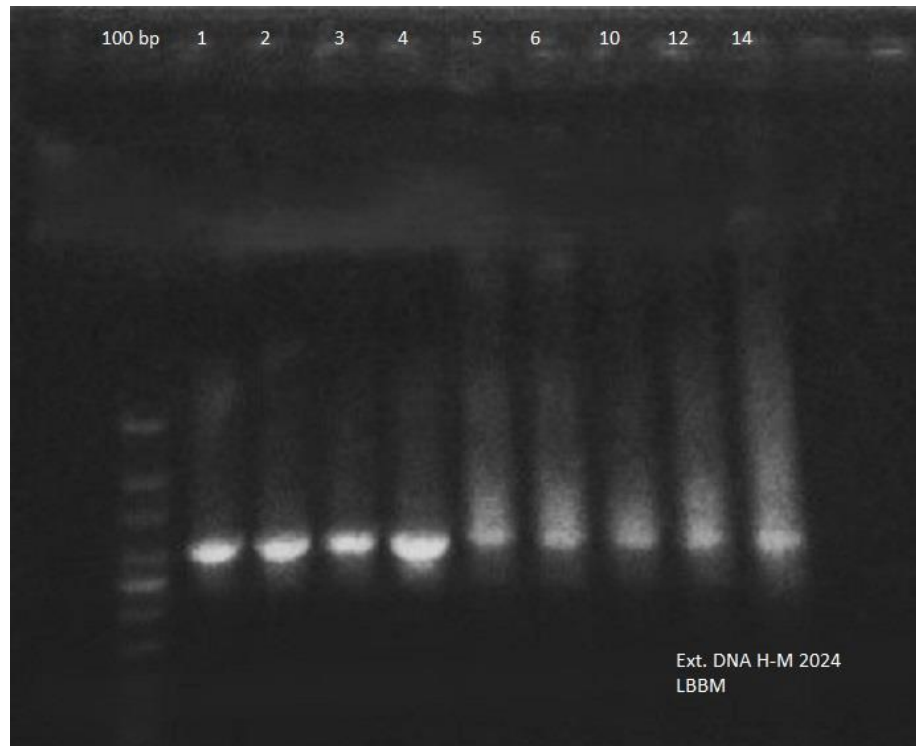
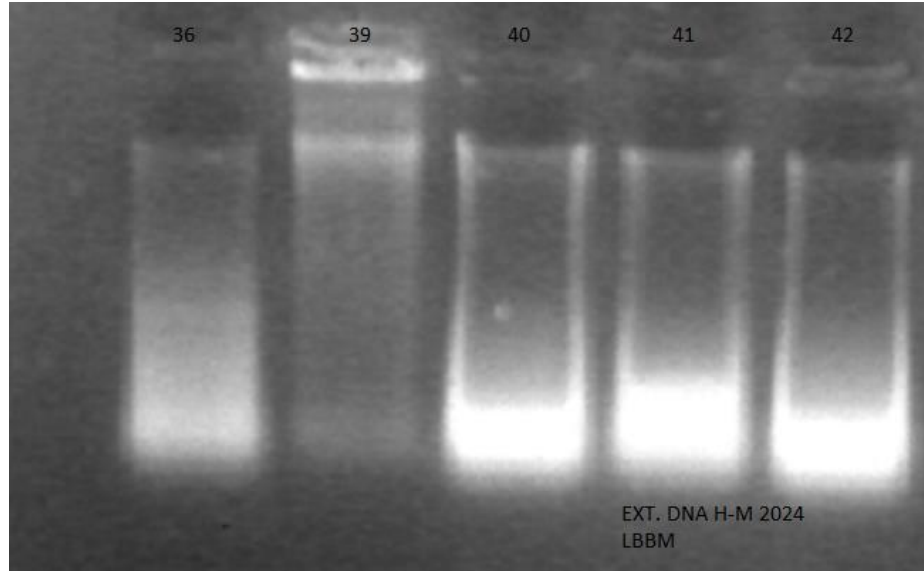


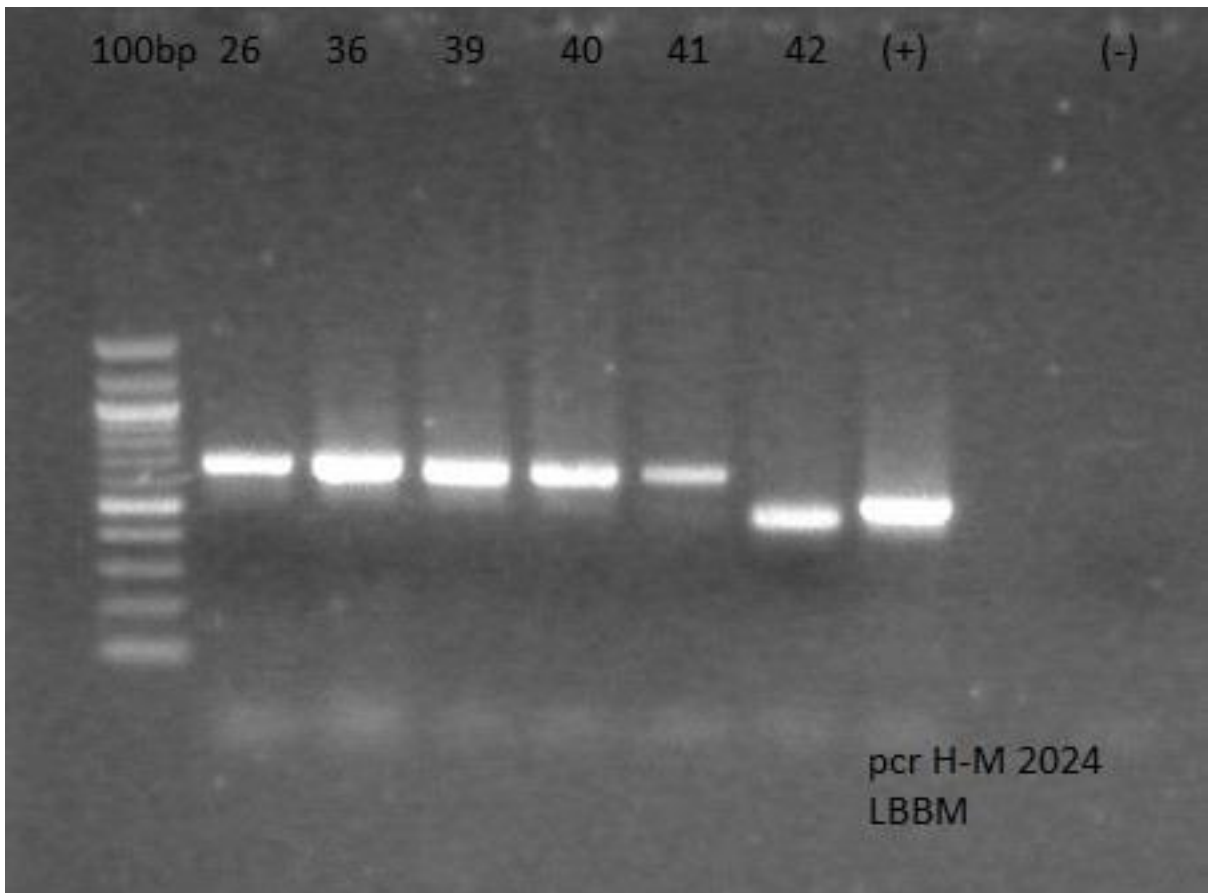
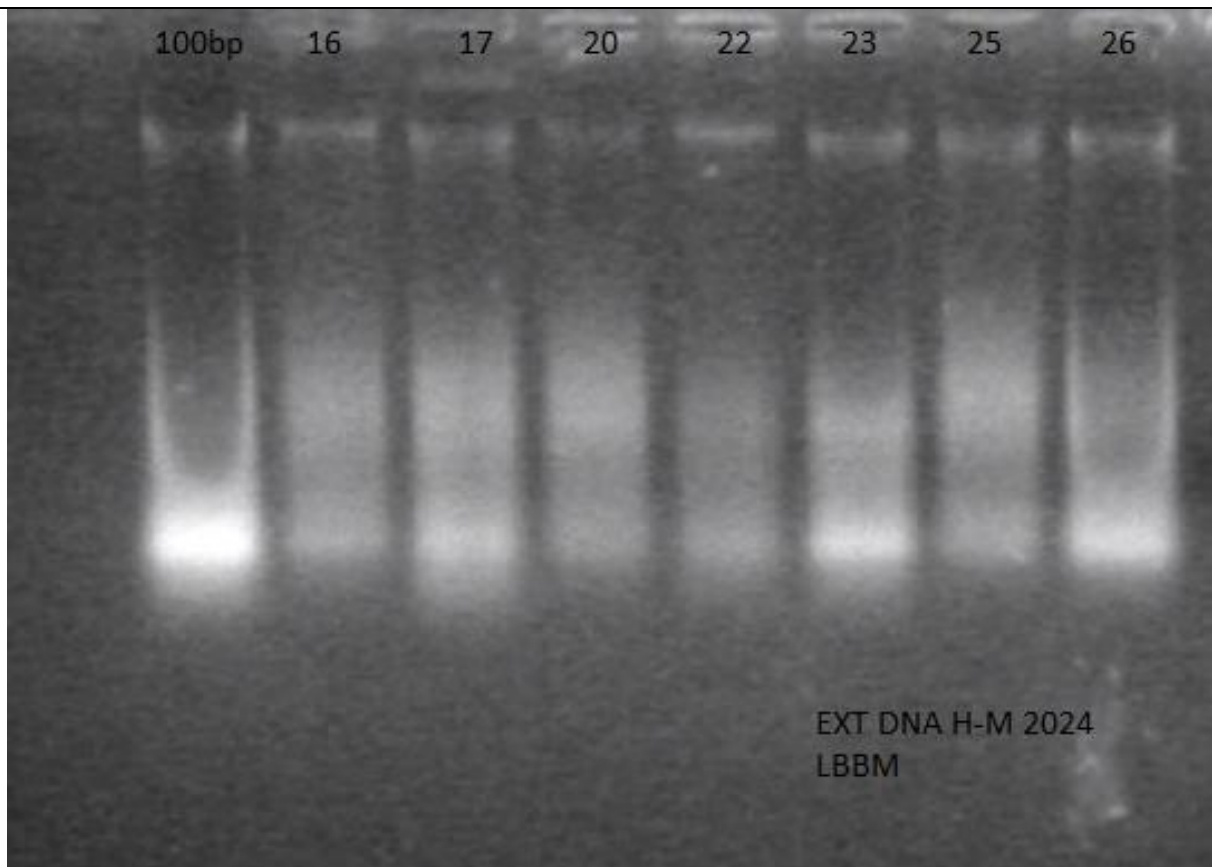
Figura 5.3: Ejemplos de colonias de hongos luego de dos semanas desde la inoculación.

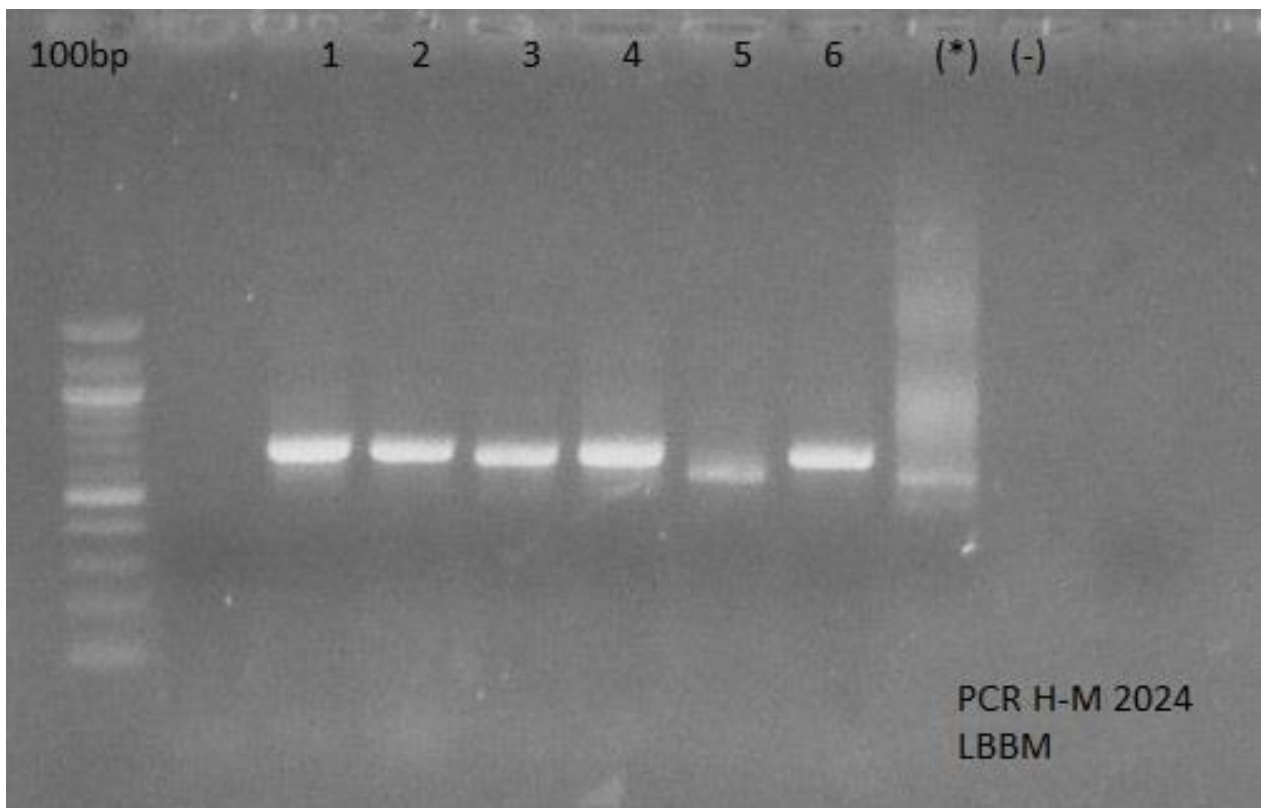
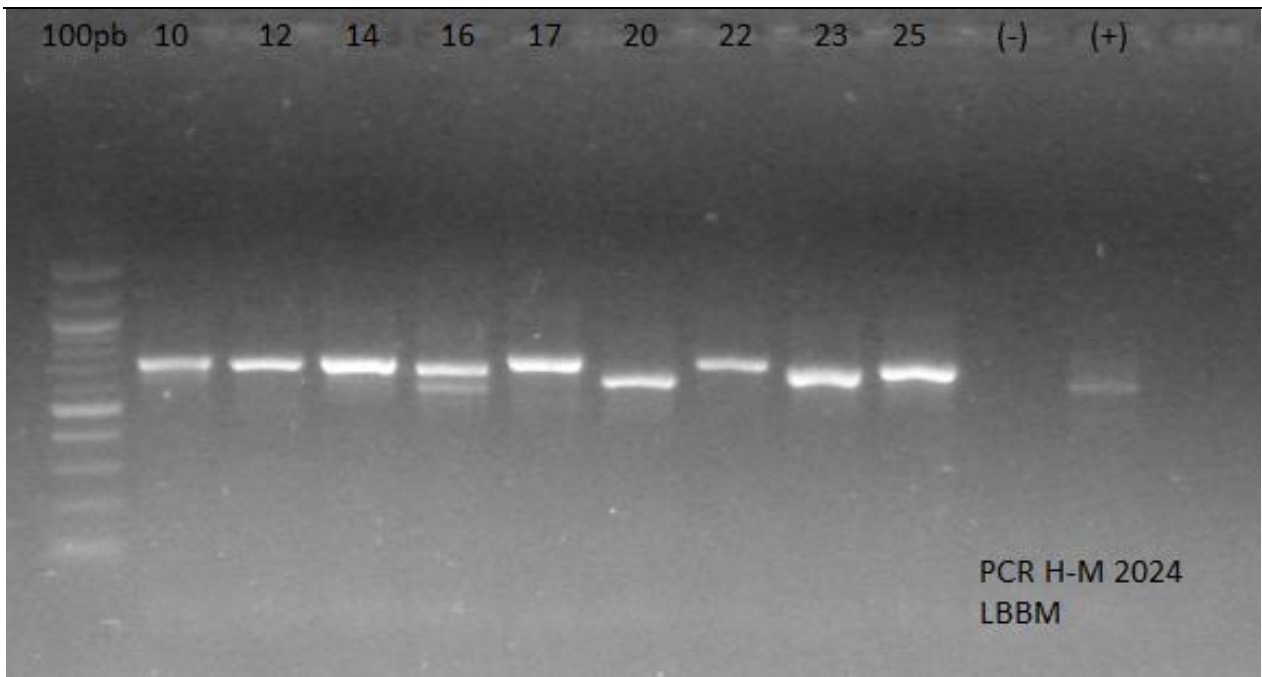
5.2 RESULTADOS ASOCIADOS AL SEGUNDO OBJETIVO ESPECÍFICO

5.2.1 Resultados de las electroforesis

En las figuras de a continuación, se presentan los resultados de las electroforesis asociadas a las muestras de las cuales fue posible realizar la extracción de su ADN:







5.2.2 Identificación preliminar por características morfológicas

5.2.2.1 Placa 1

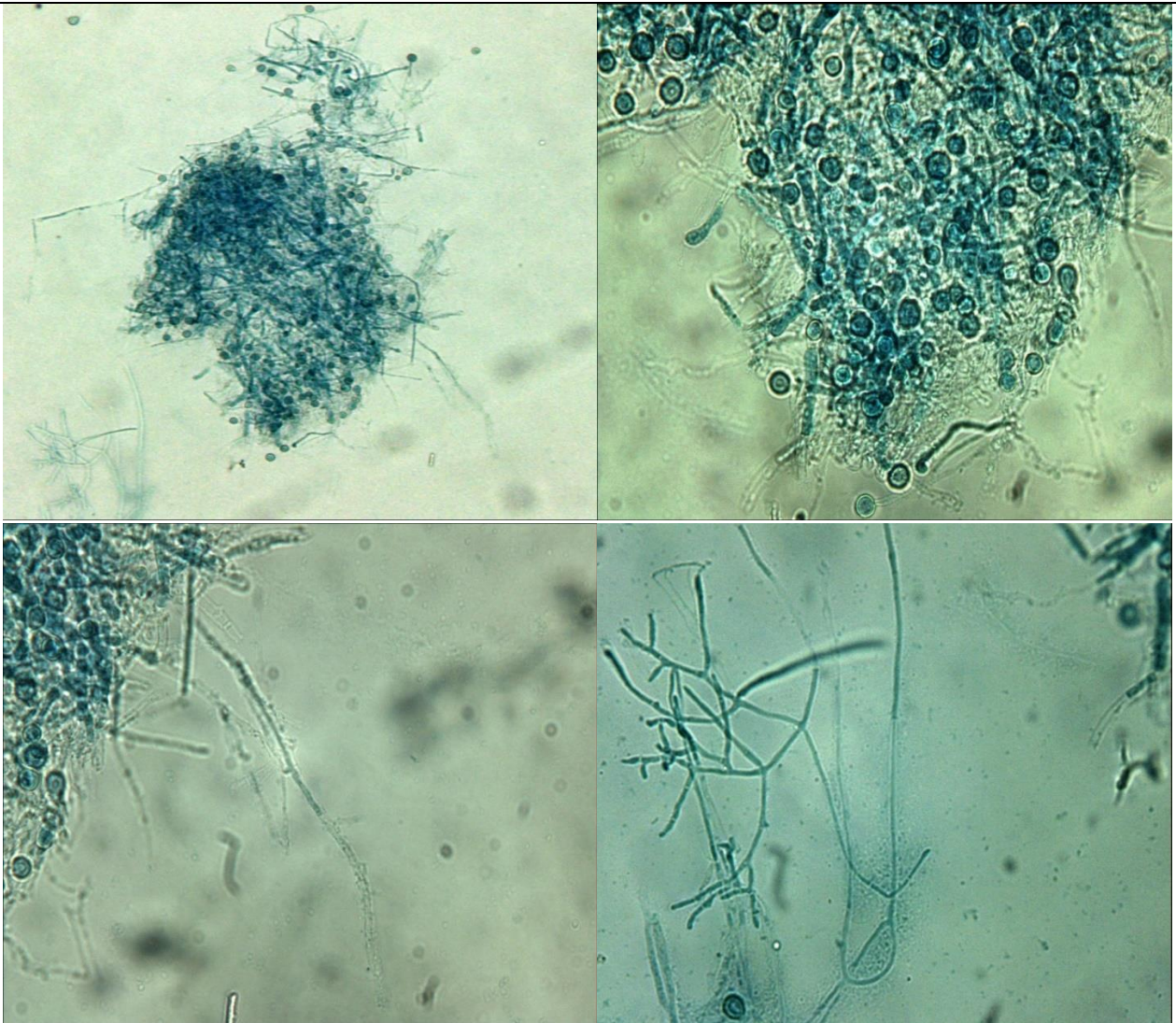


Figura 5.4: Placa 1 al microscopio, primera imagen a 10x y el resto a 40x.

Estas hifas llegan a cubrir todo el medio de cultivo, son colonias blancas, al alcanzar la madurez (cuarto día) comienzan a adquirir una tonalidad gris oscura (la tonalidad se debe al desarrollo de las estructuras de reproducción asexual, llamadas endosporas). Son vellosas, algodonosas y secas (Bonifaz, 2012).



Figura 5.4: Placa 1, observación macroscópica.

Características:

Presenta un micelio macrosifonado (entre 5 - 10 [µm]), hialino, cenocítico, en los puntos en donde se conectan los esporangióforos y los estolones que presentan, se forman rizoides (esta es una diferencia del género *Absidia*, en el cual se desarrollan internodales). Los esporangióforos son largos y no se ramifican y culminan en esporangios de gran tamaño (40 - 275 [µm]), con esporangiosporas hialinas o ligeramente cafés. (Bonifaz, 2012; Larone, 2011).

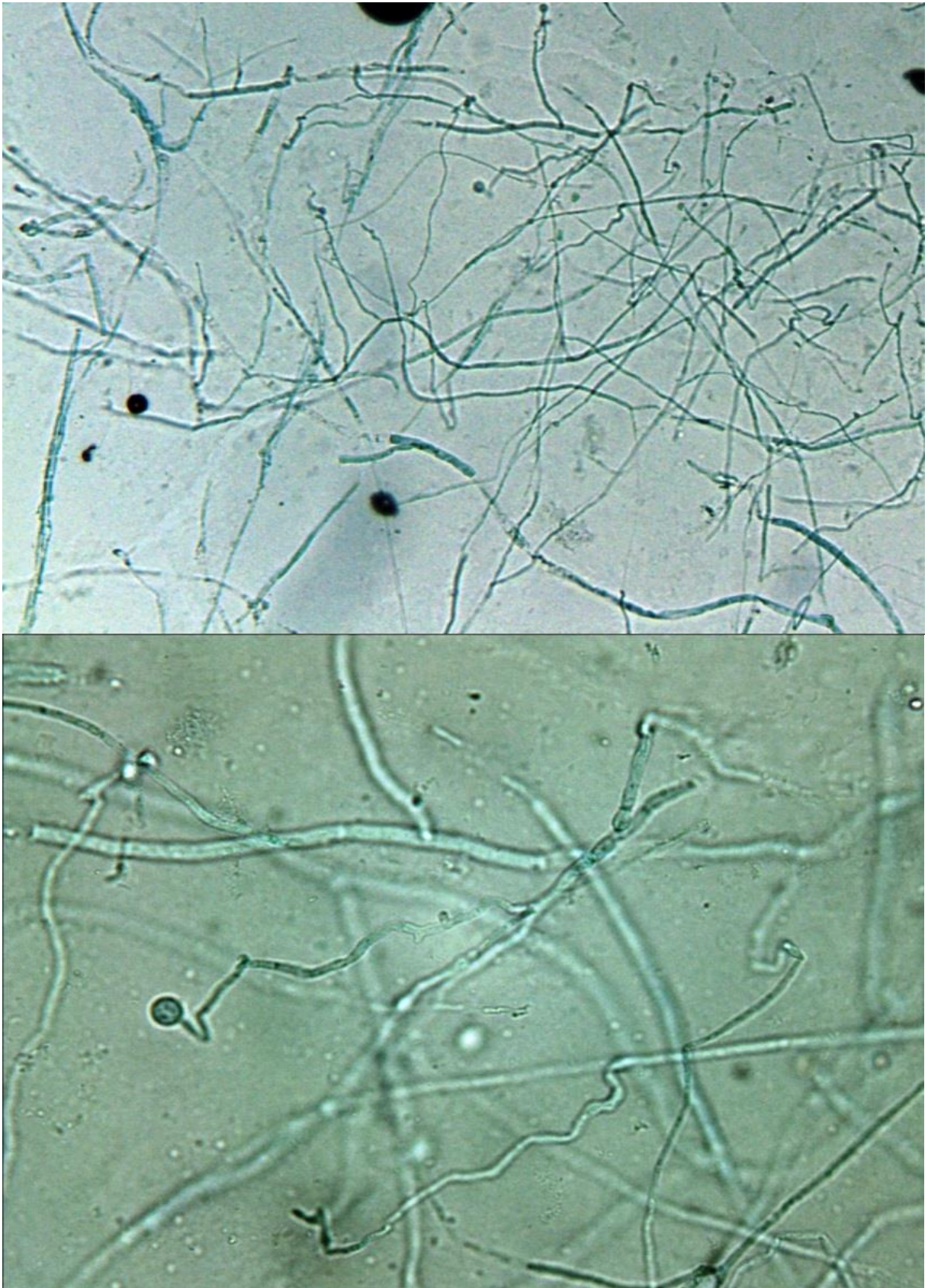
Se observa a la izquierda, un rizoide en la base de los esporangióforos, los cuales a su vez culminan en columelas libres de esporangiosporas. En la foto de la derecha se observa un esporangio, con una columela oval y gran cantidad de esporangiosporas, Azul de algodón Lactofenol, 40x.

De acuerdo a las características anteriormente nombradas, en la tabla 5.3 se encuentra el menor orden taxonómico al que podría pertenecer este hongo el cual sería su orden, el Glomerales.

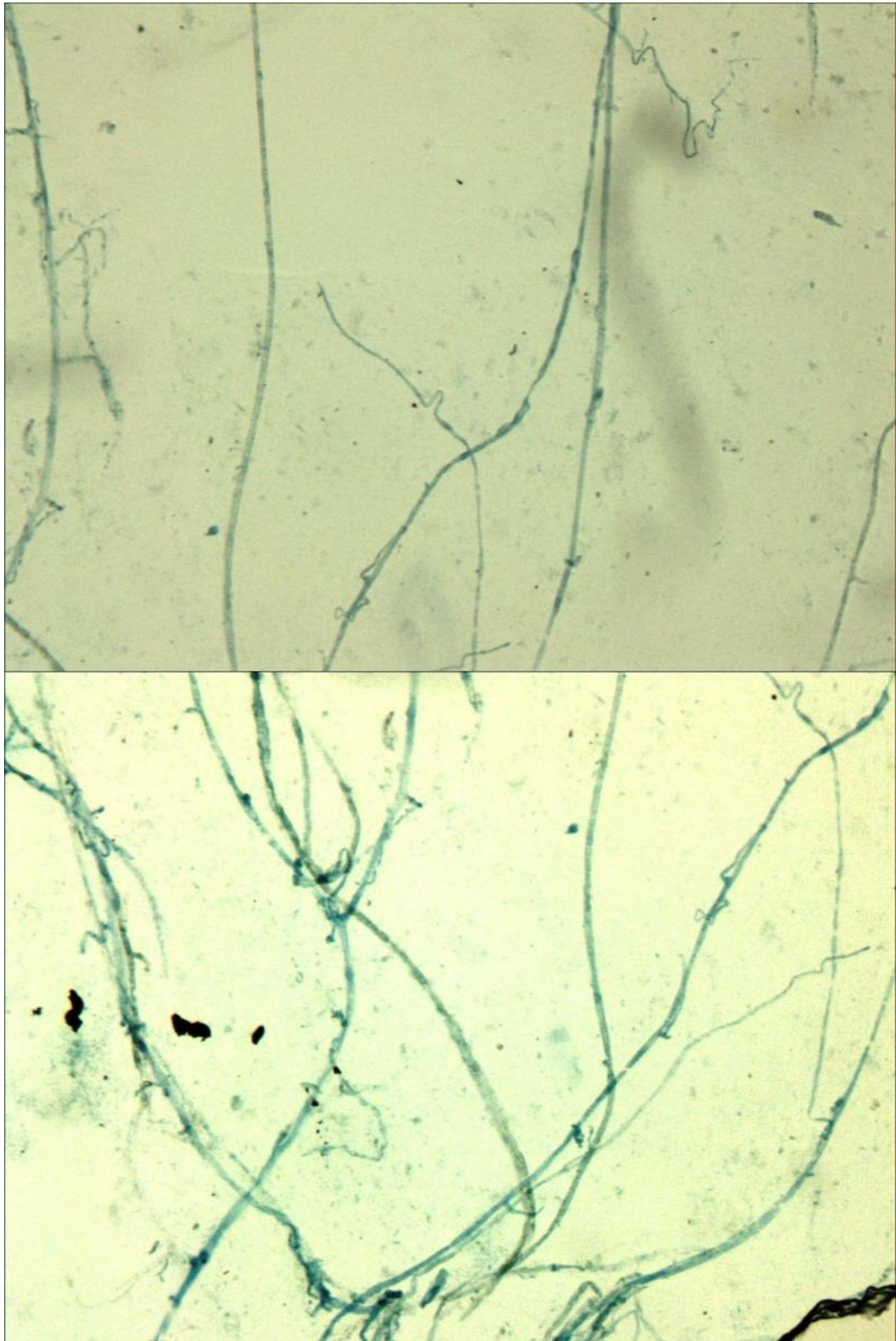
Tabla 5.3. Identificación preliminar placa 1.

Reino	Division	Orden	Genero
Fungi	Glomeromycetes	Glomerales	

5.2.2.2 Placa 4



5.2.2.3 Placa 6



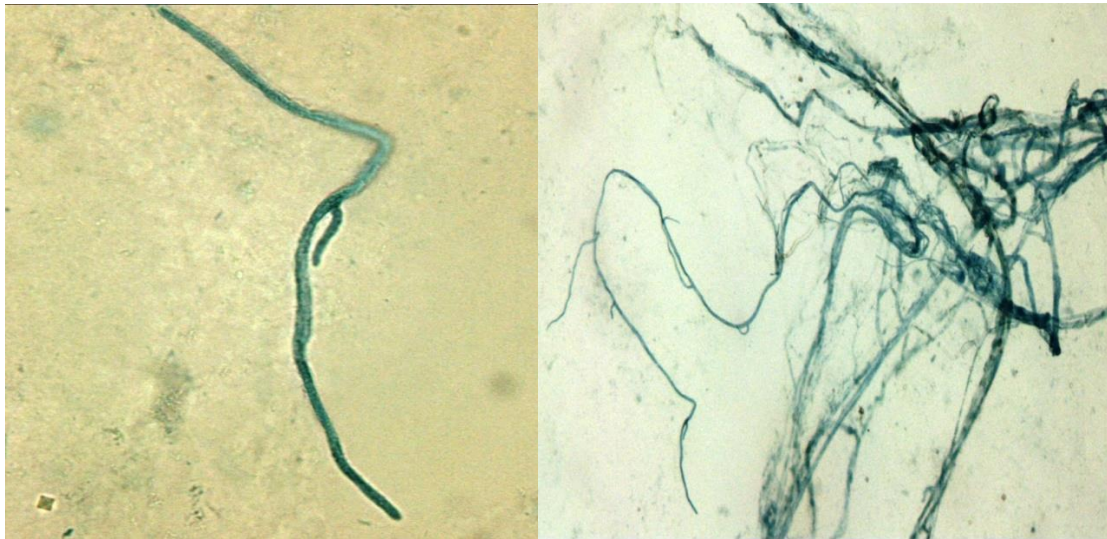
Hifas alargadas entrecruzadas finas y tabicadas sin presencia de fíbulas. Se puede observar la formación de rizoides característicos de hongos micorrícicos (imagen a 10X) con microscopio trinocular Olympus CX31 LBBM-DC-ECC.



Hifas ramificadas tabicadas y pectinadas. Se observan hifas en crecimiento (imagen a 40X) microscopio trinocular Olimpus CX31 LBBM-DC-ECC.



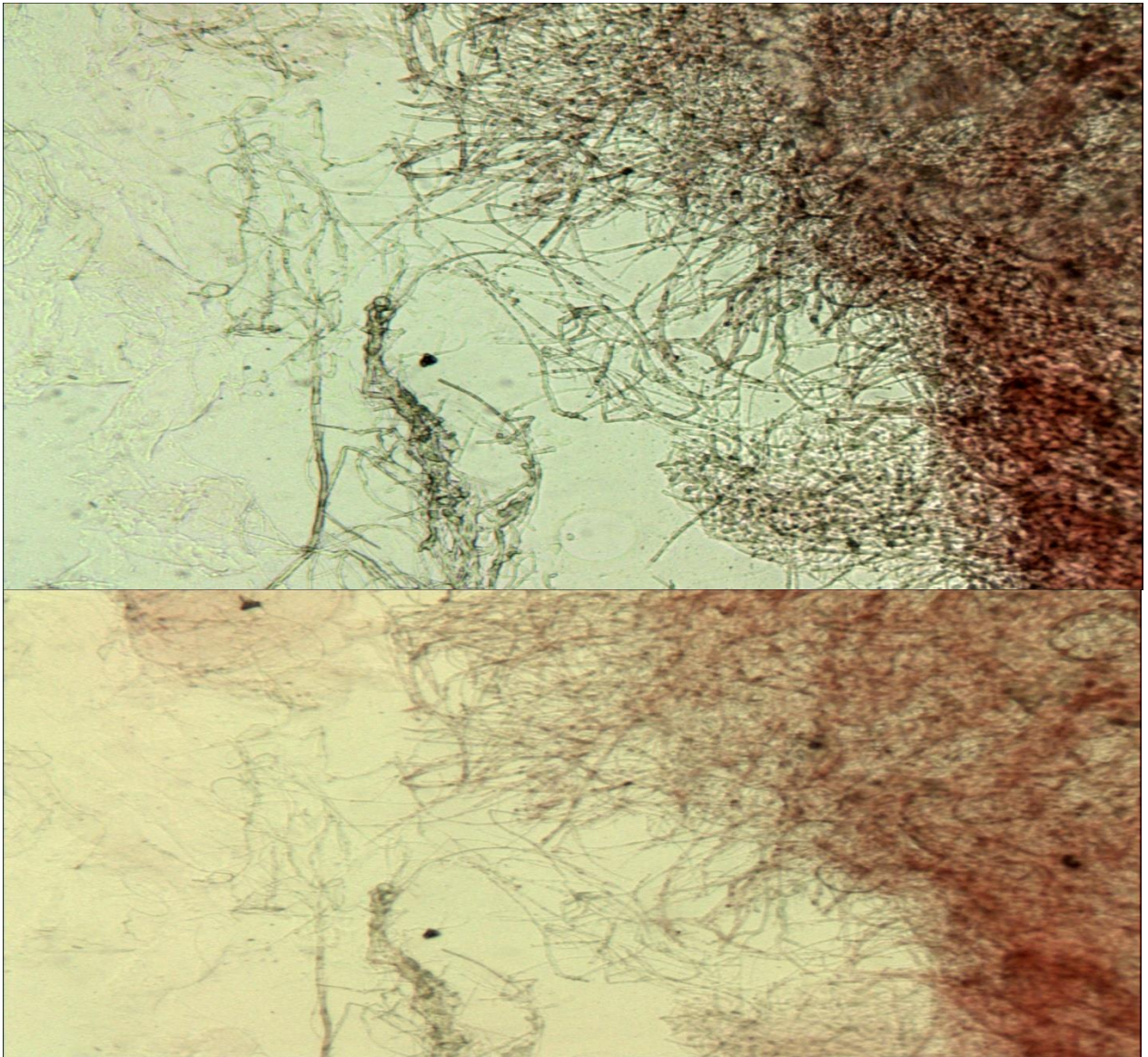
Se observa hifa aguzada la cual penetra en las raíces de la planta (imagen a 40X) microscopio trinocular Olimpus CX31 LBBM-DC-ECC.



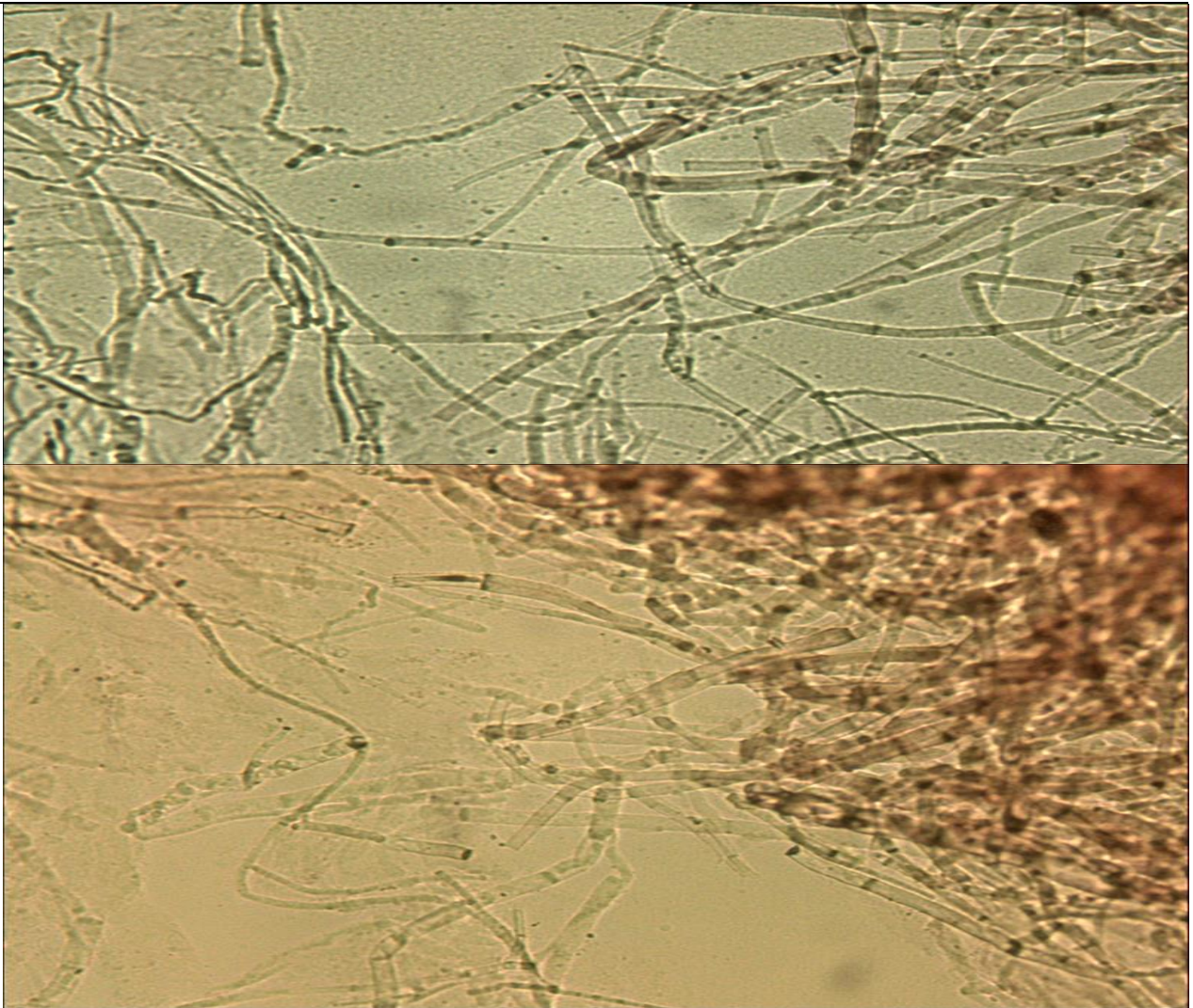
En la imagen se puede observar el micelio formado por hifas ramificadas y tabicadas. En la imagen de la derecha se observa un esporangio y en su base formación de rizoides característico de hongos micorrícicos (imagen a 10X). A la izquierda se observa una hifa alargada aguzada, la cual es la encargada de penetrar en la raíz del hospedero. (imagen 40X)

Reino	Division	Orden	Genero
Fungi	Glomeromycetes	Glomerales	

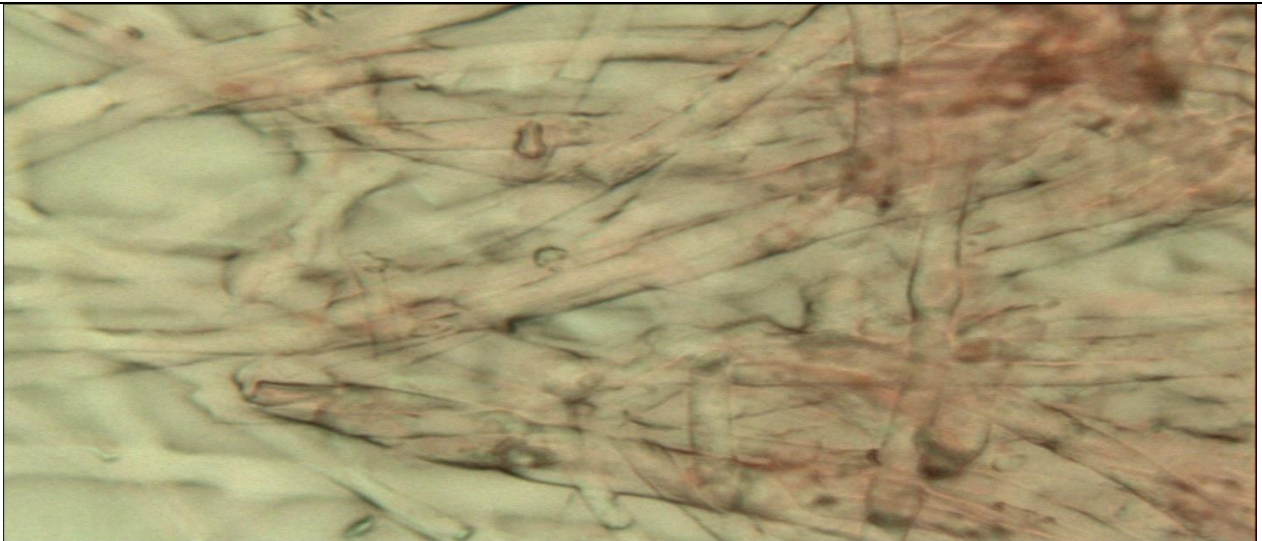
5.2.2.4 Placa 38



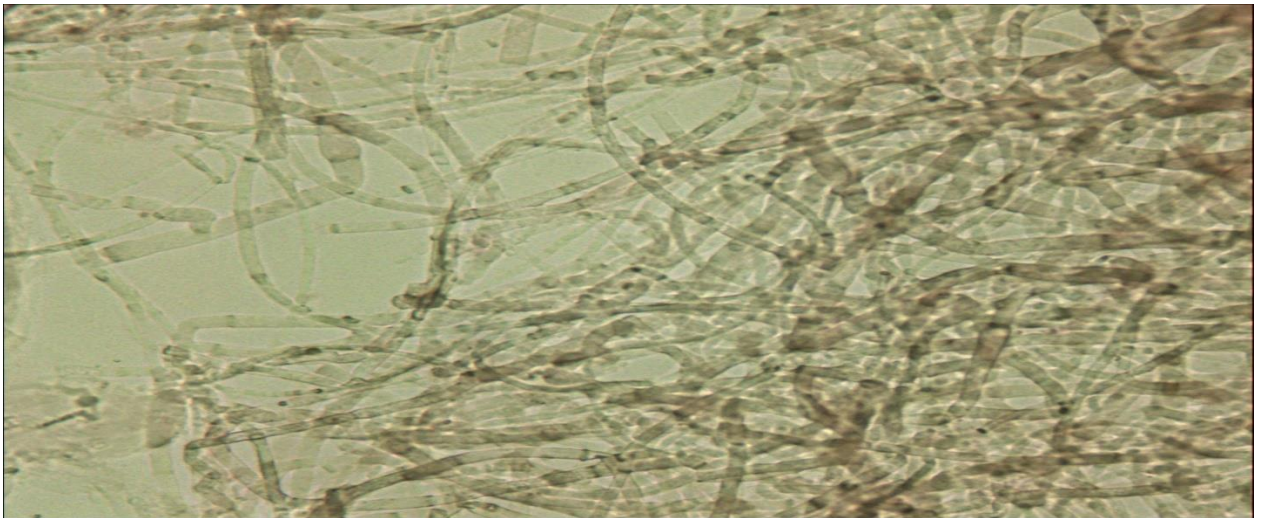
Hifas filamentosas rojizas, más o menos paralelas, tabicadas, ya que, presentan septos muy evidentes en el microscopio. (imagen a 10X) microscopio trinocular Olympus CX31 LBBM- DC- ECC. Placa 38



Las hifas son muy finas, poco ramificadas, con tabiques desprovistos de fíbulas con pigmento marrón, se pueden observar en el microscopio presencia de algunos basidios. (imagen a 40X) microscopio trinocular- Olympus CX31 LBBM- DC- ECC. Placa 38



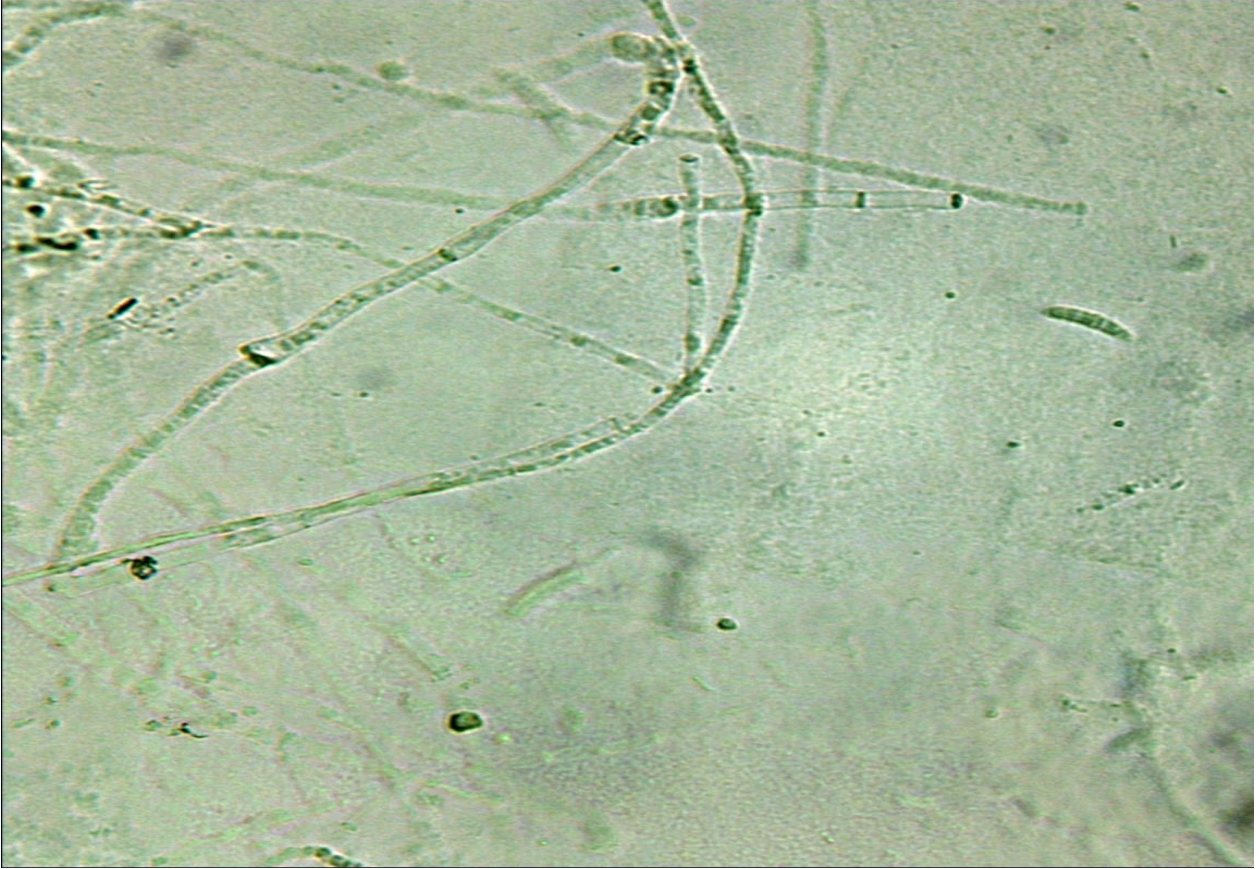
Hifas filamentosas muy finas septadas, con presencia de basidios con extremidad redondeada. Basidios pequeños. (imagen a 100X) microscopio trinocular- Olympus CX31 LBBM- DC- ECC. Placa 38



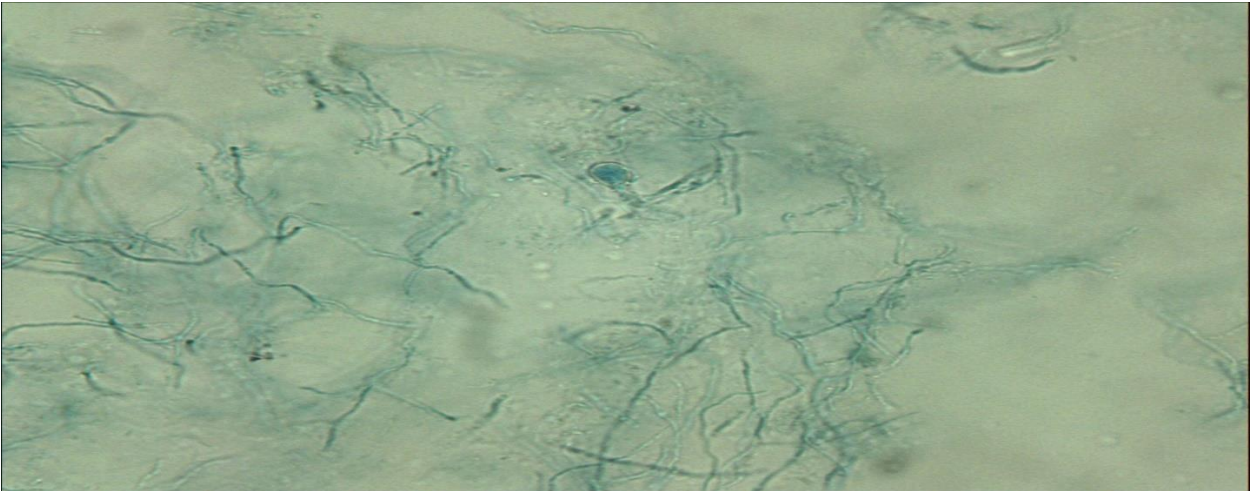
Micelio presenta una estructura filamentososa y está formado por hifas alargadas, paralelas y apretadas lo que da consistencia a la estructura. (imagen a 40X) microscopio trinocular- Olympus CX31 LBBM- DC- ECC. Placa 38.

Reino	Division	Familia	Genero
Fungi	basidiomycota		Suillus

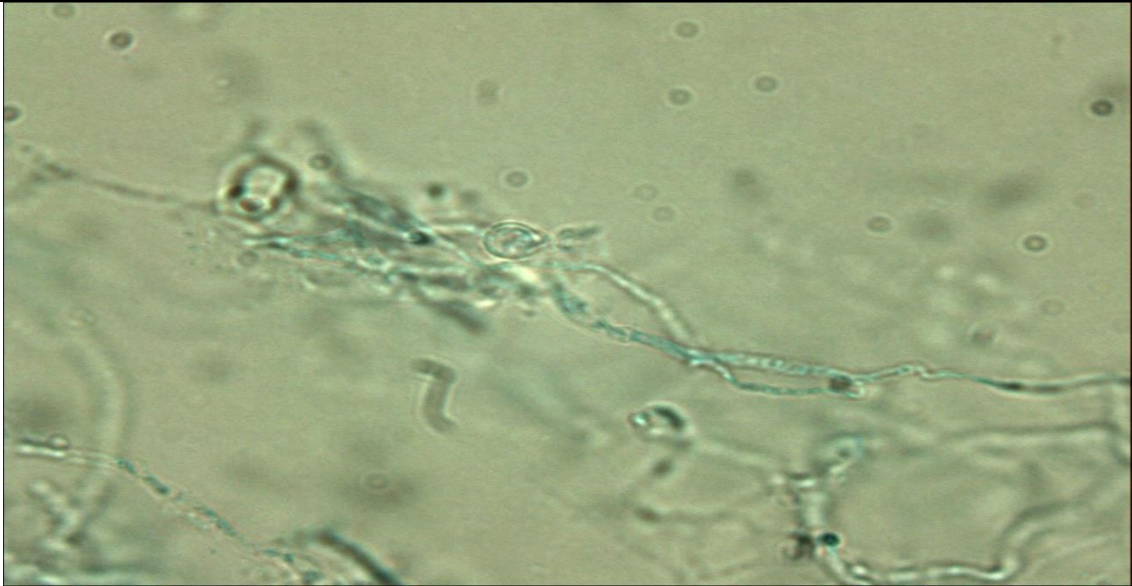
5.2.2.5 Placa 37



En la superficie se pueden observar de esporas incoloras al microscopio, cilíndricas y curvadas, con pequeñas vacuolas en su interior. (imagen a 40X) microscopio trinocular- Olympus CX31 LBBM- DC- ECC. Placa 37



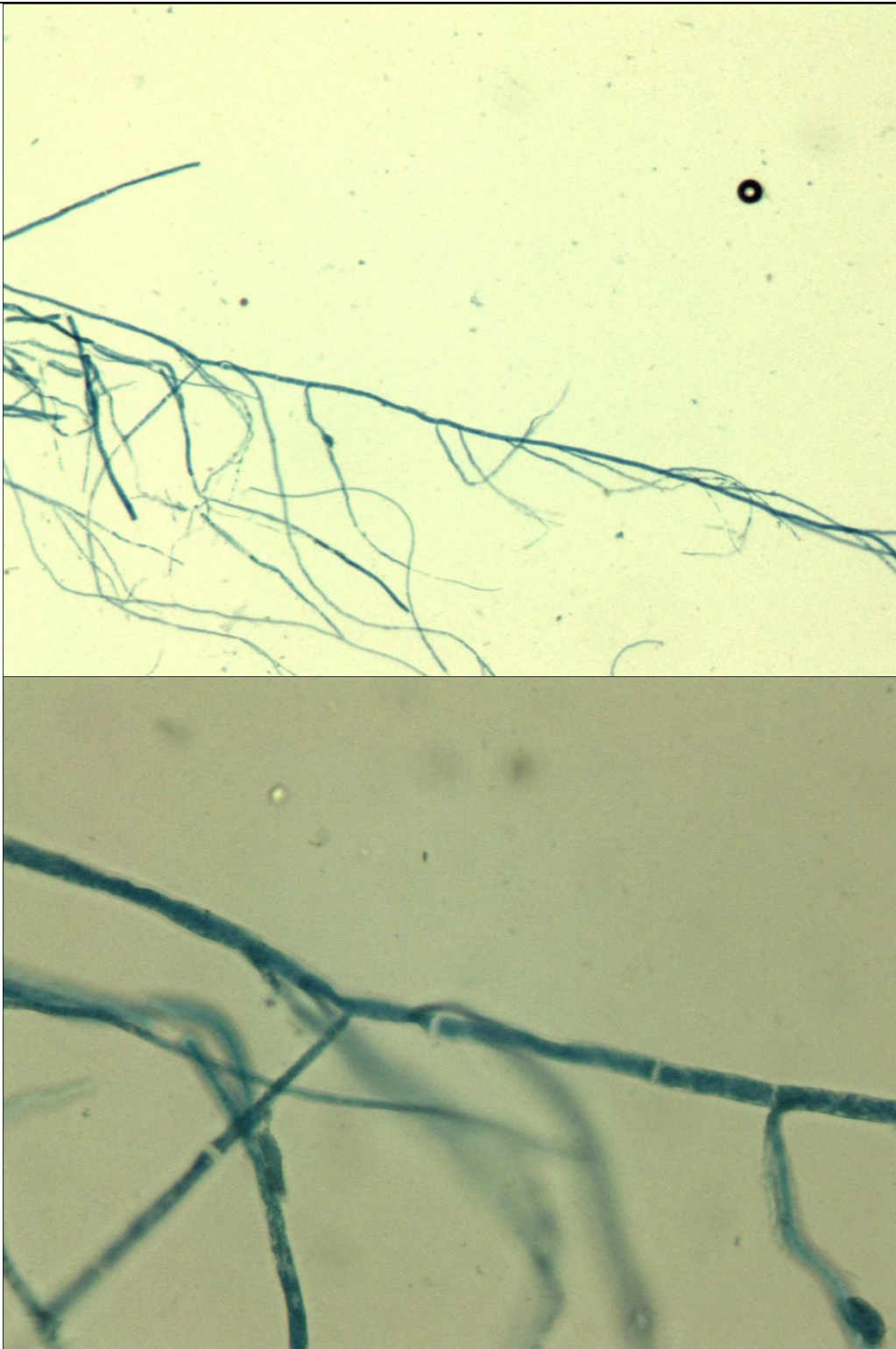
Las hifas que forman el micelio son muy estrechas, retorcidas y ramificadas, de paredes finas y con tabiques provistos de fíbulas. Hifas, generativas, muy delgadas, entremezcladas y muy ramificadas que hacia la superficie dan lugar a los basidios. (imagen a 40X) microscopio trinocular- Olympus CX31 LBBM- DC- ECC. P

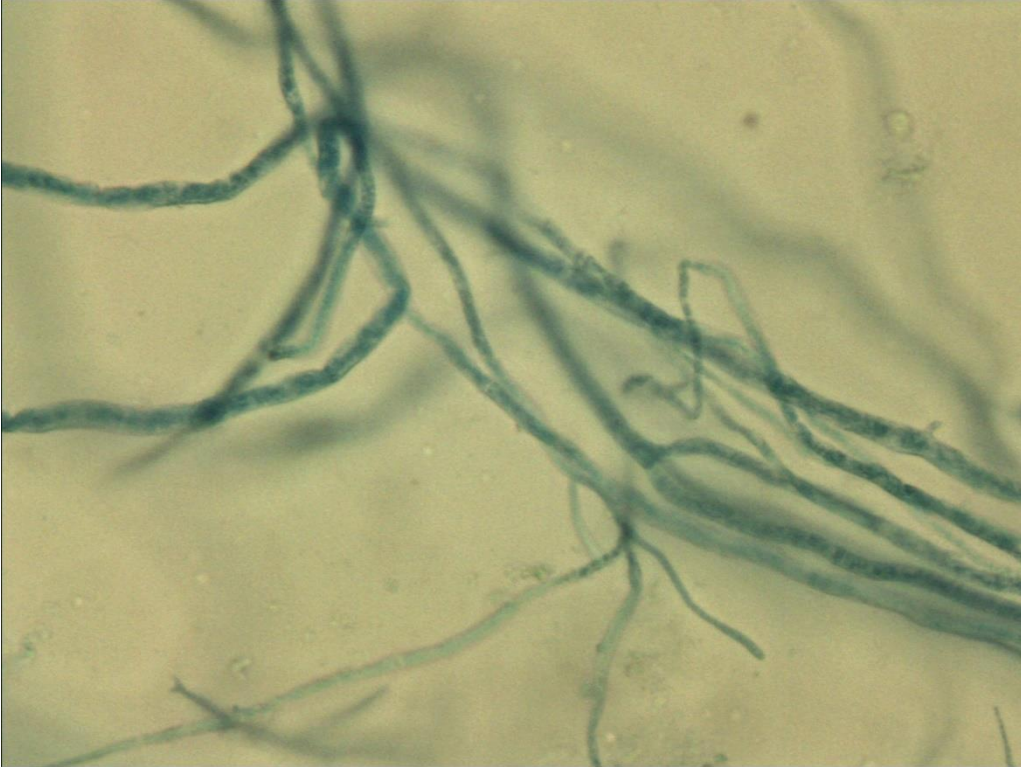
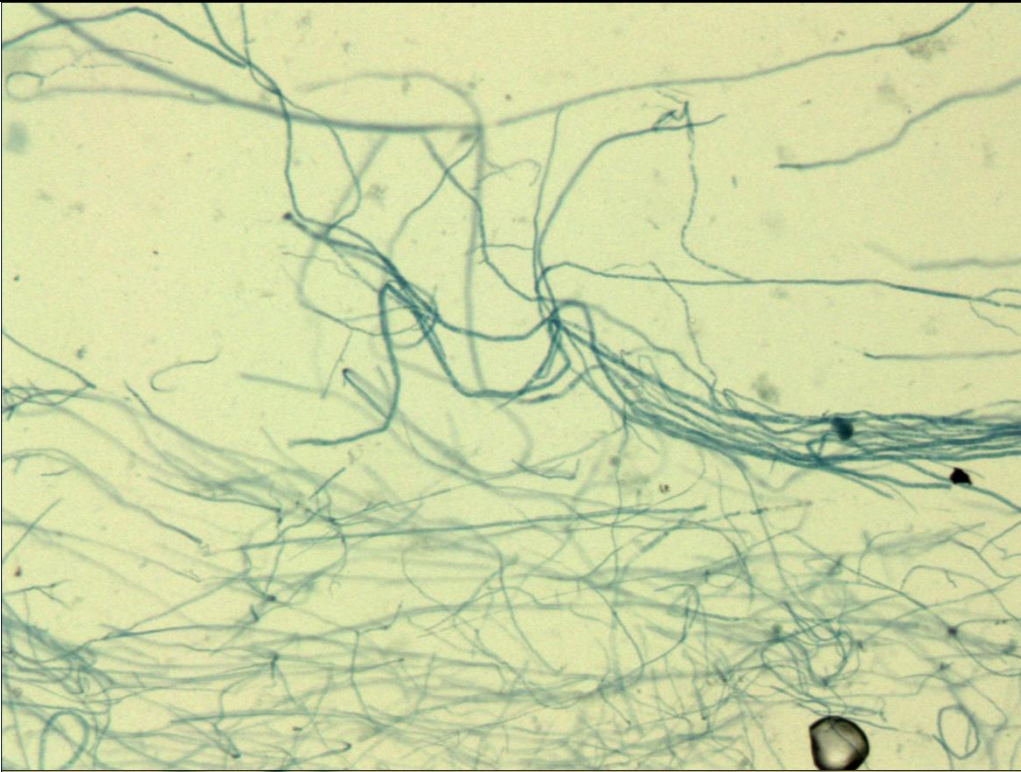


Hifa tabicada con presencia de fíbulas, se puede observar un basidios en la superficie. .(imagen a 40X) microscopio trinocular- Olympus CX31 LBBM- DC- ECC. Placa 37

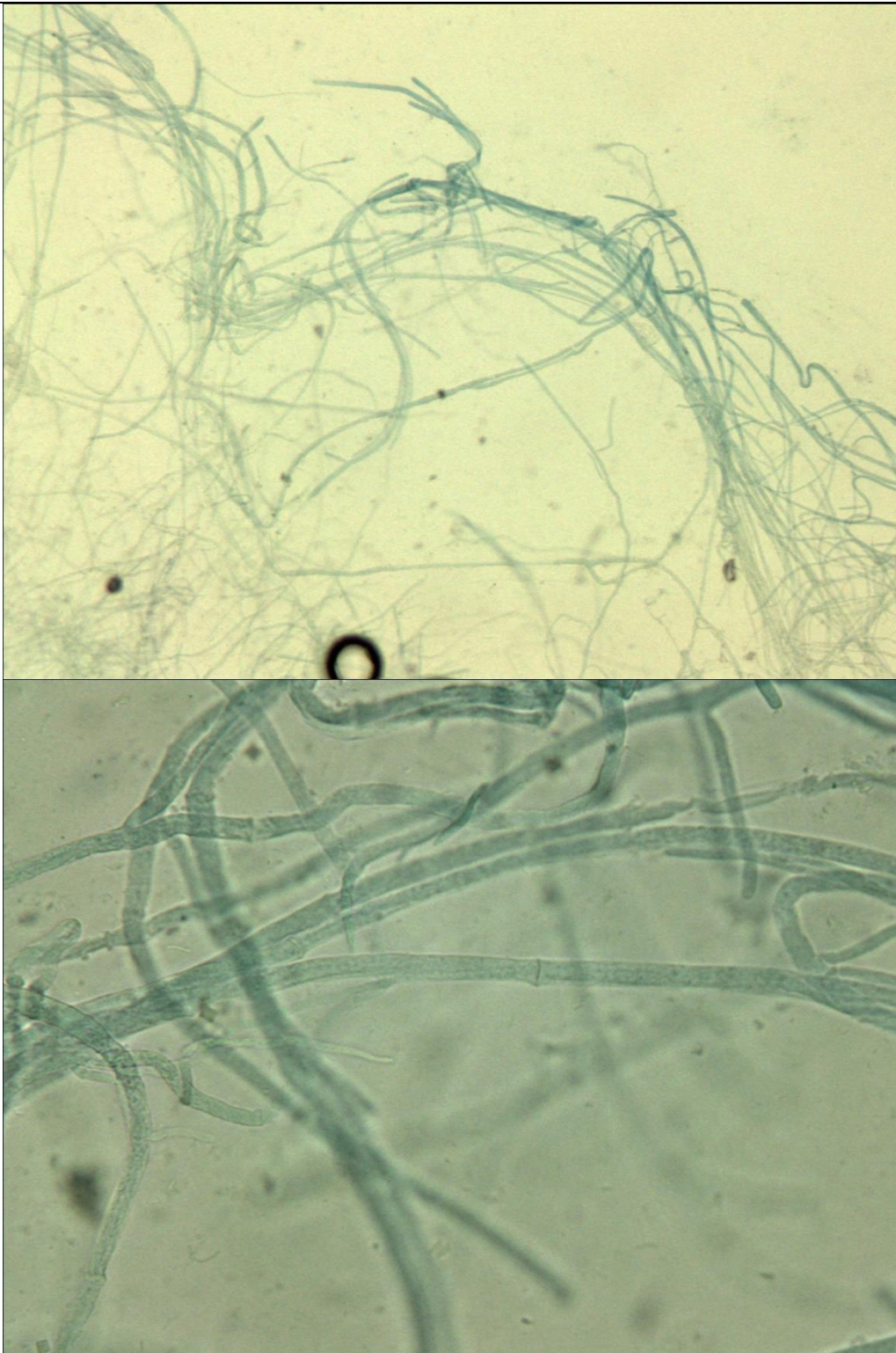
Reino	Division	Familia	Genero
Fungi	basidiomycota		Cortinarius

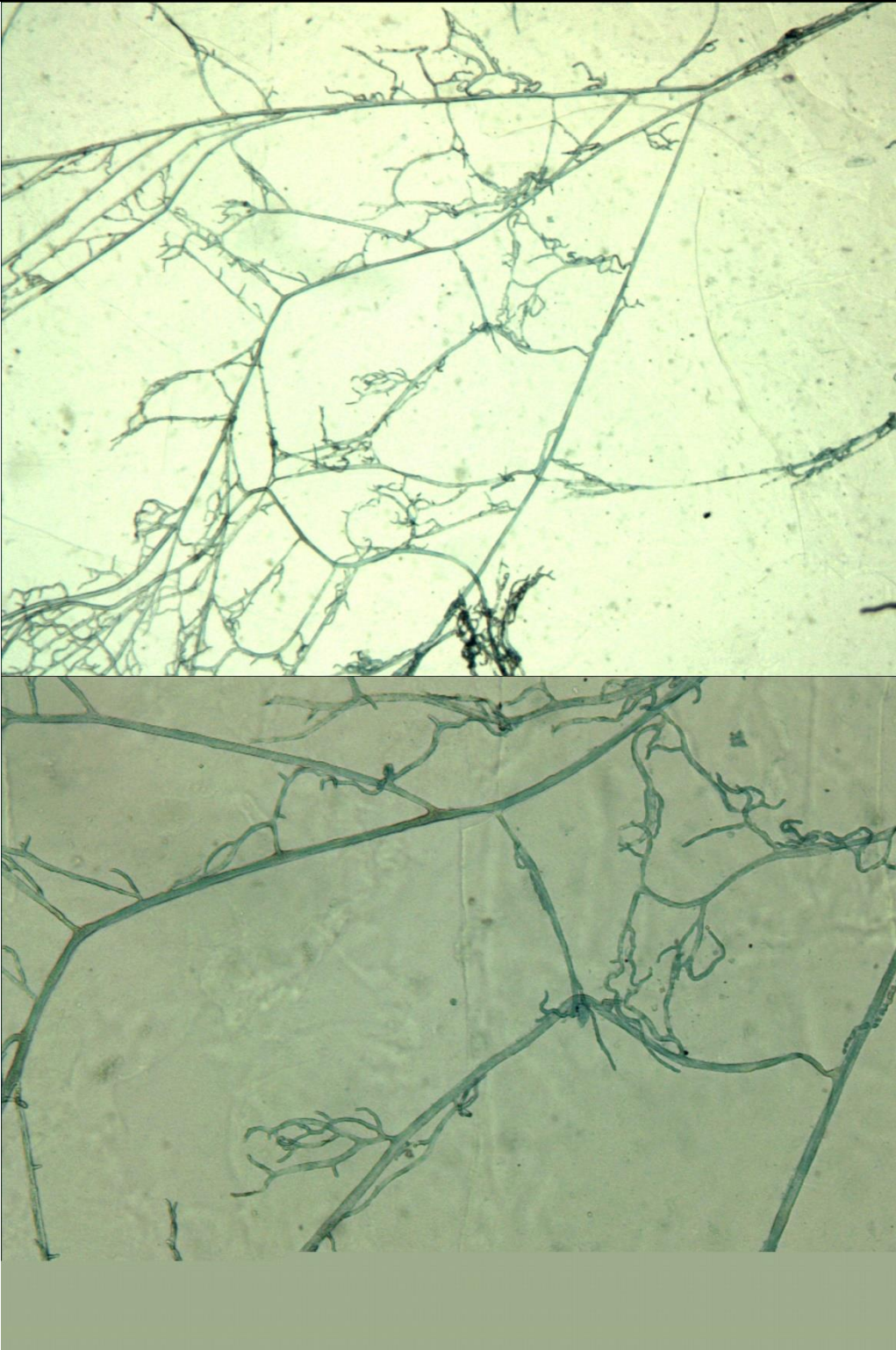
Placas para caracterización microscópica.



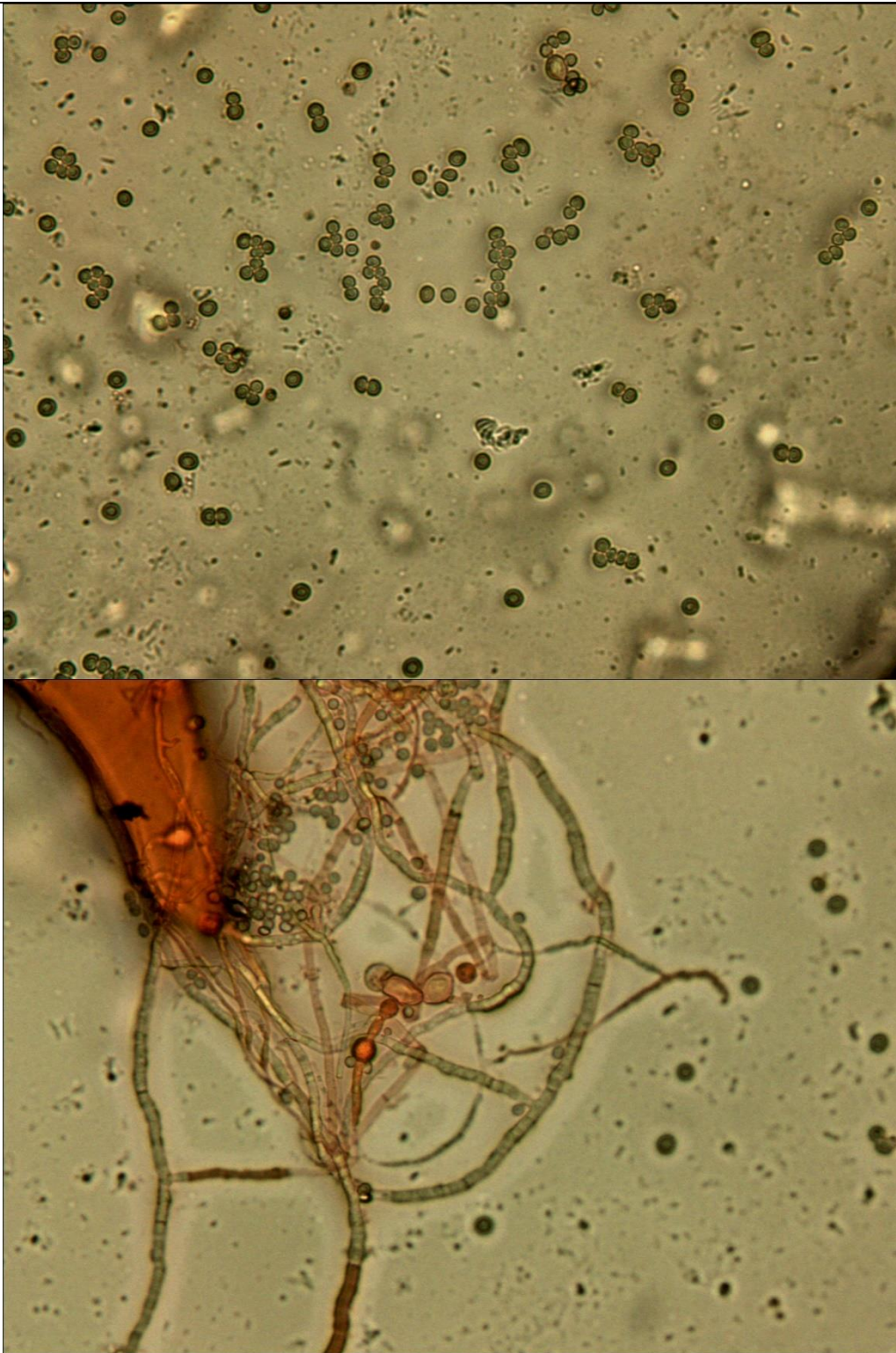


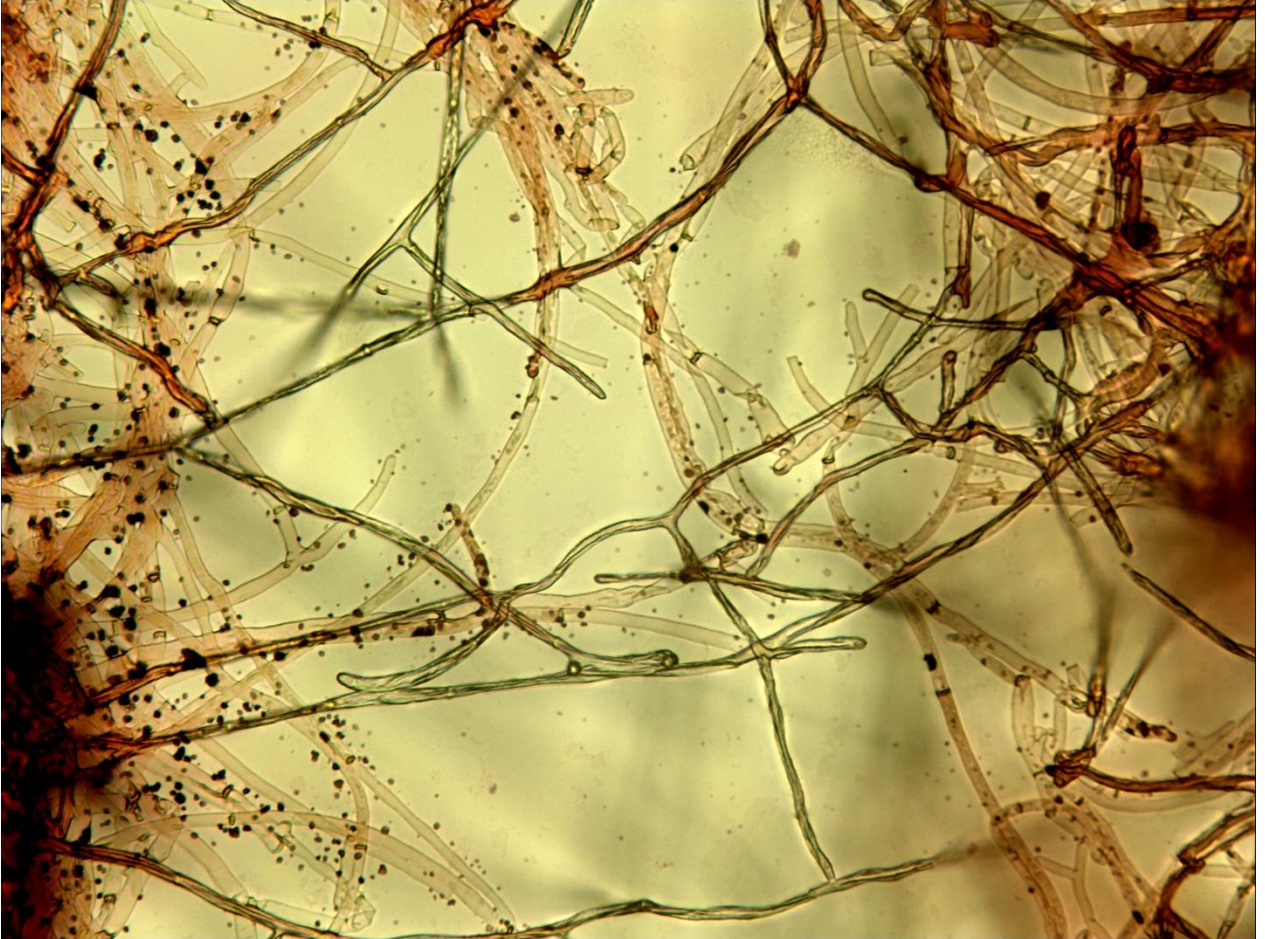
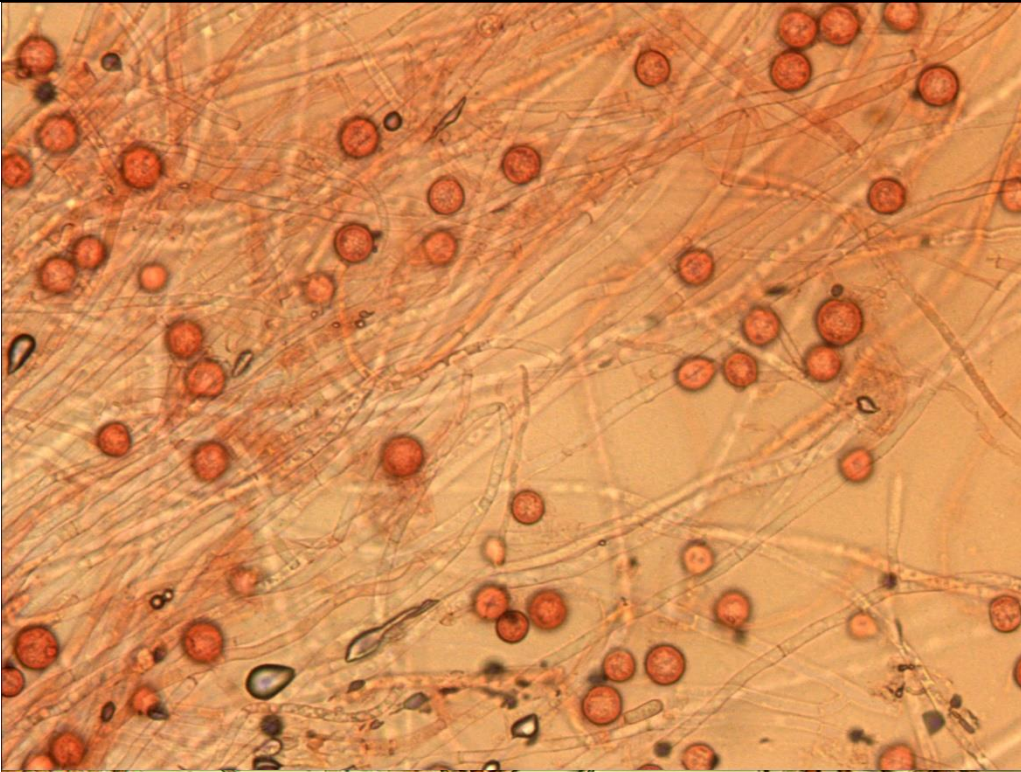


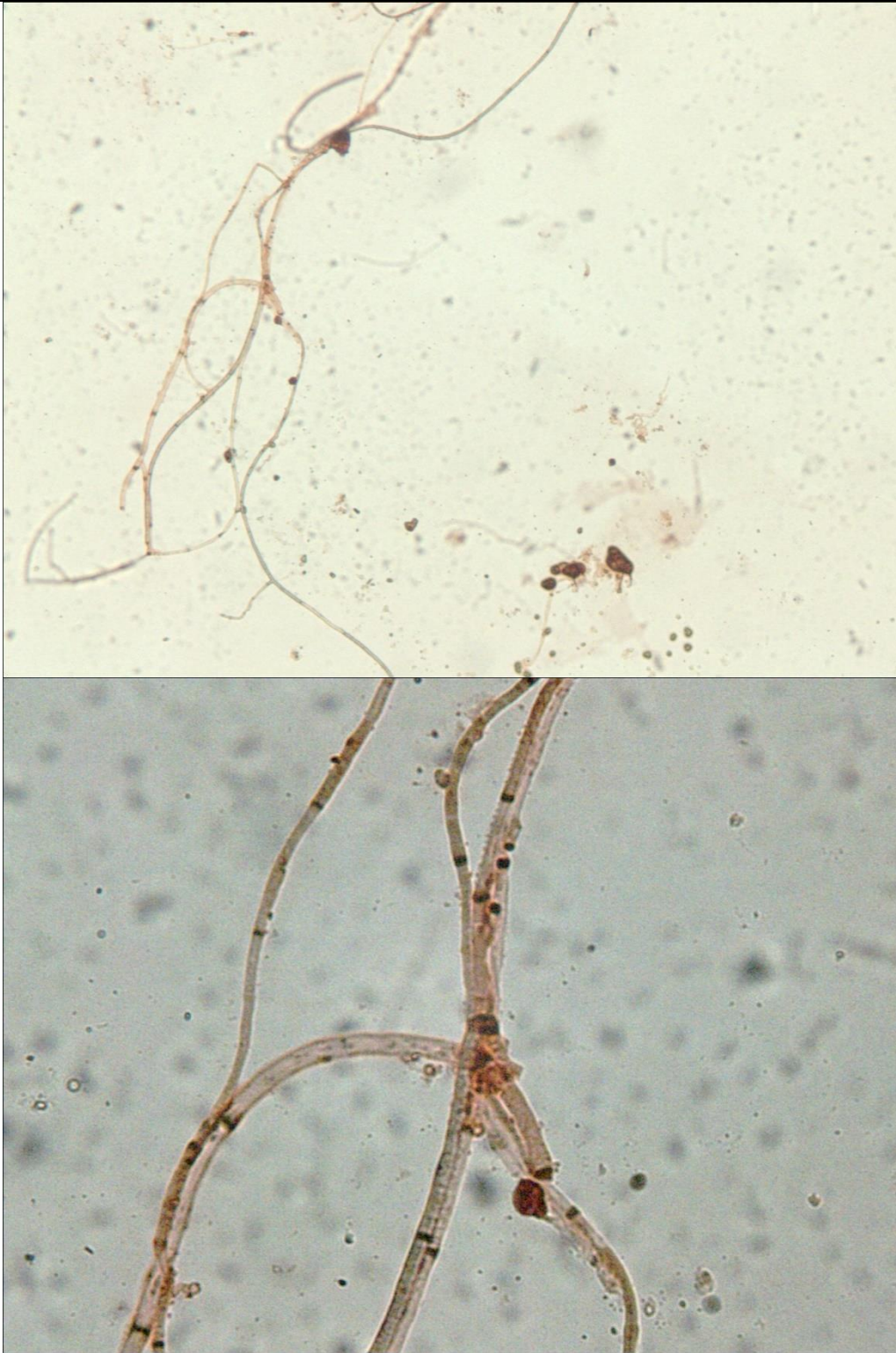


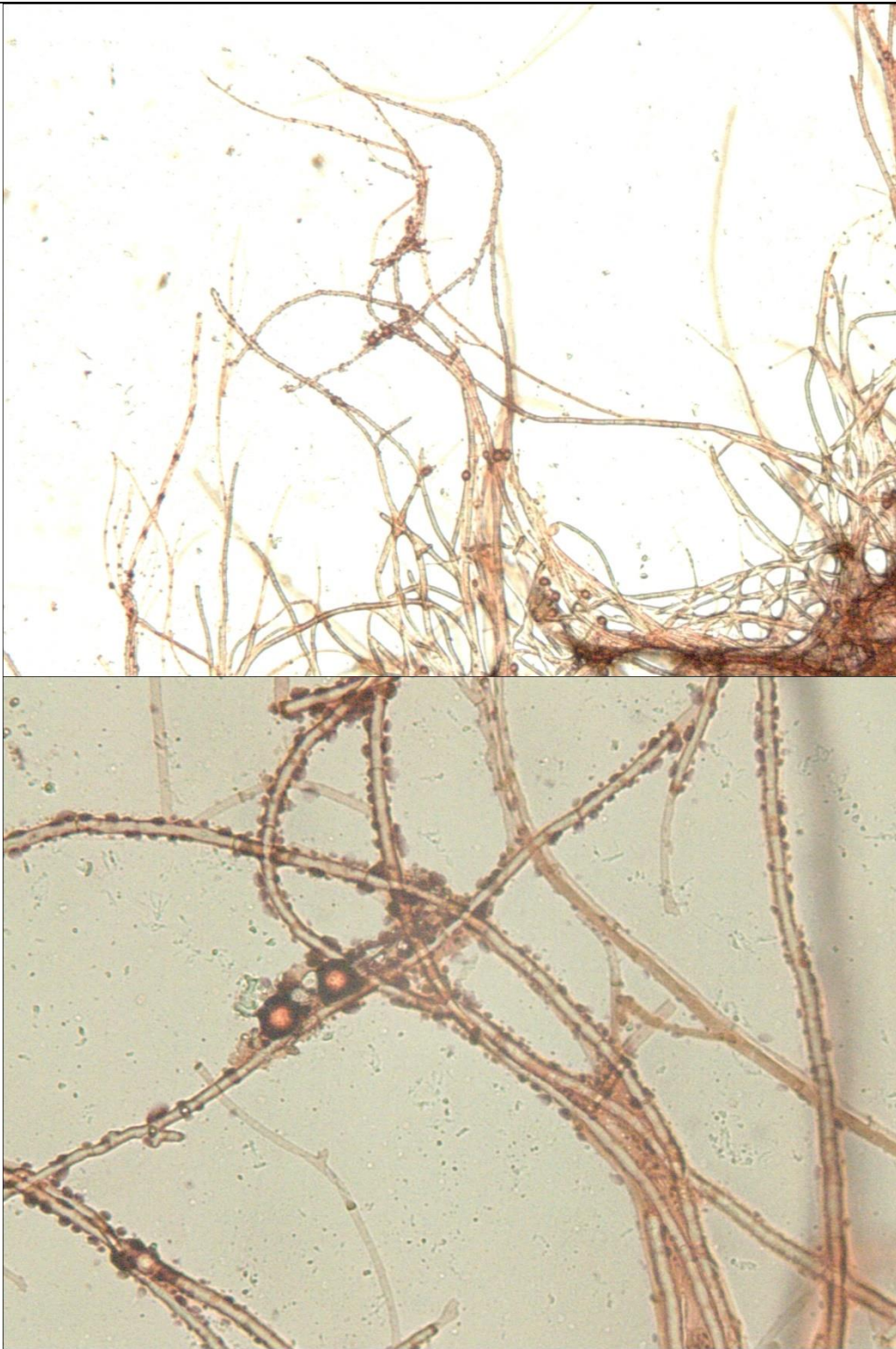


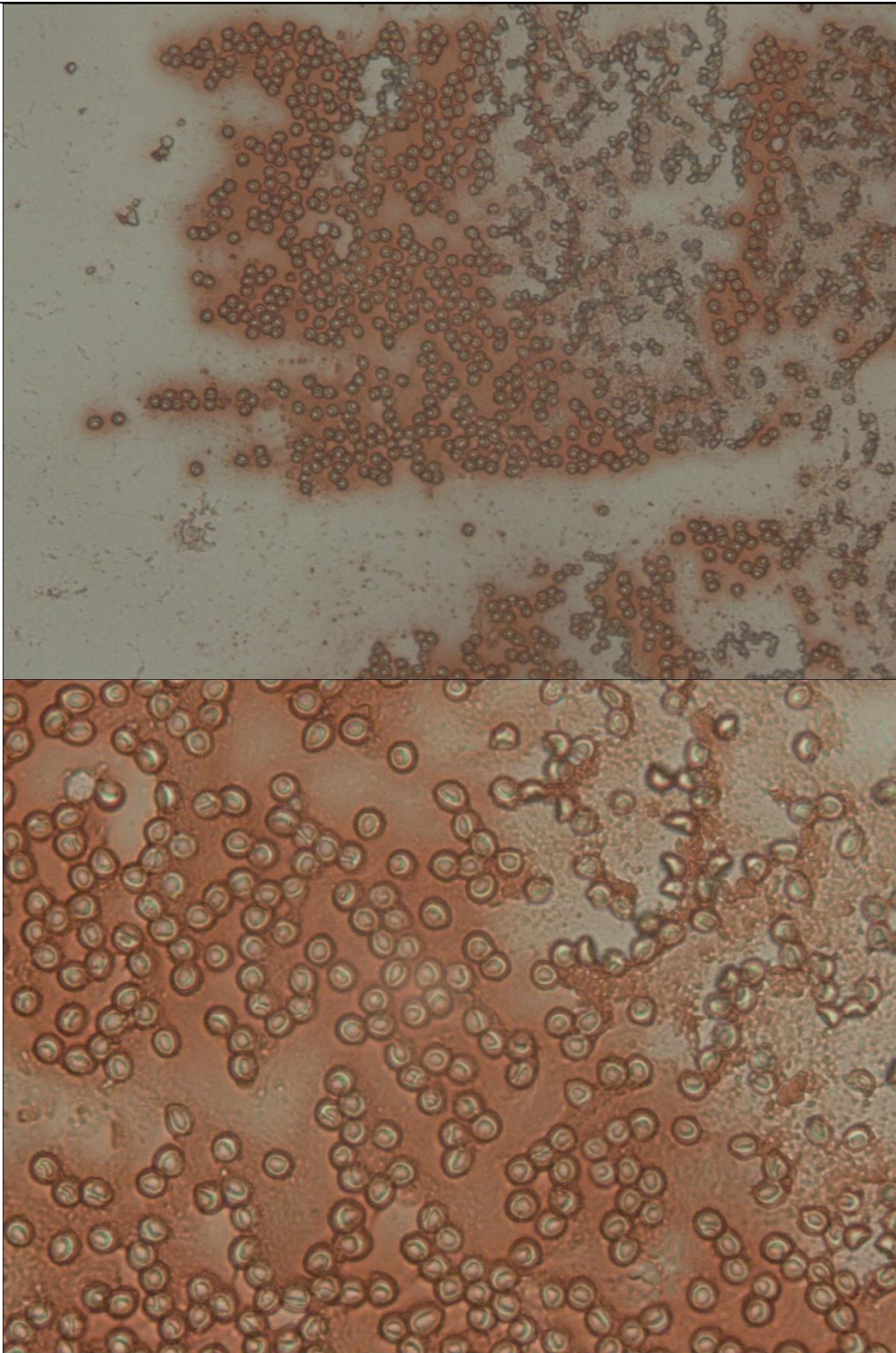


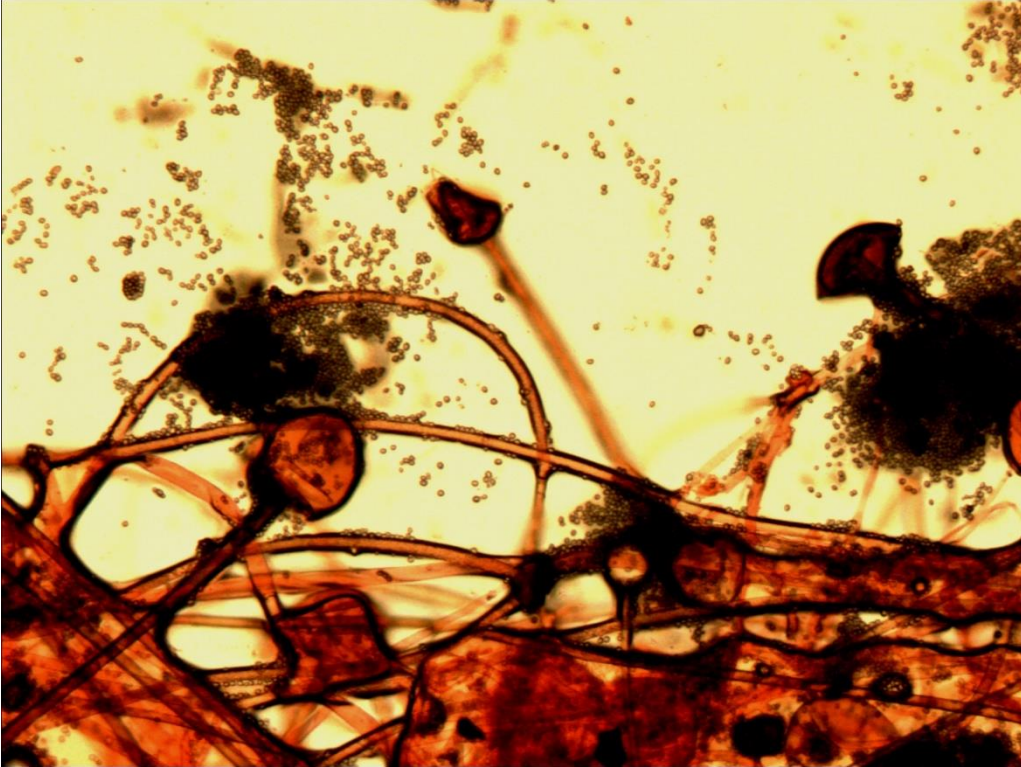
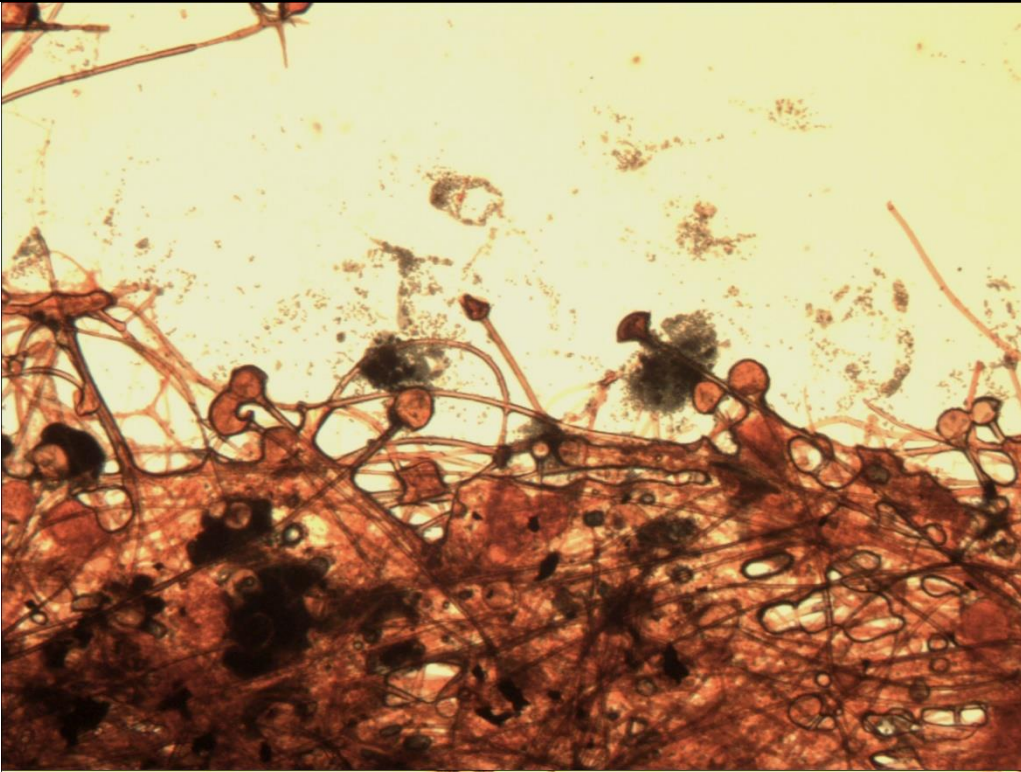


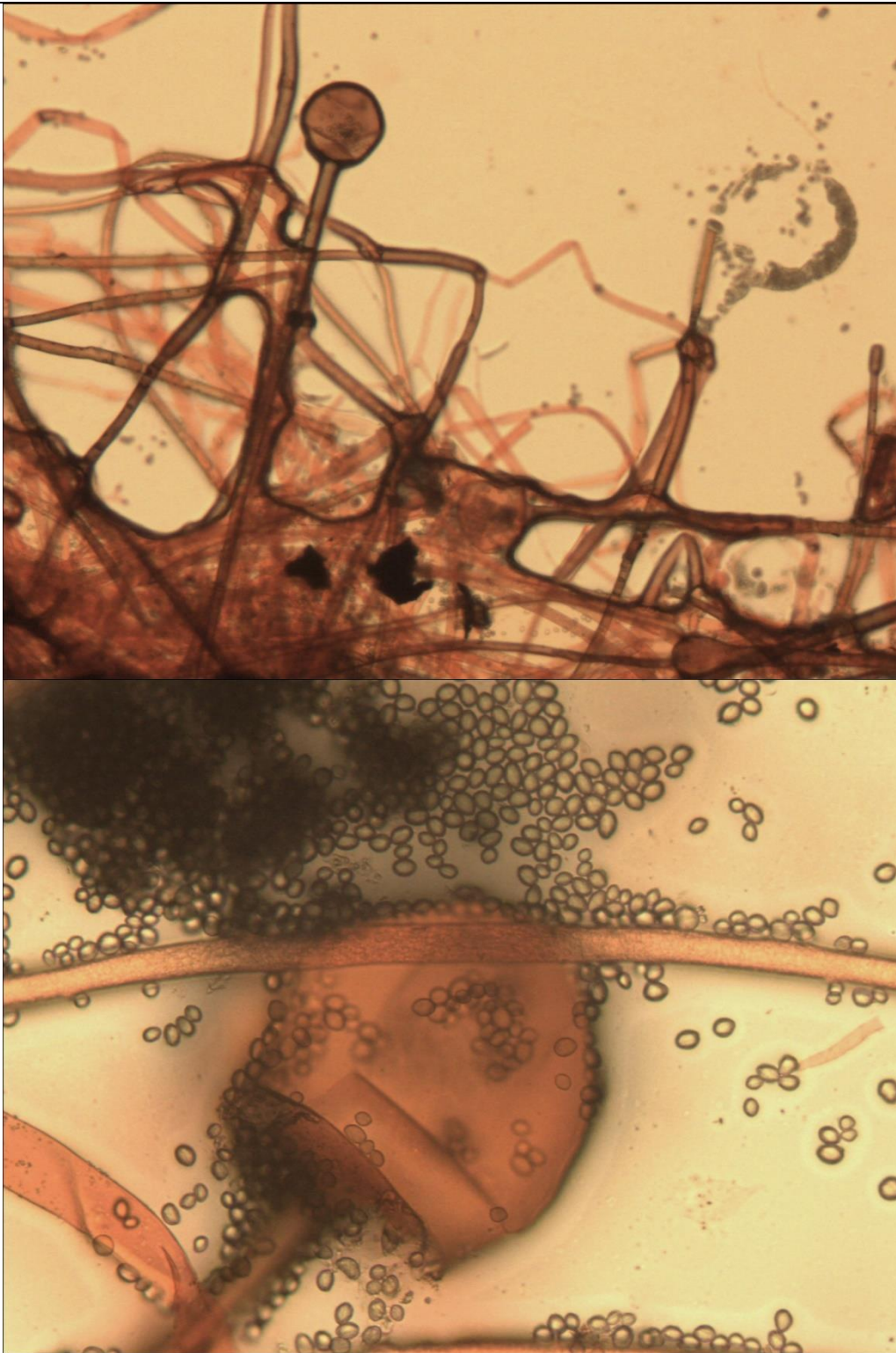






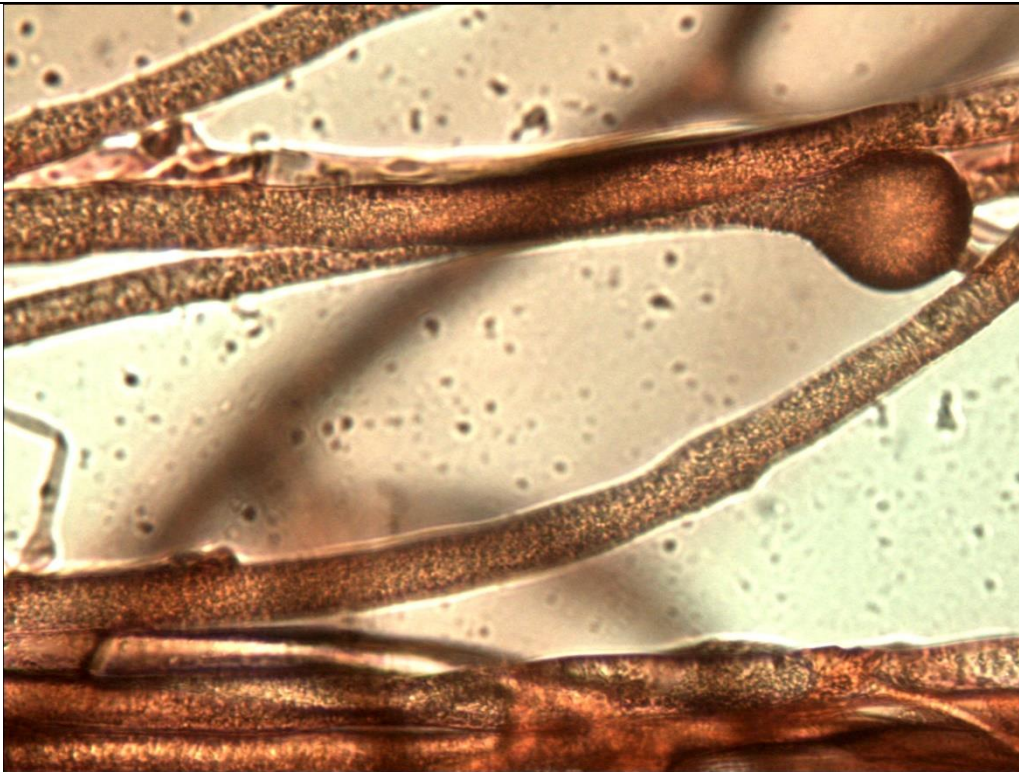


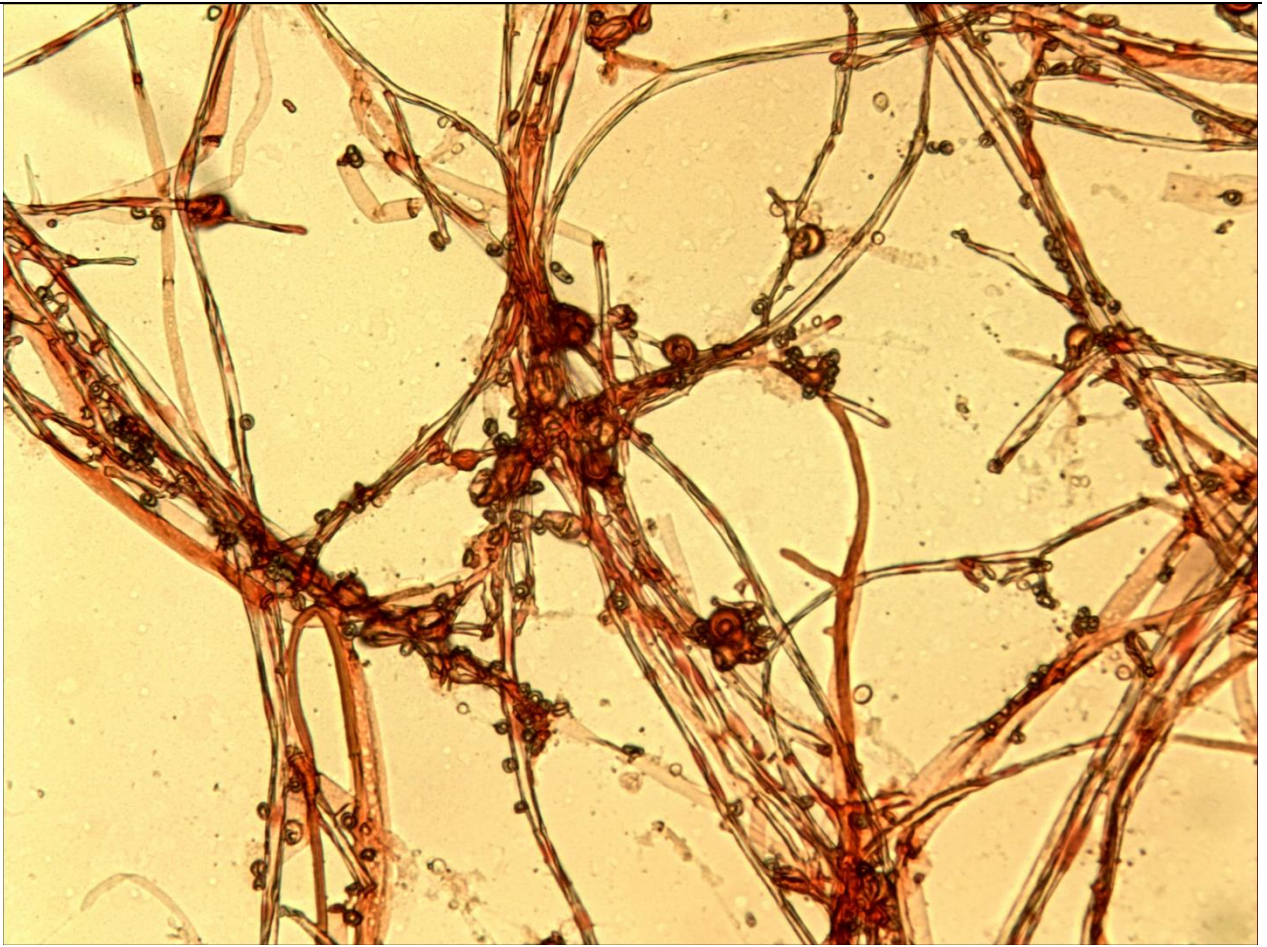


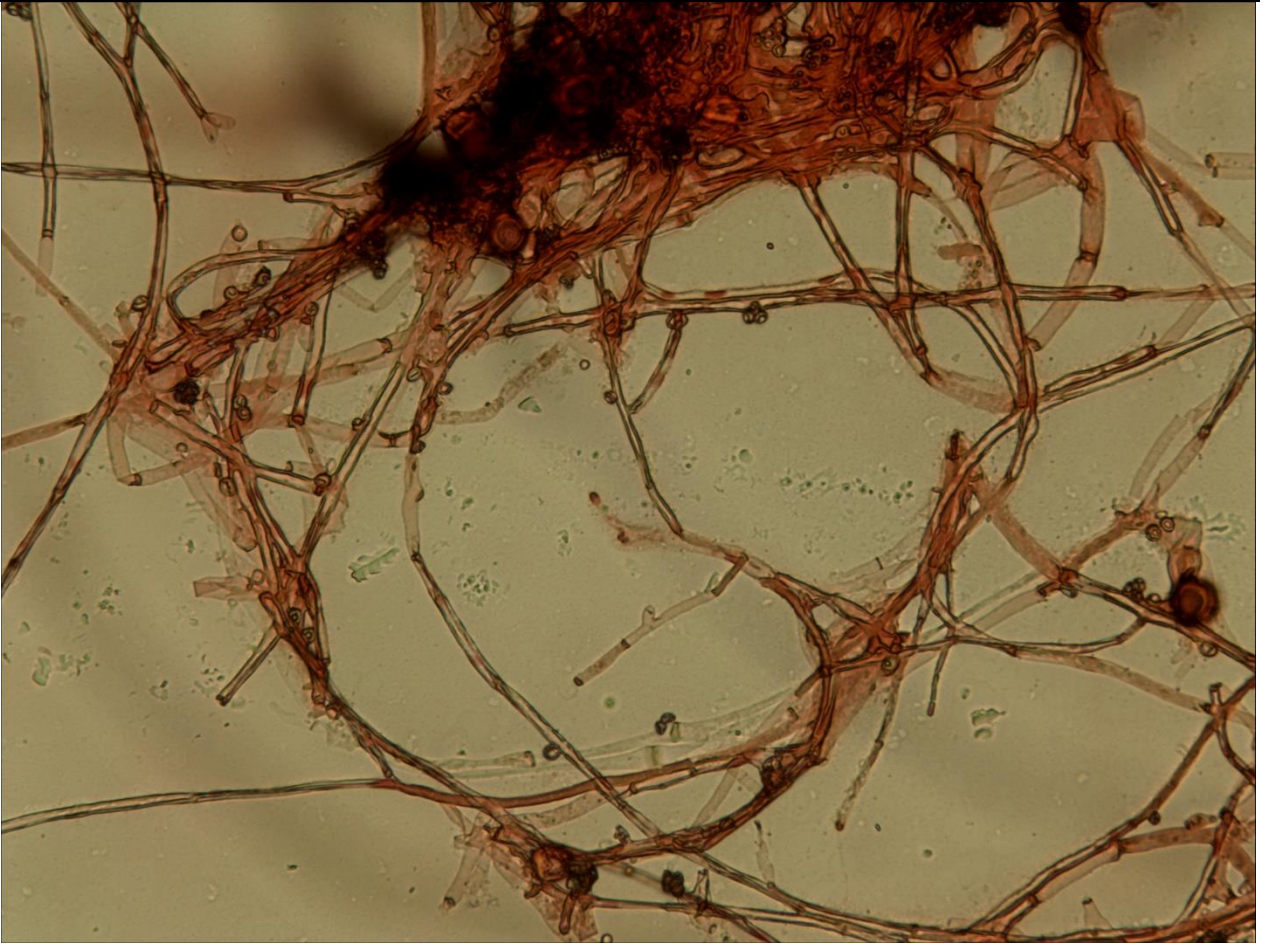


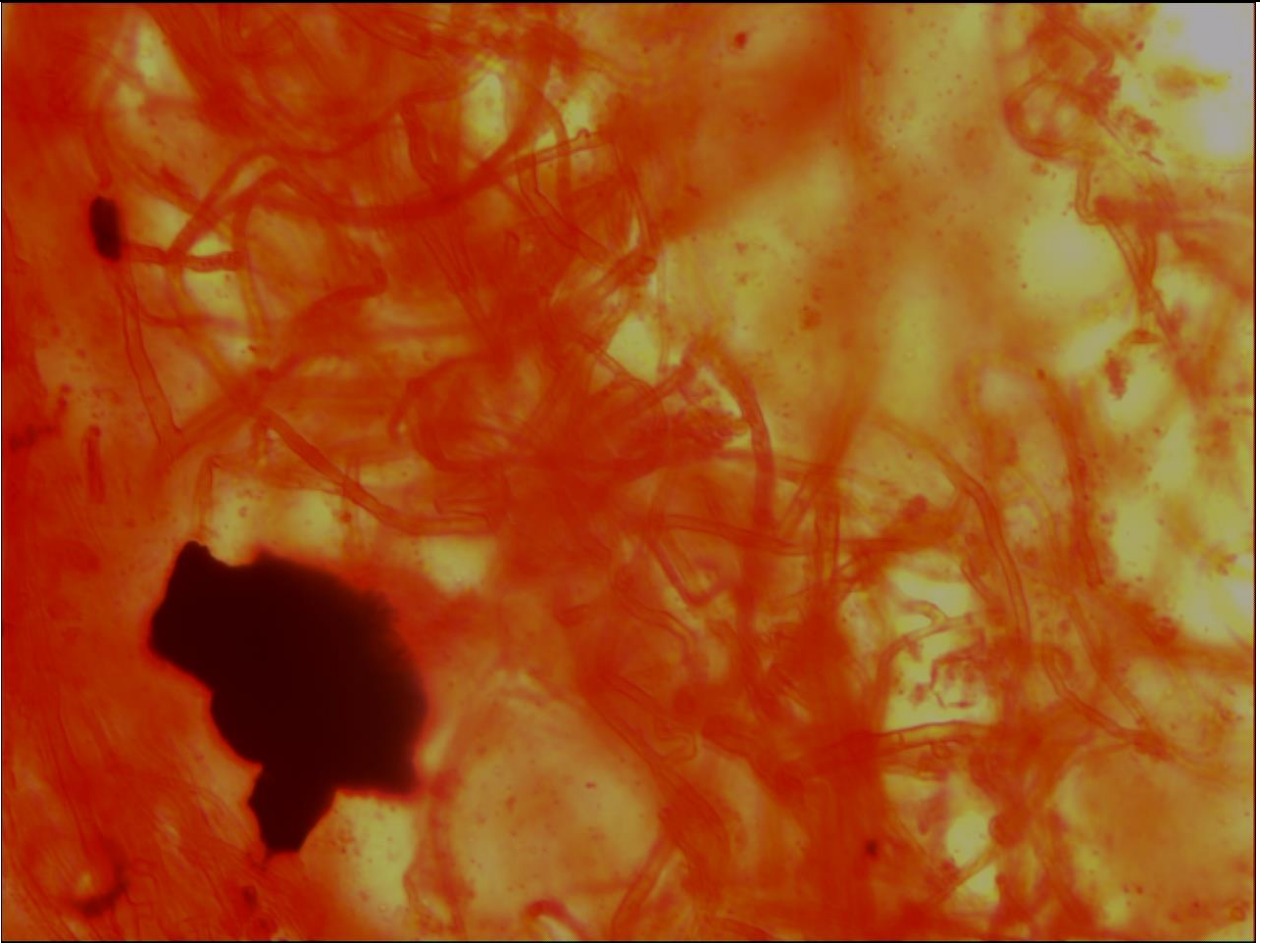


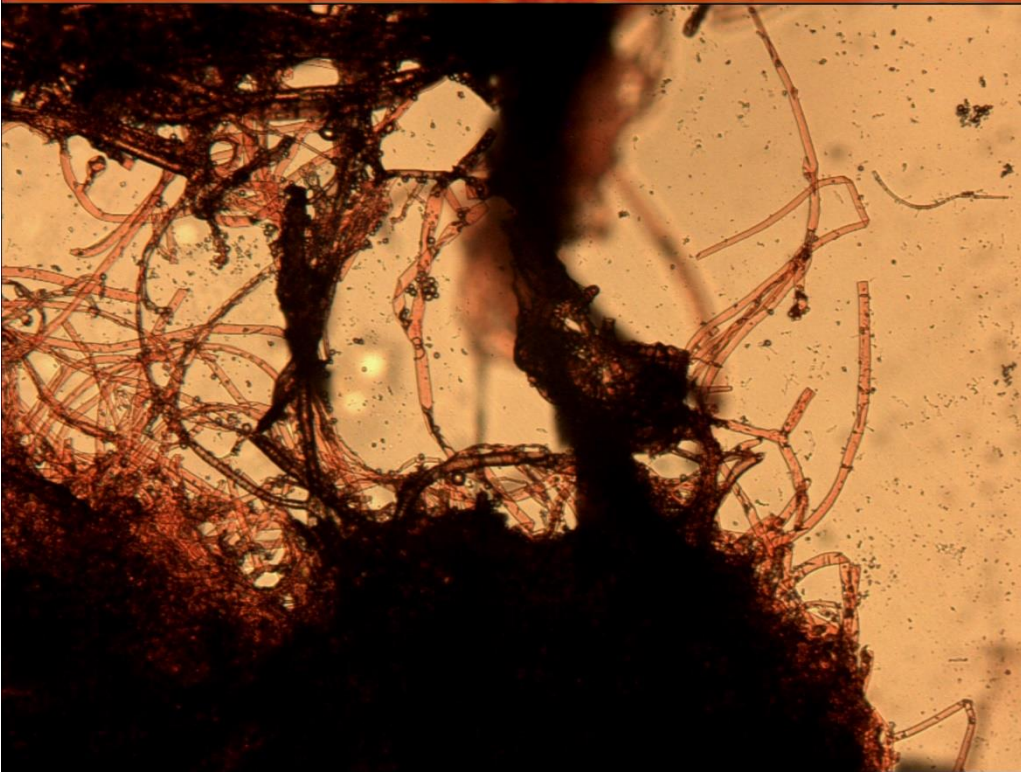
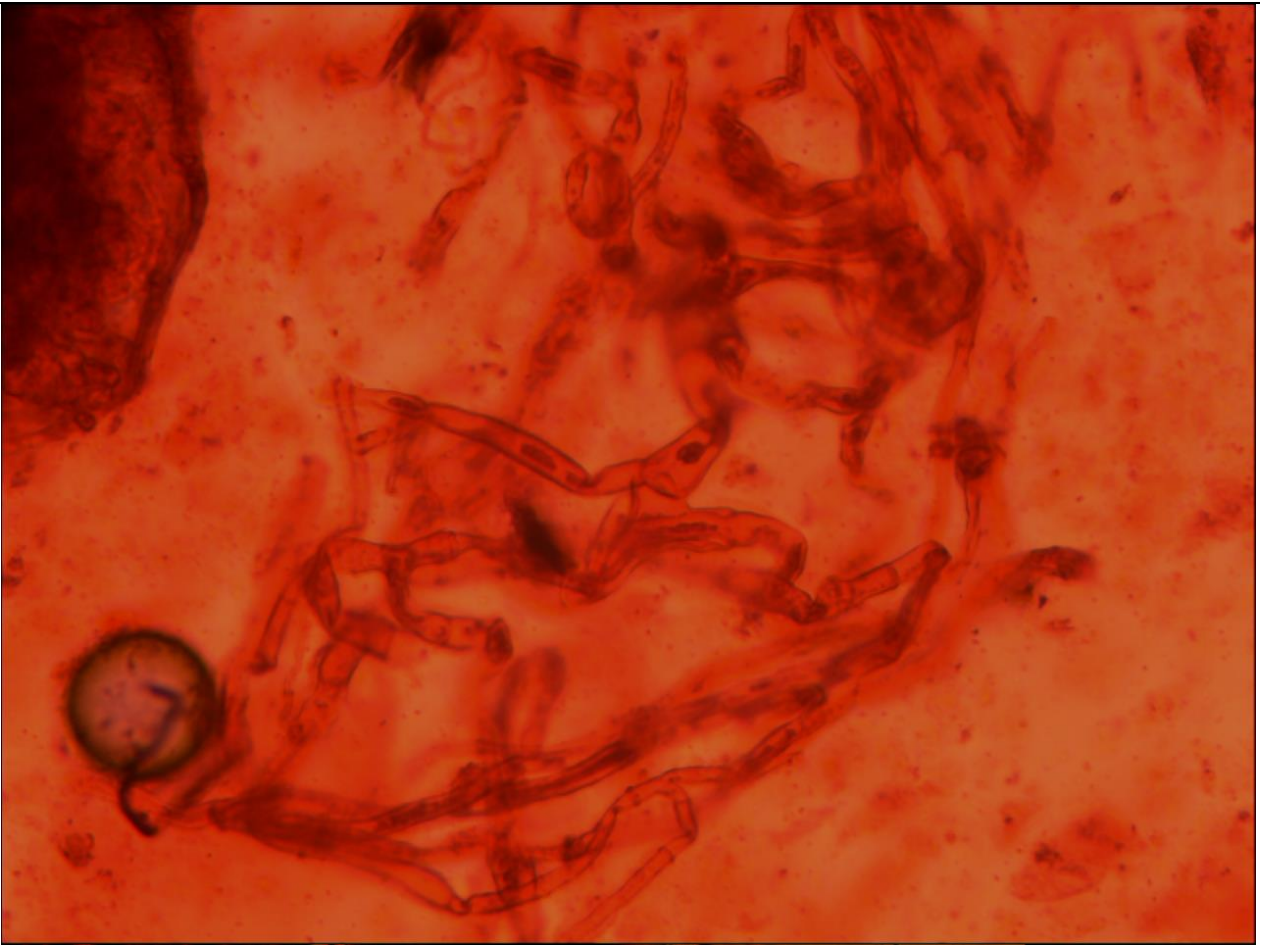


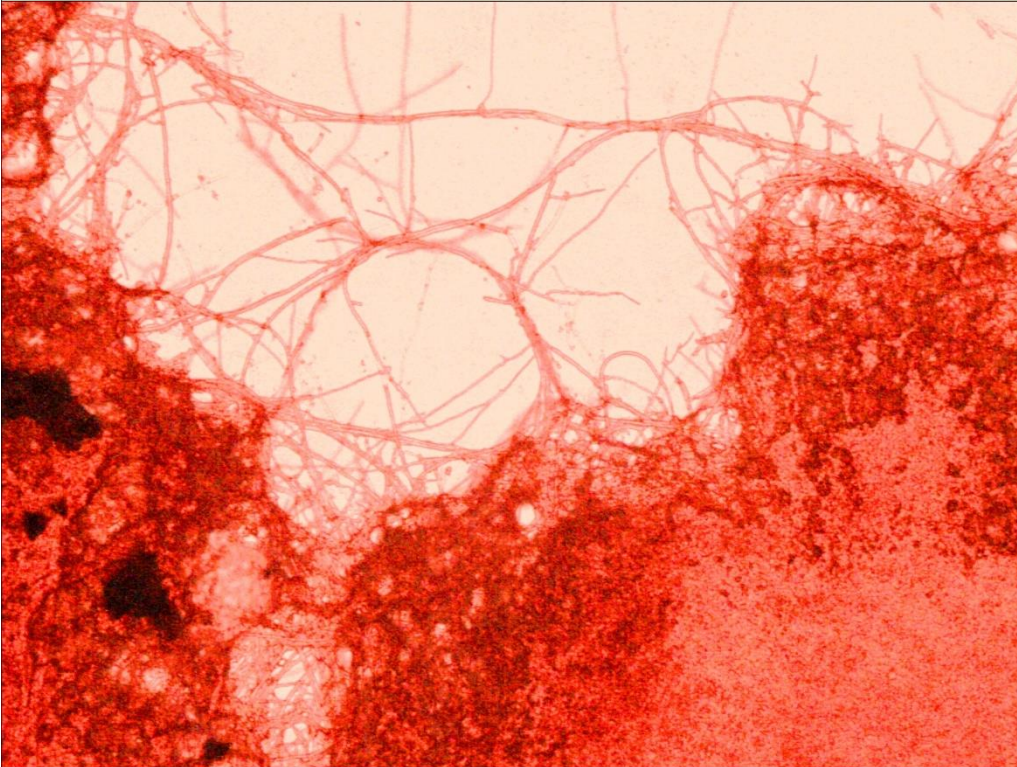


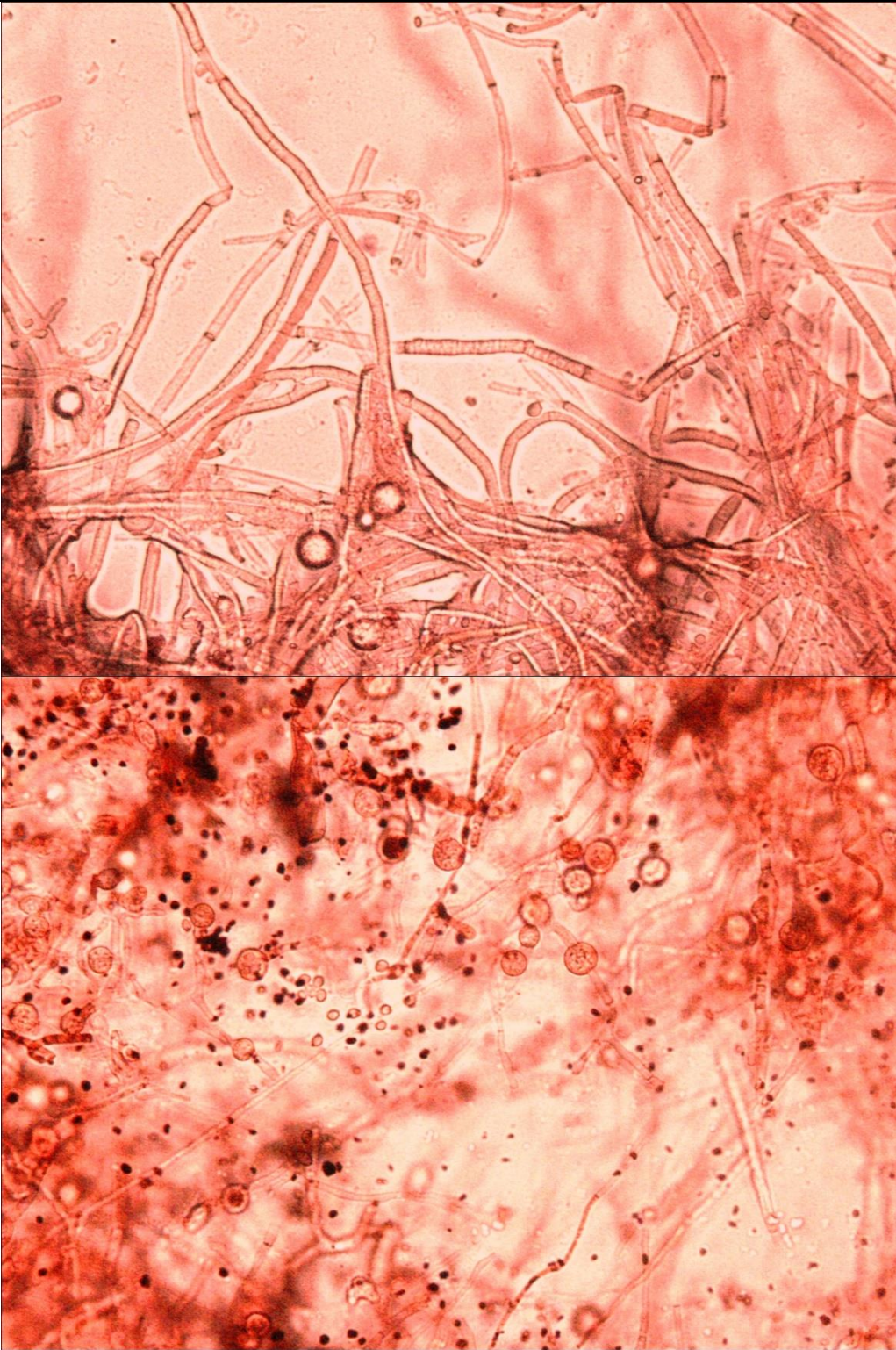


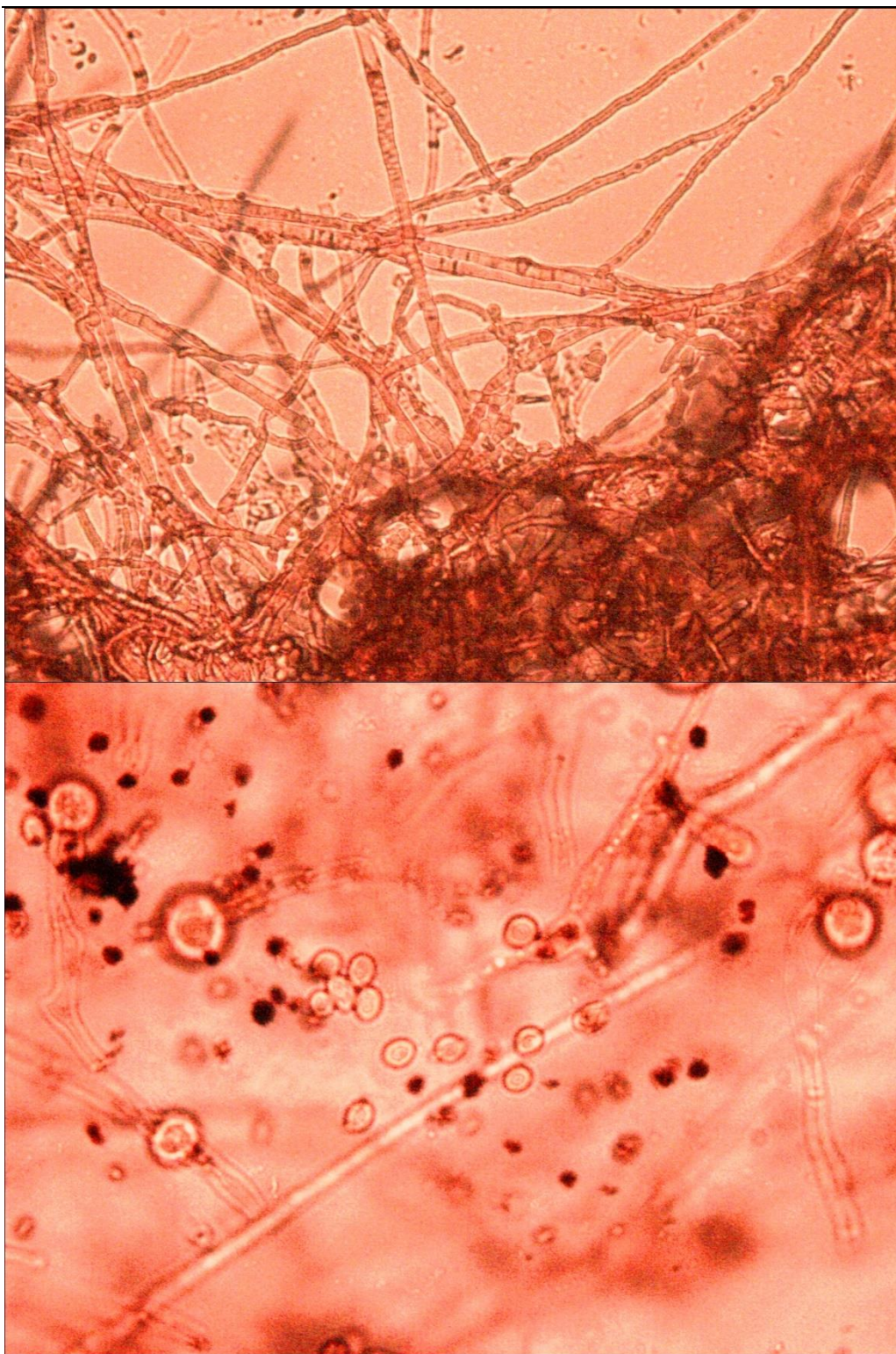


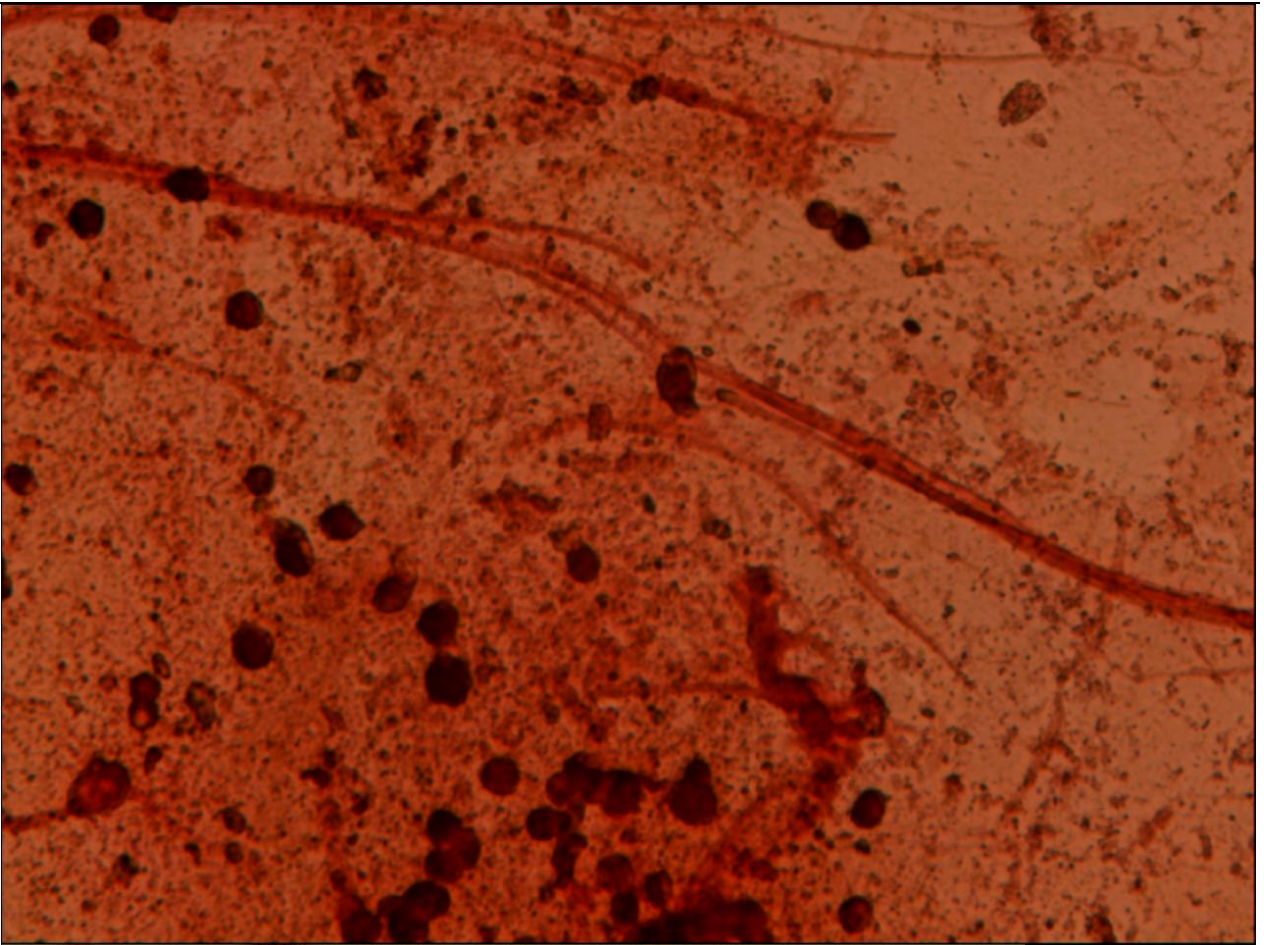


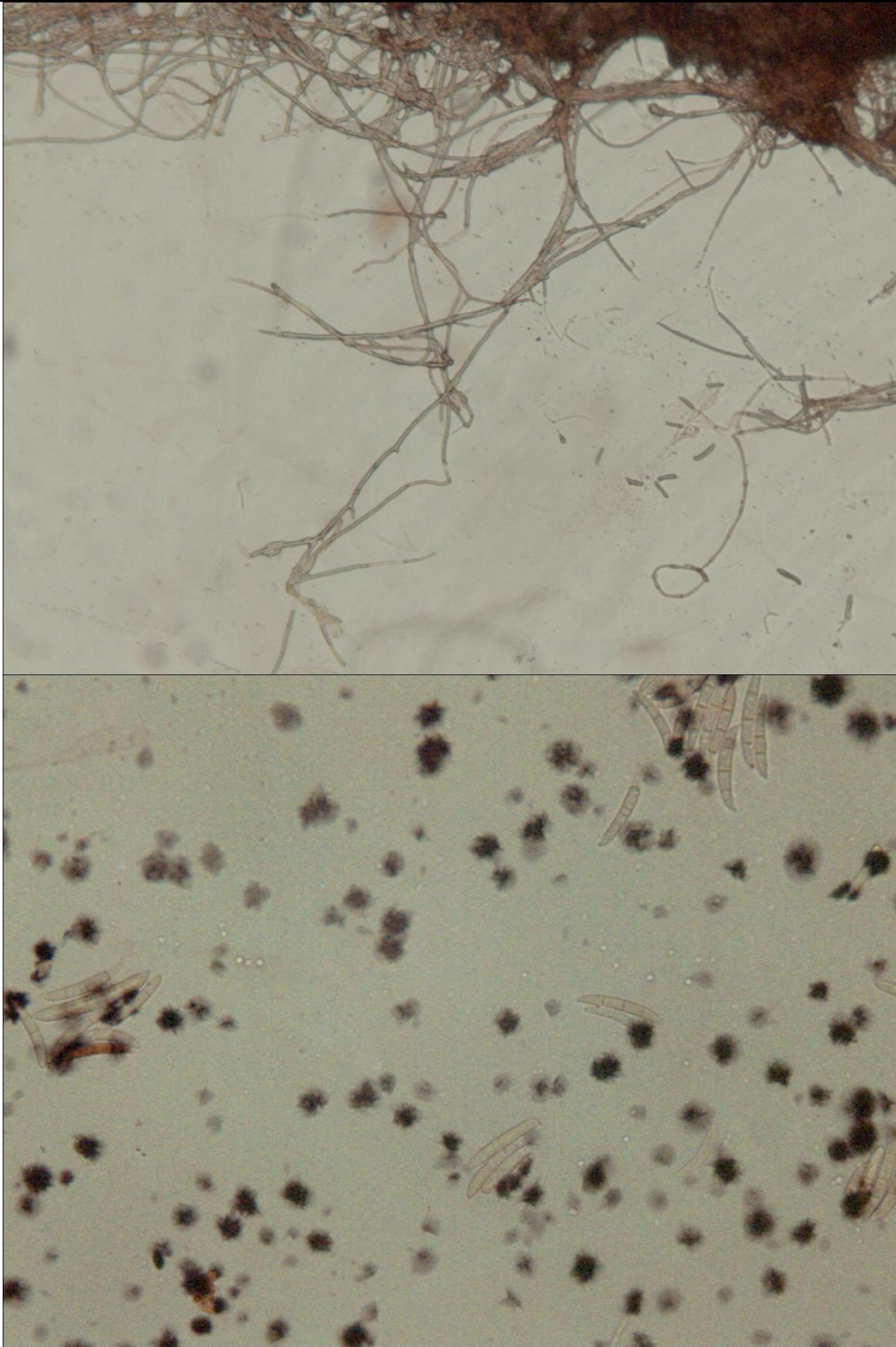


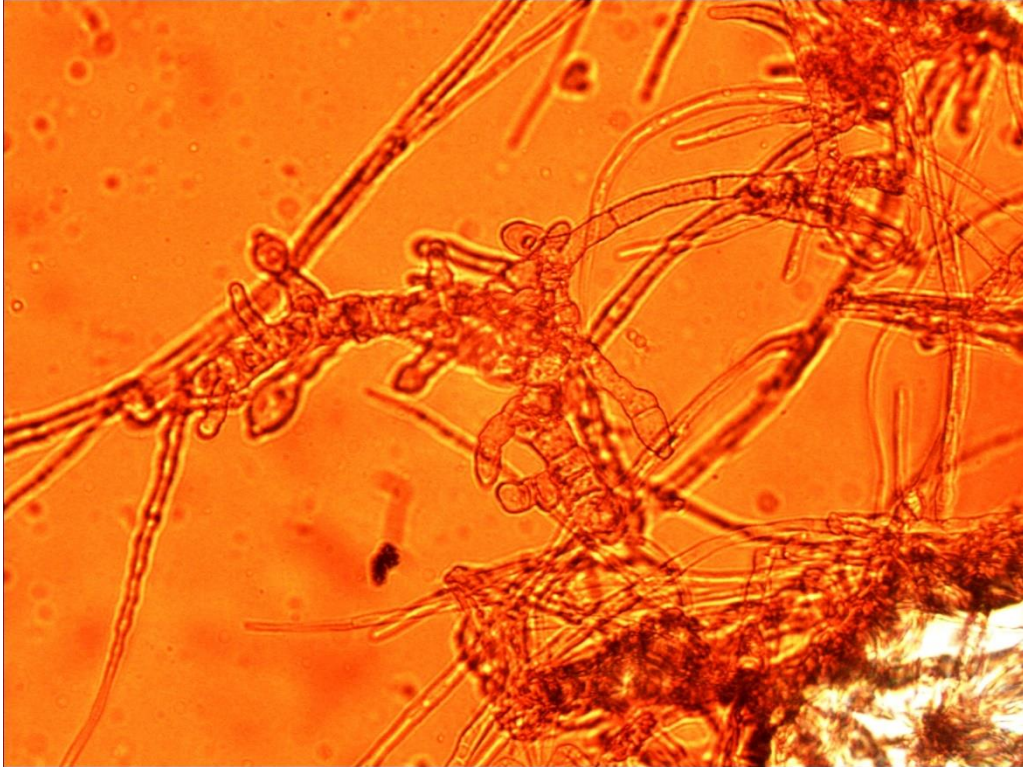


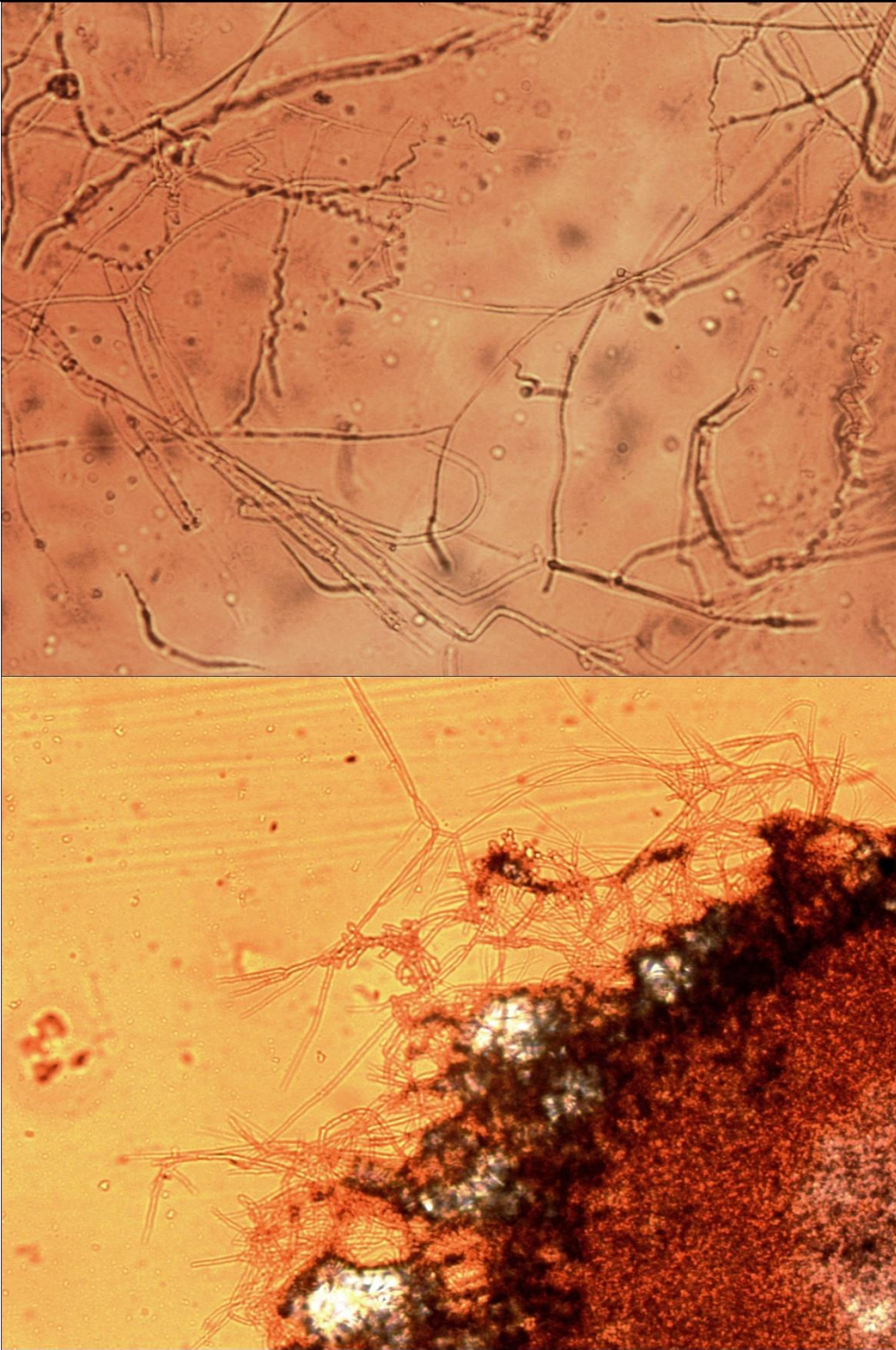


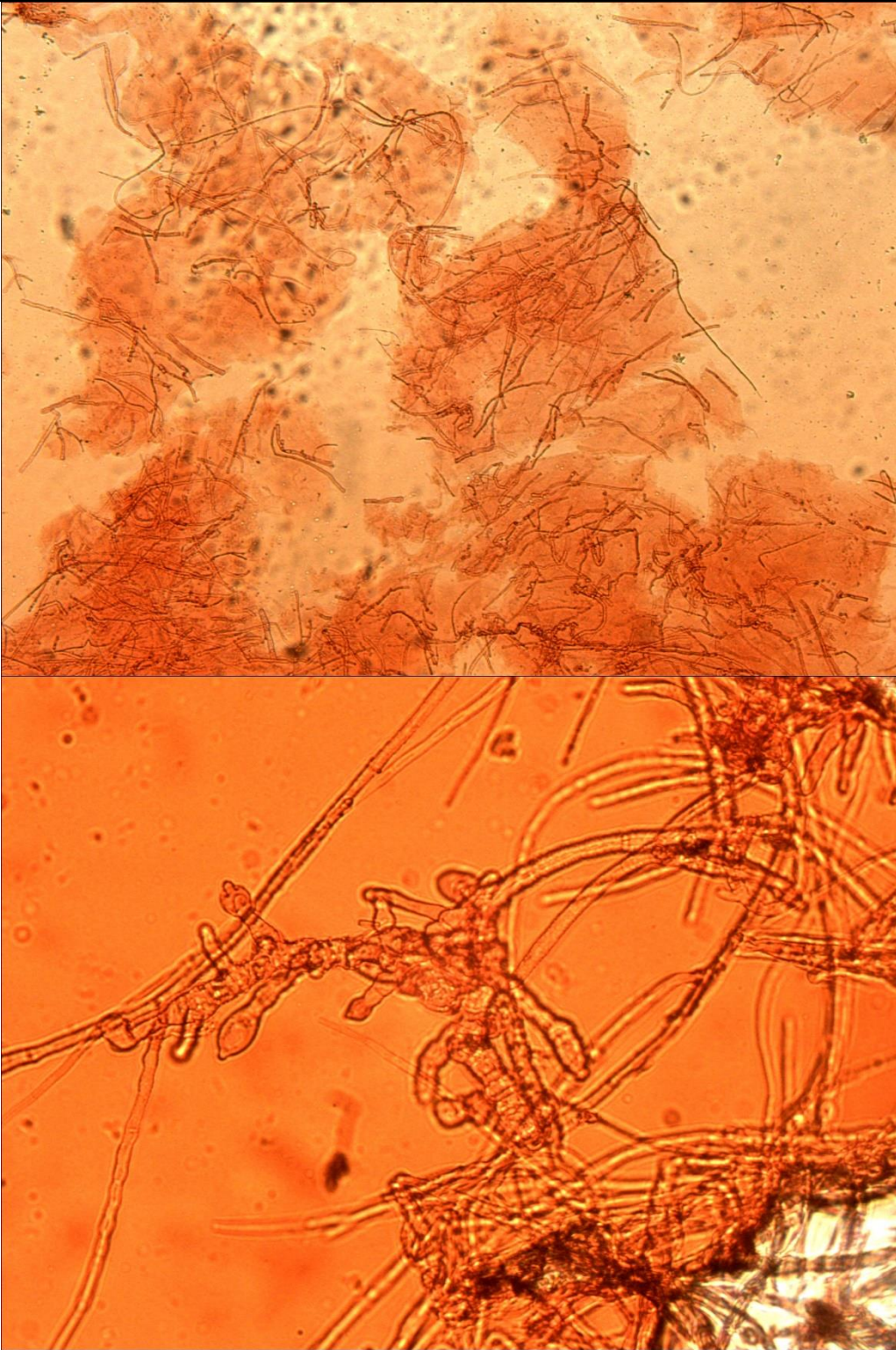


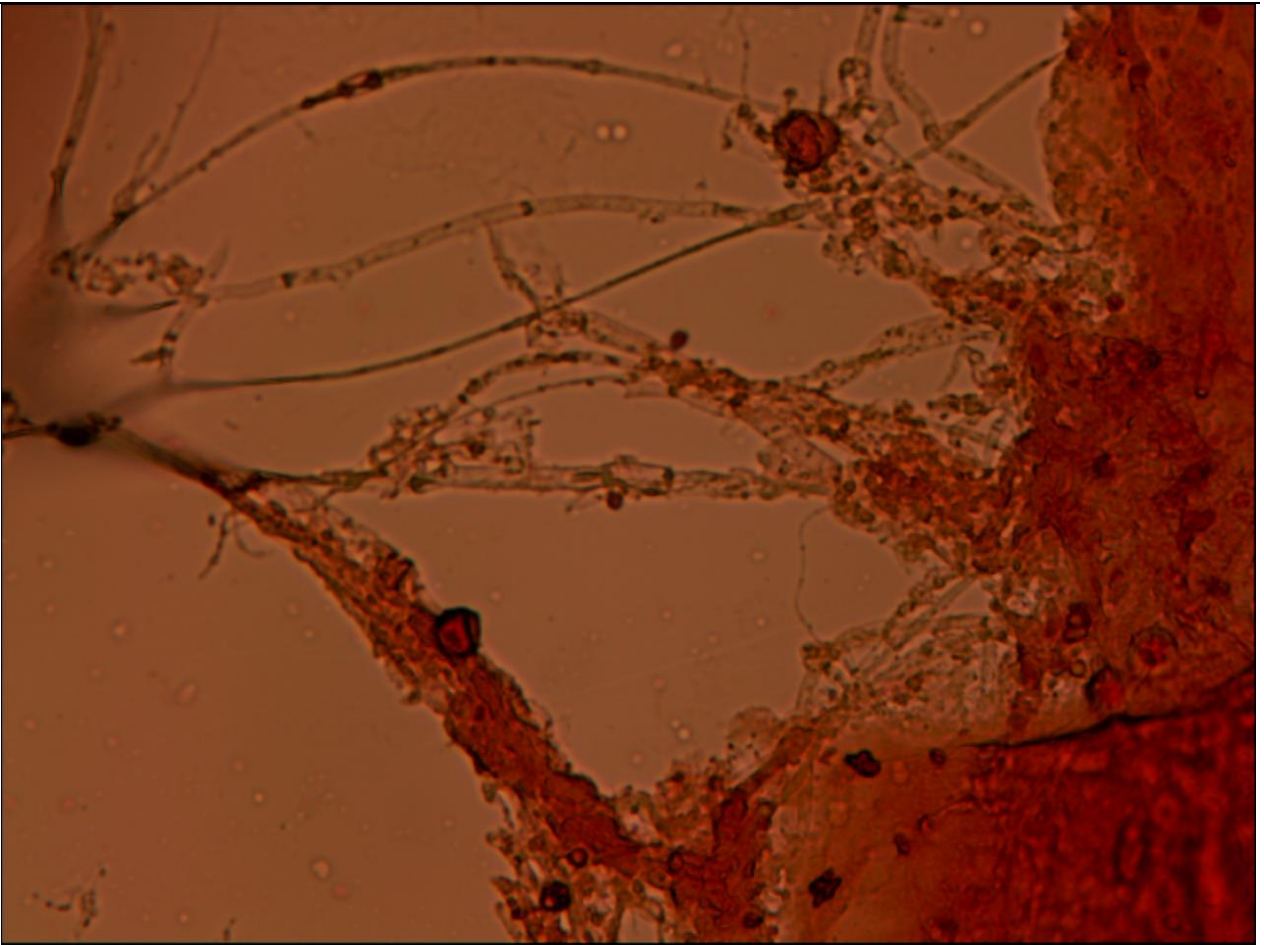


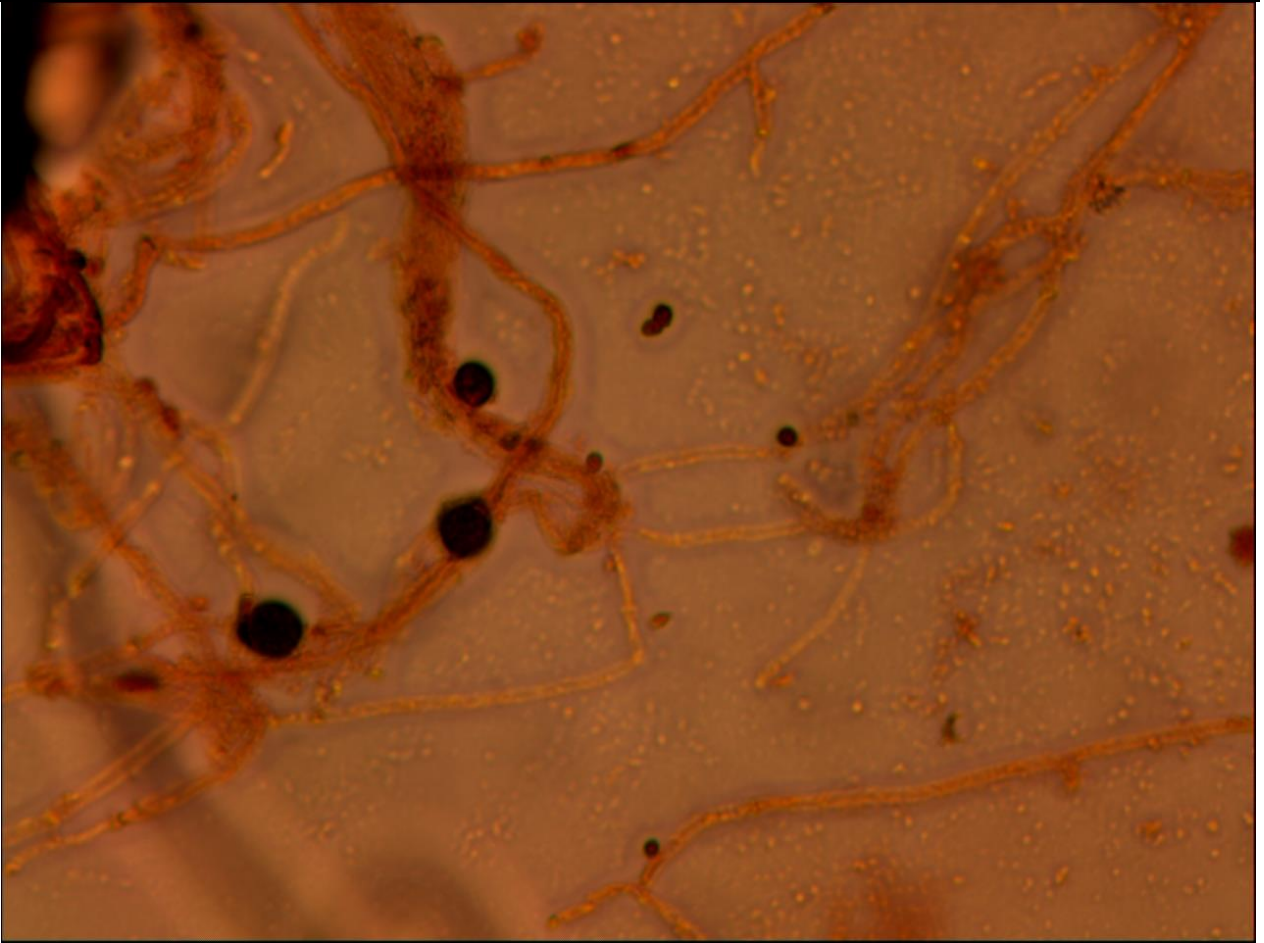


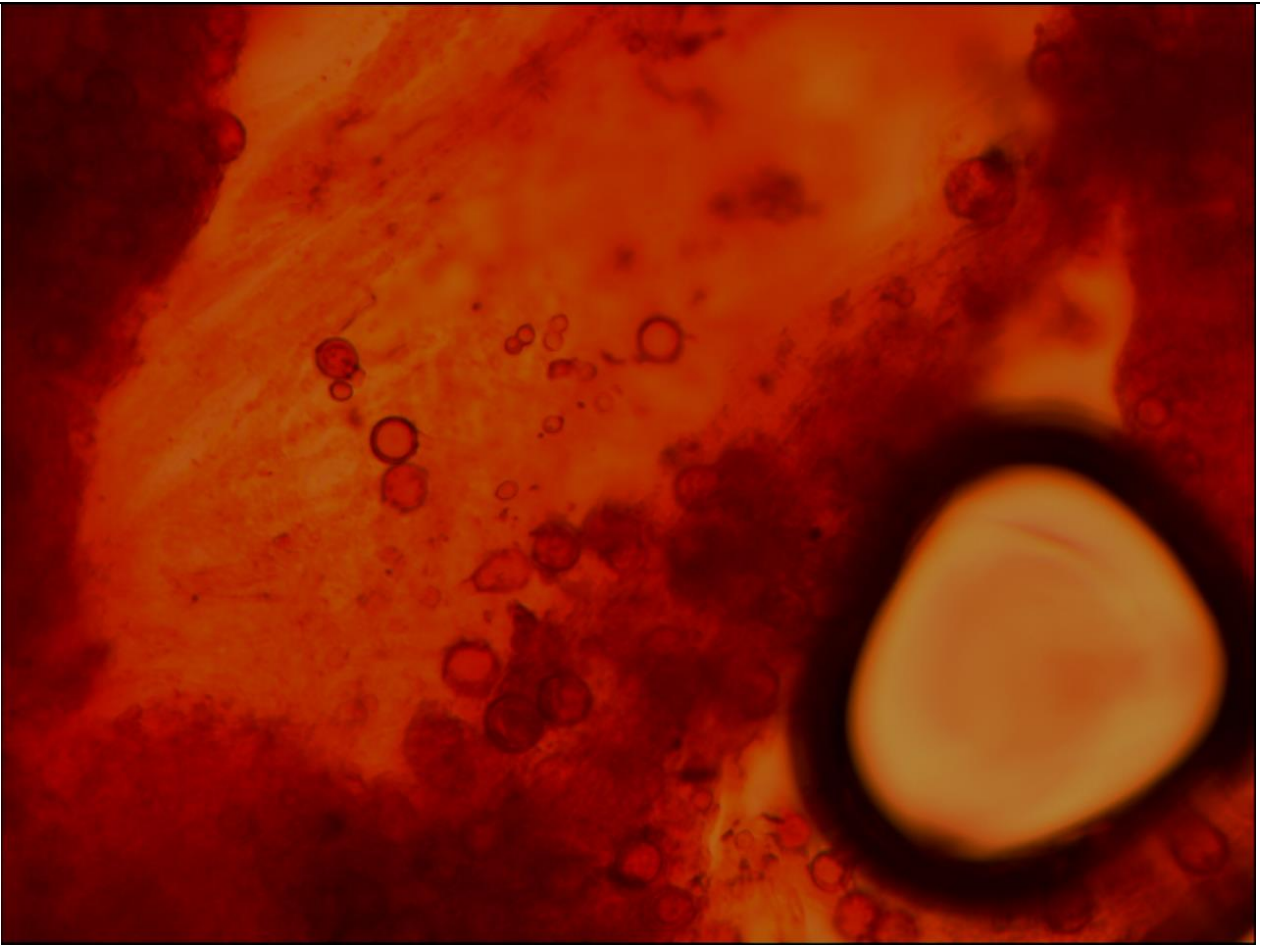


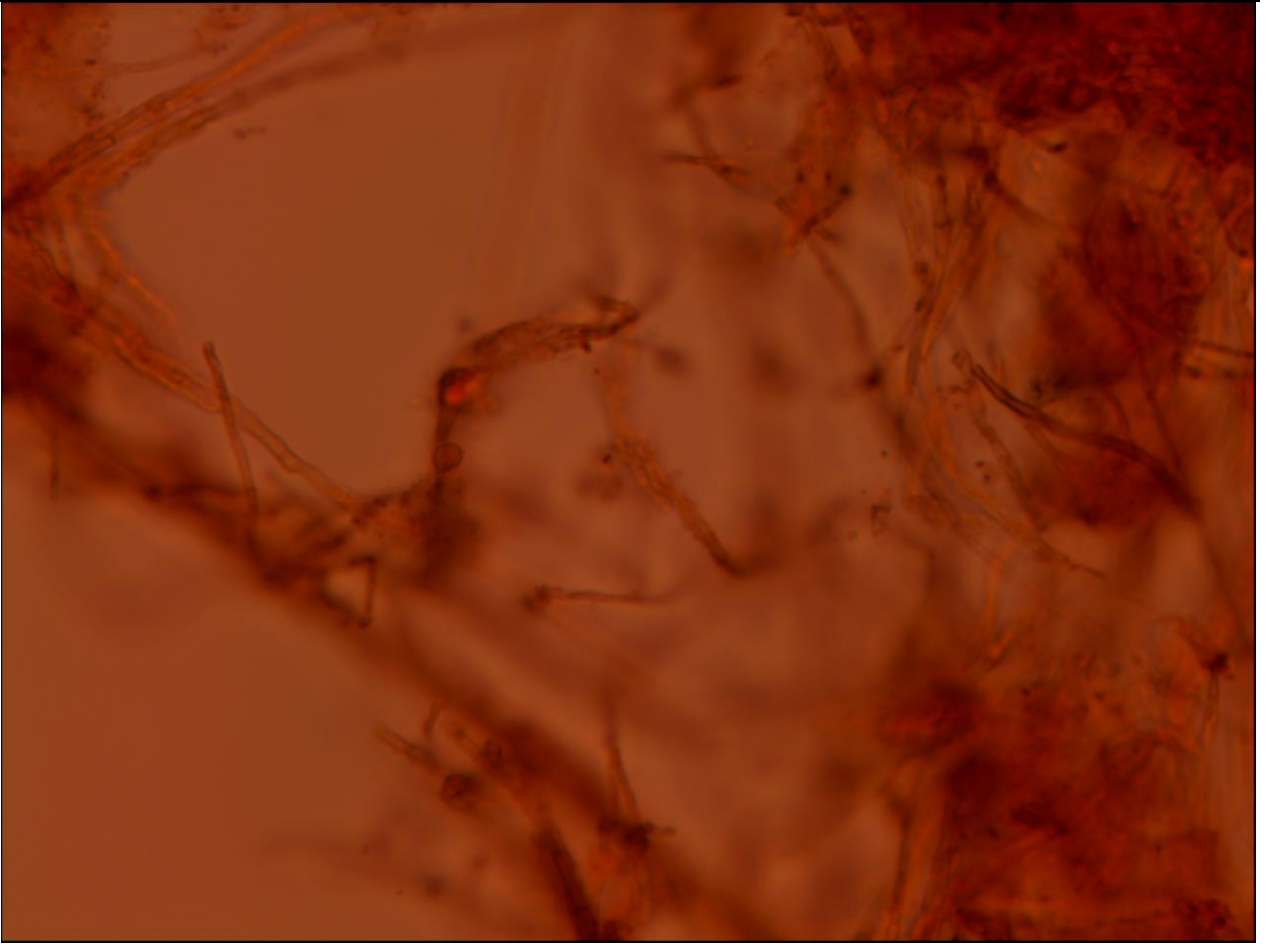


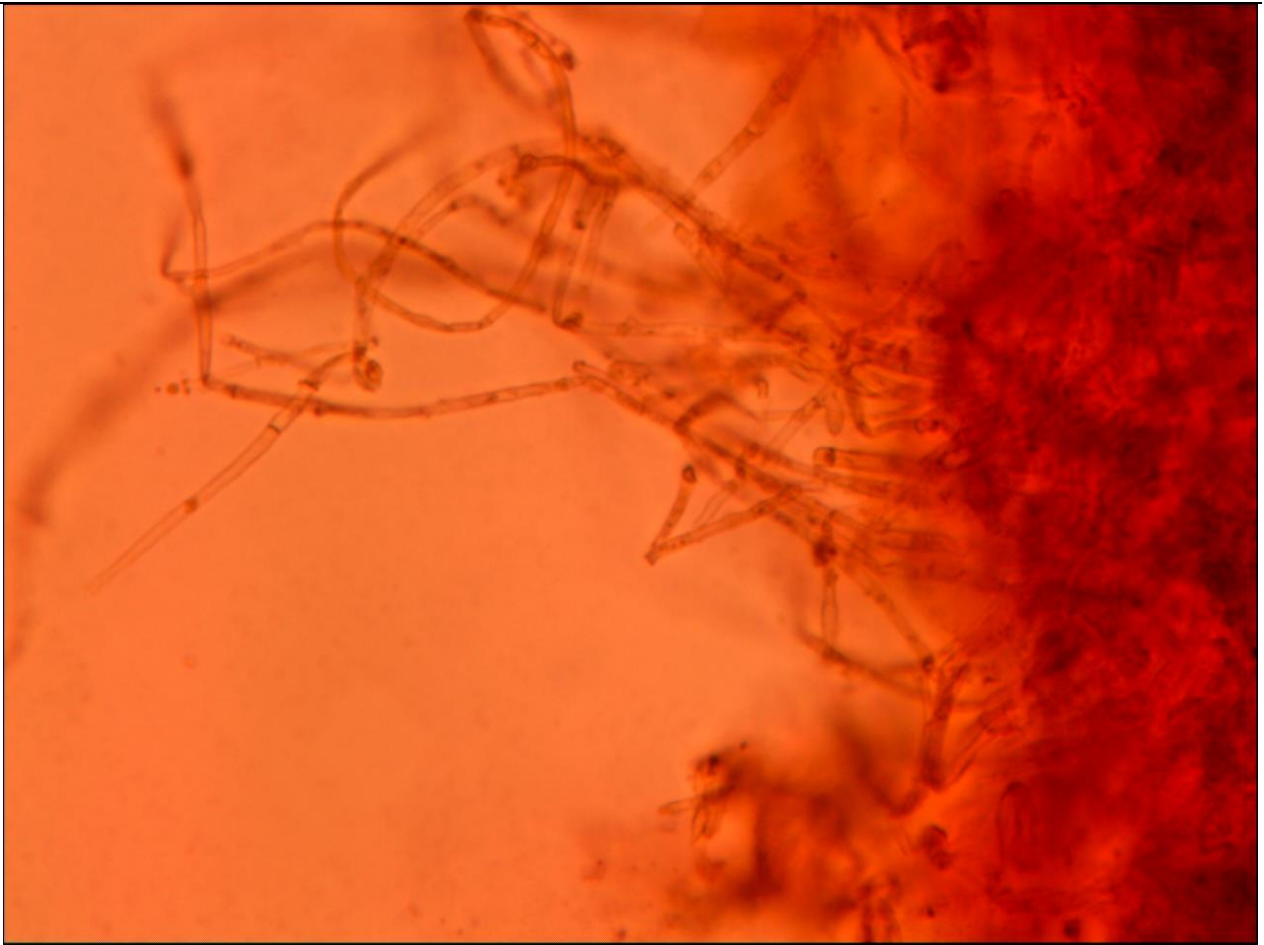






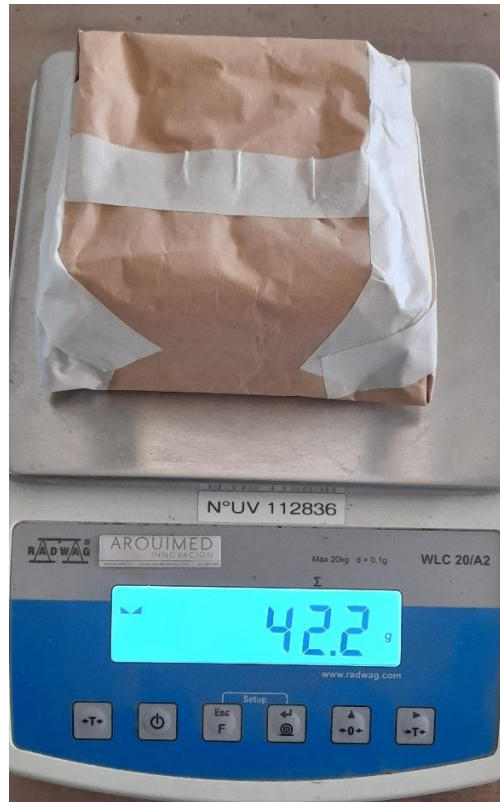
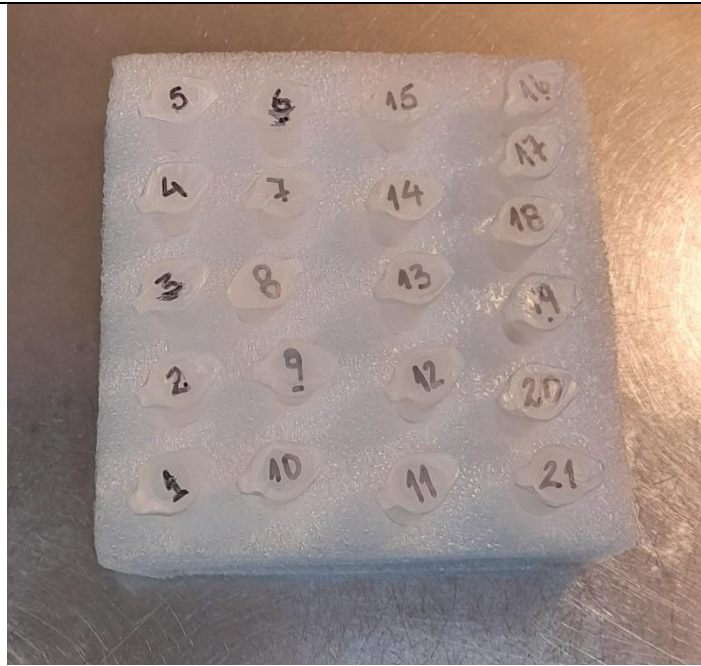






5.2.3 Identificación molecular por secuenciación

El total de muestras a las cuales fue posible realizar con éxito la extracción del ADN fueron 21 muestras en total, las cuales fueron enviadas siguiendo las recomendaciones del personal de MacroGen.



Las muestras fueron enviadas de acuerdo a los siguientes códigos, que se presentan en la tabla 5.3 que sigue:

Tabla 5.3: Códigos de muestras enviadas a secuenciar de HMA

Nro. ID de envío	Código de ID
1	HM-1
2	HM-2
3	HM-3

4	HM-4
5	HM-5
6	HM-6
7	HM-10
8	HM-12
9	HM-14
10	HM-16
11	HM-17
12	HM-20
13	HM-22
14	HM-23
15	HM-25
16	HM-26
17	HM-36
18	HM-39
19	HM-40
20	HM-41
21	HM-42

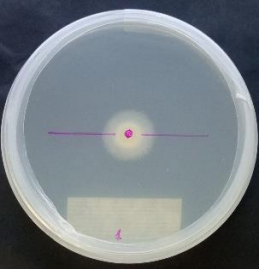
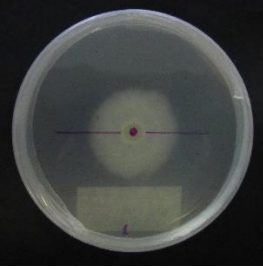
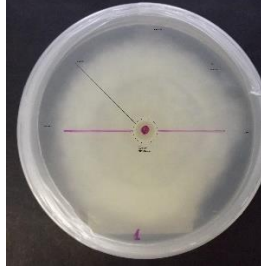
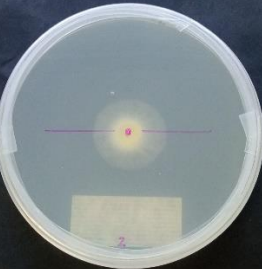
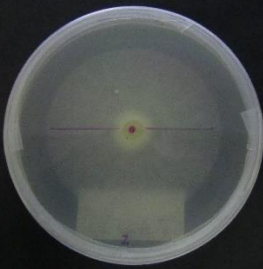
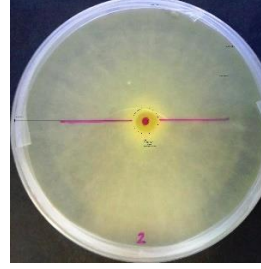
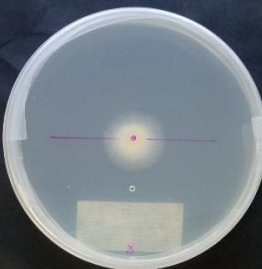
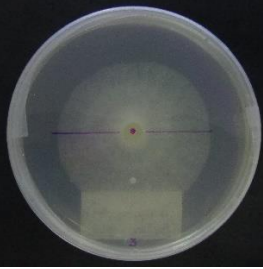
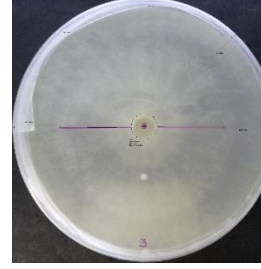
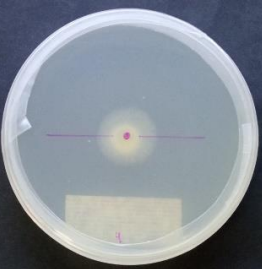
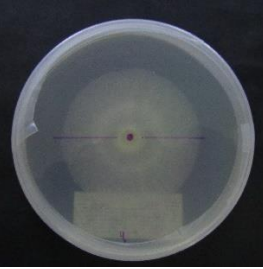
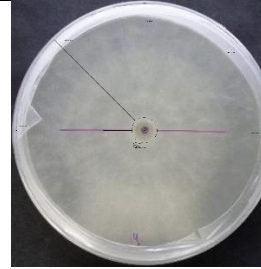
5.3 RESULTADOS ASOCIADOS AL TERCER OBJETIVO ESPECÍFICO

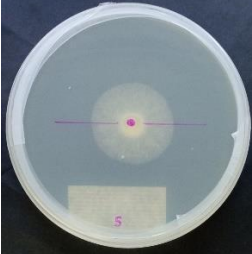
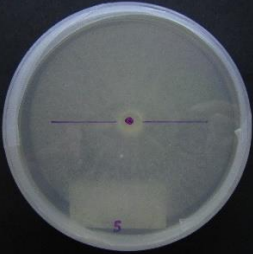
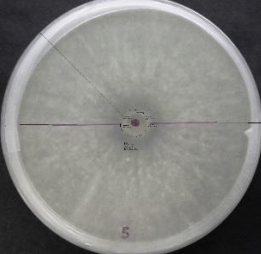
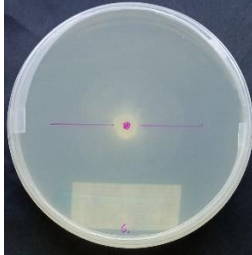
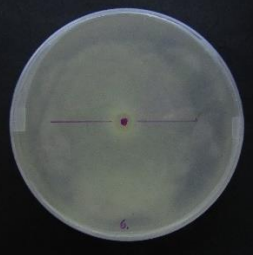
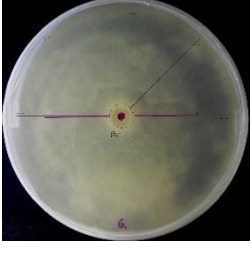
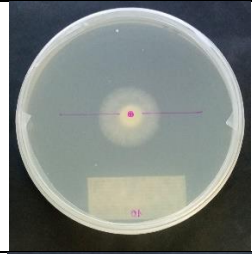
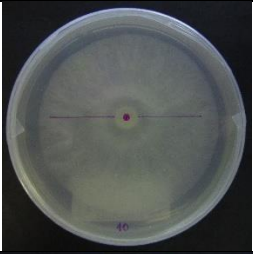
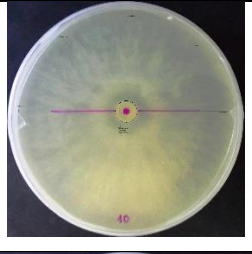
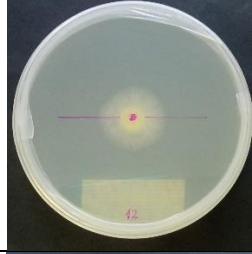
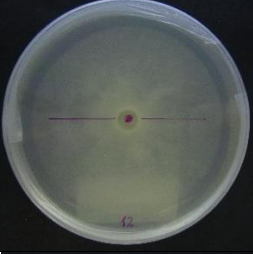
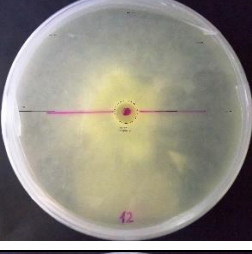
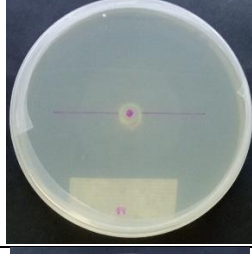
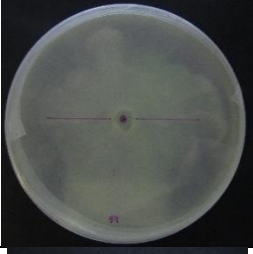
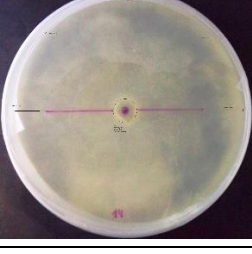
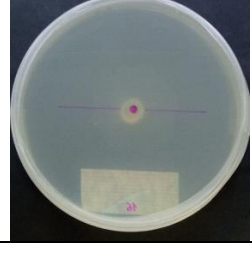
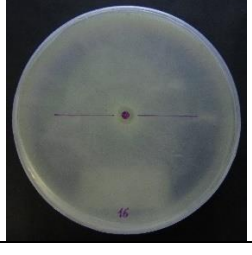
5.3.1 Especies con mayor abundancia relativa

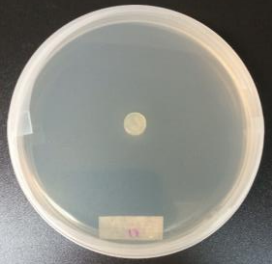
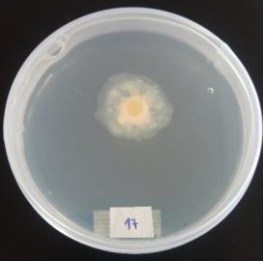
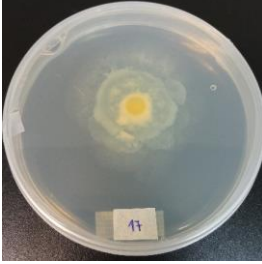
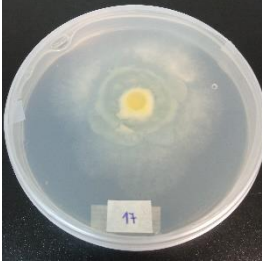

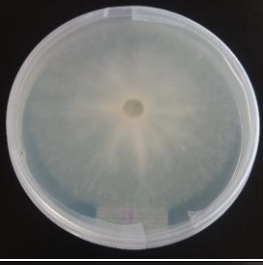
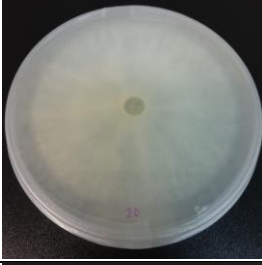
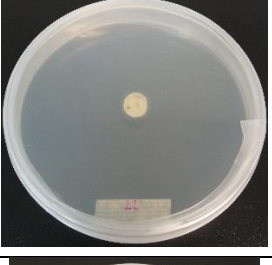
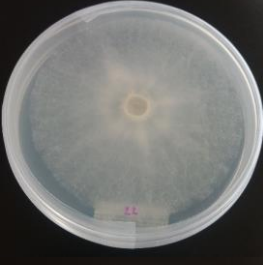
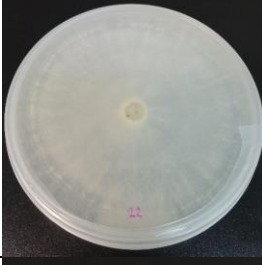
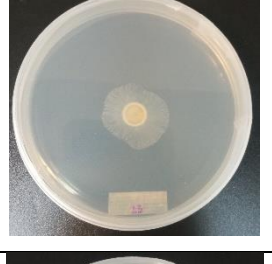



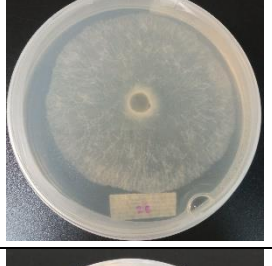

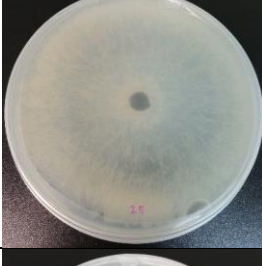

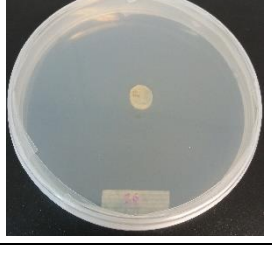



De las 21 especies a las cuales fue posible extraer con éxito parte de su ADN, los códigos asociados a las colonias más abundantes con respecto a la cantidad de individuos totales aislados corresponden a las placas 1, 4, 6, 10, 12, 14, 16, 25, 26 y 39.

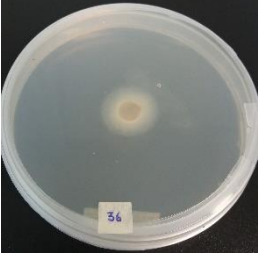
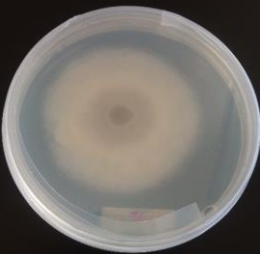
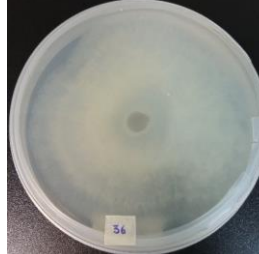
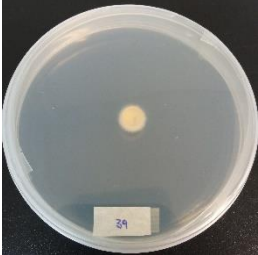
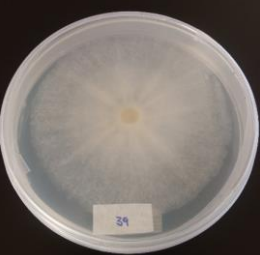
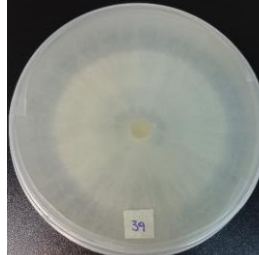
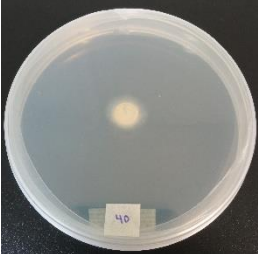
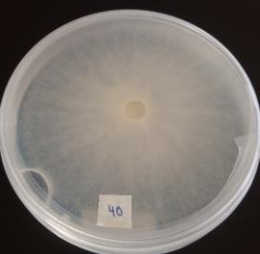
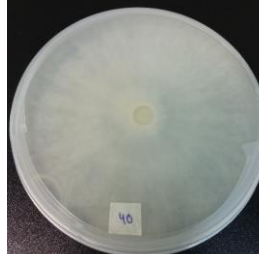
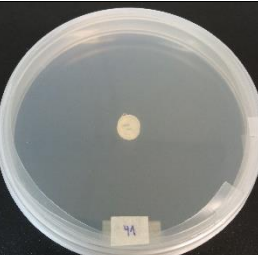
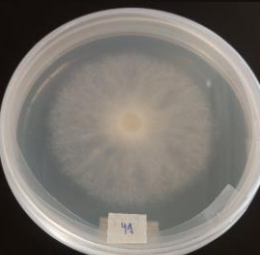
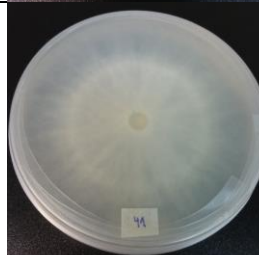
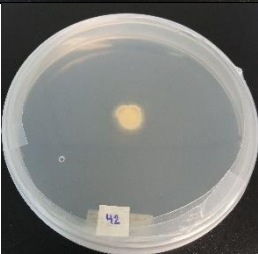
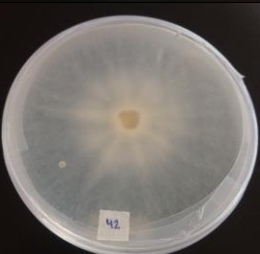
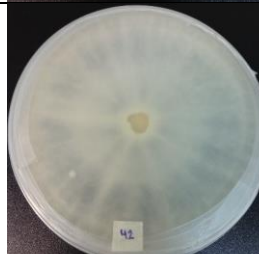
5.3.2 Especies con mayor velocidad de crecimiento

A continuación, se presentan los registros fotográficos del crecimiento de las placas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 14, 16. Donde el día 0 corresponde al día de inoculación, el día 1 luego de 24 horas de la inoculación y así sucesivamente hasta llegar a la colonización total de cada placa.

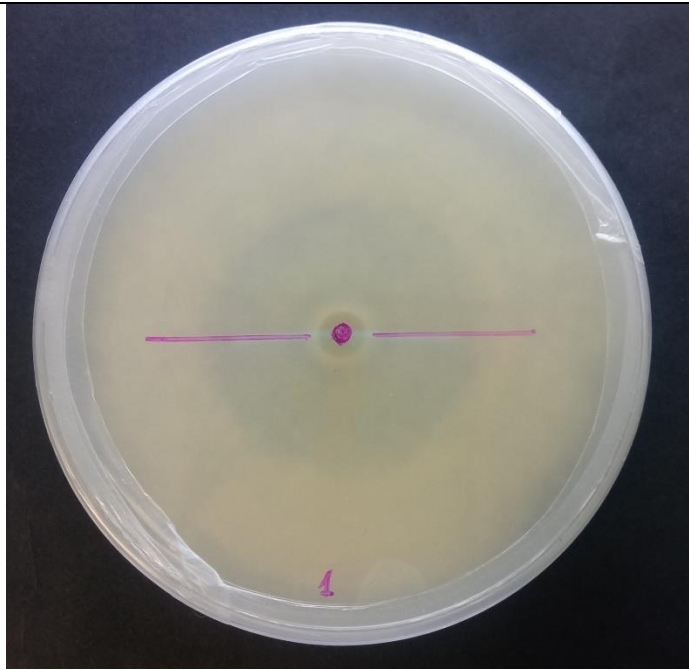
ID	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
1			Sin registro	
2			Sin registro	
3			Sin registro	
4			Sin registro	

ID	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
5			Sin registro	
6				Sin registro
10				Sin registro, pues coloniza por completo la placa al 3er día.
12				Sin registro, pues coloniza por completo la placa al 3er día.
14				Sin registro, pues coloniza por completo la placa al 3er día.
16			Sin registro, pues coloniza por completo la placa al 2do día.	Sin registro

ID	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
17				
20				Sin registro, pues coloniza por completo la placa al 3er día.
22				Sin registro, pues coloniza por completo la placa al 3er día.
23				
25				
26				

ID	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
36				Sin registro, pues coloniza por completo la placa al 3er día.
39				Sin registro, pues coloniza por completo la placa al 3er día.
40				Sin registro, pues coloniza por completo la placa al 3er día.
41				Sin registro, pues coloniza por completo la placa al 3er día.
42				Sin registro, pues coloniza por completo la placa al 3er día.

Como se puede apreciar en la tabla la placa con ID 1 fue la única que al cuarto día no había sido colonizada por completo, por ende, correspondió a la que más tiempo le tomó colonizar la placa. Sin embargo, ya para el día 7, había colonizado la placa, como se puede observar en la figura que sigue:



Ahora bien, a partir de todo lo anterior es que se tiene que las especies que tienen una mejor velocidad de crecimiento, es decir, a las cuales les toma menos tiempo alcanzar a colonizar la placa son las placas 6, 10, 12, 14, 16 ya que, al tercer día ya habían colonizado por completo la placa. Luego les siguen las especies contenidas en las placas:

6 DISCUSIÓN

6.1 PAPEL DE LOS HMA EN PROCESOS DE RESTAURACIÓN ECOLÓGICA

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) juegan un papel fundamental en la restauración de ecosistemas degradados, ya que, influyen positivamente en el establecimiento y crecimiento de las plantas, pues la mayoría de las especies vegetales estudiadas están asociadas con los HMA, los cuales incrementan el desempeño de las plantas al facilitar la absorción de nutrientes y agua del suelo (Varela & Guadarrama, 2023)

La inoculación de plantas con HMA nativos ha demostrado ser una estrategia efectiva para mejorar el éxito de los proyectos de restauración en diversos ecosistemas, destacan que la aplicación de inóculos de HMA en plantas durante el establecimiento en el campo puede aumentar significativamente su supervivencia y crecimiento, especialmente en condiciones de estrés (Barea *et al.*, 2011).

6.2 RESTAURACIÓN DE SUELOS DEGRADADOS

Los HMA juegan un papel crucial en la restauración de suelos degradados, como los contaminados, mineros o erosionados. Estos hongos tienen la capacidad de solubilizar y movilizar nutrientes del suelo, mejorando su fertilidad y disponibilidad para las plantas.

En el caso de suelos contaminados, los HMA pueden secuestrar metales pesados y reducir su biodisponibilidad para las plantas, disminuyendo así los efectos tóxicos. Además, la simbiosis con HMA mejora la estructura del suelo, aumentando la agregación de partículas y la retención de agua, lo que favorece la recuperación de suelos erosionados.

Los hongos micorrícicos, en particular el *Glomus*, han demostrado ser efectivos en la rehabilitación de suelos mineros, mejorando propiedades del suelo y estimulando el crecimiento de plantas (Quiroz-Mojica 2021). Estos hongos también han sido utilizados en la restauración ecológica, mostrando un impacto positivo en la recuperación de suelos y en el crecimiento de plantas (Cuenca 2011, Padilla 2004). Además, se ha observado que la interacción entre hongos micorrícicos y la planta *Tecoma stans* puede promover el crecimiento y la capacidad de ganancia de recursos de la planta, lo que sugiere un papel importante en la restauración de suelos (Becerril-Navarrete 2022).

6.3 REFORESTACIÓN Y AGRICULTURA SOSTENIBLE

Los HMA también tienen un gran potencial en proyectos de reforestación y en el desarrollo de sistemas agrícolas sostenibles. La inoculación de plantas forestales con HMA nativos puede acelerar el establecimiento y crecimiento de las plántulas en vivero, mejorando su supervivencia y adaptación al campo.

En agricultura, la utilización de HMA permite reducir el uso de fertilizantes químicos y pesticidas, al mejorar la absorción de nutrientes por parte de las plantas y aumentar su resistencia a patógenos y plagas. Esto contribuye a la sostenibilidad de los sistemas agrícolas y a la conservación del medio ambiente.

6.4 POTENCIAL DE LOS HMA EN CHILE Y LA ZONA CENTRAL

En Chile, y particularmente en la zona central, existe un gran potencial para la utilización de HMA en procesos de restauración ecológica. Estos ecosistemas presentan una alta diversidad de especies vegetales nativas que pueden estar asociadas con HMA nativos, adaptados a las condiciones ambientales locales.

Sin embargo, el conocimiento sobre la diversidad y ecología de los HMA en Chile aún es limitado. Es necesario realizar más investigaciones para caracterizar las comunidades de HMA presentes en diferentes ecosistemas y evaluar su potencial en la restauración. El desarrollo de tecnologías para la producción de inóculos de HMA nativos también es un aspecto clave para facilitar su aplicación en proyectos de restauración a gran escala.

6.5 PROYECCIONES

Al haber identificado y caracterizado una variedad de especies de hongos micorrícicos arbusculares (HMA), futuras investigaciones podrán enfocarse en evaluar el efecto específico de la inoculación de estas especies de HMA en las plantas xerofíticas. Estas evaluaciones permitirán determinar la efectividad de cada especie de hongo en la promoción del crecimiento y la salud de las plantas, así como en la mejora de la resiliencia de los ecosistemas. Además, los resultados obtenidos en este trabajo de titulación proporcionan un marco económico y metodológico que puede ser replicado y mejorado en estudios posteriores, facilitando el diseño de experimentos a largo plazo que analicen las interacciones planta-hongo en condiciones controladas y naturales.

7 CONCLUSIÓN

La presente investigación logró cumplir con los objetivos específicos propuestos, proporcionando una base sólida para el uso de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en la restauración ecológica de ecosistemas xerofíticos costeros.

Se recolectaron y cultivaron con éxito HMA a partir de las raíces de ocho especies de plantas xerofíticas del Santuario de la Naturaleza Federico Santa María. El medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) permitió el crecimiento y aislamiento de 49 potenciales especies de HMA, demostrando la efectividad del método de cultivo utilizado.

Luego, mediante técnicas de biología molecular y secuenciación, se identificaron las especies de HMA aisladas, lo cual permitió determinar su identidad taxonómica. Esta identificación es crucial para entender las relaciones ecológicas y funcionales de estos hongos en los ecosistemas xerofíticos costeros.

Las especies de HMA fueron evaluadas y seleccionadas en función de su abundancia relativa y velocidad de crecimiento. Este proceso permitió identificar las especies más prometedoras para ser utilizadas en futuros procesos de restauración ecológica, basándose en criterios de eficiencia y adaptabilidad.

En definitiva, la investigación buscó resaltar la importancia de los HMA en la restauración de ecosistemas xerofíticos costeros. A pesar de las limitaciones encontradas, como la imposibilidad de evaluar el efecto real de la inoculación de los HMA en las plantas y las restricciones de tiempo, presupuesto y materiales, los resultados obtenidos son prometedores. Estos hallazgos sientan las bases para futuras investigaciones y aplicaciones prácticas en la restauración ecológica, destacando el potencial de los HMA para mejorar la resiliencia y sostenibilidad de los ecosistemas afectados.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez Sánchez, J., Guadarrama, P., Sánchez Gallen, I., & Olivera, D. (2007). Restauración de ambientes deteriorados derivados de la selva tropical húmeda: el uso de los hongos micorrizógenos arbusculares. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, Sup(80), 59-68. [en línea]. Obtenido de: <https://www.redalyc.org/pdf/577/57708007.pdf>
- Consejo de Monumentos Nacionales. (s.f.). Acontilados Federico Santa María. [en línea]. Obtenido de: <https://www.monumentos.gob.cl/monumentos/santuarios-de-la-naturaleza/acantilados-federico-santa-maria>
- Consejo de Monumentos Nacionales. (s.f.). Santuarios de la Naturaleza de Chile. [en línea]. Obtenido de: <https://fundacionphilippi.cl/wp-content/uploads/2018/10/santuarios-de-la-naturaleza-corporacion-del-patrimonio.pdf>
- Cuenca, G., Arrindell, P., & Capote, R. (2011). El uso de los hongos micorrícicos arbusculares en las prácticas de restauración ecológica. *Interciencia*, 36, 931-936. [en línea]. Obtenido de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3831380>
- Becerril, A., Gómez, M., Lindig, R., Blanco-García, A., Villegas, J., & Pineda-García, F. (2022). Interacciones biológicas en la restauración: el caso de *Tecoma stans* (Bignoniaceae) y hongos micorrícicos. *Acta Botanica Mexicana*, 129. <https://doi.org/10.21829/abm129.2022.1937>
- C., M., & M.R., G. (2014). La restauración ecológica en Colombia: Tendencias, necesidades y oportunidades. Center for International Forestry Research (CIFOR). <https://doi.org/10.17528/cifor/004519>
- Carrillo-Saucedo, S. M., Puente-Rivera, J., Montes-Recinas, S., Cruz-Ortega, R., Carrillo-Saucedo, S. M., Puente-Rivera, J., Montes-Recinas, S., & Cruz-Ortega, R. (2022). Las micorrizas como una herramienta para la restauración ecológica. *Acta Botanica Mexicana*, 129. <https://doi.org/10.21829/abm129.2022.1932>
- Fajardo, L., Cuenca, G., Arrindell, P., Capote, R., & Hasmy, Z. (2011). El uso de los HMA en prácticas de restauración ecológica.
- Fardella, C., Osés, R., Torres-Díaz, C., & Molina-Montenegro, M. A. (2014). Hongos endófitos antárticos como herramienta para la reintroducción de especies nativas en zonas áridas. *Bosque (Valdivia)*, 35(2), 235-239. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002014000200011>
- González, L., Granda Moser, V., Torres Romero, S., Muñoz Chamba, L., & Aguirre Mendoza, Z. (2024). Contexto e implicaciones de la restauración ecológica y de paisajes. *Bosques Latitud Cero*, 14(1), 123-136. <https://doi.org/10.54753/blc.v14i1.2088>
- <https://bosquenativo.cl/restauracion-ecologica-con-especies-nativas-chile-esta-en-condiciones-de-afrontarla/>
- https://cdn.ymaws.com/www.ser.org/resource/resmgr/custompages/publications/SER_Primer/ser-primer-spanish.pdf

https://mma.gob.cl/wp-content/uploads/2020/10/Libro_Restauracion_Ecosistema_Cayumanque.pdf

- Lozano, J., García, R., Pulido, M., & Ruiz, V. (2020). Recursos hídricos actuales y futuros en Chile y su disponibilidad para la vegetación mediterránea. *Physis Terrae - Revista Ibero-Afro-Americana de Geografía Física e Ambiente*, 2(1), 87–100. <https://doi.org/10.21814/physisterrae.1889>
- Riedemann, P., & Aldunate, G. (2014). Flora Nativa de valor ornamental. Identificación y Propagación.
- Squeo, F. A., Holmgren, M., Jiménez, M., Albán, L., Reyes, J., & Gutiérrez, J. R. (2007). Tree establishment along an ENSO experimental gradient in the Atacama desert. *Journal of Vegetation Science*, 18(2), 195–202. <https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2007.tb02530.x>
- Ministerio de Agricultura. (2008). Ley 20.238 sobre Recuperación del Bosque Nativo y Fomento Forestal. [en línea]. Obtenido de: <https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=274894>
- Ministerio de Educación. (2006). Decreto Exento 699: Declara Santuario de la Naturaleza Los Acantilados Federico Santa María, ubicados en la localidad de Laguna Verde, comuna y provincia de Valparaíso, V región de Valparaíso. Consejo de Monumentos Nacionales. [en línea]. Obtenido de: <https://www.bcn.cl/leychile/navegar?i=251838&f=2006-08-01>
- MMA. (s.f.). Definiciones Marco para la Restauración Ecológica. [en línea]. Obtenido de: <https://restauracionecologica.mma.gob.cl/definiciones/>
- Mosquera, Robinson Stewart, Valois-Cuesta, Hamleth, & Vasco-Palacios, Aida Marcela. (2023). Rol de los hongos micorrícicos arbusculares durante la sucesión natural de áreas impactadas por minería en un bosque pluvial tropical del Chocó, Colombia. *Bosque (Valdivia)*, 44(3), 617-627. <https://dx.doi.org/10.4067/s0717-92002023000300617>
- Ortiz, M. (2024). Protocolo de Extracción de ADN Genómico en Hongos Micorrícicos. Laboratorio de Biodeterioro y Biodegradación de materiales, Universidad de Valparaíso.
- Quiroz Mojica, L.J., Daza Mendoza, M.M., Díaz Mueque, L.C., Melo Ríos, A.E., & Peñuela Mesa, G.A. (2021). Efecto de biochar, micorrizas arbusculares y *Guazuma ulmifolia*, en la rehabilitación de suelos mineros. [en línea]. Obtenido de: <https://www.semanticscholar.org/paper/Efecto-de-biochar%2C-micorrizas-arbusculares-y-en-la-Quiroz-Mojica-Daza-Mendoza/e07066713a898c73864981a22659752094ae82af>
- Rodríguez, M., Soto, A., Pérez, J., & Negreros, P. (2011). Los hongos micorrícicos arbusculares y su implicación en la producción y manejo de especies neotropicales forestales, con énfasis en meliáceas. *Interciencia*, 36(8), 564-569. [en línea]. Obtenido de: <https://www.redalyc.org/pdf/339/33921395002.pdf>

9 ANEXOS

9.1 ANEXO 1: PROTOCOLOS DE LABORATORIO

9.1.1 Protocolo PCR



LABORATORIO BIODETERIORO Y BIODEGRADACIÓN DE MATERIALES (BBM). Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Encargado Laboratorio BBM: Manuel Ortiz.

Universidad de Valparaíso

Objetivo:

Amplificación de DNA extraído de muestras de Hongos de pudrición de maderas

Objetivo General:

Identificar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Objetivos Específicos:

Realizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para Hongos de pudrición de maderas

Componente para una reacción en cadena (PCR) convencional

Visualización de PCR mediante electroforesis en gel

INTRODUCCIÓN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polimerase chain reaction) se considera una de las técnicas más sensibles y específicas de las pruebas moleculares. En 1986, el doctor Kary Mullis desarrolló esta técnica en los laboratorios de CETUR Corporation, en Estados Unidos, lo que le hizo ganador del premio Nobel en 1993. La idea se fundamentó en la necesidad de obtener un gran número de copias de fragmentos específicos de ácido desoxirribonucleico (DNA, deoxyribonucleic acid) de manera rápida y económica, los cuales no podían obtenerse por otros métodos hasta ese momento. Esta técnica se basa en una replicación exponencial in vitro de una molécula de DNA genómico (gDNA) o DNA complementario (cDNA), mediante ciclos repetidos, que constan de tres temperaturas. En cada uno de los ciclos las moléculas se duplican hasta que los reactivos se agotan. La longitud del producto amplificado la delimitan los iniciadores, también llamados primers u oligonucleótidos, de cuyo diseño adecuado depende el éxito de la PCR. Los iniciadores deben ser específicos, no formar estructuras secundarias ni hibridaciones inespecíficas entre ellos u otra parte de la cadena. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es, sin lugar a dudas, la técnica más importante y revolucionaria en biología molecular, debido a que permite obtener in vitro millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula. La PCR se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde. La amplificación in vitro de la PCR se apega a las mismas reglas de la replicación realizada en la célula; esta técnica se basa en una secuencia que le sirve de molde y, por complementariedad, sintetiza la cadena antiparalela. La síntesis de la cadena sigue la dirección 5'-3', ya que requiere de un nucleótido con el extremo 3' libre que proporcione el grupo OH para la adición del siguiente nucleótido, con lo que se forma el enlace fosfodiéster.

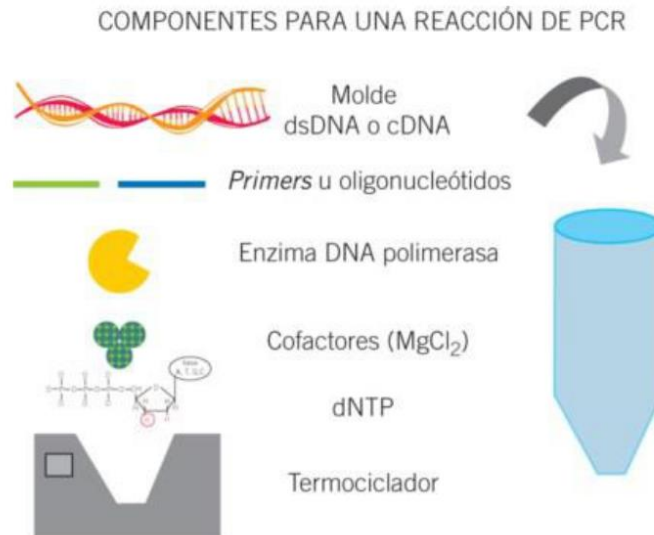


Para que se lleve a cabo la PCR se requiere una cadena de gDNA o cDNA que sirva de molde, una enzima DNA polimerasa, cofactores necesarios para la actividad correcta de la DNA polimerasa, desoxinucleótidos (dNTP) para la síntesis del producto de PCR y oligonucleótidos o primers. Esta mezcla se coloca en un tubo en cual es llevado a un equipo llamado termociclador.

Componentes de la reacción de PCR

Para que se lleve a cabo la reacción en cadena de la polimerasa se requiere:

- ✚ Una cadena molde ya sea de gDNA o cDNA
- ✚ Una enzima DNA polimerasa,
- ✚ Mn+2 o Mg+2 necesarios como cofactores para la enzima,
- ✚ dNTP o desoxinucleótidos
- ✚ Oligonucleótidos o Primers para el inicio de la síntesis.
- ✚ Estos reactivos se mezclan y se someten en el termociclador a los ciclos de amplificación.

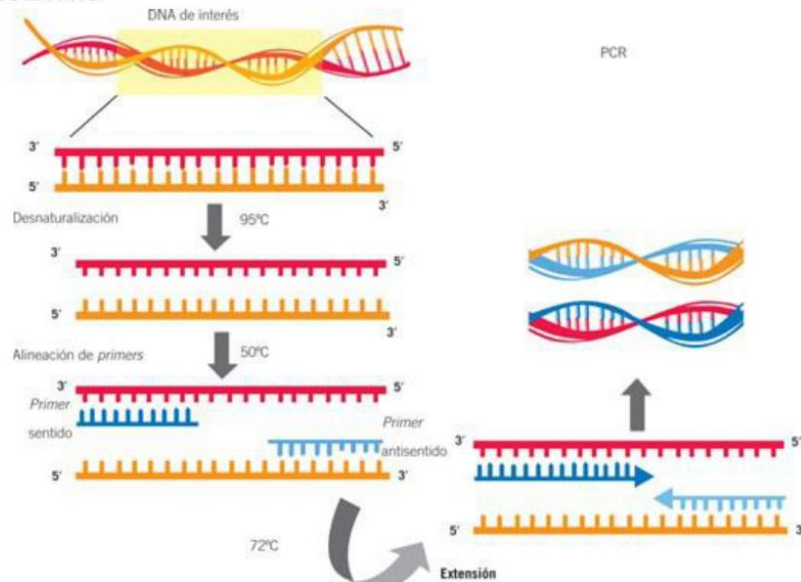


Fuente: Adriana María Salazar Montes, Ana Soledad Sandoval Rodríguez, Juan Socorro Armendáriz Borunda: *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*, 2e: www.accessmedicina.com
Derechos © McGraw-Hill Education. Derechos Reservados.



Esquema convencional de un PCR

Generalmente, la PCR inicia con la desnaturalización o separación de la doble hélice de ADN mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 94 y 96 °C para romper los puentes de hidrógeno que las unían, de esta manera cada cadena queda como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN. Una vez separadas las cadenas del ADN, se alinean los iniciadores a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar, para que esto suceda se baja la temperatura entre 40 y 60 °C lo que permite la unión (alineamiento) de los iniciadores. Finalmente, se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3' para lo cual se incrementa la temperatura, por lo general a 72 °C, porque es la temperatura óptima a la cual la ADN polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación. Estas tres etapas: 1) desnaturalización, 2) alineamiento y 3) extensión del ADN, se repiten sucesivamente, en cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias. Los productos generados aumentan su concentración de manera exponencial porque cada nueva copia sirve de molde en los ciclos subsiguientes.



Fuente: Adriana María Salazar Montes, Ana Soledad Sandoval Rodríguez, Juan Socorro Armendáriz Borunda: *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*, 2a: www.accesmedina.com
Derechos © McGraw-Hill Education. Derechos Reservados.



Inicio de la desnaturalización

Es necesaria una temperatura de 95°C para la desnaturalización de la doble cadena de DNA, en el caso del DNA genómico, o el rompimiento de estructuras secundarias, en el cDNA. Esta temperatura se mantiene por 5 min al inicio de la PCR.

Ciclos de amplificación

Un ciclo típico de PCR convencional consta de las tres temperaturas siguientes:

- 95°C: desnaturalización por unos 30 segundos.
- 55 a 60°C: alineación por 30 a 40 segundos.
- 72°C extensión, según la longitud del producto que se va amplificar, considerando la adición de 1 000 nucleótidos en 60 segundos.

Este ciclaje de temperatura se repite de forma continua por 30 a 35 ocasiones. Cada temperatura cumple con una función específica.

Desnaturalización

Se realiza a 95°C y tiene como objetivo desnaturalizar la doble cadena de DNA, lo que permite el acceso de los primers a la cadena molde en sus secuencias complementarias. Esta temperatura se mantiene por 30 segundos.

Alineación

En esta fase, la temperatura se encuentra en un rango entre 55 y 65°C, en el cual la mayoría de los iniciadores hibridan; así, se genera la energía cinética necesaria para que los iniciadores busquen en las cadenas de DNA su secuencia complementaria y formen los puentes de hidrógeno con la cadena molde, dejando el extremo 3'OH disponible y listo para la adición de los nucleótidos consecutivos por la DNA polimerasa.

Extensión

Se produce a la temperatura óptima para el funcionamiento de la DNA polimerasa empleada, por lo que la temperatura para la PCR dependerá de la enzima a utilizar. En el caso de la Taq polimerasa, la temperatura óptima es de 72°C.

Amplificación final

Una vez terminados los ciclos designados para la PCR, la reacción se somete a un ciclo más de temperatura de extensión (72°C) y se mantiene por 5 min, lo que permite que la polimerasa termine la extensión de los productos de PCR que quedaron incompletos.

Almacenamiento temporal

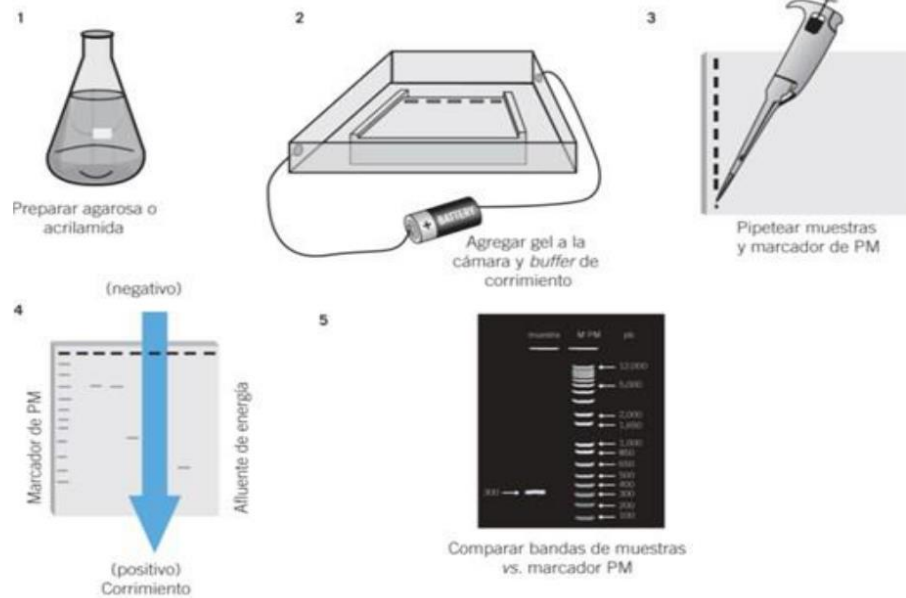
Durante la programación de los ciclos de la PCR se programa también un ciclo final de 4°C por varias horas, lo que permite conservar los productos de PCR a baja temperatura hasta que se retiren los tubos de reacción del equipo evitando así su posible degradación.

Visualización del producto de PCR mediante electroforesis en gel.

La detección del producto de amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa se observa como una banda. La intensidad de la banda se considera proporcional a la cantidad de producto amplificado y su longitud se verifica interpolando contra un marcador de peso molecular comercial de longitudes conocidas.



En este gel el carril marcado MPM corresponde al marcador de peso molecular de 1 kb plus DNA ladder; los valores correspondientes a las bandas se observan en la columna pb (pares de bases). La muestra corresponde a un producto de aproximadamente 300 pb, como se puede apreciar en el carril de muestra.



Fuente: Adriana María Salazar Montes, Ana Soledad Sandoval Rodríguez, Juan Socorro Armendáriz Borunda: *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*, 2e: www.accessmedicina.com
Derechos © McGraw-Hill Education. Derechos Reservados.

Practico Laboratorio (BBM)

Protocolo PCR Laboratorio BBM para hongos de pudrición de maderas

Materiales:

- Pipetas
- Puntas estériles
- Tubos eppendorff de 1.5ml
- Tubos de PCR de 0.2ml
- Lápiz marcador
- Guantes
- Mascarilla

Equipos:

- Vortex
- Térmociclador
- Cámara Electroforesis



PROCOLO PCR Hongos LBBM

Mezcla de Reacción: (MIX)

Buffer 10X ----- 5 μ L
Oligo ITS1 (10 μ M) ----- 2 μ L
Oligo ITS4 (10 μ M) ----- 2 μ L
dNTP (10mM) ----- 1 μ L
MgCl₂ (25mM) ----- 3 μ L
Paq (5U/ μ L) ----- 0,3 μ L

DNA molde ----- 5 μ L

H₂O-MQ

Llevar todo a un volumen final de 50 μ L, completando con H₂O-MQ

Ejemplo: 13,3 μ L (MIX)+ 5 μ L (DNA molde)+ 31.7 μ L H₂OMQ / Vol. total=50 μ L

Programa de amplificación: Termociclador

Programa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94°C	5 minutos	1
Amplificación	95°C	30 segundos	45
	59°C	30 segundos	
	72°C	45 segundos	
Extensión Final	72°C	10 minutos	1
Enfriamiento	4°C	∞	1



Referencias

Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I). Amelia Cornejo Romero, Alejandra Serrato Díaz, Beatriz Rendón Aguilar, Martha Graciela Rocha Munive (compiladoras).

Rodríguez, Ana Soledad Sandoval, et al. "Reacción en cadena de la polimerasa." Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud, 2e Eds. Adriana María Salazar Montes, et al. McGraw Hill, 2016, <https://accessmedicina-mhmedical-com.bibliotecadigital.uv.cl/content.aspx?bookid=1803§ionid=124156025>.

Protocolo (PCR) para Hongos de Pudrición de Maderas. Laboratorio Biodeterioro y Biodegradación de Materiales (BBM). Laboratorio Docencia. Escuela de Ingeniería Construcción Civil. Facultad de Ingeniería. Universidad de Valparaíso.

9.1.2 Protocolo Electroforesis



LABORATORIO BIODETERIORO Y BIODEGRADACIÓN DE MATERIALES (BBM). EXTRACCIÓN DNA

Encargado Laboratorio BBM: Manuel Ortiz.

Universidad de Valparaíso

Objetivo:

EXTRACCIÓN DNA DE MICELIO DE HONGOS

Objetivo General:

Comprobación integridad extracción del ADN por electroforesis

Objetivos Específicos:

- Preparar gel de agarosa
- Cargar muestras en cámara de electroforesis
- Visualización del gel con luz ultravioleta y análisis de resultados de la extracción del DNA

INTRODUCCIÓN

La electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida es una de las metodologías más utilizadas en el laboratorio en todo lo relacionado con el trabajo con ácidos nucleicos. Mediante la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de ésta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza. Podemos además extraer del gel los fragmentos de ADN que sean de interés, para posteriormente utilizarlos en diferentes aplicaciones. La electroforesis de ADN fue, y sigue siendo, una herramienta de importancia primordial en el desarrollo de las técnicas del ADN recombinante o ingeniería genética.

Electroforesis de ADN en Gel de Agarosa

La agarosa es un polímero lineal compuesto de residuos alternantes de D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa unidos por enlaces glucosídicos $\alpha(1-3)$ y $\beta(1-4)$. Las cadenas del polímero de agarosa forman fibras helicoidales, que al solidificar forma una malla tridimensional de canales con diámetros entre 50 y >200 nm (Kirkpatrick 1990). Existen diferentes tipos de agarosa que se clasifican en función de la temperatura a la que se disuelven y solidifican. Las agarosas estándar se disuelven en el buffer a una temperatura de 90-95°C y solidifican a 35-45°C. Las agarosas de bajo punto de fusión se disuelven a unos 65°C y solidifican a 30-35°C. Existen además otros tipos, como las agarosas de alta fuerza de gel o las de baja viscosidad, que permiten respectivamente una mejor separación y un rango inferior del tamaño de las moléculas a separar. La concentración (p/v) de la agarosa es un parámetro de gran importancia pues determina el rango de tamaños en los que obtendremos una buena separación de los fragmentos de ADN. El gel se obtiene disolviendo la agarosa en un buffer de TAE o TBE y se funde usando un microondas, hasta obtener una solución homogénea y transparente. La disolución se vacía en un molde y se coloca un peine (el peine forma unos pozos donde se depositan las muestras). Se deja enfriar para polimerizar para formar una matriz porosa variando el tamaño del poro según la concentración de agarosa



contenida en la disolución. Además, la migración de los fragmentos de ADN variarán dependiendo del tamaño, conformación molecular (lineal, circular, superenrollado), concentración de la agarosa en el gel, voltaje, dirección del campo eléctrico, presencia de colorantes añadidos que se intercalan en el ADN (como el bromuro de etidio y SYBR-green, Gelred) y de la composición del buffer en el gel.

Cuando el ADN se deposita en los pozos del gel debe mezclarse con un buffer de carga, este permite:

- 1) aumentar la densidad de la muestra para depositarse en el fondo del pozo
- 2) teñir la muestra para facilitar su carga dentro del gel
- 3) identificar la distancia recorrida por las muestras

Etapas de la técnica:

- a) Obtención de las muestras de ADN
- b) Preparación del gel de agarosa
- c) Preparación buffer electroforesis TAE 0.5X
- d) Cargar las muestras en gel
- e) Corrida del gel
- f) Visualización del gel con luz ultravioleta y análisis de resultados

TRABAJO PRACTICO LABORATORIO (BBM)

Procedimiento Electroforesis Laboratorio (BBM)

Para preparar un gel de agarosa al 1% se debe pesar 1g de agarosa y este se disuelve en 100 mL de buffer TAE 0.5 X. Caliente la mezcla contenida en una botella de borosilicato o matraz, en una placa magnética hasta lograr una mezcla homogénea. NOTA: evite la ebullición violenta de la mezcla. Agregar tinción Gelred (GelRed- es un tinte de ácido nucleico fluorescente sensible, estable y ambientalmente seguro diseñado para reemplazar el bromuro de etidio (EtBr) altamente tóxico para teñir dsDNA, ssDNA o RNA en geles de agarosa o geles de poliacrilamida. GelRed- y EtBr tienen prácticamente los mismos espectros, por lo que puede reemplazar directamente EtBr con GelRed- sin cambiar su sistema de imagen existente. Además, GelRed- es mucho más sensible que EtBr). Agregar 6 a 8 ul de gelred al gel de agarosa, se puede agregar mientras la solución de gel aún está caliente. Posteriormente vacíe con mucho cuidado la mezcla caliente de agarosa/buffer evitando hacer burbujas y coloque un peine en un extremo de la bandeja de la cámara. Se deja enfriar hasta que polimeriza el gel. Se colocan 10 µL de muestras de la extracción del ADN en cada pocillo con buffer de carga. Se corre el gel a 90 volts por una hora. **NOTA: el tiempo y el voltaje**

requerirán de una estandarización. Se retira el gel y se procede a su Visualización en un transiluminador con luz ultravioleta estándar a 260-280 nm para su análisis de resultados de la extracción del DNA.

Figura. Procedimiento Gel agarosa. Imagen: Albero Checa.

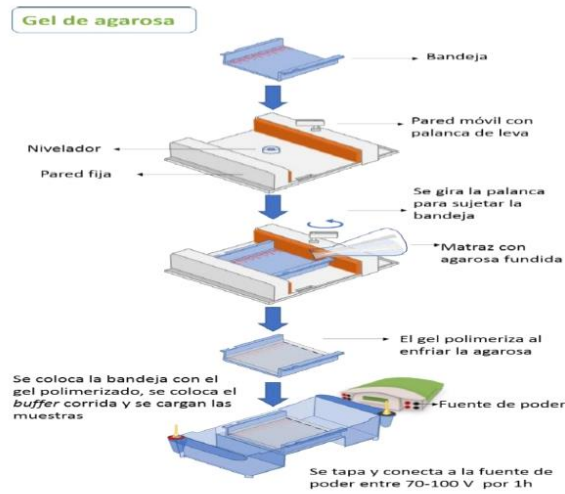
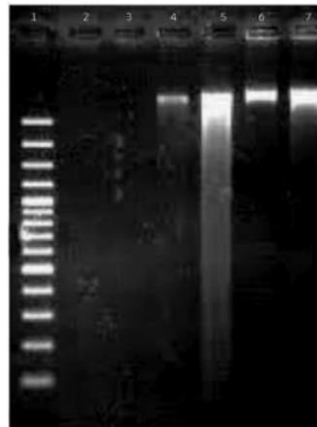


Figura. Gel de agarosa para visualizar la integridad del ADN. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 y 3 vacíos, carril 4 y 7 muestras con poca fragmentación, carril 5 muestra fragmentada, carril 6 muestra íntegra.





Materiales

- Botella borosilicato de 100ml
- Vaso precipitado de 100ml
- Micropipetas
- Placa orbital magnética
- Cámara de electroforesis horizontal
- Guantes de látex
- Balanza analítica

Reactivos

- Agarosa
- Buffer TAE 0.5X
- Buffer de Carga
- Marcador de DNA de 100pb
- Gelred

Referencias

Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I). Amelia Cornejo Romero, Alejandra Serrato Díaz, Beatriz Rendón Aguilar, Martha Graciela Rocha Munive (compiladoras)

Alberto Checa Rojas. (2017). Método: Gel de electroforesis Agarosa. 2022, Octubre 21, Conogasi.org Sitio web: <https://conogasi.org/articulos/metodo-gel-de-electroforesis-agarosa/>

Protocolo Extracción DNA. Laboratorio Biodeterioro y Biodegradación Materiales (BMM) Laboratorio Docencia. Escuela de Ingeniería en Construcción Civil. Universidad de Valparaíso

9.1.3 Protocolo de extracción de ADN genómico – HMA

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA ACIDOS NUCLEICO. EXTRACCION DNA GENÓMICO

Hongos Micorrícicos

Extracción del ADN

Un buen método de extracción debe mantener la integridad física y bioquímica del ADN e incrementar sus rangos de pureza y concentración (Sambrook et al. 2001). A continuación, se presenta el protocolo utilizado para esta tesis, propuesto por Miranda y Sandoval (2000), con modificaciones (P. Rocha, Cenipalma 2005). Se incluyeron otras modificaciones utilizadas en un protocolo de extracción de ácidos nucleicos para semillas y tejido vegetal (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, México 2017) y de Marcadores Moleculares y Extracción DNA (Velasco, 2005).

Antes de comenzar, se recomienda precalentar el buffer de lisis (2% de CTAB, 1% de PVP, 50mM EDTA pH 8.0, 100mM Tris base pH 8.0, 500mM de NaCl) a 65°C, en un baño termoregulado.

1. Colocar 50 a 100mg de hongo en tubo eppendorf 1,5ml, previamente molido en un mortero hasta obtener un polvo.
2. Adicionar sobre ella 800ul del buffer de lisis previamente precalentado. Homogenizar un par de veces antes de que descongele completamente.
3. Homogenizar e incubar a 90 C° por 20 minutos en un baño termoregulado, mezclar por vortex a los 10 minutos durante el proceso.
4. Posteriormente sacar las muestras y adicionar 100ul de CTAB al 10%, homogenizar e incubar por 20 minutos más a 65C° en baño termoregulado.
5. Transcurrido ese tiempo se permite que la muestra se enfríe a temperatura ambiente. Adicionar 0.5 volúmenes de la mezcla previamente enfriada de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1v/v), homogenizar y centrifugar a 13,000 rpm por 15 minutos.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y agregar 100ul de acetato de sodio 3M (pH 5.2), 0.5 volúmenes de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1v/v), homogenizar y centrifugar a 13,000rpm por 15 minutos a temperatura ambiente.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y Adicionar 640 ul de isopropanol frío y mezclar e incubar a -20C° por 2 horas
8. Transcurrido el tiempo de incubación, centrifugar a 13000 rpm por 21 minutos a temperatura ambiente.
9. Eliminar todo el líquido y preservar el precipitado, agregar 350ul de Alcohol absoluto al 70 % y centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos.
10. Eliminar todo el sobrenadante tratando de no sacar el pellet(precipitado). Posteriormente Secar el pellet a 60°C en un termoblock por 10 minutos a 38C°
11. Una vez seco el tubo re-suspender el pellet(precipitado) en 50 µL H2O-MQ. Conservar.

Referencias bibliográficas

G. Shafiqua and R, 2013. Stephan. Molecular detection of Arbuscular mycorrhizal fungi in calcareous soil and roots of Zea mays L. Dept. of Biotechnology, VMKV Engineering College, Vinayaka Missions University, Salem, TN, India 2Dept. of Botany, Government Arts College, Ariyalur, TN, India. J. Acad. Indus. Res. Vol. 1(9).

Miranda, E., y Sandoval, L. 2000. Desarrollo de un método rápido y sencillo para el aislamiento de DNA de especies fúngicas que afectan el arroz y el tabaco. *Fitosanidad* vol. 4, no. 1-2, marzo-junio. 107- 108 p.

Rocha, P. 2005. Cenipalma. Comunicación personal. Bogotá.

Sambrook, J.; Russell, D.; 2001. *Molecular Cloning*, 3rd ed. Cold Spring Harbor laboratory, New York.
Scott O. Rogers & Arnold J. Bendich. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology* 5: 69-76, 1985.

Velasco, R. 2005. Marcadores Moleculares y la Extracción de ADN. Grupo de Investigación ASUBAGROIN Facultad Ciencias Agropecuarias. Vol3 N°1, Unicauca.14-18p.

Protocolo de Extracción de DNA y RNA a partir de Semillas y Hojas. Dirección General de Sanidad Vegetal. Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria Área de Desarrollo y Validación de Protocolos. SAGARPA. México, 2017.

9.2 ANEXO 2

9.2.1 Registros fotográficos de la recolección de muestras





