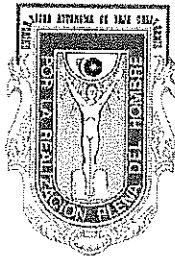


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



CARACTERIZACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD FÚNGICA DE
ECOSISTEMAS ÁRIDOS DE BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

ADRIANA LUCÍA ROMERO OLIVARES

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. DICIEMBRE 2010

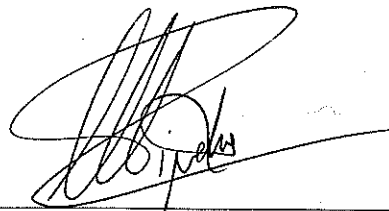
RESUMEN

“Caracterización de la biodiversidad fúngica de ecosistemas áridos de Baja California, México”

Los hongos del suelo poseen un papel crucial en el funcionamiento de los ecosistemas. Están involucrados en procesos primarios tales como reciclado de nutrientes y degradación de materia orgánica. Además pueden existir en cualquier tipo de ambiente, incluyendo los ecosistemas áridos. Estos ecosistemas, dependiendo del tipo de sustrato que presenten, son muy ricos en microhábitats y es ahí donde se dan las condiciones óptimas para el desarrollo de hongos. Debido a que sólo una pequeña fracción de los hongos presentes en la tierra son cultivables y una fracción aún más pequeña desarrolla cuerpos fructíferos, las técnicas convencionales de identificación arrojan información limitada de la composición y dinámica de las comunidades de hongos en el suelo. Actualmente, la extracción y amplificación de ADN directamente de muestras del suelo han permitido caracterizar la biodiversidad fúngica sin utilizar medios de cultivo ni observación de cuerpos fructíferos. La región blanco en estudios de biodiversidad es el ITS (espaciador interno transcripcional) del ADN ribosomal (ADNr), ya que posee secuencias altamente variables, no codificantes, que acumula mutaciones neutrales, adecuado para discernir entre especies de hongos cercanamente relacionadas. Debido a que Baja California posee zonas áridas en más del 50% de su territorio y que la biodiversidad fúngica del suelo es desconocida, se procedió a caracterizar la biodiversidad fúngica de ecosistemas áridos de Baja California, tomando muestras del suelo de ecosistemas áridos bien representados a lo largo del estado con distintas características climáticas. Se extrajo ADN genómico de la tierra y se amplificó la región ITS por PCR anidada utilizando cebadores específicos para el subreino Dikarya. Se obtuvieron amplicones de interés en todas las localidades muestreadas. Estos amplicones fueron clonados en un plásmido y propagadas en bacterias con el fin de construir una genoteca. Las

colonias positivas fueron seleccionadas para extraer los plásmidos y diferenciar las secuencias ITS utilizando análisis de patrones de restricción para posteriormente enviar a secuenciar una muestra representante por cada patrón de restricción. Los patrones de restricción y los filotipos obtenidos fueron utilizados para determinar índices de diversidad, así como para determinar filotipos por patrón y observar el parentesco de los filotipos por medio de la construcción de un árbol filogenético. Los resultados obtenidos indicaron que la metodología utilizada presenta sesgos, por lo que la biodiversidad fúngica de Baja California seguramente está siendo subestimada. Aún así los resultados mostraron que la biodiversidad de los ecosistemas áridos del estado es mucho más amplia que la descrita en anteriormente, que estaba basada en la observaciones de cuerpos fructíferos. Asimismo se observó que la diversidad fúngica muestra patrones de distribución geográfica similares a los descritos en organismos superiores (p.e. plantas), por lo menos para el estado de Baja California, habiendo filotipos distintos para el mismo ecosistema al norte y sur del estado, así como filotipos únicos para localidades con características climáticas muy exclusivas y filotipos de transición entre ecosistemas áridos mediterráneos y desérticos. Por lo anterior se concluyó que los hongos se distribuyen dependiendo de las características climáticas y biogeográficas de las localidades muestreadas.

Aprobado por:



Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Directora de tesis

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD FÚNGICA DE
ECOSISTEMAS ÁRIDOS DE BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

ADRIANA LUCÍA ROMERO OLIVARES

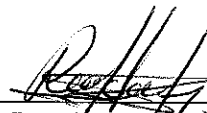
Aprobada por:



Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Presidente del jurado



Dr. Faustino Camarena Rosales
Sinodal



Dra. Rufina Hernández Martínez
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Adriana y Ramón Oscar, por su esfuerzo para sacarme a mí y a mis hermanos adelante.

A mi mamá, mi mejor amiga. Porque gracias a tus consejos a lo largo de toda mi vida y especialmente en estos últimos años, me has enseñado a valorar todo lo que tengo y a esforzarme por conseguir lo que me he propuesto. Gracias porque constantemente me recuerdas lo afortunada que soy por tener todas las oportunidades que se me han presentado y porque me ayudas a mantener los pies en la tierra y centrarme en las cosas realmente importantes en la vida. Porque con tus palabras compones mis días y con tu gran serenidad me recuerdas que hay que vivir solo por hoy.

A mi papá, por ser la mayor influencia en mi vida. Porque me has enseñado a pensar y cuestionar. Porque lo que otros ven como defectos de carácter yo los veo como cualidades, porque me veo reflejada en ti y me encanta.

A mis hermanos, Ramón Oscar y Pedro Alberto, por alegrar mi vida desde el día en que nacieron.

A mi compañero en este camino, Jovani. Porque con tu hermosa simpatía y tu inagotable paciencia haces de mis días, los mejores. Porque has estado para mí en todo momento, porque eres mi amigo, mi maestro, mi colega y sobre todo mi gran amor. Yo también estoy para ti, siempre.

A mis abuelos, María Esthela y Oscar, así como a mi tío Pepe, mi más grande ejemplo de vida. A mi Tía Isabel y a mis tías Olivares: Sandra, Clara, Azu, Laura, Paty y Lucía, porque siempre han estado al pendiente de mí. Al resto de mi familia Romero y Olivares.

A la Dra. Meritxell. Gracias por adoptarme e integrarme dentro de su equipo de trabajo. Por su tiempo y apoyo a lo largo de toda la tesis, por su amistad y sobre todo su confianza en mí. Es un gran ejemplo a seguir.

A Raúl por involucrarme en el proyecto y enseñarme las maravillas de la ecología microbiana. Por el tiempo que me has dedicado y porque a pesar de la distancia siempre has estado ahí para apoyarme.

A mi sinodal, la Dra. Rufina. Gracias por su apoyo en los momentos difíciles, sus palabras me alentaron más de lo que se imagina. Por sus valiosos comentarios al revisar mi tesis y sobretodo su enorme disponibilidad para ayudarme ante cualquier obstáculo que se me presentó.

A mi sinodal, el Dr. Faustino, por sus observaciones y comentarios desde el principio hasta el final de mi tesis.

A mis amigos, Silvia, Fini, Celia, Iliana, Erika, Luis, Daniel, Ariel y Susana, porque a pesar del tiempo y la distancia nuestra amistad sigue intacta.

A mi amiga y compañera de laboratorio Roxy, por todo el apoyo que me dio durante la elaboración de mi tesis. Por los desayunos, comida y nachos reconfortantes y sobre todo por escucharme y darme ánimos siempre.

A Olga y Eddy, por siempre darse tiempo para responder mis preguntas y por su enorme disponibilidad para ayudarme.

A todo el departamento de microbiología del CICESE, especialmente a mis compañeros de laboratorio: Lisandro, Ana Lucía, Leonora, Cynthia, Mario, Ramón, Diego, Rosy, Rosita, Naidy e Isa y al técnico Guillermo.

A mis compañeras de posgrado: Michelle, Ana y Cynthia.

Al laboratorio de Ecología Molecular de la UABC especialmente al Dr. Luis Enriquez, por su apoyo en cuanto a material y equipo.

A Angélica, la secretaria de posgrado, por su impresionante agilidad y rapidez siempre, que hizo que todos los trámites fueran muy sencillos.

A mis profesores del posgrado de Ecología molecular y biotecnología.

Al CONACyT, por la beca que me otorgo durante los dos años de maestría, así como a SEMARNAT fondo sectorial de investigación ambiental, por el apoyo y material para la elaboración de mi tesis.

A mi lindo país, México.

***“The Earth is a microbial planet,
on which macroorganisms
are recent additions”***

Mark Wheelis

INDICE

Capítulo I	Pág.
1. Introducción	1
1.1 Planteamiento del problema	1
1.2 Antecedentes	9
1.2.1 El ADN ribosomal como blanco taxonómico	9
1.2.2 Taxonomía de hongos	10
1.2.3 Estudio de hongos en muestras ambientales	12
1.2.4 La región ITS como blanco para el estudio de hongos de suelo	16
1.2.5 Métodos para la identificación de secuencias pertenecien- tes a hongos "sin cultivar"	19
1.2.6 Análisis de datos para caracterizar comunidades fúngicas	21
1.2.7 Biodiversidad fúngica de Baja California	24
1.3 Justificación	25
1.4 Hipótesis	26
1.5 Objetivo	26
1.5.1 Objetivo general	26
1.5.2 Objetivos particulares	26

Capítulo II

2. Métodos	27
2.1 Descripción del área de estudio	27
2.1.1 Sitios de muestreo	27
2.2 Metodología	32
2.2.1 Recolección de muestras	32
2.2.2 Extracción de ADN genómico de las muestras de suelo	40
2.2.3 Presencia y cuantificación de ADN	40
2.2.4 Amplificación de secuencias ITS de hongos	41
2.2.5 Purificación de secuencias ITS	46
2.2.6 Clonación de los productos de PCR	47
2.2.7 Transformación por shock térmico	48
2.2.8 Análisis de los transformantes	48
2.2.9 PCR de colonia	49
2.2.10 Conformación de la genoteca	50
2.2.11 Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina	51
2.2.12 Resguardo de bacterias en glicerol	52
2.2.13 Análisis de restricción para diferenciación de secuencias ...	52
2.2.14 Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina para se – cuenciar	54
2.2.15 Secuenciación y análisis de secuencias	55
2.2.16 Construcción de árbol filogenético	56

2.2.17 Caracterización de los patrones de restricción	56
2.2.18 Estimación de diversidad de filotipos	57
Capítulo III	
3. Resultados	58
3.1 Extracciones de ADN genómico de muestras de tierra	58
3.2 PCR de secuencias ITS de hongos del subreino Dikarya	61
3.3 Selección de transformantes, PCR de colonia y análisis de restricción	62
3.4 Análisis bioinformático de secuencias ITS	70
3.5 Estimación de biodiversidad de filotipos	81
Capítulo IV	
4. Discusión	82
Capítulo V	
5. Conclusiones	100
6. Referencias	102
7. Apéndice	117
7.1 Patrones de restricción	117
7.2 Índice de diversidad de Shannon	124
7.3 Reactivos y soluciones	127

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Coordenadas geográficas de los puntos de muestreo en la localidad de la Salada	Pág. 35
Tabla II. Coordenadas geográficas de los puntos de muestreo en la localidad de Valle de las Palmas	36
Tabla III. Coordenadas geográficas de los puntos de muestreo en Santa Catarina	37
Tabla IV. Coordenadas geográficas de los puntos de muestreo en El Rosario .	38
Tabla V. Coordenadas geográficas de los puntos de muestreo en Cataviña	39
Tabla VI. Indicador de concentración de ADN utilizando el marcador de peso molecular de ADN del fago lambda digerido con EcoRI y HindIII	46
Tabla VII. Número de colonias resultantes de cada transformación, así como número de colonias seleccionadas y verificadas como positivas por PCR de colonia	63
Tabla VIII. Número de restricciones, así como de patrones de bandas distintas de cada localidad resultado de los RFLPs	65
Tabla IX. Filotipo al que pertenece cada secuencia, con su respectivo valor de E, así como el porcentaje de la máxima identidad, el porcentaje de cobertura y el número de veces que se repite el mismo patrón de bandas por muestra en los RFLPs	75
Tabla X. Valores de H del índice de Shannon de cada una de las localidades	81

LISTA DE FIGURAS	Pág.
Figura 1. Mapa de climas de Baja California	2
Figura 2. Repeticiones en tándem que conforman el ADNr	9
Figura 3. Árbol filogenético del reino Fungi	12
Figura 4. Principales tipos de ecosistemas según la vegetación de Baja California	28
Figura 5. Imagen de los puntos de muestreo en La Salada	35
Figura 6. Imagen de los puntos de muestreo en el Valle de las Palmas	36
Figura 7. Imagen de los puntos de muestreo en Santa Catarina	37
Figura 8. Imagen de los puntos de muestreo en El Rosario	38
Figura 9. Imagen de los puntos de muestreo en Cataviña	39
Figura 10. Localización de los cebadores específicos para el subreino Dikarya en el genoma fúngico del ADNr	42
Figura 11. Secuencia seguida al procesar las muestras de ADN de cada una de las localidades para la obtención de los amplicones ITS para clonar.....	44
Figura 12. Electroforesis para la observación de ADN genómico total resultado de las extracciones de ADN del suelo de las distintas localidades ..	58
Figura 13. Concentración de ADN en nanogramos por microlitro de cada una de las muestras de las extracciones de ADN genómico total de tierra de cada localidad	60
Figura 14. Electroforesis para la observación de los productos obtenidos por PCR anidada de cada localidad	62

Figura 15. Electroforesis de los productos obtenidos en la PCR de colonia ...	63
Figura 16. Electroforesis para observar el ADN obtenido en la extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina de 14 colonias positivas de la localidad de Cataviña	64
Figura 17. Esquema de los patrones de restricción obtenidos con la enzima RsaI de los plásmidos de la localidad de La Salada	65
Figura 18. Esquema de los patrones de restricción obtenidos con la enzima RsaI de los plásmidos de la localidad de Valle de las Palmas	66
Figura 19. Esquema de los patrones de restricción obtenidos con la enzima RsaI de los plásmidos de la localidad de Santa Catarina	67
Figura 20. Esquema de los patrones de restricción obtenidos con la enzima RsaI de los plásmidos de la localidad de El Rosario	68
Figura 21. Esquema de los patrones de restricción obtenidos con la enzima RsaI de los plásmidos de la localidad de Cataviña	69
Figura 22. Imagen con los patrones de restricción distintos obtenidos con la enzima EcoRI	70
Figura 23. Árbol filogenético "neighbor-joining" con 500 réplicas condensado (valores > 50) con el nombre del hit con menor valor de E y mayor porcentaje de identidad de las muestras a las cuales se les sometió a BLAST, así como la clave del patrón de restricción que le corresponde	79

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema

La microbiota conformada por los microorganismos del suelo representa una fracción considerable de la biomasa viva del planeta (Fierer et al, 2007). Se estima que en la tierra, hay cerca de 10^4 kg de biomasa microbiana por hectárea en suelos superficiales (Brady, 2002). Esta biomasa posee un papel crucial en el funcionamiento de los ecosistemas ya que está involucrada en procesos, tales como, el reciclaje de nutrientes, la descomposición de materia orgánica y la fijación de nitrógeno, entre otros (Valinsky et al, 2002). A pesar de su importancia, se conoce muy poco acerca de la distribución de la microbiota y su relación con el resto de los componentes de los ecosistemas que habitan (Fierer et al, 2007).

Gran parte de estos microorganismos son ubicuos ya que poseen distribución cosmopolita (Perry et al, 2003). Pueden existir bajo cualquier condición ambiental, incluyendo ecosistemas extremos, como las zonas áridas. Éstas se distinguen por la escasez de lluvia, presentando precipitaciones anuales que no sobrepasan los 254 mm de agua (Bhatnagar y Bhatnagar, 2005).

Baja California posee ecosistemas áridos en más del 50% de su territorio, en los cuales la precipitación anual es de 100 a 200 mm de agua (INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía, México) (Figura 1).

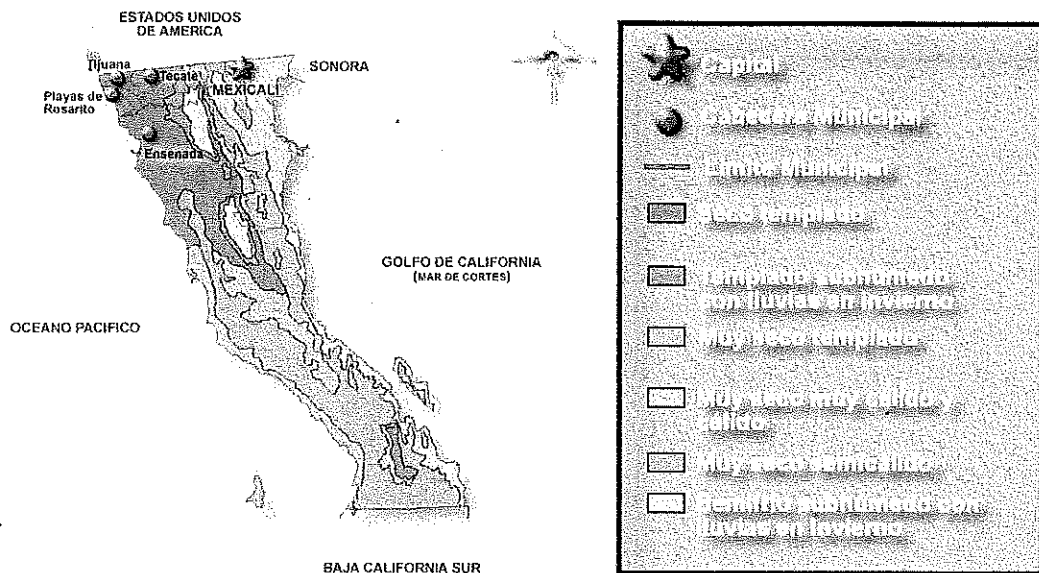


Figura 1. Mapa de climas de Baja California. Modificado del Instituto Nacional de Estadística y Geografía¹

Basándose en el tipo de vegetación, fisiografía y climatología, se estableció que en Baja California se pueden encontrar cinco ecosistemas distintos (Delgadillo, 1990), de los cuales, cuatro son considerados como áridos según la clasificación del INEGI. Estos ecosistemas son: “chaparral”, “matorral desértico”, “matorral costero” y “marismas y dunas costeras”. Por la precipitación y altas temperaturas, las zonas áridas de Baja California se asemejan al desierto del Sahara en África, que es considerado uno de los más áridos del mundo (Goodall y Perry, 1979).

Los ecosistemas áridos aparentan poseer poca biodiversidad debido a la falta de agua, la cual limita las actividades biológicas. Sin embargo, existe una

¹ www.inegi.gob.mx

gran cantidad de microhábitats ocupados por microorganismos; es ahí, donde éstos desarrollan sus ciclos vitales (Mueller, 2004). Los microhábitats se forman por la yuxtaposición de agregados de suelo y los espacios de aire que quedan entre agregados. Los microorganismos tienden a adherirse a la superficie de dichos agregados (Daniel, 2005) y es ahí donde se dan las condiciones adecuadas para su crecimiento y desarrollo, gracias a la presencia de humedad, nutrientes y materia orgánica en descomposición². Por lo tanto, la presencia de microhábitats en un ecosistema depende del tipo de suelo y del tamaño de agregados que los conforma (Daniel, 2005). Los ecosistemas áridos en su mayoría poseen suelos formados por grandes partículas como arenas y gravas³. Estas partículas forman agregados de gran tamaño unidos por hifas y compuestos orgánicos, que a su vez, producen un suelo poco compacto repleto de espacios vacíos, donde se dan las condiciones óptimas para el desarrollo de microhábitats, ya que permite el filtrado de agua al subsuelo y por lo tanto la retención de humedad y precipitación de nutrientes². Cada microhábitat posee características específicas, por lo que los microorganismos que lo habitan han adaptado su metabolismo para poder sobrellevar las condiciones ambientales que soportan. Por lo anterior, existen microorganismos altamente tolerantes, con metabolismos especializados y eso aumenta las probabilidades de especiación simpátrica dentro de una misma zona (Binga et al, 2008). Por lo mismo, la bioprospección de microorganismos de ecosistemas extremos, incluidos los áridos, ha experimentado

² <http://www.soilhealth.com>

³ <http://www.ucmp.berkeley.edu>

un gran auge en los últimos años y se han identificado microorganismos que poseen genes que codifican para enzimas que actualmente son utilizadas en la industria farmacéutica y biotecnológica (Binga et al, 2008; Satyanarayana, 2005;).

Se ha comprobado que la microbiota es la encargada de mantener la integridad de los ecosistemas (Whitford, 1996), debido a que está involucrada en todos los ciclos biogeoquímicos y es la encargada de la formación de nuevo suelo, así como de mantener la permeabilidad del sustrato y proporcionar características de paisaje (Bhatnagar y Bhatnagar, 2005). A pesar de su importancia ecológica y sus repercusiones médicas e industriales, la biodiversidad de la microbiota ha sido la menos explorada en el mundo (Satyanarayana, 2005).

De la microbiota del suelo, la biodiversidad procariota ha sido la más estudiada en suelos alrededor del mundo (Fierer et al, 2008; Hartmann y Widmer, 2006; Bhatnagar y Bhatnagar, 2005; Rainey et al 2005). Mientras que, la biodiversidad eucariota, específicamente la del reino Fungi, permanece aún escasamente estudiada a pesar de que se sabe, que en ecosistemas desérticos la biomasa microbiana está dominada por hongos (Jeewon, y Hyde, 2007; Borneman y Hartin, 2000) y que la estabilidad a largo plazo de los ecosistemas, depende en gran parte, de las actividades llevadas a cabo por ellos (Cannon, 1999). Los hongos en ecosistemas áridos, han sido en la mayoría de los casos ignorados, a pesar de que se ha sugerido que la riqueza fúngica, específicamente las micorrizas, influyen la biodiversidad de flora en un ecosistema (van der Heijden

et al, 1998) y que estimulan y mantienen el proceso de crecimiento en plantas liberando nutrientes y otras moléculas (Liesack y Stackebrandt, 1992). A la vez, se ha comprobado que un suelo no impactado posee una comunidad de hongos bien desarrollada y se cree que ésta, está directamente relacionada con la supresión del desarrollo de hongos patógenos para plantas y humanos (Alabouvette, 1990). En el ecosistema existen actividades que son prácticamente exclusivas de hongos, p.e. la descomposición completa de la lignina, la ruptura de moléculas complejas como la celulosa y los taninos (Cannon, 1999), la producción de resinas que mantienen unidos los agregados de suelo (Bhatnagar y Bhatnagar 2005) y el ser alimento para muchos invertebrados (Shaw, 1992). Por otro lado, de los escasos estudios en hongos, la mayoría están enfocados a micorrizas y hongos patógenos de humanos y plantas ya conocidos, dejando a un lado a los hongos degradadores de materia orgánica los cuales poseen importantes funciones en los ecosistemas (Ryberg, 2009). Se ha sugerido que la pérdida de una sola especie fúngica en un ecosistema podría tener repercusiones ecológicas a macro escala especialmente debido a la reacción en cadena que llevaría a la interrupción de interacciones entre organismos. De hecho, se ha sugerido que los perfiles de la comunidad fúngica se modifican significativamente en respuesta a mínimas perturbaciones en el ambiente (Jones, 1998).

Se estima que existen cerca de 1.5 millones de especies fúngicas de las cuales solo se han descrito menos del 5% (Hawksworth y Rossman, 1997) y se cree que ésta cifra aún subestima la verdadera cantidad de especies fúngicas en

el mundo (Persoh y Rambold, 2003). La principal causa de la falta de información en la caracterización de la diversidad fúngica, ha sido la dependencia de técnicas basadas en medios de cultivo, a pesar de que la proporción de organismos cultivables representa únicamente del 0.1-10% de los microorganismos que en realidad habitan en el ecosistema estudiado (Head et al, 1998). Esto se debe a que el sustrato en el que se desarrollan los hongos es muy específico para cada especie, por lo que un medio de cultivo universal no ha funcionado para obtener una perspectiva real de los hongos que habitan en una muestra de suelo (Leger et al, 2000). Asimismo, de los organismos cultivables, se han descrito varias especies crípticas, haciendo más complicada la identificación basada en la morfología y subestimando aún más la riqueza de un ecosistema (O'Donnell et al, 2004; Hibbett y Donoghue, 1996). Por si fuera poco, utilizando medios de cultivo habitualmente se pasan por alto hongos de lento crecimiento y aquellos que no esporulan en el medio de cultivo, aislando únicamente los hongos más comunes y abundantes llamados "generalistas", como lo son algunos miembros de los géneros *Fusarium* y *Trichoderma* (Jeewon y Hyde, 2007).

Actualmente, el estudio de la biodiversidad microbiana ha progresado ampliamente gracias al manejo de herramientas moleculares (Head et al, 1998). La obtención de secuencias de ADN directamente de muestras ambientales ha provisto el medio para caracterizar microorganismos sin la necesidad de cultivarlos (comúnmente llamados microorganismos "sin cultivar") (Kowalchuck, 1999). La aplicación de estos métodos moleculares ha llevado a un mejor conocimiento en el

campo de la ecología microbiana y ha revelado la existencia de microorganismos anteriormente desconocidos (Liesack y Stackebrandt, 1992). Además, ha proporcionado una visión más amplia y realística de la riqueza y distribución de microorganismos en un ecosistema (Smit et al, 1999). En la actualidad, muchos organismos que sólo son conocidos por su secuencia de ADN son considerados muy importantes para ciertos ecosistemas, debido a las funciones muy específicas que se cree que llevan a cabo (Head et al, 1997). Las muestras de suelo, aunque difíciles de procesar debido a su alto contenido de ácidos húmicos que inhiben algunas reacciones moleculares (Schneegurt et al, 2003) y su complejidad en sí (O'Brien et al, 2005), han sido comúnmente utilizadas para la caracterización de la diversidad microbiana de un ecosistema (Mueller y Schmit, 2007), ya que éstas probablemente contienen la más amplia diversidad de microorganismos que cualquier otro ambiente muestreado en el planeta (Daniel, 2005). Para el caso de hongos, se estima que en una sola muestra de suelo pueden encontrarse de 100 a 1000 especies distintas, dependiendo del ecosistema muestreado (O' Brien et al, 2005). En biomas desérticos de Norteamérica se han aislado cerca de 288 especies de 87 géneros distintos de hongos (Buchan et al, 2002).

El ADN ribosomal (ADNr) ha sido utilizado como blanco taxonómico desde mediados de los años ochenta (Head et al, 1998). Para analizar la biodiversidad fúngica, a nivel de género y especie, ha resultado adecuado la amplificación de la región del espaciador interno transcripcional (ITS) del ADNr (Lai et al, 2007). Las técnicas moleculares mencionadas han complementado numerosos trabajos en

ecología microbiana que tenían como base los medios de cultivo y han cambiado la idea que se tenía de las comunidades microbianas (Reysenbach et al, 1992).

Una evaluación precisa de la composición de la biodiversidad fúngica permitiría caracterizar patrones espaciales y temporales de diversidad así como respuestas a los cambios ambientales (Bent y Forney, 2008). Pero para entender cómo funciona un ecosistema primero se debe identificar a sus integrantes (López-García y Moreira, 2008). Por lo tanto, caracterizar la biodiversidad fúngica de un ecosistema es el primer paso y la base para futuros proyectos que a largo plazo podrían contestar una gran cantidad de preguntas, por ejemplo: ¿Cuál es el rol evolutivo de los hongos en los ecosistemas actuales?, ¿Está involucrada la biodiversidad fúngica en la resiliencia a los impactos ambientales provocados por el hombre?, ¿Qué correlaciones evolutivas se pueden haber dado entre hongos - plantas y hongos - animales? A su vez se pueden interpretar patrones biogeográficos y distribución de microorganismos patógenos. Se pueden encontrar especies de interés para bioprospección y utilizar la composición taxonómica de un ecosistema como un indicador de su funcionamiento. Por si fuera poco, conocer las especies que componen la comunidad fúngica, contribuye a la caracterización global de la comunidad microbiana de un ecosistema. Por lo tanto, el objetivo de éste trabajo fue caracterizar la biodiversidad fúngica del suelo de ecosistemas áridos de Baja California con el fin de ampliar el conocimiento de la comunidad microbiana de dicha zona y establecer una pauta para futuros estudios de ecología microbiana en la localidad.

1.2 Antecedentes

1.2.1 El ADN ribosomal como blanco taxonómico

En Eucariotas, el ADNr codifica para el ARNr (ARN ribosomal) que conforma, junto con varias proteínas, a los ribosomas. Éstos son organelos intracelulares encargados de sintetizar polipéptidos (Lodish et al, 2003). El ADNr consiste en repeticiones en tándem de secuencias compuestas por la región NTS (por sus siglas en inglés para Espaciador No Transcripcional), la región ETS (por sus siglas en inglés para Espaciador Externo Transcripcional), la subunidad 18S (SSU, por sus siglas en inglés para Subunidad Pequeña), la región ITS1 (por sus siglas en inglés para Espaciador Interno Transcripcional), la subunidad 5.8S, la región ITS2 y la subunidad 28S (LSU, por sus siglas en inglés para Subunidad Grande) (Figura 2).

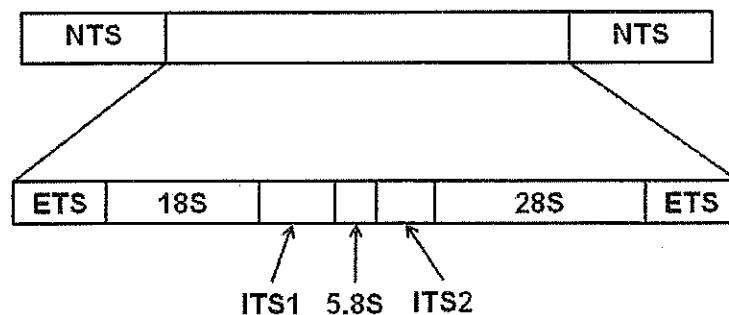


Figura 2. Imagen de las repeticiones en tándem que conforman el ADNr (Modificado de Cooke y Duncan, 1998).

El ADNr posee características en sus secuencias que lo han hecho un determinante taxonómico para el estudio de microorganismos "sin cultivar" (Bruns et al, 1991). Estos estudios se remontan a finales de los años ochenta, cuando C.R. Woese, determinó los tres grandes dominios del árbol de la vida: Arquea, Prokarya y Eukarya, basándose en el análisis filogenético comparativo del ADNr (Woese et al, 1990). A partir de entonces, la taxonomía microbiana, ha estado en constante evolución y se considera una de las disciplinas de la ciencia menos estables (Hugenholtz, 2002).

El ADNr como blanco taxonómico fue seleccionado entre otros marcadores, debido a que posee una tasa de evolución lo suficientemente significativa como para llevar a cabo comparaciones a nivel de taxa utilizando grupos monofiléticos. Tiene regiones muy conservadas (p.e. la subunidad 18S en eucariotas) que provee información muy general y a la vez posee regiones que varían dentro de un mismo género (ITS), por lo que también provee información muy detallada. Por otro lado, el ADNr evoluciona como una sola copia y conserva la misma función en todos los taxa (Bruns et al, 1991).

1.2.2 Taxonomía de hongos

La caracterización de hongos "sin cultivar" ha sido de particular dificultad debido a que el Reino Fungi recientemente ha sufrido modificaciones en cuanto a la clasificación de algunos de sus integrantes. Hasta el 2007, un phylum (Oomicetos) que actualmente pertenece a otro reino era clasificado dentro del

reino Fungi. A su vez, el reino Fungi estaba compuesto de un subreino 6 phyla, 12 subphyla, 35 clases, 12 subclases y 129 órdenes (Hibbet et al, 2007). Sin embargo, la clasificación del reino Fungi está en constante cambio y en el 2010, algunos phyla que se pensaba que eran monofiléticos, gracias a estudios de genómica comparada, se estableció que realmente son parafiléticos. Por lo anterior, actualmente los 4 phyla aceptados dentro del reino Fungi son: Ascomicetos, Basidiomicetos, Quitridiomicetos y Neocallimastigomicetos (Spatafora y Robbertse, 2010) (Figura 3).

Los Ascomicetos y Basidiomicetos son taxa hermanos monofiléticos (Spatafora y Robberste, 2010; Bruns et al, 1991); ambos poseen la característica de desarrollar hifas dicarióticas en determinado momento en su ciclo de vida (Lutzoni et al, 2004) y debido a esto han sido agrupados para formar el subreino Dikarya (Hibbett et al, 2007). Estos taxa poseen una amplia diversidad en morfología que va desde levaduras, hasta amplios micelios y pseudohifas. Los ciclos de vida son muy variables y complejos, tal es el caso de algunos basidiomicetos fitopatógenos (p.e. los Uredinales) que pueden tener hasta dos hospederos distintos y producir incluso cinco tipos diferentes de estructuras de esporulación durante su ciclo de vida. De los hongos, los Dikarya, son los más abundantes y evolucionados y se cree que divergieron hace aproximadamente 600 millones de años (Berbee y Taylor, 2010).

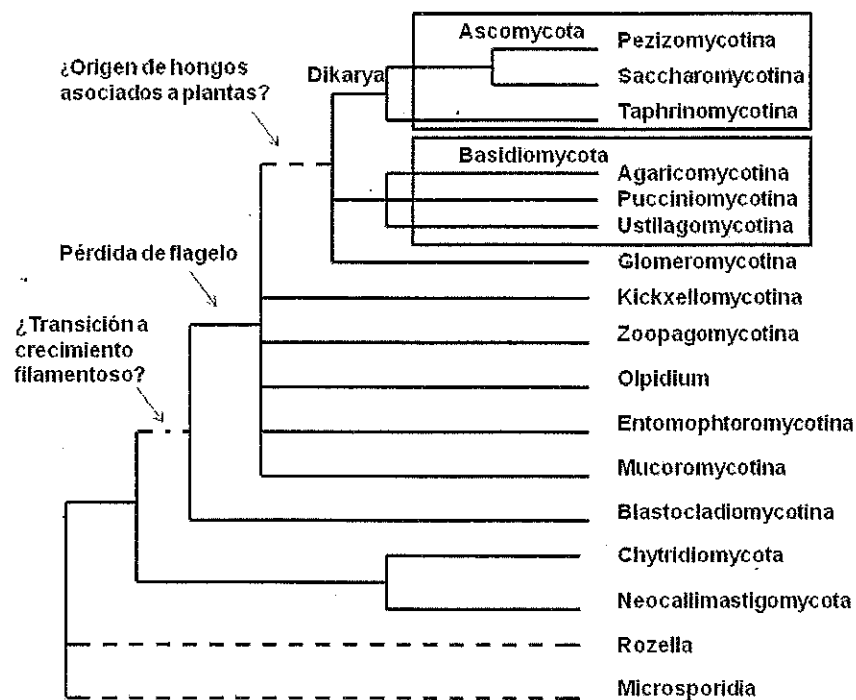


Figura 3. Árbol filogenético en el cual se muestran los principales phyla y subphyla del reino Fungi. A su vez se muestran los grupos hermanos (*Microsporidia*, *Rozella*) de los cuales se cree que emergieron los primeros hongos flagelados. Los phyla *Chytridiomycota* y *Neocallimastigomycota* se presentan como grupos hermanos al igual que los phyla *Ascomycota* y *Basidiomycota*. A partir del clado que forma el subphylum *Blastocladiomycotina*, se cree que los hongos pierden flagelo, y se desarrollan los hongos asociados a plantas, dando lugar al clado más evolucionado formado por los hongos pertenecientes al subreino Dikarya (Modificado de Spatafora y Robbertse, 2010).

1.2.3 Estudio de hongos en muestras ambientales

Como se mencionó anteriormente, los procariotas "sin cultivar" han sido los microorganismos más estudiados en muestras ambientales (Kowalchuck, 1999). En las últimas dos décadas la obtención de ADN de muestras ambientales, así como la extracción, amplificación y secuenciación de ADN, específicamente de

genes de la subunidad pequeña del ARNr (SSU ARNr), han aportado gran conocimiento de la biodiversidad procariótica de diversos ecosistemas (Hartmann y Widmer, 2006; Buchan et al, 2003; Hugenholtz, 2002; Ranjard et al, 2001). Sin embargo, los primeros estudios de la biodiversidad en muestras ambientales de los microeucariotas, particularmente de los integrantes del reino Fungi, comenzaron hasta mediados de los años noventa, basándose en las técnicas aplicadas en procariotas (Valinsky et al, 2002).

En 1997 se caracterizaron los componentes de la comunidad fúngica en raíces de pastos de dunas costeras en Holanda, utilizando cebadores para la SSU ARNr (NS1-GC y NS2+10), conociendo así, ectomicorrizas que interactúan con los pastos que habían pasado desapercibidos en medios de cultivo; sin embargo, se hizo notar que la estrategia utilizada no fue exitosa en la distinción de especies cercanamente relacionadas. Además la falta de una base de datos robusta para el análisis de secuencias de la SSU ARNr dificultó el análisis de datos (Kowalchuck et al, 1997). Una investigación similar con distintos cebadores (EF-4, EF-3 y fung-5) y muestras obtenidas en la rizósfera de cultivos de trigo en Holanda, fue llevada a cabo en 1999. A pesar de que se obtuvieron resultados en la caracterización de las especies presentes de dicho ecosistema, se llegó a las mismas conclusiones que el estudio anterior en cuanto a la base de datos y la falta de precisión en la distinción de especies cercanamente relacionadas (Smit et al, 1999). Unos años más adelante, se analizó la biodiversidad fúngica en muestras de suelo de cultivos de aguacate en California, E.U.A., con cebadores de mayor especificidad para la

SSU del ARNr (nu-SSU-0817-5' y nu-SSU1196-3') y se obtuvieron resultados mucho más favorables que en análisis llevados a cabo anteriormente con cebadores menos específicos (Borneman y Hartin, 2000). Aunque la utilización de la SSU del ARNr como blanco de amplificación en estudios de biodiversidad procariota es altamente efectivo, en eucariotas, esta región no evoluciona rápidamente; por lo tanto, se recomienda su uso para la obtención de niveles taxonómicos como: orden y familia, pero se dificulta la obtención de niveles taxonómicos, como: género y especie (Vandenkoornhuyse et al, 2002). A pesar de esto, se siguen llevando a cabo investigaciones de biodiversidad fúngica utilizando cebadores de alta especificidad para la SSU del ARNr con el fin de determinar clases, órdenes y en algunos casos géneros de hongos presentes en ciertos ecosistemas, siempre y cuando la relevancia del proyecto no sea la identificación de especies dentro de un mismo taxón (Fierer et al, 2007; Nikolcheva y Bärlocher, 2005; Nikolcheva et al, 2003; Pennanen et al, 2001).

El principal problema para el estudio de la biodiversidad fúngica de muestras ambientales, basado en las técnicas aplicadas en procariontes, es el diseño de cebadores adecuados. Se han diseñado numerosos marcadores moleculares que amplifican diversas regiones del ADNr, pero de éstos, muy pocos han resultado exitosos en la aplicación en muestras ambientales complejas (p.e. suelo), ya que la mayoría co-amplifica secuencias pertenecientes a otros reinos. Hasta el momento, los cebadores que han resultado más eficientes y con mayor resolución taxonómica para el análisis de diversidad fúngica en muestras

ambientales complejas, son aquellos que amplifican para la región ITS del ADNr. En el 2003, se llevó a cabo un estudio en el cual se compararon oligonucleótidos diseñados para el estudio de la biodiversidad fúngica de muestras de suelo. Algunos de estos cebadores amplificaron para la subunidad 18S, mientras que otros amplificaron para la región ITS, ambos del ADNr. Los árboles filogenéticos que se obtuvieron mostraron que con los cebadores que amplifican para la región ITS se obtiene una mayor cobertura de las especies fúngicas que habitan en la muestra de suelo y se consigue una buena resolución incluso dentro de un mismo género. El problema con estos cebadores es que en algunos casos arrojan datos muy versátiles por lo que se complica la identificación de secuencias debido a la escasez de información precisa en las bases de datos, p.e. secuencias que no han sido designadas a un filotipo o bien, varias secuencias designadas al mismo filotipo (Anderson et al, 2003). Sin embargo en los últimos años este problema ha ido disminuyendo, gracias al aumento de investigaciones de comunidades fúngicas en muestras ambientales que ha ido enriqueciendo y precisando la información en las bases de datos. Para el 2004 se reportaron 21,075 secuencias pertenecientes a la región ITS de hongos, las cuales son las secuencias más comunes para la caracterización de hongos de muestras ambientales en GenBank (Lutzoni et al, 2004). En los cuatro años siguientes, la base de datos aumentó en más de un 300% y continúa creciendo (Ryberg et al, 2008). Hasta febrero del 2008, 50,956 secuencias ITS pertenecientes a hongos fueron completamente identificadas y aceptadas como filotipos, mientras que 27,364 aún se mantienen

sin clasificar. Sin embargo, de las secuencias sometidas al GenBank del NCBI (por sus siglas en inglés para National Center for Biotechnology Information), la mayoría pertenecen a estudios enfocados a micorrizas y hongos patógenos, por lo que hay una deficiencia de secuencias pertenecientes a hongos degradadores de materia orgánica que se clasifican como datos no relevantes (Ryberg et al, 2008). Actualmente, las secuencias ITS más comunes de hongos (asignadas a un filotipo) que han sido depositadas en el GenBank, pertenecen al género *Fusarium* con 3,539 secuencias ITS. El listado total hasta septiembre del 2010 es de aproximadamente 2,500 géneros de hongos, de los cuales más de 1,500 han sido depositados menos de 5 veces en la base de datos, esto sin contar las secuencias ITS que no han sido asignadas a un filotipo. Lo anterior se debe al tipo de estudio a los que se enfocan la mayoría de las investigaciones, por lo que dicha información no es significativa en cuanto a la abundancia real de las especies encontradas en una muestra ambiental; las secuencias en GenBank sólo nos muestran las especies más estudiadas⁴.

1.2.4 La región ITS como blanco para el estudio de hongos de suelo

Como se mencionó en la sección previa, las regiones ITS (ITS1 e ITS2) se localizan entre la subunidad 18S, 5.8S y 28S del ADNr (Figura 2) y se repiten en tándem a lo largo de todo el ADNr (Lopez-Garcia y Moreira, 2008). La región ITS posee secuencias altamente variables, no codificantes, que acumulan mutaciones

⁴ <http://fungalignomes.org>

neutrales adecuadas para discernir entre organismos cercanamente relacionados a nivel de género o especie (Kowalchuck, 1999). Debido a su alta resolución como blanco taxonómico, la región ITS se ha propuesto como el código de barras de hongos en el "Consortio del Código de Barras de la Vida" (Seifert, 2009).

En 1990 se diseñó el primer conjunto de cebadores que amplifica para la región ITS en hongos. Éstos son conocidos como ITS universales (ITS1, ITS2, ITS3 e ITS4) y son utilizados, entre otras cosas, para amplificar secuencias pertenecientes a hongos de muestras ambientales (White et al, 1990), pero poseen un alto porcentaje de co-amplificación de secuencias pertenecientes a otros eucariotas (Martin y Rygielwicz, 2005). Posteriormente, se diseñaron los cebadores ITS1-F e ITS4-B, específicos para la amplificación de Basidiomicetos en muestras ambientales sin la co-amplificación de ADN de otros eucariotas (Gardes y Bruns, 1993). Estos marcadores han sido utilizados para caracterizar a la comunidad fúngica de Basidiomicetos de suelos en pastizales en el norte del estado de California, E.U.A., sin embargo, la caracterización no se pudo llevar a cabo adecuadamente ya que no había un claro discernimiento de especies. Aún así este conjunto de cebadores ha sido utilizado para determinar la escala espacial de estos organismos. En Point Reyes, California, E.U.A, se llevó a cabo una investigación de los Basidiomicetos de los pastizales y se concluyó que existe una mayor riqueza de especies fúngicas en las profundidades del suelo(14-15 cm) que en suelos superficiales (1-2 cm) (Robinson et al, 2009).

Más adelante, se diseñaron cebadores con mayor especificidad para micorrizas (ITS8, ITS9, ITS10, NL5, NL6A, NLB6B, NL8) y sin que hubiera amplificación de secuencias de otros reinos cuando se usaron para muestras ambientales (Egger, 1995). Hasta la fecha, estos cebadores, siguen siendo los más utilizados para el estudio de micorrizas previamente aisladas. Gracias a esto, se han detectado polimorfismos en la región ITS para el análisis de diversidad de ectomicorrizas (Gomes et al, 2002). Sin embargo, estos cebadores no han sido probados para estudios de biodiversidad en muestras de suelo.

Recientemente, Martin y Rygielwicz (2005), presentaron un grupo de cebadores optimizados para la amplificación de secuencias pertenecientes al subreino Dikarya (NSA3, NLC2, NSI1 y NLB4). Este grupo de cebadores ha resultado adecuado para el análisis de comunidades fúngicas en muestras ambientales complejas (madera, Martos, 2008; sustrato marino, Pang y Mitchell, 2005; suelo, Torres et al, 2005; Martin, 2007). El uso de cebadores específicos en el perfilamiento de una comunidad ha proporcionado mayor sensibilidad en cuanto a diferentes especies de un mismo taxón o bien filotipos a nivel de un mismo género que no se pudieron obtener utilizando cebadores universales (Blackwood et al, 2005).

1.2.5 Métodos para la identificación de secuencias pertenecientes a hongos “sin cultivar”

Las bibliotecas de clones, o más comúnmente conocidas como genotecas, han resultado en la obtención de datos más precisos (en comparación a otros métodos) al analizar comunidades microbianas de muestras ambientales (Bridge y Newshama, 2009; Bent y Forney, 2008; Borneman y Hartin, 2000). Por lo tanto, para la identificación de las secuencias amplificadas de las muestras ambientales, la construcción de una genoteca ha sido la opción más viable (Anderson et al, 2003). Este método ha sido ampliamente utilizado en análisis de comunidades fúngicas y se ha logrado identificar, con ayuda de bases de datos, a las especies presentes en ecosistemas extremos, como el permafrost de la Antártida (Bridge y Newshama, 2009), marismas salobres en E.U.A. (Buchan et al, 2002) y sedimentos marinos profundos en China (Lai et al, 2007). Gracias a estos estudios, se sabe que los hongos son cosmopolitas y que habitan prácticamente bajo cualquier condición ambiental. Asimismo se ha obtenido información más acotada acerca de la composición fúngica de varios ambientes, p.e. en ecosistemas extremos se ha encontrado que el 75% de las especies de hongos son Ascomycetos, mientras que sólo el 25% pertenecen a Basidiomicetos (Bridge y Newshama, 2009). A la vez se ha eliminado la creencia general de que la presencia de hongos solo era posible en ambientes con humedad, abundante materia orgánica y temperatura cálida (Perry et al, 2003).

Por otro lado, los análisis de restricción o RFLP (por sus siglas en inglés para Restriction Fragment Length Polymorphism), han sido utilizados como herramienta para obtener patrones de restricción en secuencias distintas en composición, pero del mismo tamaño y así diferenciarlas sin necesidad de enviar a secuenciar, o bien como un método de preselección antes de enviar a secuenciar (Prewitt et al, 2008; Hartmann y Widmer, 2006; Buchan et al, 2002; Borneman y Hartin, 2000). Sin embargo, es sabido que este método por sí solo, no es el más adecuado para caracterizar biodiversidad microbiana en un ecosistema, debido a los artefactos de ADN que se generan por digestión incompleta de la enzima lo cual resulta en datos no confiables (Mills et al, 2003). A su vez, se ha observado que en especies de hongos cercanamente emparentadas, las diferencias en los patrones de restricción no son visibles a simple vista, debido a que pueden poseer diferencias de longitud de sólo 20 nucleótidos⁵. A pesar de esto, éste método se ha utilizado para estudiar la distribución de hongos Basidiomicetos en suelos de pastizales (Robinson et al, 2009), así como para determinar la enzima más adecuada para análisis de restricción de secuencias ITS de hongos (Alvarado y Manjón, 2009).

⁵ <http://www.lifesciencessociety.org/csb2009/pdf/030Ali.pdf>

1.2.6 Análisis de datos para caracterizar comunidades fúngicas

En la última década se ha tratado de analizar a las comunidades microbianas basándose en el conocimiento que se tiene de las comunidades macroscópicas de plantas y animales. Los índices de biodiversidad más utilizados son: los índices de “diversidad de especies”, p.e. el índice de diversidad de Shannon y los índices de “riqueza de especies”, p.e. el índice de Simpson o índice de Sørensen (Bent y Forney, 2008; Fierer et al, 2007). La principal diferencia entre “diversidad de especies” y “riqueza de especies” (ambos indicadores de biodiversidad) radica en la abundancia; mientras que la “diversidad de especies” indica el número de individuos por especie (abundancia) en un ambiente muestreado, la “riqueza de especies” sólo enumera a las especies presentes en una muestra sin tomar en cuenta el número de individuos por especie.

Debido a la complejidad de las formas de vida de los microorganismos, los métodos de muestreo en ecología microbiana capturan únicamente una pequeña proporción de la biodiversidad total que existe en una comunidad microbiana (Bent y Forney, 2008). A pesar de la escasez en los muestreos en investigaciones de caracterización de comunidades microbianas, se han hecho estimaciones de biodiversidad con los datos obtenidos a partir de las PCRs y se ha obtenido una primera aproximación de la estructura de una comunidad de microorganismos en una muestra ambiental. Los resultados mostraron que a pesar de no haber obtenido la asíntota en una curva de rarefacción, se obtuvo una primera

perspectiva de la riqueza ("riqueza de especies") y abundancia ("diversidad de especies") de ciertas especies en distintos ecosistemas (Alvarado y Manjón, 2009; Tao, 2008; Hartmann y Widmer, 2006; Fierey y Jackson, 2006) y éstos análisis son ampliamente aceptados en la comunidad de científicos dedicados a la ecología microbiana.

En comunidades de hongos se ha demostrado que la riqueza de especies fúngicas de un ecosistema se mantiene uniforme a lo largo de todo el año y que la abundancia de especies es la que tiende a variar (Schneider, 2010). Por lo anterior, para el análisis de comunidades fúngicas es esencial la caracterización de microorganismos para determinar riqueza, así como su abundancia para determinar diversidad.

Para el análisis de la biodiversidad microbiana se pueden utilizar diversas herramientas bioinformáticas que ordenen las secuencias de ADN para un mejor entendimiento de los resultados. Los métodos más utilizados en investigaciones de biodiversidad de comunidades microbianas, son los llamados métodos de distancia (Bruns et al, 1991), como el agrupamiento filogenético: "Neighbor-Joining" (Fierer et al, 2008; Prewitt et al, 2008; Zhou et al, 2007), "Maximum-likelihood" (Fierer et al, 2007; Jampachaisri et al, 2005) y UPGMA (Nagy et al, 2005; Valinsky et al, 2002), que consisten en crear árboles basados en la reducción de la información de los caracteres genéticos por pares o estimados de similitud o diferencias (Bruns et al, 1991). Para proporcionarle refuerzo estadístico

a los resultados obtenidos por los métodos de distancia se han utilizado diversas herramientas estadísticas, como el "bootstrap" (Tao et al, 2008; Prewitt et al, 2008; Lai et al, 2007; Anderson et al, 2003). Éste se encarga de llevar a cabo réplicas del método de distancia aplicado y selecciona la réplica del árbol más común. Además le proporciona valores a los clados basados en las réplicas que se repitieron con más frecuencia. Por lo tanto, la probabilidad de que el dato sea correcto es más elevado mientras más se acerque a 100, que es el valor máximo otorgado por el "bootstrap" (Zvelebil y Baum, 2008).

A pesar de las dificultades en el análisis de datos para caracterizar comunidades de microorganismos, se han obtenido avances significativos en el conocimiento de la distribución de dichas comunidades utilizando herramientas para macroorganismos. Gracias a estos avances se ha puesto en duda el principio de "todos los microorganismos están en todas partes", el cual plantea que todos los microorganismos tienden a distribuirse globalmente y que los factores bióticos y abióticos del ambiente que los rodea no influyen en su distribución. Sin embargo, se ha reportado que a escala global, poblaciones de microorganismos hipertermófilos se encuentran aislados por barreras geográficas. Asimismo se ha identificado el patrón de distribución biogeográfico del arquea *Sulfolobus* que actualmente es un modelo de distribución de biodiversidad microbiana (Whitaker et al, 2003). Por otro lado se ha reportado que algunas comunidades de microorganismos del suelo de una salina presentaron una relación área-taxa, en donde los microorganismos más cercanos en distancia tendían a parecerse más

en comparación con microorganismos más lejanos, por lo cual sugirieron que los microorganismos tienden a formar comunidades bien diferenciadas en un área delimitada y que dichas comunidades asemejan aquellas de organismos superiores, tales como plantas y animales (Horner-Devine et al, 2004). De igual forma, se han reportado comunidades de microorganismos bien estructuradas en suelos de bosques caducifolios, por lo cual se ha concluido que los microorganismos, al igual que plantas y animales, tienden a distribuirse siguiendo patrones biogeográficos (Noguez et al, 2005).

1.2.7 Biodiversidad fúngica de Baja California

En el estado de Baja California, que se considera un estado con ecosistemas extremos, no se han llevado a cabo trabajos de caracterización de biodiversidad fúngica en muestras ambientales. La composición florística, climática y edafológica (ricos en microhábitats) de algunos ecosistemas áridos de Baja California, los hacen un blanco ideal para la prospección de especies fúngicas. A pesar de esto, los antecedentes locales se reducen a las descripciones morfológicas de hongos que desarrollan cuerpo fructífero (Ayala y Ochoa 1998, 1991). En estudios previos se han reportado: *Geastrum triplex*, *Podaxis longii*, *Calvatia sculpta*, *Mycenastrum corium*, *Batarrea stevensii*, *Astraeus hygrometricus*, *Phallus ravenelli*, entre otros (Ayala y Ochoa, 1991). Sin embargo, la taxonomía en la que están basados estos antecedentes se encuentra actualmente obsoleta.

1.3 Justificación

La caracterización de la biodiversidad fúngica de zonas áridas de Baja California tendrá un alto impacto en el conocimiento general microbiológico de estos ecosistemas ya que no existe información previa detallada de los componentes micológicos microscópicos que habitan en dicha zona.

La relevancia del trabajo se fundamenta en la importancia que poseen los microorganismos del suelo en mantener la integridad de los ecosistemas. Éstos son los encargados de llevar a cabo la mayoría de las actividades primarias de un ecosistema, como la degradación de materia orgánica y la fijación y el reciclado de nutrientes.

El conocimiento de la biodiversidad fúngica es de particular importancia para entender las interacciones que tienen los hongos con el resto de los componentes del ecosistema, así como para determinar de qué manera podría verse afectada la comunidad microbiana por los impactos ambientales y como ello repercute en organismos superiores, incluido el humano.

Este estudio aportará conocimientos generales sobre la biodiversidad fúngica del estado de Baja California, establecerá una pauta para futuros estudios de ecología microbiana en la localidad y complementará estudios de diversidad de flora y fauna que se han elaborado en años anteriores en la región.

1.4 Hipótesis

La biodiversidad fúngica de ecosistemas áridos de Baja California obtenida utilizando herramientas moleculares será mucho más diversa que la reportada anteriormente por observación de cuerpos fructíferos por otros autores y esta mostrará patrones de distribución y abundancia asociados a las características climáticas y edafológicas específicas de cada localidad.

1.5 Objetivo

1.5.1 Objetivo General

Identificar por medio de diversas herramientas moleculares los principales filotipos que conforman la biodiversidad fúngica de ecosistemas áridos de Baja California y como varía su distribución a lo largo del estado.

1.5.2 Objetivos Particulares

- Evaluar los filotipos fúngicos obtenidos por localidad y su probable relación con las características climáticas y edafológicas exclusivas del ecosistema árido que habitan.
- Establecer diferencias en la composición de la biodiversidad fúngica entre cada localidad.

CAPITULO II

2. MÉTODOS

Para la caracterización de la biodiversidad fúngica del suelo de ecosistemas áridos de Baja California se llevó a cabo un muestreo para la obtención de muestras de suelo. Éstas se procesaron con distintas técnicas moleculares y posteriormente se realizó el análisis bioinformático y estadístico para la obtención de resultados.

2.1 Descripción del área de estudio

2.1.1 Sitios de muestreo

El muestreo se realizó en áreas del estado de Baja California, las cuales el INEGI clasificó como áridas, es decir, que no sobrepasan los 254 mm de precipitación anual. Éstas son: "seco templado", "muy seco templado", "muy seco muy cálido y cálido" y "muy seco semicálido" (Figura 1). A la vez, fueron seleccionados sitios en distintos ambientes, los cuales para fines del presente trabajo, se consideraron representativos de los principales ecosistemas establecidos para Baja California (Delgadillo, 1990) (Figura 4). Con este tipo de muestreo se pretendió obtener una prospección de las comunidades fúngicas en las condiciones consideradas representativas de los distintos ambientes, p.e.: la heterogeneidad del sustrato, materia orgánica, tipo de vegetación, altitud y latitud.

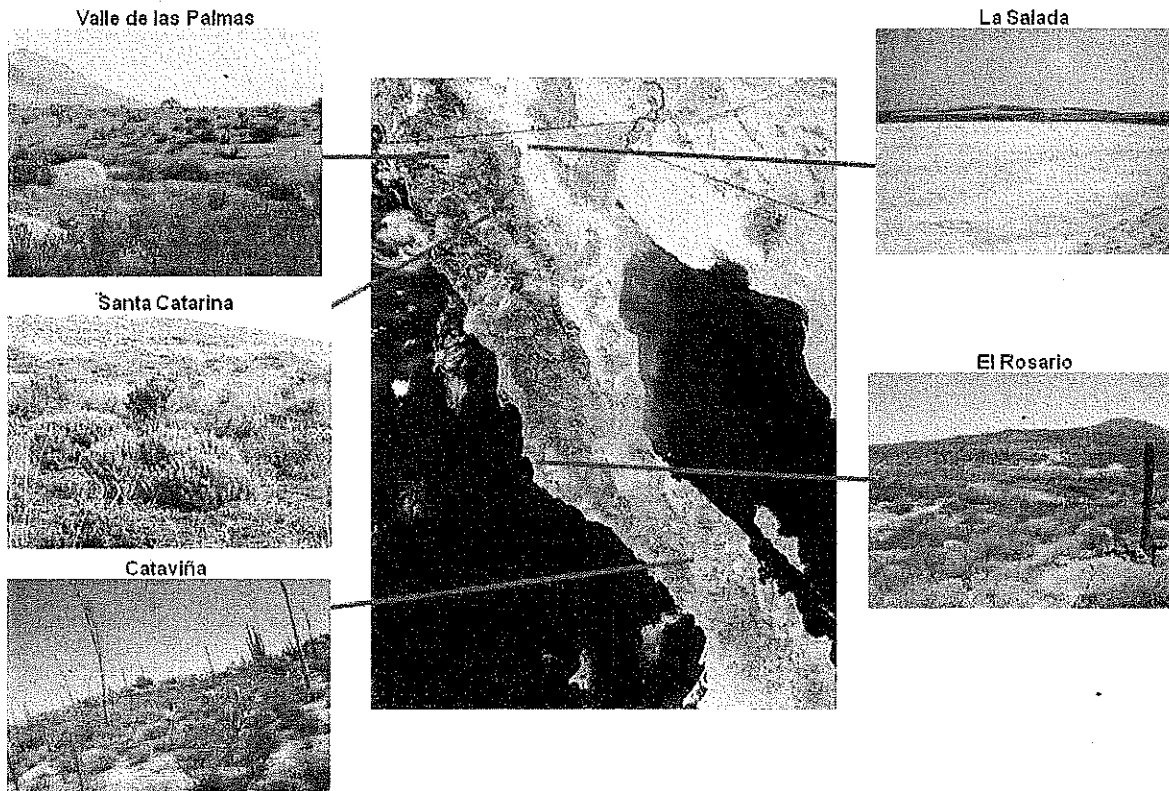


Figura 4. Principales tipos de ecosistemas según la vegetación de Baja California (adaptado de Delgadillo, 1990). Imagen superior derecha: "La Salada", vegetación: matorral desértico. Imagen inferior derecha: "El Rosario", vegetación: transición entre chaparral y matorral desértico. Imagen superior izquierda: "Valle de las palmas", vegetación: chaparral desértico de transición. Imagen central izquierda: "Santa Catarina", vegetación: chaparral. Imagen inferior izquierda: "Cataviña", vegetación: matorral desértico.

Como primera localidad de muestreo se seleccionó el área aledaña a la Laguna Salada conocida como "La Salada" (Figura 5) localizada en el municipio de Mexicali B.C., catalogada dentro del ecosistema tipo matorral desértico, aproximadamente a $32^{\circ} 33' 50''$ N y $115^{\circ} 47' 00''$ O a 30 msnm (metros sobre el nivel del mar), entre la Sierra Cucapá y la Sierra Juárez. Es considerada la zona más árida del estado con una precipitación anual de 5 mm, con lluvias en invierno

y temperaturas que oscilan entre los 12 a 49°C con noches frías y días cálidos⁶. Ésta se caracteriza por tener un suelo de tipo lacustre con sedimentos limosos, arcillosos y de evaporitas, formados a partir de la invasión intermitente de agua marina y las aguas del Río Colorado⁷. Debido al sustrato con altas concentraciones de sal, la vegetación está reducida a matorral micrófilo teniendo como flora representativa a *Tamarix petandra*. En cuanto a la fauna, debido a que toda la península de Baja California forma parte de la misma región faunística, ésta es muy similar a lo largo de todo el estado, encontrando elementos como: *Dipodomys sp.*, *Lepus sp.*, *Odocoileus sp.*, *Crotalus sp.*, *Puma concolor*, *Canis latrans*, entre otros⁸.

La segunda localidad de muestreo se localiza en el Valle de las Palmas (Figura 6) (32°24'35" N, 116°40'45" O) a 28 km de la ciudad de Tecate, B.C. Esta área se caracteriza por formar parte del ecosistema chaparral desértico o de transición, el cual se encuentra en zonas con condiciones xéricas más elevadas (1,000 a 1,300 msnm) así como temperaturas medias alrededor de los 30°C. Presenta suelos de tipo rendzina, rico en humus y desarrollado sobre roca caliza. La característica más importante de estos ecosistemas es que las plantas que lo conforman poseen un sistema de raíces extenso y una alta tasa de endemismos con especies que requieren de características muy específicas para habitar ahí.

⁶ <http://www.sci.sdsu.edu/salton/PreIStdFisheryLagunaSalada.html>

⁷ http://geologia.cicese.mx/sist_inf_geo/Salada/xsalada.html

⁸ www.inegi.org.mx

En dicho sitio prevalece un período de sequía bien marcado, con temperaturas moderadamente altas en verano, precipitación por debajo de los 200 mm al año y el factor fuego, ya que dicho ecosistema está constantemente expuesto a incendios debido a la naturaleza pirófila de algunas plantas de la región. En cuanto a la composición florística, ésta se caracteriza por presentar elementos del chaparral costero y chaparral de montaña, así como especies del desierto sonorense como: *Simmondsia chinensis*, *Ephedra californica*, *Adenostoma fasciculatum*, *Yucca schidigera*, *Ferocactus acanthodes*, *Mammillaria dioica*, entre otras (Delgadillo 1992). Cabe recalcar que esta localidad es de particular importancia debido a que se ha comprobado que alberga al hongo patógeno *Coccidioides spp.* causante de la Coccidioidomicosis, más comúnmente llamada fiebre del Valle de San Joaquín, que afecta a mamíferos, incluido el humano (datos no publicados).

El tercer sitio de muestreo incluyó puntos cercanos a Santa Catarina (Figura 7). Esta área se consideró representante del ecosistema de chaparral. Se encuentra en una meseta a 62 km de la misión Santo Tomás rodeada de valles irrigados, en el municipio de Ensenada, B.C. a 31° 37' 0" N y 115° 48' 0" O, aproximadamente a 1,400 msnm, en las faldas de la Sierra Juárez⁹. El suelo es de tipo leptosol, de materiales no consolidados con una susceptibilidad moderada a la erosión y poco carbón orgánico¹⁰. Presenta precipitaciones apenas por debajo de

⁹ http://www.kumeyaay.info/california_native_research.html

¹⁰ <http://www.conabio.gob.mx>

los 250 mm al año y temperaturas promedio de 22 °C. Entre la flora sobresaliente se encuentra: *Prosopis glandulosa*, *Larrea tridentata*, *Cercidium microphyllum* y *Olneya tesota*¹¹.

El cuarto sitio de muestreo fueron las áreas aledañas a El Rosario (Figura 8), poblado localizado en B.C., aproximadamente en 29° 42' 22.17" N y 115° 22' 50.99" O, a 300 msnm, con temperaturas promedio alrededor de los 30°C y una precipitación anual en promedio de 180 mm. El suelo es de tipo regosol, escasamente desarrollado, típico de suelos erosionados¹². Esta área se considera como una transición entre regiones florísticas biogeográficas y de ecosistemas mediterráneos y desérticos, ya que posee elementos tanto del chaparral como del matorral desértico, tanto en su vegetación como en las características climáticas, edafológicas y demás (Delgadillo, 1992).

El quinto sitio de muestreo fue Cataviña (Figura 9), situado aproximadamente en 29° 11' 56.34" N y 114° 17' 16.97" O, a 300 msnm. El tipo de suelo es arenosol el cual es un suelo relativamente profundo con una textura gruesa, que carece de carbón orgánico y muy macizo lo cual dificulta la penetración de raíces¹¹. Esta zona también forma parte del ecosistema matorral desértico pero posee elementos del matorral costero (Delgadillo, 1992). El fin de muestrear esta área radica en observar el patrón de riqueza de especies fúngicas presentes y determinar si éstas son las mismas que habitan en ecosistemas

¹¹ http://www.kumeyaay.info/california_native_research.html

¹² <http://www.conabio.gob.mx>

iguales situados al norte del estado o tienden a variar después del paralelo 28, en donde se sitúa el punto de muestreo de El Rosario.

2.2 Metodología

2.2.1 Recolección de muestras

El muestreo se llevó a cabo en mayo del año 2009, durante el cual se registró una precipitación total anual de 115.5 mm para todo el estado de Baja California¹³. Para la toma de muestras se siguieron las recomendaciones descritas por Bills y colaboradores (Mueller, 2004). Se obtuvieron aproximadamente 3 gr de suelo a 15 – 20 cm de profundidad, con el fin de disminuir el sesgo que provocaría la presencia de esporas en la superficie; asimismo para asegurar la presencia de micelio ya que la superficie terrestre de zonas áridas con altas temperaturas presenta horas intensas de exposición solar que con frecuencia esterilizan el suelo, además de que previamente se ha comprobado que la riqueza de especies fúngicas se distribuye verticalmente (Robinson et al, 2009). Las muestras de suelo se recolectaron utilizando guantes y cucharas desechables para evitar contaminación y se guardaron en un recipiente estéril, a temperatura ambiente en total oscuridad hasta ser procesadas.

Hasta la fecha, no se ha establecido una estrategia de muestreo efectiva para el estudio de microorganismos del suelo, por lo que el muestreo fue considerado aleatorio tomando en cuenta los siguientes criterios: los puntos de

¹³ www.inegi.org.mx

muestreo se encontraran a más de 1 km de la carretera y en áreas no impactadas, esto es, sin contaminación y sin erosión; en caso de obtener muestras por debajo o cerca de la cobertura vegetal, ésta debió ser endémica o bien no caracterizarse por ser vegetación de áreas perturbadas (p.e. pasto, tabaquillo y chamizo rodador). Los puntos fueron marcados con un sistema de posicionamiento global (GPS) para asegurar que se encontraran dentro de las áreas clasificadas como áridas. Según la figura 1, las áreas a muestrear se extienden en la mayor parte del estado, descartando las clasificadas como "seco templado" y "semifrío subhúmedo con lluvias en invierno" (Figura 1). Asimismo se descartaron las zonas urbanas y debido a las características climáticas tan exclusivas de las zonas costeras, éstas tampoco fueron consideradas dentro del muestreo.

Debido a que no existen antecedentes locales de la composición de la comunidad fúngica del suelo de ecosistemas áridos de Baja California y a que como se mencionó anteriormente, no existe un método establecido de muestreo para el análisis de comunidades microbianas, no fue posible diseñar un muestreo estadísticamente significativo, ya que se desconoce el número mínimo de muestra necesario. Tomando en cuenta que el objetivo de este trabajo es la prospección en ambientes no explorados para especies fúngicas por métodos moleculares, no se realizaron curvas de rarefacción, lo cual indicaría un muestreo significativo, debido a que hasta la fecha ningún trabajo de caracterización de microorganismos de suelo ha conseguido tal resultado. Por lo tanto, se obtuvieron 5 muestras de suelo en puntos aleatorios de cada sitio de muestreo que cumpliera con los

criterios mencionados anteriormente, teniendo así un total de 25 muestras que representan los principales ecosistemas áridos de todo el estado de Baja California. Se sabe que cada hongo alcanza longitudes distintas y trabajos previos han demostrado que en suelo, en promedio el micelio de un mismo organismo alcanza los 5 m, aunque se han descrito especies que alcanzan más de 25 m de longitud¹⁴. Por lo anterior, las muestras se recolectaron lo suficientemente espaciadas (50 m una de otra), buscando tener una visión más amplia de los hongos que habitan en dicho sitio y evitar recolectar repeticiones de un mismo micelio.

¹⁴ http://bugs.bio.usyd.edu.au/learning/resources/Mycology/Plant_Interactions/Mycorrhizas/Arbuscular/soilAggregation.shtml

Tabla I. Coordenadas geográficas (DMS) de los puntos de muestreo en la localidad de la Salada; L abreviación para La Salada.

Clave de muestreo	Coordenadas Geográficas
L060	32° 33' 16.4" N, 115° 47' 19.8" O
L063	32° 33' 14.7" N, 115° 47' 16.7" O
L064	32° 33' 14.8" N, 115° 47' 14.9" O
L065	32° 33' 30.8" N, 115° 45' 04.7" O
L066	32° 33' 29.5" N, 115° 44' 32.7" O

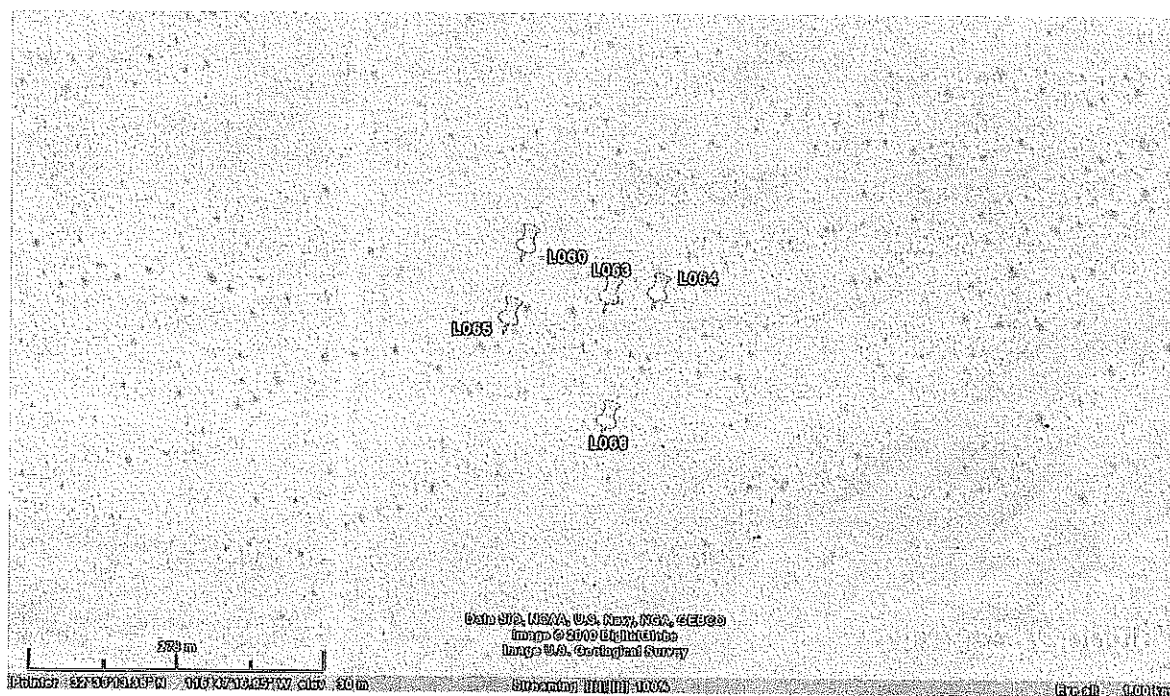


Figura 5. Imagen de los puntos de muestreo en La Salada tomada a una altitud de 1 km (Google Earth V5.1, 2009).

Tabla II. Coordenadas geográficas (DMS) de los puntos de muestreo en la localidad de Valle de las Palmas; **V** abreviación para Valle De las Palmas.

Clave de muestreo	Coordenadas Geográficas
V03	32°24'53" N, 116°40'47" O
V06	32°24'53" N, 116°40'46" O
V010	32°24'51" N, 116°40'44" O
V013	32°24'52" N, 116°40'46" O
V06	32°24'52" N, 116°40'44" O



Figura 6. Imagen de los puntos de muestreo en el Valle de las Palmas tomada a una altitud de 1 km (Google Earth V5.1, 2009).

Tabla III. Coordenadas geográficas (DMS) de los puntos de muestreo en Santa Catarina; S abreviación para Santa Catarina.

Clave de muestreo	Coordenadas Geográficas
S01	31°44'50.5" N, 115°45'48.5" O
S02	31°44'53.4" N, 115°45'48.4" O
S04	31°44'59.9" N, 115°45'47.6" O
S05	31°45'01.3" N, 115°45'46.1" O
S08	31°44'54.1" N, 115°45'47.7" O



Figura 7. Imagen de los puntos de muestreo en Santa Catarina tomada a una altitud de 3 km (Google Earth V5.1, 2009).

Tabla IV. Coordenadas geográficas (DMS) de los puntos de muestreo en El Rosario; E abreviación para El Rosario.

Clave de muestreo	Coordenadas Geográficas
E042	30°1'6.76" N, 115°32'7.02" O
E043	30°1'5.95" N, 115°32'7.05" O
E045	30°1'6.93" N, 115°32'5.94" O
E046	30°1'6.31" N, 115°32'6.32" O
E047	30°1'5.00" N, 115°32'5.98" O



Figura 8. Imagen de los puntos de muestreo en El Rosario tomada a una altitud de 1 km (Google Earth V5.1, 2009).

Tabla V. Coordenadas geográficas (DMS) de los puntos de muestreo en Cataviña; C abreviación para Cataviña.

Clave de muestreo	Coordenadas Geográficas
C014	29°11'56.34" N, 114°17'16.97" O
C035	29°11'55.44" N, 114°17'18.29" O
C040	29°11'57.64" N, 114°17'15.05" O
C075	29°11'55.63" N, 114°17'15.00" O
C080	29°11'54.51" N, 114°17'16.55" O

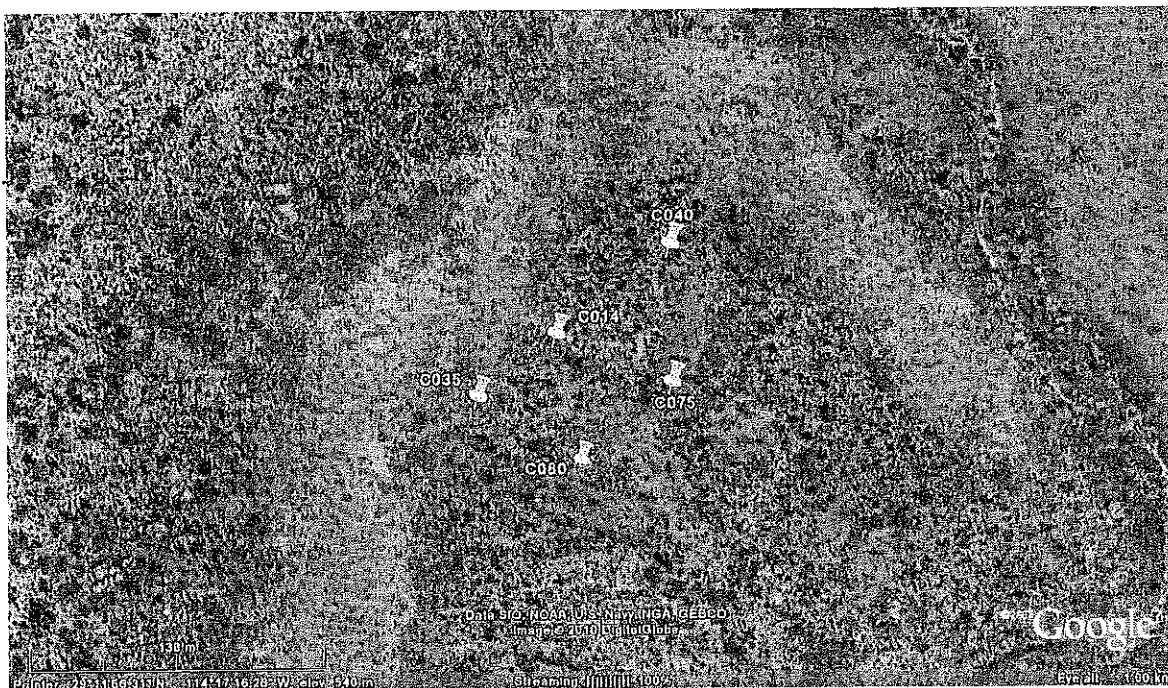


Figura 9. Imagen de los puntos de muestreo en Cataviña tomada a una altitud de 1 km (Google Earth V5.1, 2009).

2.2.2 Extracción de ADN genómico de las muestras de suelo

Para la extracción de ADN genómico total de suelo se utilizó el *UltracleanTM Soil DNA Isolation kit* (MoBio Laboratories, Inc.) de acuerdo al protocolo proporcionado por el fabricante. Se utilizó 1 gr de suelo para cada extracción, obteniendo un volumen final de 30 μ l de ADN disuelto en amortiguador EB que se almacenó a -20°C para su posterior uso.

2.2.3 Presencia y cuantificación de ADN

Para verificar la presencia de ADN genómico, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio [0.1 μ g/ml] en el cual se corrieron 5 μ l de muestra de ADN a 80 Volts por 45 minutos. Como marcador de peso molecular se utilizaron 10 μ l de ADN del fago lambda digerido con *EcoRI* y *HindIII* (Promega, Co.) a una concentración de 50 ng/ μ l. En la mayoría de las muestras no se observó ADN o bien se observó poca cantidad por lo que se recurrió a la cuantificación por espectrofotometría.

La cuantificación de ADN se llevó a cabo utilizando el espectrofotómetro *NanodropTM* (Thermo Fisher Scientific, Inc.), haciendo lecturas a 260/280 nanómetros. Se utilizó 1 μ l de muestra y como blanco buffer EB del *UltracleanTM Soil DNA Isolation kit* (MoBio Laboratories, Inc.). Debido a las condiciones extremas de los ecosistemas áridos y a la escasez de materia orgánica de éstos, una concentración mayor a 1 ng/ μ l de ADN se consideró adecuada.

2.2.4 Amplificación de secuencias ITS de hongos pertenecientes al subreino Dikarya

La amplificación de las secuencias de interés se llevó a cabo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos para la región ITS de hongos del subreino Dikarya, siguiendo las condiciones recomendadas para la GoTaqTM Flexi DNA polymerase (Promega, Co.) y utilizando los cebadores diseñados por Martin y Rygiewicz (2005) (Figura 10). Estos cebadores fueron utilizados en una PCR anidada para obtener una amplia gama de especies fúngicas pertenecientes al subreino Dikarya (incluso dentro de un mismo género) a pesar de haber aislado poco ADN genómico de hongos y a la vez aumentar la discriminación de amplicones que no pertenecen al reino Fungi y que puedan haber estado presentes en la muestra de suelo, p.e. ADN de plantas. La PCR anidada funciona de la siguiente manera: se lleva a cabo una primera PCR en la cual se utilizó el primer conjunto de cebadores, NSA3 (5' – AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA - 3') y NLC2 (5'- GAGCTGCATTCCCAAACAACACTC - 3') y una segunda PCR utilizando el producto amplificado de la primera PCR como templado y el segundo par de cebadores, NSI1 (5' – GATTGAATGGCTTAGTGAGG - 3') y NLB4 (5'- GGATTCTCACCTCTATGAC - 3').

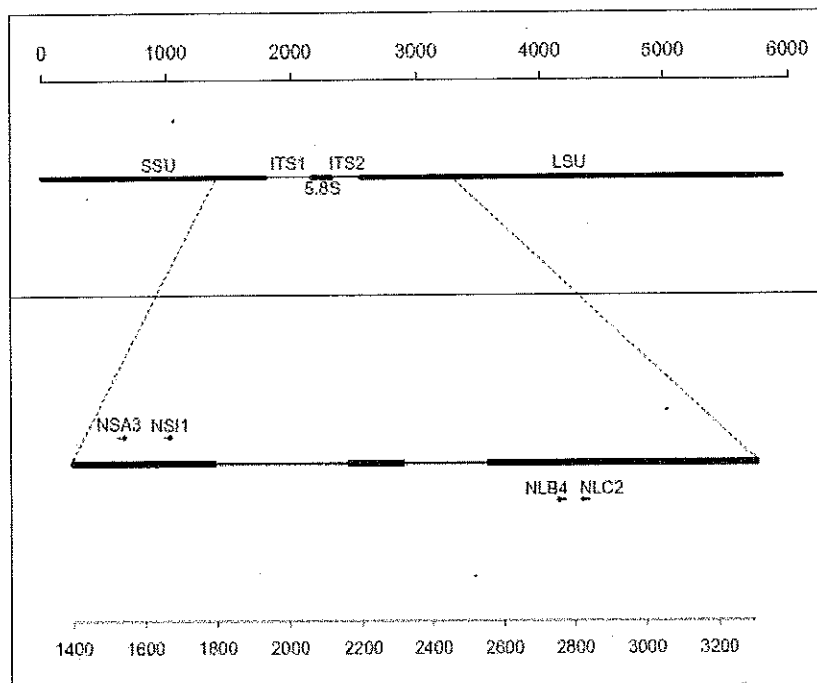


Figura 10. Diagrama de la localización de los cebadores específicos para el subreino Dikarya en el genoma fúngico del ADNr. Las distancias están representadas en pares de bases. SSU: subunidad pequeña (18S); LSU: subunidad grande (28S); ITS: espaciador interno transcripcional. Modificado de Martin y Rygiewicz (2005).

La amplificación de las secuencias ITS a partir del concentrado de ADN genómico no fue posible. A pesar de las bajas concentraciones de ADN total, las muestras debieron ser diluidas debido a la presencia de sustancias potencialmente inhibitoras de la acción de la polimerasa en las reacciones de PCR. Estas sustancias, tales como los ácidos húmicos, algunos metales y partículas de la arcilla se encuentran en todo tipo de suelo (Schneegurt et al, 2003; O'Donnell y Görres, 1999; Tsai y Olson, 1992).

Las reacciones de la primera PCR se prepararon en un volumen final de 20 μ l. Como ADN templado se utilizó 1 μ l de ADN genómico extraído de las muestras de suelo diluido 1:10 (la concentración varió en cada muestra), 1.5 μ l de una mezcla de los deoxinucleótidos (adenina, guanina, citosina y timina) a una concentración de 2.5 mM c/u (Promega, Co.), 1.25 μ l de oligonucleótido sentido NSA3 a una concentración de 10 μ M (Martin y Rygiewicz, 2005) así como 1.25 μ l de oligonucleótido antisentido NLC2 a una concentración de 10 μ M (Martin y Rygiewicz, 2005), 1 μ l de cloruro de magnesio a una concentración de 25 mM (Promega, Co.), 0.25 μ l (1 unidad) de GoTaqTM Flexi DNA polymerase [5U/ μ l] (Promega, Co.), 4 μ l de amortiguador GoTaqTM [5x] (Promega, Co.) y se completó a 20 μ l con 9.75 μ l de agua HPLC. Como control positivo se utilizó 1 μ l del ADN genómico del ascomiceto *Neurospora crassa* a una concentración de 100 ng/ μ l y como control negativo agua.

Para la PCR anidada se mezcló 1 μ l de la reacción de la primera PCR de cada muestra por localidad y se mezcló, formando así un “conjunto por localidad”. De este “conjunto” se tomó el templado para la PCR anidada (Figura 11).

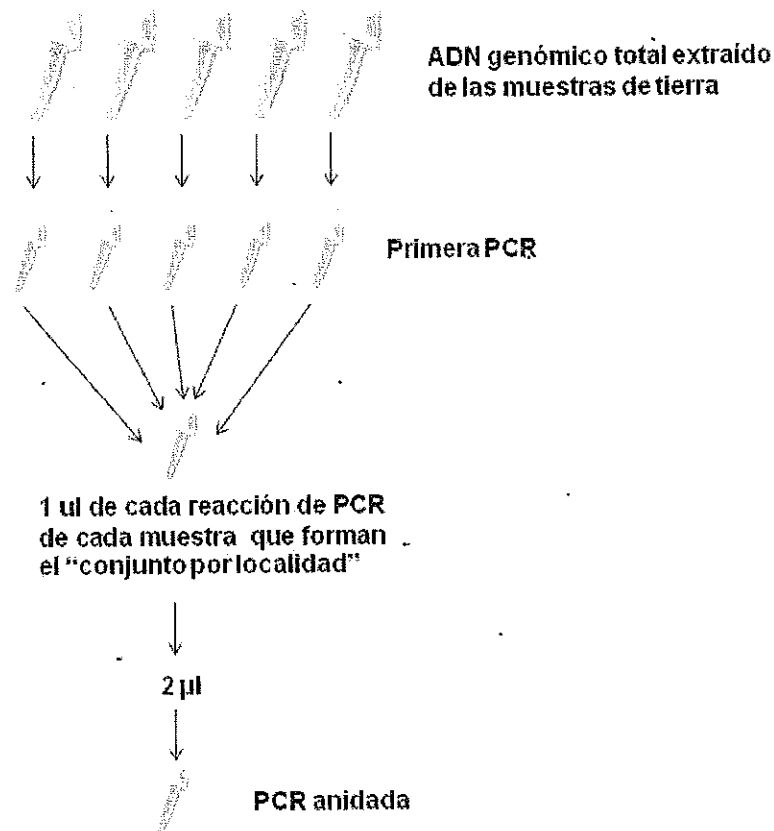


Figura 11. Secuencia que se siguió para procesar las muestras de ADN de cada una de las localidades para la obtención de los amplicones ITS para clonar.

Las reacciones de la PCR anidada se prepararon en un volumen final de 50 µl conteniendo 2 µl de ADN templado del conjunto por localidad de la primera PCR (la concentración varió en cada muestra), 3.75 µl de una mezcla de los deoxinucleótidos (adenina, guanina, citosina y timina) a una concentración de 2.5 mM c/u (Promega, Co.), 3.12 µl de oligonucleótido sentido NS11 a una concentración de 10 µM (Martin y Rygielwicz, 2005) así como 3.12 µl de oligonucleótido antisentido NLB4 a una concentración de 10 µM (Martin y

Rygiewicz, 2005), 5 μ l de cloruro de magnesio a una concentración de 25 mM (Promega, Co.), 0.5 μ l (2 unidades) de GoTaq™ Flexi DNA polymerase [5U/ μ l] (Promega, Co.), 10 μ l de amortiguador GoTaq™ [5x] (Promega, Co.) y se completó a 50 μ l con 22.51 μ l de agua HPLC. Como control positivo y negativo se utilizaron 2 μ l de las reacciones de control positivo (*N. crassa*) y negativo (agua) de la primera PCR.

Tanto la primera PCR como la PCR anidada se llevaron a cabo en un termociclador MultiGene™ II. (Labnet International, Inc.), utilizando una primera temperatura de desnaturalización de 95°C por 2 minutos, así como 35 ciclos continuos de 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 40 segundos de alineamiento de los oligonucleótidos a 55°C (para la primera PCR) ó 60°C (para la PCR anidada) y 1 minuto de extensión de la polimerasa a 72°C. Para finalizar la PCR, se programó una última extensión de 72°C por 10 minutos, para asegurar la adición de las adeninas por la polimerasa al final de la extensión, la cual fue necesaria para la posterior clonación de los amplicones usando TOPO TA® (Invitrogen, Co).

Para verificar la amplificación de la región ITS se llevó a cabo una electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio [0.1 μ g/ml] en el cual se corrieron los 50 μ l del producto de la PCR anidada a 80 Volts por 45 minutos, utilizando como referencia 10 μ l del marcador de peso molecular de ADN

del fago lambda digerido con *EcoRI* y *HindIII* (Promega, Co.) a una concentración de 50 ng/ μ l.

2.2.5 Purificación de secuencias ITS

Para la extracción y purificación de los amplicones obtenidos se utilizó el *QIAquickTM gel extraction kit* (Qiagen, Inc.) de acuerdo al protocolo proporcionado por el fabricante.

Para verificar la concentración del producto de ADN purificado, se llevó a cabo una electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio [0.1 μ g/ml] en la cual se corrieron 3 μ l de ADN a 80 Volts por 45 minutos. Se calculó la concentración del producto purificado utilizando como referencia 10 μ l del marcador de peso molecular del ADN del fago lambda digerido con *EcoRI* y *HindIII* (Promega, Co.) a una concentración de 50 ng/ μ l (Tabla VI).

Tabla VI. Indicador de concentración de ADN utilizando como referencia la intensidad de las bandas del marcador de peso molecular de ADN del fago lambda digerido con *EcoRI* y *HindIII* (Promega, Co) a una concentración de 50 ng/ μ l y una cantidad de 10 μ l (los valores de concentración que se utilizaron como referencia se encuentran sombreados).

pb	%	1 μ l	3 μ l	4 μ l	5 μ l	8 μ l	10 μ l	12 μ l
		50 ng	150 ng	200 ng	250 ng	400 ng	500 ng	600 ng
21,226	43.7	21.84	65.52	87.36	109.21	174.73	218.41	262.09
5,148	10.6	5.30	15.89	21.19	26.49	42.38	52.97	63.57
4,973	10.2	5.12	15.35	20.47	25.59	40.94	51.17	61.41

4,268	8.8	4.39	13.18	17.57	21.96	35.13	43.92	52.70
3,530	7.3	3.63	10.90	14.53	18.16	29.06	36.32	43.59
2,027	4.2	2.09	6.26	8.34	10.43	16.69	20.86	25.03
1,904	3.9	1.96	5.88	7.84	9.80	15.67	19.56	23.51
1,584	3.3	1.63	4.89	6.52	8.15	13.04	16.30	19.56
1,375	2.8	1.41	4.24	5.66	7.07	11.32	14.15	16.98
947	1.9	0.97	2.92	3.90	4.87	7.80	9.74	11.69
831	1.7	0.86	2.57	3.42	4.28	6.84	8.55	10.26
779	1.6	0.80	2.40	3.21	20.24	6.41	8.02	9.62
48,592	100	50	150	200	250	400	500	600

2.2.6 Clonación de los productos de PCR

La clonación de los productos de PCR se llevó a cabo utilizando el *TOPO TA[®] Cloning kit* (Invitrogen, Co.), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. La reacción de clonación contenía una mezcla de 0.5 µl de la solución de sales del kit, así como 0.5 µl del vector pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen, Co.), se mezclaron de 0.5 - 4 µl de producto de PCR purificado (dependiendo de la concentración obtenida), tratando de mantener una relación final de 3:1, inserto:vector. Para calcular lo anterior se multiplicaron los nanogramos del vector (10 ng) por las kilobases del inserto (0.9 kb) y el resultado se dividió entre las kilobases del vector (3.9 kb). El valor obtenido se multiplicó por tres y como resultado se obtuvieron

los nanogramos de inserto requeridos. La reacción se llevó a un volumen final de 6 μ l con agua HPLC.

2.2.7 Transformación por shock térmico

Se prepararon tres placas de Petri por cada clonación (3 placas por 5 localidades) con medio LB (Luria-Bertani)-agar/ampicilina [100 μ g/ml]/X-Gal [40mg/ml]. El vial con 50 μ l de las células competentes de *Escherichia coli* (TOP10), fue descongelado en hielo. A éste se le agregaron 2 μ l de la reacción de clonación y se incubó en hielo por 30 minutos. Se aplicó shock térmico de 30 segundos en baño maría a exactamente 42°C. Inmediatamente se colocó el vial en hielo y se agregaron 250 μ l de medio LB líquido (almacenado a 37°C) a las células transformadas. Se incubó 1 hora a 37°C con agitación a 200 rpm. Posteriormente se esparcieron 50 μ l en cada una de las tres placas LB-agar/ampicilina/X-Gal y se incubaron a 37°C de 12 a 16 horas. Se llevaron a cabo cinco transformaciones en total, esto es, una por cada localidad.

2.2.8 Análisis de los transformantes

La selección de transformantes fue llevado a cabo por complementación α , esto es, seleccionando únicamente las colonias blancas y se rectificó la presencia del plásmido llevando a cabo una PCR de colonia.

2.2.9 PCR de colonia

Con un palillo estéril se tomó cuidadosamente una muestra de las colonias seleccionadas y se mezcló en el vial con los reactivos para la PCR.

Las reacciones de la PCR de colonia se prepararon en un volumen final de 20 μ l conteniendo: 1.5 μ l de una mezcla de los deoxinucleótidos (adenina, guanina, citosina y timina) a una concentración de 2.5 mM c/u (Promega, Co.), 1.25 μ l de oligonucleótido sentido NS11 a una concentración de 10 μ M (Martin y Rygiewicz, 2005) así como 1.25 μ l de oligonucleótido antisentido NLB4 a una concentración de 10 μ M (Martin y Rygiewicz, 2005), 1 μ l de cloruro de magnesio a una concentración de 25 mM (Promega, Co.), 0.25 μ l (1 unidad) de GoTaqTM Flexi DNA polymerase [5U/ μ l] (Promega, Co.), 5 μ l de Amortiguador GoTaqTM [5x] (Promega, Co.) y se llevó a 20 μ l con 10.75 μ l de agua HPLC. Como control positivo se utilizó el ADN de una colonia verificada como positiva, esto es, el plásmido pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen, Co.) con un inserto de aproximadamente 900 pb y como control negativo se utilizó agua.

La PCR de colonia se llevó a cabo en un termociclador MultiGeneTM II (Labnet International, Inc.), utilizando una primera temperatura de desnaturalización de 95°C por 2 minutos, así como 30 ciclos continuos de 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 40 segundos de alineamiento de los

oligonucleótidos a 60°C y 1 minuto de extensión de la polimerasa a 72°C. Así como una última extensión de 5 minutos a 72°C.

Para verificar que la colonia seleccionada poseía el inserto ITS se llevó a cabo una electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio [0.1 µg/ml] en el cual se corrieron 8 µl del producto de la PCR de colonia a 80 Volts por 45 minutos, como referencia del peso molecular se utilizaron 10 µl de ADN del fago lambda digerido con *EcoRI* y *HindIII* (Promega, Co.) a una concentración de 50 ng/µl.

Una vez identificadas las colonias con inserto se conformó la genoteca.

2.2.10 Conformación de la genoteca

Se prepararon placas de Petri con medio LB-agar/ampicilina [100 µg/ml] y se colocó una plantilla numerada que facilitó la clasificación de las colonias por localidad. Con ayuda de palillos estériles se tomó una muestra de las colonias transformadas y se colocó en una de las secciones de las placas, dependiendo de la localidad y número de transformante. Se incubaron a 37°C toda la noche y posteriormente se almacenaron a 4°C.

Para conocer la secuencia ITS que posee cada transformante se extrajo ADN plasmídico de las colonias seleccionadas y verificadas como positivas.

2.2.11 Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina

La extracción de ADN plasmídico se llevó a cabo utilizando el método por lisis alcalina.

Con un palillo se tomó una muestra de una colonia transformada y se inoculó en 5 ml de medio LB líquido conteniendo ampicilina [100 µg/ml]. Se incubó de 12 -16 horas a 37°C con agitación a 200 rpm. Posteriormente se cosecharon las colonias centrifugando todo el medio de cultivo (excepto 812 µl) 30 segundos a 13,000 rpm. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100 µl de solución P1 (ver apéndice) fría. Se agregaron 150 µl de solución P2 (ver apéndice) y se mezcló por inversión. Se añadieron 200 µl de solución P3 (ver apéndice) fría y nuevamente se mezcló por inversión. Se centrifugó 10 minutos a 13,000 rpm. Se transfirió el sobrenadante a un vial limpio, se agregó 1 µl de ribonucleasa A (Sigma-Aldrich Co) y se incubó 15 minutos a 37°C. Se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se mezcló por inversión y se incubó 30 minutos a -20°C. Se centrifugó 10 minutos a 13,000 rpm y se desechó el sobrenadante. A continuación se lavó el ADN con 500 µl de etanol al 75% frío y se centrifugó 5 minutos a 13,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar el pellet al aire por aproximadamente 10 minutos. El ADN plasmídico fue resuspendido en 40 µl de agua HPLC.

Para verificar la presencia de ADN plasmídico se llevó a cabo una electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio [0.1 µg/ml]

en el cual se corrieron 3 μ l del ADN plasmídico a 80 Volts por 45 minutos, como referencia del peso molecular se utilizaron 10 μ l de ADN del fago lambda digerido con *EcoRI* y *HindIII* (Promega, Co.) a una concentración de 50 ng/ μ l.

2.2.12 Resguardo de bacterias en glicerol

Del cultivo bacteriano crecido toda la noche en medio LB líquido/ampicilina [100 μ g/ml] (para la extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina) se tomaron 812 μ l y se mezclaron con 187 μ l de glicerol al 80% estéril. Estos fueron almacenados a -80°C.

2.2.13 Análisis de restricción para diferenciación de secuencias

Para diferenciar las múltiples secuencias ITS de la genoteca, los plásmidos obtenidos fueron sometidos a un análisis de restricción (RFLP). Para seleccionar la enzima con la que se hicieron los RFLPs, primero se hizo una búsqueda en GenBank de secuencias ITS de hongos Dikarya reportados anteriormente para desiertos de Norteamérica (Samaniego y Madinaveitia, 2007; Bates, 2006; Kuhlman et al, 2006; Barrow, 2004). Estas secuencias fueron digeridas *In Silico* utilizando el programa NEBcutter V2.0 (Vincze et al, 2003) con enzimas con secuencias de reconocimiento cortas (4 bases), sugeridas por Alvarado y Manjón (2009), utilizadas comúnmente en TRFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) de la región ITS de hongos. Se seleccionó la enzima que cortó dentro de las secuencias ITS con más frecuencia y que a la vez no cortó o cortó pocas veces dentro del vector pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen, Co.). La enzima que

cumplió con los criterios mencionados anteriormente fue la *Rsal* que reconoce la secuencia GT⁺AC dejando extremos romos y que sólo corta tres veces dentro del plásmido obteniendo 3 fragmentos de 1800, 700 y 200 pb.

Una vez seleccionada la enzima, se llevaron a cabo los RFLPs siguiendo las recomendaciones descritas para la enzima *Rsal*. Esto es: 1 unidad de *Rsal* [10,000U/ml] (New England Biolabs, Inc.), 2 - 4 µl de plásmido (dependiendo de la concentración de las extracciones de ADN plasmídico que en su mayoría estuvieron entre 300 y 400 ng/µl), 2 µl de buffer 4 [10x] (New England Biolabs, Inc.) para una concentración final de 1x y se llevó a 20 µl con agua HPLC. Se incubó a 37°C durante 2 horas.

Algunos de los amplicones ITS no presentaron secuencia de reconocimiento para la enzima *Rsal*. Estas secuencias fueron digeridas con otra enzima, que en este caso fue la *EcoRI* (G⁺AATT.C). Esta enzima reconoce la secuencia que flanquea la región en la que se inserta el producto de PCR en el vector pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen, Co.) y además es una secuencia común en la región ITS de Ascomycetos y Basidiomycetos¹⁵. Las reacciones se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones descritas para la enzima *EcoRI*, esto es: 1 unidad de *EcoRI* [10U/µl] (Promega, Co.), 2 - 4 µl de plásmido (dependiendo de la concentración de las extracciones de ADN plasmídico que en su mayoría estuvieron entre 300 y 400 ng/µl), 2 µl de buffer RE "H" [10x] (Promega, Co.), 0.2

¹⁵ <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>

μl de BSA [$10\mu\text{g}/\mu\text{l}$] (Promega, Co.) y se llevó a $20\mu\text{l}$ con agua HPLC. Se incubó a 37°C durante 2 horas.

Para verificar los patrones de restricción, se llevó a cabo una electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio [$0.1\mu\text{g}/\text{ml}$] en el cual se corrieron $5\mu\text{l}$ de muestra a 80 Volts por 45 minutos. Como marcador de peso molecular se utilizaron $10\mu\text{l}$ de ADN del fago lambda digerido con *EcoRI* y *HindIII* (Promega, Co.) a una concentración de $50\text{ ng}/\mu\text{l}$.

Se analizaron los patrones de bandas y se seleccionó una muestra por patrón para enviar a secuenciar.

2.2.14 Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina para secuenciar

Con una punta de pipeta estéril se tomó una muestra del resguardo de bacterias en glicerol (almacenadas a -80°C) de las muestras seleccionadas para enviar a secuenciar. Estas se inocularon en 5 ml de medio LB líquido/ampicilina [$100\mu\text{g}/\text{ml}$] y se incubaron de 12 -16 horas a 37°C con agitación a 200 rpm.

En esta ocasión la extracción de ADN plasmídico se llevó a cabo con el *QIAprep spin miniprep kit* (QIAGEN, Inc.). De esta forma se aseguró el nivel de pureza requerido para la secuenciación, que no se obtiene con la extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina convencional (llevada a cabo anteriormente). El kit basa su procedimiento en el principio de adsorción de ADN en una membrana de sílice en presencia de altas concentraciones de sal. Dicha membrana adsorbe

únicamente ADN obteniendo como resultado ADN puro¹⁶. La extracción se llevó a cabo siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante.

Para verificar la concentración de ADN plasmídico extraído, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio [0.1 µg/ml] en el cual se corrieron 3 µl de muestra a 80 Volts por 45 minutos. Como marcador de peso molecular e indicador de concentración (Tabla VI) se utilizaron 10 µl de ADN del fago lambda digerido con *EcoRI* y *HindIII* (Promega, Co.) a una concentración de 50ng/µl. La concentración de la mayoría de las muestras fue de aproximadamente 400ng/µl.

2.2.15 Secuenciación y análisis de secuencias

Las muestras se enviaron a secuenciar a la compañía MACROGEN, Inc. (Seúl, Corea). Siguiendo las especificaciones requeridas por dicha compañía para secuenciación de plásmidos, el ADN plasmídico se llevó a una concentración de 100 ng/µl en un volumen de 30 µl, esto es, 6 µl de la extracción de ADN plasmídico más 24 µl de agua HPLC. Para la secuenciación, se utilizaron los cebadores universales (suministrados gratuitamente por la compañía) M13 sentido (5' – GTAAAACGACGGCCAGT – 3') y M13 antisentido (5' – GCGGATAACAATT TCACACAGG – 3') que flanquean los extremos en donde se insertó la secuencia de interés en el plásmido pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen, Co.).

¹⁶ QIAprep[®] Miniprep Handbook

Los electroferogramas río arriba y río abajo de cada muestra se editaron y las secuencias se alinearon con el software MEGA 4.1 (MEGA®). Los alineamientos fueron exportados a formato FASTA y unidos para formar una secuencia consenso la cual se sometió a BLAST (por sus siglas en inglés para Basic Local Alignment Search Tool) (NCBI), para ser alineadas con secuencias similares dentro del GenBank y así determinar el filotipo al que pertenecen. El BLAST se llevó a cabo siguiendo los siguientes criterios: "BLAST de nucleótidos", "base de datos: otros", "optimizado por megablast" y "con parámetros del algoritmo generales".

2.2.16 Construcción de árbol filogenético

Las secuencias resultantes de los alineamientos pertenecientes a cada muestra, fueron alineadas manualmente en un solo archivo como alineamiento múltiple y se construyó un árbol filogenético por el método de "neighbor-joining" con 500 réplicas y condensado para valores mayores a 50 utilizando el software MEGA 4.1 (MEGA®).

2.2.17 Caracterización de los patrones de restricción

Para obtener el patrón de restricción *In Silico*, representante de cada muestra, se utilizó el software NEBcutter V2.0 (Vincze et al, 2003)

Las secuencias ITS recibidas fueron insertadas en el sitio que flanquean los cebadores M13F y M13R en la secuencia de ADN del plásmido pCR®2.1-TOPO®

(Invitrogen, Co.). Se formó un solo archivo formato .fas por cada una de las muestras representantes. Este archivo contenía la secuencia de ADN completa del plásmido más la secuencia ITS de cada muestra representante. Estos archivos fueron utilizados para llevar a cabo las digestiones *In Silico* de los plásmidos siguiendo los siguientes criterios: secuencia: circular, digestión específica: enzima *RsaI*. Una vez llevada a cabo la digestión, el software ofrece la opción de observar el gel, por lo que este fue observado siguiendo los siguientes criterios: agarosa al 1%, marcador de peso molecular: 1 kb. Las imágenes obtenidas fueron unidas en un solo archivo por localidad.

2.2.18 Estimación de diversidad de filotipos

Para la estimación de diversidad de filotipos se aplicó el índice de diversidad más utilizado para hongos que es el índice de diversidad de Shannon (H'). Este índice utiliza la abundancia de especies en una muestra y proporciona en la mayoría de los casos un valor entre 1.5 y 3.5 que indica baja diversidad de especies o alta diversidad de especies respectivamente dentro del ecosistema muestreado (Zak y Willig, 2004). La fórmula utilizada es: $H = -\sum P_i (\ln P_i)$, donde P_i es la proporción de especies en una muestra. Esta fórmula fue aplicada a cada una de las localidades.

CAPITULO III

3. RESULTADOS

3.1 Extracciones de ADN genómico de muestras de suelo

El ADN genómico extraído de las muestras de suelo de cada localidad se muestra a continuación (Figura 12).

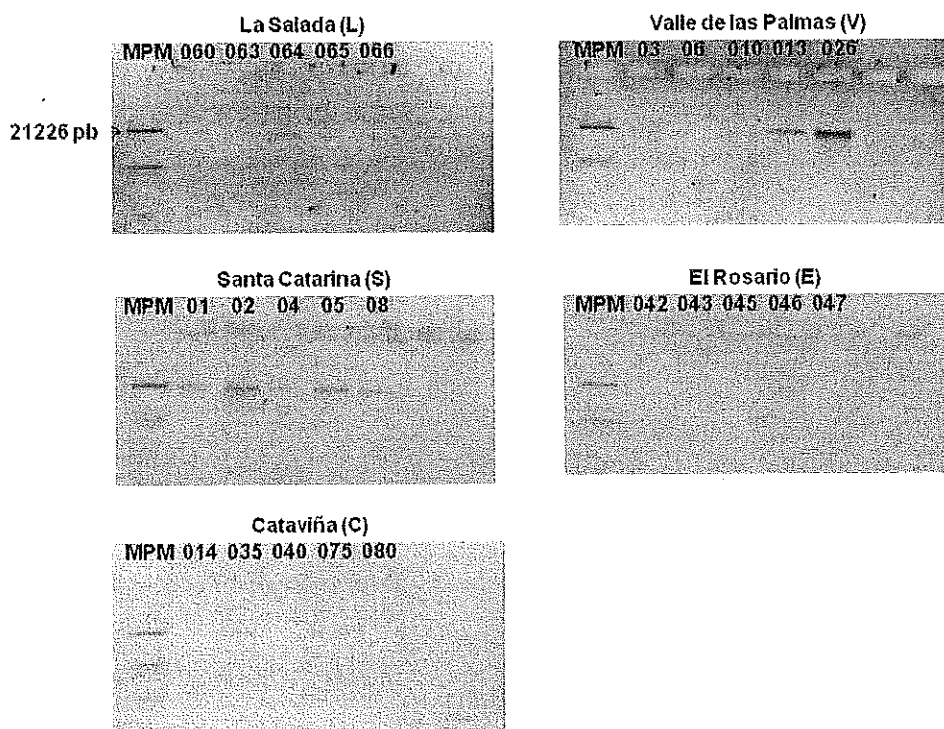


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio [0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$] demostrando ADN genómico total resultante de las extracciones de ADN del suelo de las distintas localidades. Sobre cada imagen se muestra el nombre de la localidad a la cual corresponden las extracciones de ADN y sobre cada carril se muestra el número de muestra de cada localidad. **MPM:** marcador de peso molecular que en todos los casos fueron 10 μl de ADN del fago lambda digerido con *EcoRI* y *HindIII* (Promega, Co.) a una concentración de 50 ng/ μl .

En las extracciones de Santa Catarina se observaron bandas de ADN genómico en todas las muestras. Éstas presentaron un barrido por debajo de la banda, lo cual significó que la agitación con cuentas para romper la pared celular de los microorganismos fue demasiado intensa y el ADN probablemente se fraccionó ligeramente¹⁷. En las extracciones de Valle de las Palmas se observó una banda de fuerte intensidad que corresponde a la muestra VDP26. Asimismo se apreciaron tres bandas tenues, una de ellas VDP10 presentó un barrido al igual que las muestras de Santa Catarina y una de las muestras, específicamente VDP06 no se alcanzó a observar. En las extracciones de La Salada, El Rosario y Cataviña se apreciaron tres, una y dos bandas respectivamente, las cuales fueron muy tenues; el resto de las muestras no se alcanzaron a observar.

Debido a que en la mayoría de las muestras no se apreciaron bandas de ADN genómico total se procedió a cuantificar la concentración de ADN por espectrofotometría. Los resultados que se muestran en la figura 13 corresponden a la concentración de ADN por microlitro de muestra.

¹⁷ <http://www.mobio.com>

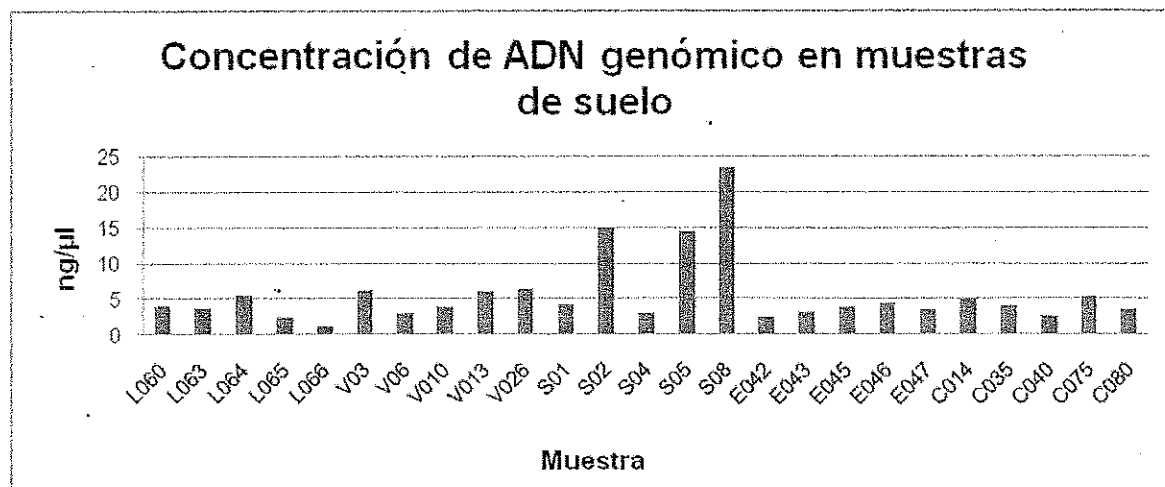


Figura 13. Concentración de ADN en ng/μl de cada una de las muestras de las extracciones de ADN genómico total de suelo de cada localidad. En la gráfica se observa de izquierda a derecha las cinco muestras representantes de cada localidad: Laguna Salada, Valle de las Palmas, Santa Catarina, El Rosario y Cataviña.

En la Salada se obtuvo una concentración promedio de 3.4 ng/μl. Las concentraciones coincidieron con la intensidad de las bandas observadas en la electroforesis en donde la banda más intensa fue L064 y su concentración de 5.6 ng/μl, siendo la más concentrada de las cinco muestras. En Valle de las Palmas se obtuvo una concentración promedio de 5.16 ng/μl, la muestra más concentrada fue V026 [6.5 ng/μl] que en la electroforesis corresponde a la banda más intensa. En Santa Catarina, se obtuvo una concentración promedio de 12.04 ng/μl, la muestra más concentrada correspondió a S08, a pesar de que en la electroforesis la muestra más intensa pertenece a S02 (esto puede deberse a la presencia de ARN resultado de la intensa agitación con las cuentas¹⁷). En el Rosario se obtuvo una concentración promedio de 3.56 ng/μl, siendo la muestra más concentrada la E046

que coincide con la única banda de la electroforesis de El Rosario que se alcanza a observar. En Cataviña, se obtuvo una concentración promedio de 4.1 ng/μl y la muestra más concentrada correspondió a la muestra C075 que coincide con la banda más intensa en la electroforesis de dicha localidad.

En general, la concentración de ADN genómico total extraído de las muestras de suelo fue muy baja. Sin embargo, según reportes de la compañía MoBio, una concentración de 10 - 20 ng/μl se considera el promedio adecuado en extracciones de ADN en muestras de suelo convencionales, esto es sin mucha materia orgánica¹⁸. Por lo tanto, podría concluirse que las concentraciones de ADN de las muestras de suelo de los ecosistemas áridos muestreados son adecuadas para suelos con escasez de materia orgánica.

3.2 PCR de secuencias ITS de hongos del subreino Dikarya

El ADN genómico fue diluido 1:10 (1 μl de la extracción de ADN diluido en 9 μl de agua HPLC) y se tomó 1 μl para usar como templado para la primera PCR. Posteriormente se formaron los "conjuntos por localidad" y se llevó a cabo la PCR anidada, en la cual se obtuvieron amplicones de aproximadamente 900 pb para cada una de las localidades. En total se obtuvieron cinco amplicones distintos, uno por cada localidad (Figura 14).

¹⁸ <http://www.mobio.com>

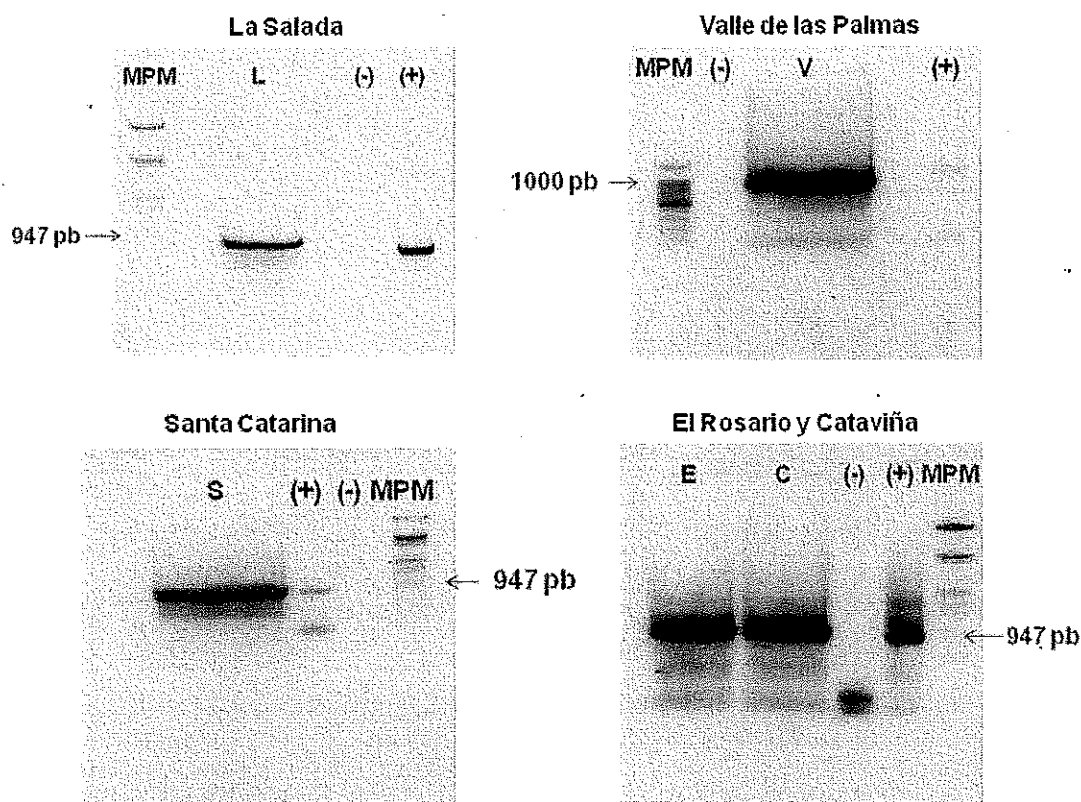


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio [0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$] de la PCR anidada de cada localidad. Sobre cada carril se muestra el nombre de cada localidad con la banda correspondiente a cada "conjunto por localidad", cuyo tamaño esperado fue de aproximadamente 1000 pb. A su vez, se muestra el carril correspondiente al control positivo (ADN genómico de *N. crassa*) y al control negativo (agua). **MPM:** marcador de peso molecular que en el caso de la imagen de La Salada, Santa Catarina, El Rosario y Cataviña corresponde a 10 μl de ADN del fago lambda digerido con la enzima *EcoRI* y *HindIII* [50ng/ μl] (Promega, Co.), mientras que para la imagen de Valle de las Palmas son 10 μl del MPM de 100 pb [130 ng/ μl] (Promega, Co.).

3.3 Selección de transformantes, PCR de colonia y análisis de restricción

Una vez que los amplicones fueron purificados y clonados, se obtuvo una gran cantidad de colonias azules y blancas por localidad (Tabla VII). De entre las colonias blancas, se seleccionaron 150 por cada localidad. Se llevó a cabo una PCR de colonia para cada colonia seleccionada y así se verificó la presencia del

inserto ITS, con el fin de descartar falsos positivos (Figura 15). En la tabla VII se muestran las colonias positivas resultantes de la PCR de colonia, de 750 colonias analizadas, 656 resultaron positivas.

Tabla VII. Número de colonias resultantes de cada transformación, así como número de colonias seleccionadas y verificadas como positivas.

Localidad (conjunto)	No. de colonias blancas	No. de colonias azules	No. colonias blancas seleccionadas para verificar	No. de colonias verificadas positivas por PCR de colonia
L	163	18	150	131
V	199	61	150	147
S	160	6	150	133
E	162	11	150	115
C	158	15	150	130
Total	842	111	750	656

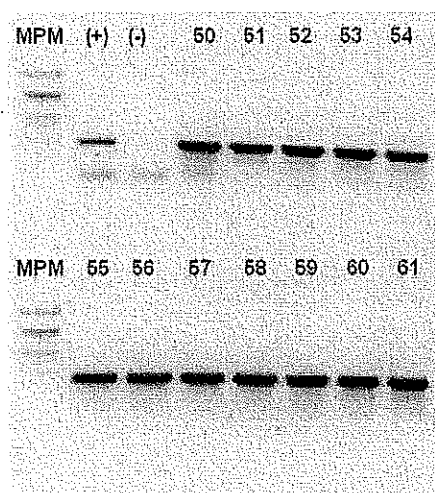


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio [0.1 µg/ml] de la PCR de colonia. Como control positivo se utilizó ADN de una colonia verificada como positiva por análisis de restricción, esto es, el plásmido pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen, Co.) con un inserto de aproximadamente 900 pb,

como control negativo se utilizó agua. Sobre cada carril se muestra el número clave de la colonia positiva de la localidad de Cataviña. Esto se llevó a cabo con cada una de las 750 colonias analizadas. **MPM**: marcador de peso molecular que corresponde a 10 μ l de ADN del fago lambda digerido con la enzima *EcoRI* y *HindIII* [50ng/ μ l] (Promega, Co.).

Una vez verificadas las colonias transformadas se procedió a los análisis de restricción. Se identificaron en total 656 colonias positivas. Los 656 plásmidos correspondientes fueron extraídos de las colonias positivas pero algunas de las colonias presentaron muy baja producción de plásmido, por lo que las restricciones no se apreciaron adecuadamente. Estas muestras fueron eliminadas después de extraer plásmido varias veces y obtener los mismos resultados (Figura 16). En total se realizaron 592 digestiones exitosas con la enzima *RsaI* y se obtuvieron 83 patrones de bandas diferentes (Tabla VIII) (Figuras 17 - 21). Los RFLPs de todas las muestras por localidad se presentan en el apéndice.

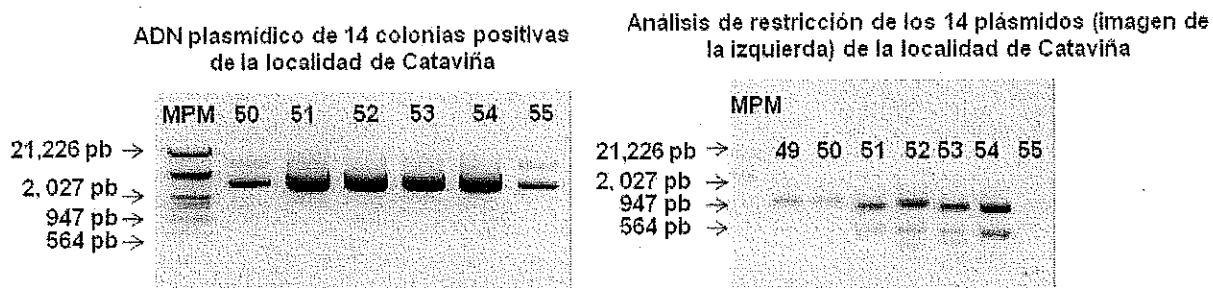


Figura 16. La imagen de la izquierda muestra una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio [0.1 μ g/ml] correspondiente a la extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina de 14 colonias positivas de la localidad de Cataviña; las colonias 50 y 55 presentaron baja producción de plásmido. En la imagen de la derecha se observa una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio [0.1 μ g/ml] la cual corresponde al análisis de restricción de los plásmidos extraídos de la imagen de la derecha. Se puede observar que las muestras 50 y 55 tuvieron baja producción de plásmido y por lo

tanto no es posible distinguir el patrón de bandas después del análisis de restricción. **MPM**: marcador de peso molecular que corresponde a 10 μ l de ADN del fago lambda digerido con la enzima *EcoRI* y *HindIII* [50ng/ μ l] (Promega, Co.).

Tabla VIII. Número de restricciones, así como de patrones de bandas distintas de cada localidad.

Localidad (conjunto)	No. de restricciones exitosas	No. de patrones de restricción distintos
L	117	14
V	138	25
S	118	14
E	101	14
C	117	16
Total	592	83

Patrones de restricción de la localidad de La Salada obtenidos con la enzima *RsaI*

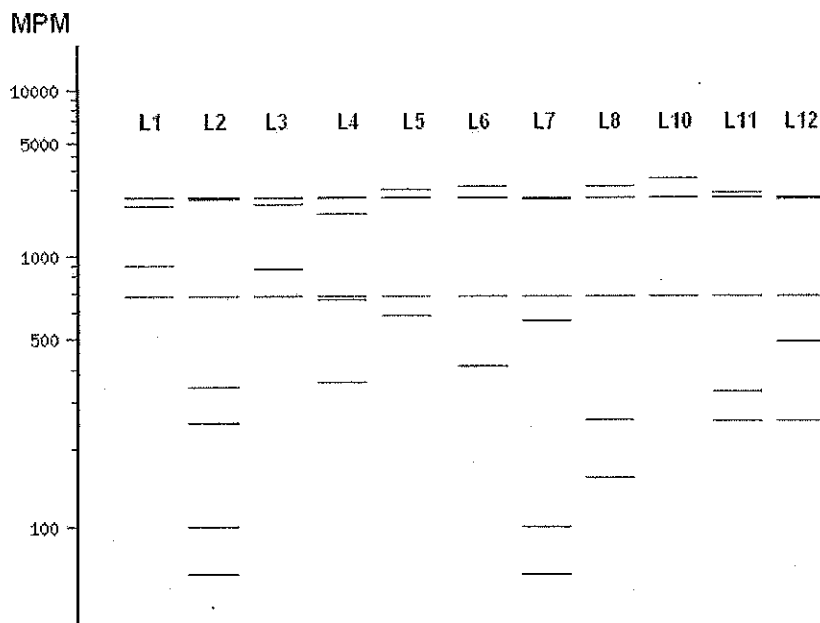


Figura 17. Esquema de los patrones de restricción obtenidos después de la digestión con la enzima *RsaI* de los plásmidos de la localidad de La Salada. Sobre

cada carril se muestra la clave para los patrones de restricción. La muestra L10 no tuvo secuencia de reconocimiento dentro del amplicón ITS. Los geles con los patrones de restricción (para la enzima *RsaI*) y las claves para cada patrón de restricción de la localidad de La Salada se encuentran en el apéndice. **MPM**: marcador de peso molecular que indica los tamaños de banda desde 100 hasta 10000 pb. **L**: La Salada.

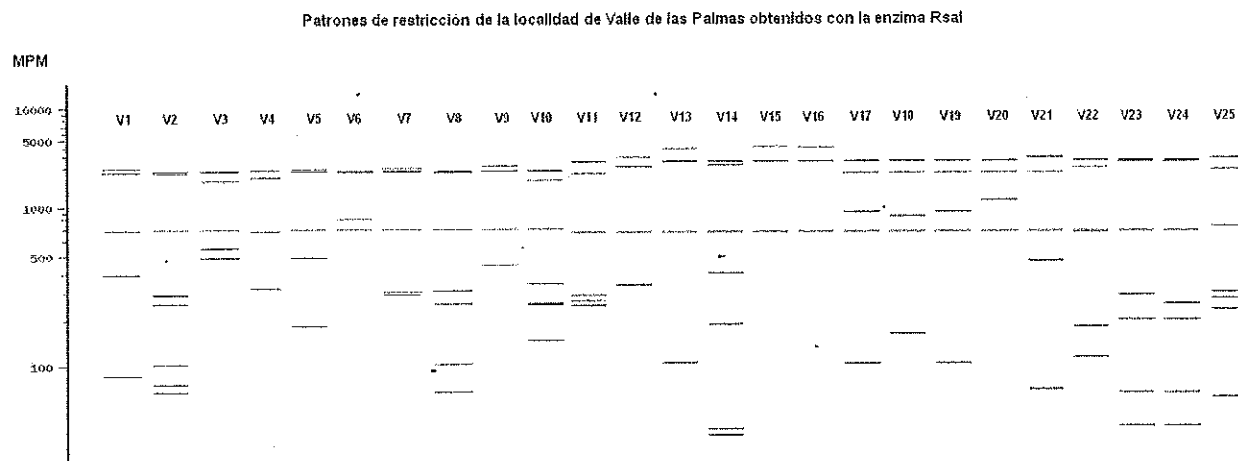


Figura 18. Esquema de los patrones de restricción obtenidos después de la digestión con la enzima *RsaI* de los plásmidos de la localidad de Valle de las Palmas. Sobre cada carril se muestra la clave para los patrones de restricción. Las muestras V15 y V16 no tuvieron secuencia de reconocimiento dentro del amplicón ITS. Los geles con los patrones de restricción (para la enzima *RsaI*) y las claves para cada patrón de restricción de la localidad de Valle de las Palmas se encuentran en el apéndice. **MPM**: marcador de peso molecular que indica los tamaños de banda desde 100 hasta 10000 pb. **V**: Valle de las Palmas.

Patrones de restricción de la localidad de Santa Catarina obtenidos con la enzima *RsaI*

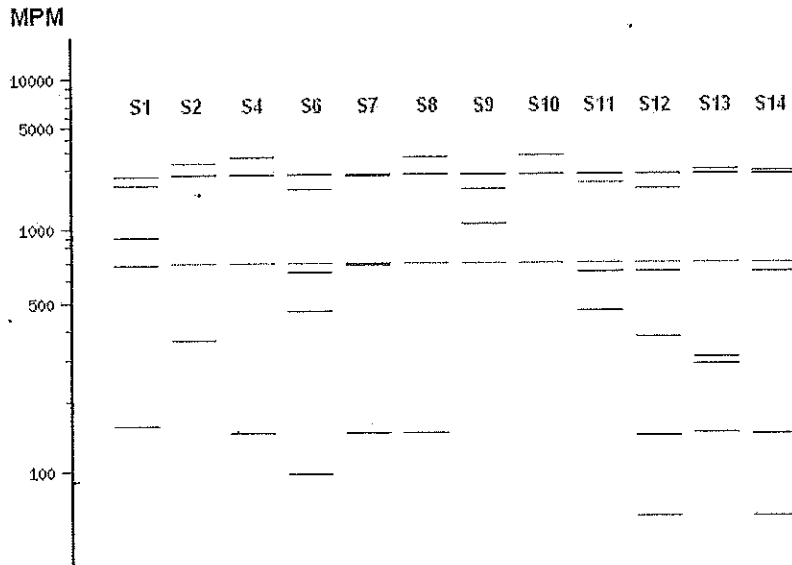


Figura 19. Esquema de los patrones de restricción obtenidos después de la digestión con la enzima *RsaI* de los plásmidos de la localidad de Santa Catarina. Sobre cada carril se muestra la clave para los patrones de restricción. La muestra S10 no tuvo secuencia de reconocimiento dentro del amplicón ITS. Los geles con los patrones de restricción (para la enzima *RsaI*) y las claves para cada patrón de restricción de la localidad de Santa Catarina se encuentran en el apéndice. **MPM:** marcador de peso molecular que indica los tamaños de banda desde 100 hasta 10000 pb. **S:** Santa Catarina.

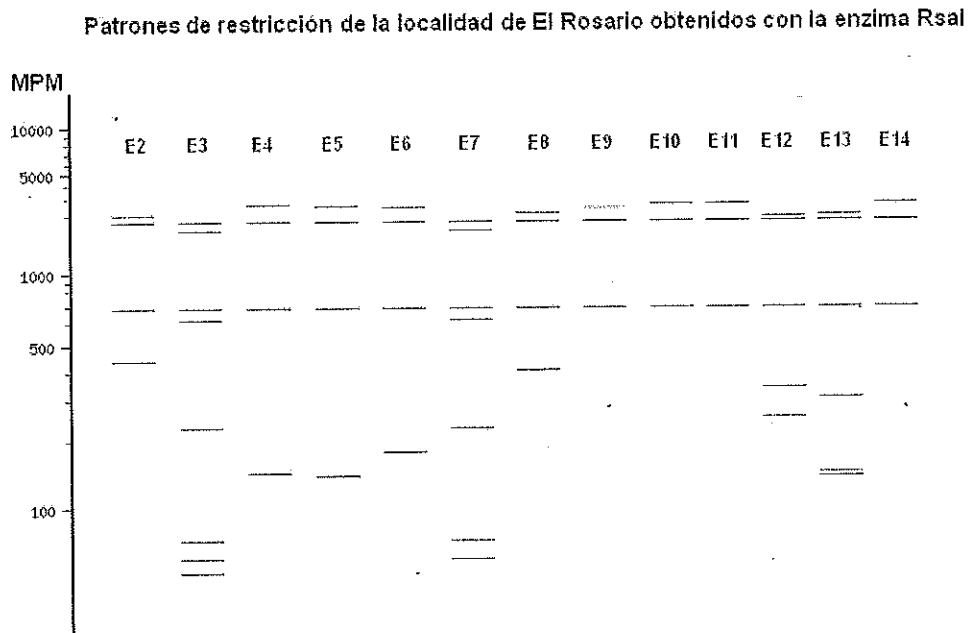


Figura 20. Esquema de los patrones de restricción obtenidos después de la digestión con la enzima *Rsa*I de los plásmidos de la localidad de El Rosario. Sobre cada carril se muestra la clave para los patrones de restricción. Las muestras E10, E11 y E14 fueron iguales al cortar con la enzima *Rsa*I, lo cual indicó que dicha enzima no tuvo secuencia de reconocimiento dentro del amplicón ITS. Los gels con los patrones de restricción (para la enzima *Rsa*I) y las claves para cada patrón de restricción de la localidad de El Rosario se encuentran en el apéndice. **MPM:** marcador de peso molecular que indica los tamaños de banda desde 100 hasta 10000 pb. **E:** El Rosario.

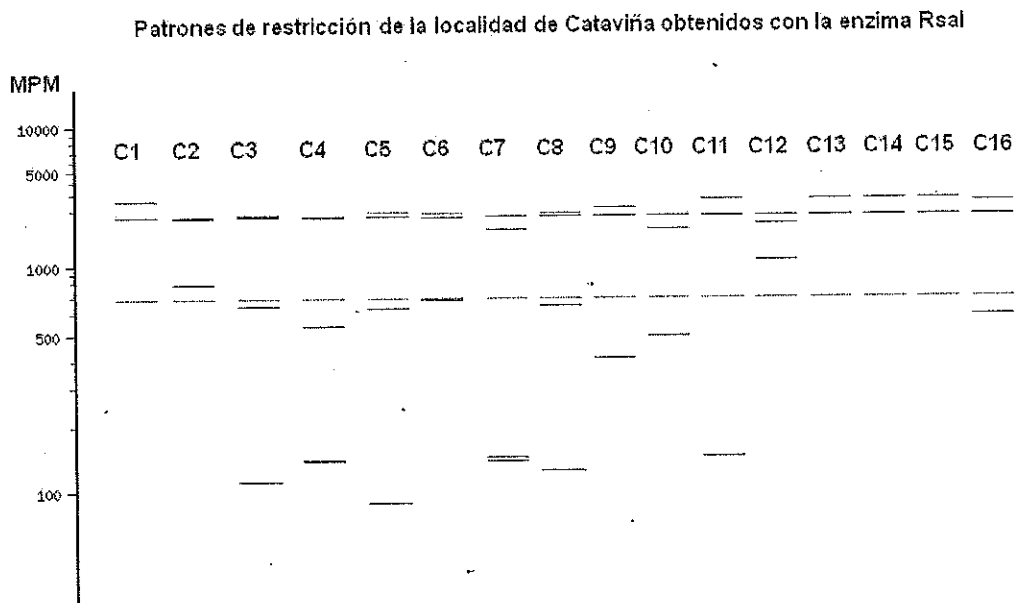


Figura 21. Esquema de los patrones de restricción obtenidos después de la digestión con la enzima *RsaI* de los plásmidos de la localidad de Cataviña. Sobre cada carril se muestra la clave para los patrones de restricción. Las muestras C13, C14 y C15 fueron iguales al cortar con la enzima *RsaI*, lo cual indicó que dicha enzima no tuvo secuencia de reconocimiento dentro del amplicón ITS. Los geles con los patrones de restricción (para la enzima *RsaI*) y las claves para cada patrón de restricción de la localidad de Cataviña se encuentran en el apéndice. **MPM:** marcador de peso molecular que indica los tamaños de banda desde 100 hasta 10000 pb. **C:** Cataviña.

Los únicos patrones de restricción que se repitieron entre localidades fueron los patrones pertenecientes a las muestras C9 y E8 de las localidades de Cataviña y El Rosario, respectivamente. Asimismo, aquellas muestras que no tuvieron secuencia de reconocimiento para la enzima *RsaI*. Posteriormente éstas fueron digeridas con la enzima *EcoRI*. En la figura 22 se observan los principales patrones de restricción obtenidos con la enzima *EcoRI*.

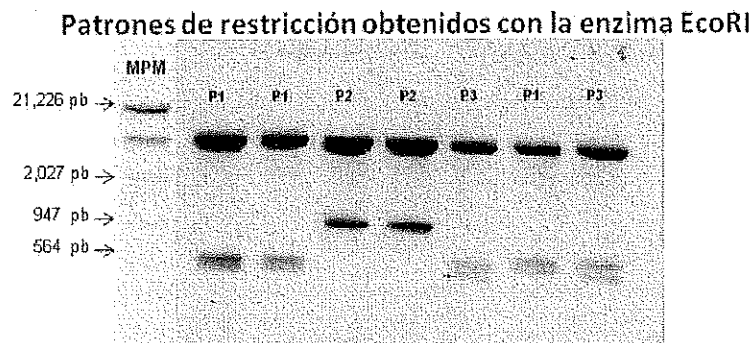


Figura 22. Imagen con los tres patrones de restricción distintos (**Patrón 1**, **Patrón 2**, **Patrón 3**) obtenidos con la enzima *EcoRI*. Sobre cada carril se muestra la clave para cada patrón de restricción. **MPM**: marcador de peso molecular que corresponde a 10 μ l de ADN del fago lambda digerido con la enzima *EcoRI* y *HindIII* [50ng/ μ l] (Promega, Co.).

Como se puede observar en la figura 22, los patrones de restricción obtenidos con la enzima *EcoRI* no son fáciles de distinguir. Esto dio pie a dificultades al momento de leer los patrones de restricción obtenidos con la enzima *EcoRI*. Sin embargo, los patrones obtenidos y clasificados como distintos se enumeraron: P1, P2 y P3. De estos, se seleccionó uno de cada uno por localidad para enviar a secuenciar.

3.4 Análisis bioinformático de secuencias ITS

En la tabla IX se enlista la clave del patrón representante con el número de veces que se repitió dicho patrón dentro de la muestra. A la vez se enlista el filotipo de cada una de las muestras que corresponden al hit de menor valor de E y mayor porcentaje de identidad, así como el porcentaje de cobertura de la secuencia dado por BLAST. Los nombres: "Ascomiceto sin cultivar",

“Basidiomiceto sin cultivar”, “Hongo sin cultivar” y “Especie de hongo” corresponden a secuencias que anteriormente han sido agregadas al GenBank y pertenecen a estudios similares a éste, en donde no se ha identificado la especie a la que pertenece la secuencia ya que la obtención de la secuencia no ha ido acompañada de aislamientos en cultivo.

Las secuencias correspondientes a las muestras L9, L13, L14, S3, S5 y E1 no fueron incluidas dentro del análisis debido a que dos de los electroferogramas (S3 y S5) fueron de muy mala calidad. Por otro lado para el resto de las secuencias, aunque fueron alineadas, al parecer hubo errores de amplificación de la taq polimerasa ya que los hits en BLAST dieron para “vector de clonación”. Las secuencias de las muestras C6 y V14 no pudieron ser alineadas dentro del archivo de alineamiento múltiple (para la construcción del árbol filogenético) debido a sus secuencias tan variables en comparación a las demás secuencias. Estas ocho secuencias no fueron tomadas en cuenta para el análisis de datos.

En la tabla IX se observa el número de filotipos distintos obtenidos por localidad. De los 76 filotipos incluidos en el análisis, que han sido identificados por lo menos hasta taxón, 36 son Ascomicetos mientras que 25 son Basidiomicetos. En La Salada se obtuvieron 11 filotipos distintos de los cuales 8 se encuentran identificados hasta el nivel de especie, 1 de ellos hasta taxón y dos de ellos no están identificados. De los filotipos identificados, todos pertenecen al taxón Ascomycota y el más común en esta localidad corresponde a *Penicillium*

dipodomycicola (L10) con 36 repeticiones de su patrón de restricción. En Valle de las Palmas se obtuvieron 24 filotipos distintos, de los cuales 9 se encuentran identificados hasta el nivel de especie, 1 hasta el nivel de clase, 10 hasta taxón (de los cuales 8 pertenecen al taxón Ascomycota y 2 al taxón Basidiomicota) y 4 no han sido identificados. De los filotipos identificados por lo menos hasta taxón, 14 son Ascomicetos y 5 son Basidiomicetos. El filotipo más común en ésta localidad pertenece a la muestra V16 que ha sido identificada solo hasta el nivel de taxón (Ascomycota) con 25 repeticiones de su patrón de restricción. En Santa Catarina se obtuvieron 12 filotipos distintos, todos Basidiomicetos, de los cuales 4 han sido identificados hasta el nivel de especie, 1 hasta el nivel de género, 5 hasta el nivel de taxón y 2 no han sido identificados. El filotipo más común en ésta localidad pertenece a la muestra S10 con 31 repeticiones de su patrón de restricción y que ha sido identificada hasta el nivel de género como *Coprinellus sp.* En El Rosario se obtuvieron 13 filotipos distintos de los cuales, 6 han sido identificados hasta el nivel de especie, 3 hasta taxón y 4 no han sido identificados. Dentro de ésta última categoría se encuentra el filotipo más común perteneciente a la muestra E10 con 39 repeticiones de su patrón de restricción. De los filotipos identificados por lo menos hasta taxón, 5 son Basidiomicetos, mientras que 4 son Ascomicetos. En Cataviña se obtuvieron 16 filotipos distintos de los cuales, 9 han sido identificados hasta especie, 2 hasta género, 2 hasta taxón y 3 no han sido identificados, de todos estos 8 son Ascomicetos, mientras que 5 son

Basidiomicetos. Al igual que La Salada, el filotipo más común corresponde a *Penicillium dipodomyicola* con 27 repeticiones de su patrón de restricción.

Los filotipos repetidos entre localidades fueron: *Penicillium dipodomyicola* entre La Salada, Cataviña y El Rosario, aunque el género *Penicillium* estuvo presente en todas las localidades excepto Santa Catarina. Otro filotipo repetido entre La Salada y Cataviña fue: *Alternaria alternata*. El filotipo repetido entre La Salada y Valle de las Palmas corresponde a *Phoma medicaginis*. Asimismo el filotipo correspondiente a *Phoma nebulosa* se repitió tanto en El Rosario como en Cataviña. Por otro lado, entre Valle de las Palmas y Santa Catarina se repitió el filotipo de *Tulostoma kotlabae*.

De los filotipos encontrados, solamente uno de los géneros, *Geastrum*, había sido reportado para Baja California por Ayala y Ochoa (1998). El antecedente se había dado específicamente para la especie *Geastrum triplex*, mientras que el filotipo encontrado en éste estudio corresponde a *Geastrum campestre*. El resto de los filotipos encontrados en este estudio no han sido reportados para Baja California anteriormente.

El árbol filogenético (figura 23) se construyó con las secuencias enlistadas en la tabla IX (a excepción de las muestras: L9, L13, L14, V14, S3, S5, E1y C6). Los nombres de cada secuencia van acompañados de la clave del patrón de restricción que le corresponde. El árbol filogenético está condensado para valores mayores a 50, esto significa que los clados con valores por debajo de 50 fueron

eliminados y más bien se da énfasis a los clados confiables con valores por encima de 50. Por lo anterior, la importancia del árbol radica en su topología y ha perdido el valor filogenético ya que la longitud de las ramas no es proporcional al número de sustituciones nucleotídicas¹⁹.

¹⁹ <http://evolgen.biol.metro-u.ac.jp/MEGA/manual/Phylogeny.html>

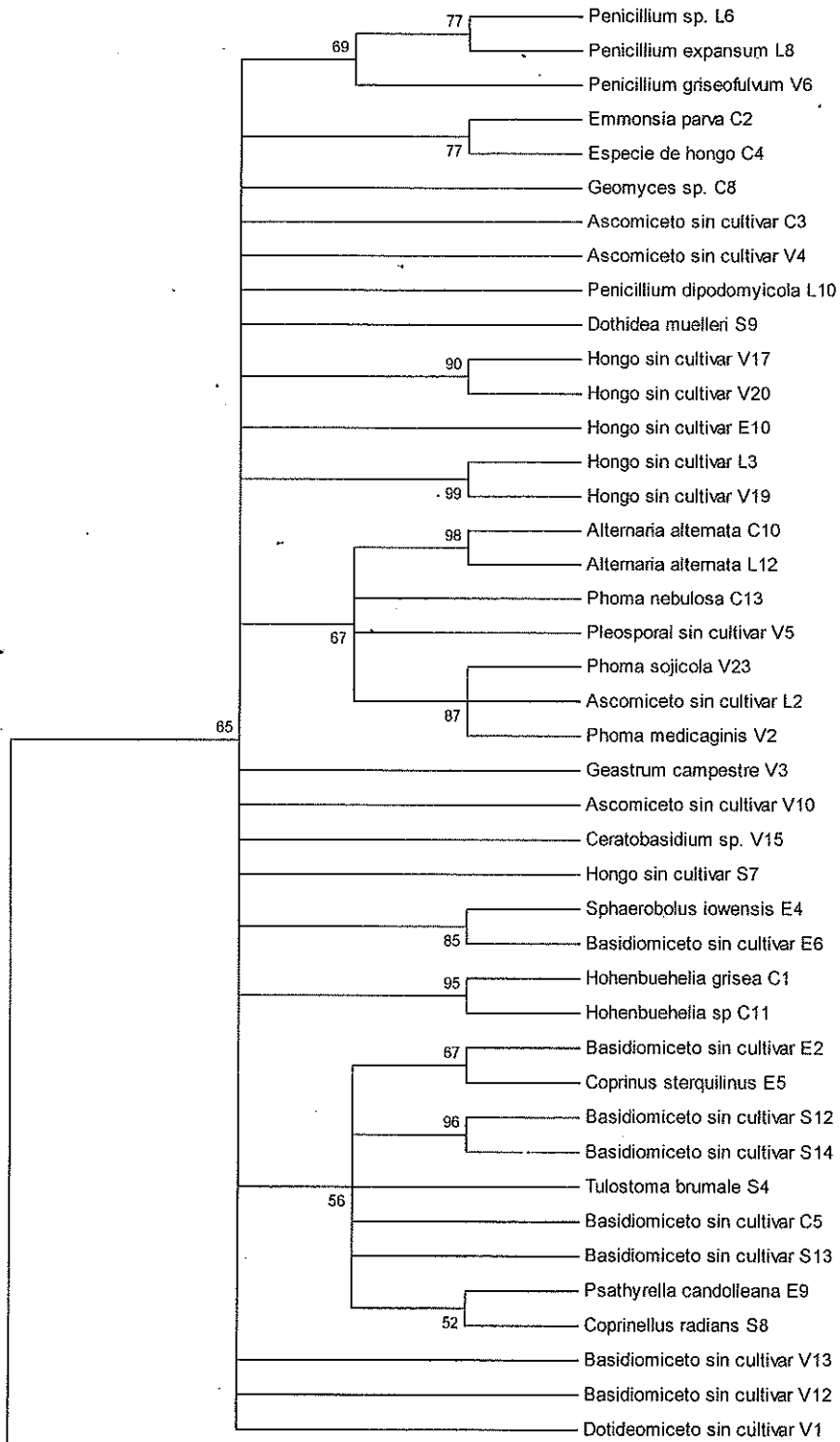
Tabla IX. Filotipo al que pertenece cada secuencia, con su respectivo valor de E, así como el porcentaje de la máxima identidad y el porcentaje de cobertura. A la vez, se muestra el número de veces que se repite el mismo patrón de bandas por muestra en los RFLP.

Clave del patrón representante por filotipo	Repeticiones	Filotipo	Máxima Identidad (%)	Valor de E	Cobertura (%)
L1	9	Hongo sin cultivar	88	1e-156	47
L2	13	Ascomiceto sin cultivar	99	0	88
L3	4	Hongo sin cultivar	99	0	62
L4	1	<i>Penicillium clavigerum</i>	89	0	88
L5	9	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	90	1e-142	66
L6	6	<i>Penicillium sp.</i>	86	0	89
L7	2	<i>Phoma medicaginis</i>	96	0	57
L8	5	<i>Penicillium expansum</i>	84	0	89
L9	2	-----	---	---	---
L10	38	<i>Penicillium dipodomyicola</i>	96	0	68
L11	13	<i>Alternaria tenuissima</i>	99	0	88
L12	6	<i>Alternaria alternata</i>	99	0	89
L13	4	-----	---	---	---
L14	4	-----	---	---	---
V1	5	Dotideomiceto	94	0	50
V2	4	<i>Phoma medicaginis</i>	99	0	91
V3	1	<i>Geastrum campestre</i>	88	0	61
V4	12	Ascomiceto sin cultivar	92	0	87
V5	5	Pleosporal sin cultivar	97	0	53
V6	10	<i>Penicillium griseofulvum</i>	96	0	89
V7	4	<i>Ulocladium atrum</i>	98	0	56

V8	13	Ascomiceto sin cultivar	99	0	88
V9	1	Ascomiceto sin cultivar	92	0	88
V10	1	Ascomiceto sin cultivar	93	0	79
V11	1	Ascomiceto sin cultivar	90	0	87
V12	1	Basidiomiceto sin cultivar	85	0	80
V13	12	Basidiomiceto sin cultivar	94	0	82
V14	1	<i>Penicillium variable</i>	77	3e-13	16
V15	17	<i>Ceratobasidium sp.</i>	92	0	76
V16	36	Ascomiceto sin cultivar	91	0	88
V17	2	Hongo sin cultivar	100	0	59
V18	2	Hongo sin cultivar	98	0	61
V19	2	Hongo sin cultivar	99	0	62
V20	1	Hongo sin cultivar	96	0	76
V21	2	Ascomiceto sin cultivar	95	0	76
V22	1	<i>Tulostoma kotlabae</i>	92	0	76
V23	1	<i>Phoma sojicola</i>	98	0	88
V24	2	Ascomiceto sin cultivar	96	0	90
V25	1	<i>Phialophora hyalina</i>	93	0	72
S1	15	<i>Tulostoma kotlabae</i>	89	0	75
S2	7	Especie de hongo	97	0	54
S3	5	-----	---	---	---
S4	1	<i>Tulostoma brumale</i>	95	0	55
S5	3	-----	---	---	---
S6	12	Basidiomiceto sin cultivar	95	0	89
S7	3	Hongo sin cultivar	99	0	58
S8	3	<i>Coprinellus radians</i>	95	0	89
S9	22	<i>Dothidea muelleri</i>	98	0	88
S10	28	<i>Coprinellus sp.</i>	94	0	89
S11	6	Basidiomiceto sin cultivar	95	0	90
S12	9	Basidiomiceto sin cultivar	92	0	89

S13	1	Basidiomiceto sin cultivar	96	0	90
S14	4	Basidiomiceto sin cultivar	93	0	90
E1	1	-----	---	---	---
E2	1	Basidiomiceto sin cultivar	86	0	82
E3	3	Hongo sin cultivar	89	0	64
E4	11	<i>Sphaerobolus iowensis</i>	99	0	64
E5	8	<i>Coprinus sterquilinus</i>	94	0	61
E6	3	Basidiomiceto sin cultivar	97	0	48
E7	1	Especie de hongo	89	0	64
E8	7	Ascomiceto sin cultivar	90	0	88
E9	7	<i>Psathyrella candolleana</i>	95	0	82
E10	36	Hongo sin cultivar	81	7E-130	63
E11	7	<i>Phoma nebulosa</i>	85	0	88
E12	1	<i>Ochrocladosporium elatum</i>	91	0	83
E13	1	Especie de hongo	92	0	45
E14	3	<i>Penicillium dipodomyicola</i>	98	0	89
C1	4	<i>Hohenbuehelia grisea</i>	96	0	79
C2	1	<i>Emmonsia parva</i>	93	0	75
C3	3	Ascomiceto sin cultivar	92	0	75
C4	3	Especie de hongo	92	0	75
C5	8	Basidiomiceto sin cultivar	89	0	90
C6	2	<i>Gibberella moniliformes</i>	100	0	48
C7	3	Especie de hongo	92	0	45
C8	4	<i>Geomyces sp.</i>	99	0	74
C9	20	Hongo sin cultivar	93	0	74
C10	6	<i>Alternaria alternata</i>	99	0	88
C11	1	<i>Hohenbuehelia sp</i>	95	0	80
C12	10	<i>Nematoctonus robustus</i>	95	0	79
C13	3	<i>Phoma nebulosa</i>	85	0	88
C14	36	<i>Penicillium dipodomyicola</i>	98	0	88

C15	12	<i>Neonectria sp.</i>	96	0	75
C16	1	<i>Psathyrella candolleana</i>	96	0	82



Continuación del árbol filogenético.

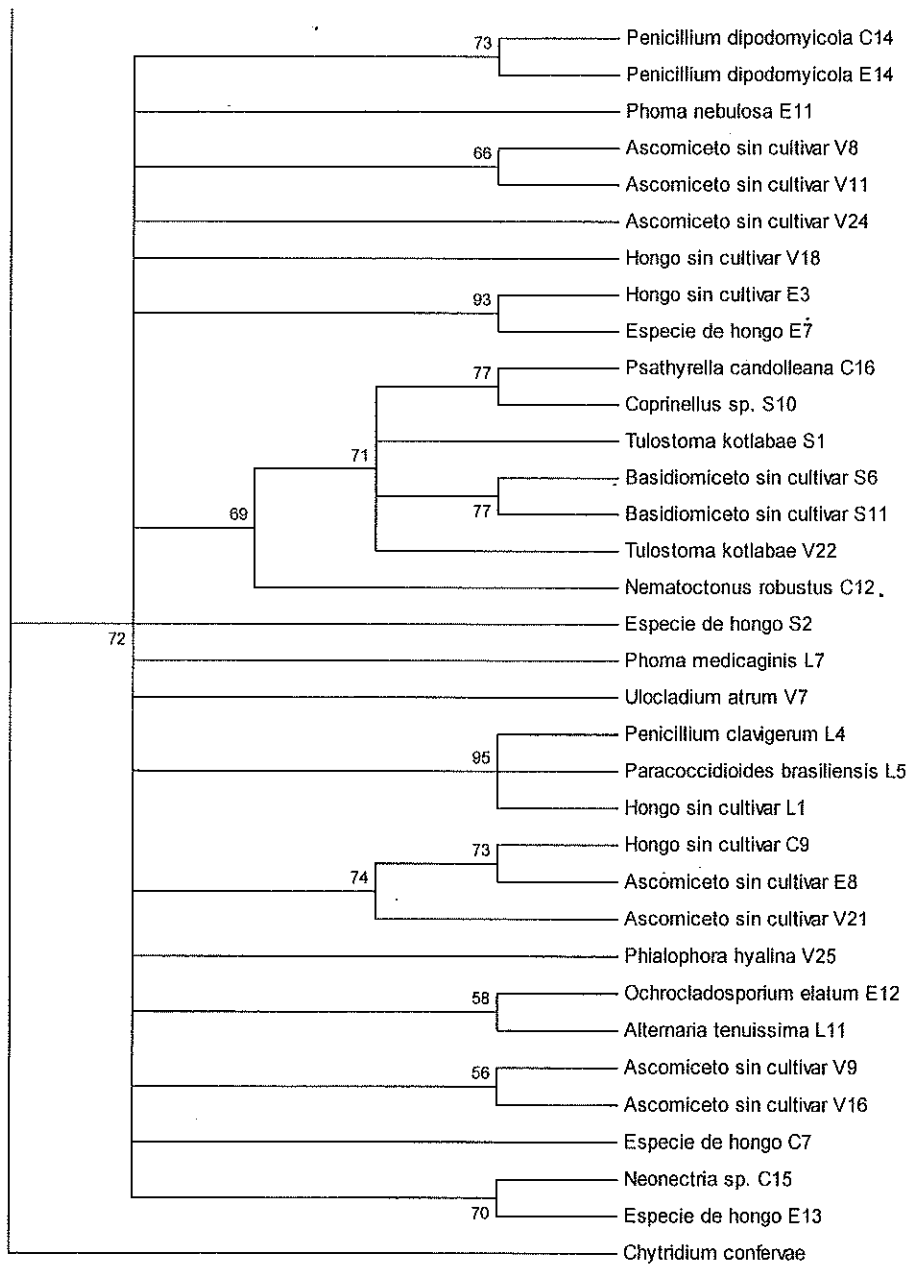


Figura 23. Árbol filogenético construido por el método de "neighbor-joining" con 500 réplicas condensado (valores > 50) en el cual se muestra el nombre del hit con menor valor de E y mayor porcentaje de identidad de las muestras a las cuales se les sometió a BLAST, así como la clave del patrón de restricción que le corresponde.

3.5 Estimación de biodiversidad de filotipos

Para la estimación de diversidad de especies se aplicó el índice de diversidad de Shannon (H') y se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla X. Valores de H del índice de Shannon obtenidos para cada una de las localidades. Valores cercanos a 1.5 indican baja diversidad de especies, mientras que valores cercanos a 3.5 indican alta diversidad de especies.

Localidad	Valor de H
La Salada	2.0203
Valle de las Palmas	2.5645
Santa Catarina	2.1146
El Rosario	1.8543
Cataviña	2.2424

Las tablas desglosadas con los valores calculados para la obtención del índice de diversidad de Shannon por localidad pueden verse en el apéndice.

CAPITULO IV

4. DISCUSION

Las concentraciones de ADN total de las muestras de suelo no están directamente relacionadas con la riqueza fúngica de las localidades, sino más bien, son un indicador de la cantidad de biomasa de cada lugar. Por lo tanto, no se esperaba que las localidades con mayor concentración de ADN tuvieran una mayor riqueza fúngica. Este fue el caso de Santa Catarina, que presentó la mayor concentración de ADN total, sin embargo su riqueza fúngica fue similar al resto de las localidades. Las altas concentraciones de ADN total de dicha localidad pueden deberse a que la disponibilidad de agua es mayor en Santa Catarina que en las otras localidades, lo que permite el desarrollo de follaje más denso, por lo que hay más materia orgánica en descomposición (proveniente de las plantas) en el suelo. Por lo tanto, al tomar la muestra de suelo, ésta está repleta de partículas de plantas y al hacer las extracciones de ADN la mayor parte del ADN aislado probablemente pertenece a plantas y no hongos. Por otro lado, a pesar de las condiciones xéricas del Valle de las Palmas, las concentraciones de ADN, aunque bajas, tendieron a ser un poco más elevadas que en las otras tres localidades. Esto podría deberse al extenso sistema de raíces del subsuelo que presenta dicha localidad y que a pesar de que a simple vista el paisaje no es muy frondoso, el suelo posee una gran cantidad de biomasa pequeña (p.e. raíces, artrópodos, etc.).

Las amplificaciones obtenidas con la PCR anidada, indicaron que en todas las muestras de suelo había presencia de Ascomicetos y Basidiomicetos (Figura 11). Por lo anterior, fue posible proceder con la clonación. A pesar de que para la clonación se utilizó un vector con alta efectividad en sus tasas de transformación²⁰, hubo una alta tasa de falsos positivos. TOPO asegura una efectividad del 95% en las transformaciones y en este caso se obtuvo una efectividad del 87% (Tabla VII). Sin embargo, la transformación con TOPO fue la única que resultó exitosa en este caso. Anteriormente se intentó utilizar el pGEM®-T Easy Vector (Promega, Co.), así como el vector pBluescript II y pUC19 sin resultado alguno. Estos problemas, tanto la baja efectividad como el fallo al utilizar otros vectores, se podrían deber a que anteriormente se ha reportado la incapacidad de clonar ciertos productos de PCR amplificados de muestras de suelo (Head et al, 1998). A su vez, es bien sabido que la clonación de conjuntos de secuencias es complicado y que debido a la composición de algunas secuencias de ADN (p.e. aquellas muy ricas en adeninas y timinas, o aquellas con secuencias repetidas que formen estructuras secundarias con el plásmido), simplemente no pueden ser mantenidas completas dentro del plásmido, por lo que la transcripción del gen de la lacZ es interrumpido por un pequeño fragmento de la secuencia insertada y no por todo el inserto en sí²¹.

²⁰ http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf

²¹ <http://www.ucl.ac.uk/>

De los plásmidos sometidos a RFLP se obtuvieron 83 patrones de bandas distintos (Tabla VIII). Como se mencionó anteriormente, los únicos patrones de restricción que se repitieron entre localidades fueron los patrones pertenecientes a las muestras C9 y E8. Sin embargo, estas muestras se alinearon con filotipos diferentes en BLAST; la muestra C9 se alineó para un "hongo sin cultivar" mientras que la muestra E8 se alineó para un "Ascomiceto sin cultivar". No obstante, en el árbol filogenético (figura 23) estas dos muestras se agrupan en el mismo clado, lo cual indica que son especies con mucha similitud dentro de su secuencia ITS, razón por la cual probablemente comparten el patrón de restricción en común y por lo que seguramente están cercanamente emparentadas.

Los patrones de restricción de las muestras en donde el amplicón ITS no tuvo secuencia de reconocimiento para la enzima *RsaI* (que posteriormente fueron digeridas con *EcoRI*) también se alinearon a filotipos distintos. La muestra L10, E14 y C14 correspondieron a *Penicillium dipodomyicola*, la muestra V15 se alineó a *Ceratobasidium sp.*, la muestra S10 se alineó a *Coprinellus sp.*, las muestras E11 y C13 se alinearon a *Phoma nebulosa* y la muestra C15 se alineó al filotipo correspondiente a *Neonectria sp.* Estos filotipos son totalmente distintos entre sí y pertenecen incluso a diferentes taxa. Haber digerido los amplicones que no fueron digeridos con la enzima *RsaI* (utilizando la enzima *EcoRI*) fue de suma utilidad, ya que de haber tomado el patrón de restricción obtenido con la enzima *RsaI* como perteneciente a un mismo filotipo, los datos hubieran estado sesgados hacia ese patrón de restricción en particular y a la colonia seleccionada para secuenciar; así,

los resultados mostrarían a ese filotipo como el más común para todas las localidades. Sin embargo, debido a que los patrones de restricción obtenidos con la enzima *EcoRI* no se pudieron distinguir con facilidad, existe la posibilidad de que algunos filotipos hayan pasado desapercibidos y estén siendo clasificados erróneamente dentro de otro filotipo.

Como se mencionó anteriormente, las muestras L10, E14 y C14 estuvieron dentro de las muestras que no fueron digeridas por la enzima *RsaI* y que posteriormente fueron digeridas con *EcoRI*. Estas tres muestras se alinearon para el mismo filotipo: *Penicillium dipodomyicola*. La muestra perteneciente a la localidad de La Salada (L10) presenta un porcentaje de cobertura muy bajo en comparación a las otras dos muestras. Mientras que E14 y C14 presentan un porcentaje de identidad y cobertura de 98% y 88% respectivamente, L10 posee un porcentaje de identidad de 96% y un porcentaje de cobertura de solamente 68%. Asimismo, en el árbol filogenético las muestras E14 y C14 se encuentran agrupadas en un mismo clado, mientras que la muestra perteneciente a L10 se encuentra en un clado totalmente distinto. Por lo anterior, se podría pensar que la muestra L10 realmente no pertenece al filotipo de *Penicillium* sino a alguna especie cercana que aún no ha sido identificada. Asimismo, en La Salada hubo presencia de otros filotipos pertenecientes al género *Penicillium* que se agruparon dentro de otro clado, estos filotipos fueron: *Penicillium sp.* (L6) y *Penicillium expansum* (L8). Este clado está compartido con *Penicillium griseofulvum* (V6) de la localidad de Valle de las Palmas; las tres muestras poseen valores de identidad y

cobertura muy similares. Sin embargo, la muestra L6 se agrupó dentro de un subclado con la muestra L8, dejando fuera a la muestra V6, lo que indica que la muestra L6 y L8 están cercanamente emparentadas. No obstante, la muestra *Penicillium sp.* L6 no ha sido debidamente identificada. Debido a su cercanía con la muestra L8 podría pensarse que se trata del mismo filotipo, pero los patrones de restricción y los porcentajes de máxima identidad y cobertura rechazan dicha teoría. Por lo tanto, la muestra L6 probablemente pertenezca a alguna variedad de la especie *Penicillium expansum* que aún no ha sido descrita.

Las muestras E11 y C13 tampoco fueron digeridas por la enzima *RsaI*. Ambas se alinearon al filotipo *Phoma nebulosa*. Los porcentajes de máxima identidad y cobertura fueron iguales para ambos casos (Tabla IX), pero en el árbol filogenético (figura 23) se encuentran agrupados en clados distintos. Mientras que la muestra *Phoma nebulosa* C13 comparte clado con *Phoma sojicola*, la muestra E11 se encuentra aislada sin formar parte de ningún clado en particular. Debido a que *Phoma nebulosa* es un patógeno de plantas²², el aislamiento de la muestra E11 podría estar asociado a que dicha especie haya desarrollado algún tipo de relación con alguna planta en particular de la localidad de El Rosario que no esté presente en las otras localidades en donde se observó el género de *Phoma*.

Por otro lado, las muestras V2 y L7 mostraron patrones de restricción distintos a pesar de haberse alineado al mismo filotipo (*Phoma medicaginis*). En la

²² <http://nt.ars-grin.gov/fungal/databases/>

tabla IX se puede observar que los valores de máxima identidad y porcentaje de cobertura de las muestras V2 y L7 tienden a variar. El porcentaje de cobertura de la muestra L7 es solamente de 57%, mientras que el porcentaje de cobertura de la muestra V2 es de 91%. En el árbol filogenético (figura 23) las dos muestras (*Phoma medicaginis* V2 y *Phoma medicaginis* L7) se encuentran en clados totalmente separados, lo que significa que sus secuencias nucleotídicas no son iguales (de ahí los patrones de restricción distintos). *Phoma medicaginis* V2 se encuentra agrupada en un clado junto con *Phoma sojicola* V23 y un "Ascomiceto sin cultivar L2", el cual probablemente pertenece a una especie hermana del género *Phoma* que aún no ha sido identificada; las muestras V23 y L2 poseen porcentajes de cobertura y máxima identidad por encima de los 98% y 88% respectivamente. Con dichos valores elevados se puede asegurar que se han alineado al filotipo adecuado y al compartir clado con esas muestras se puede también asegurar que la muestra *Phoma medicaginis* V2 realmente pertenece al filotipo al cual se alinea. Sin embargo, esto podría estar indicando que la muestra aislada (L7) probablemente no pertenece al filotipo de *Phoma medicaginis* sino a alguna especie cercana que aún no ha sido identificada o bien, a un tipo de variedad dentro de la especie.

Las muestras V22 y S1 también presentaron un patrón de restricción distinto a pesar de haberse alineado para el mismo filotipo: *Tulostoma kotlabae*. En el árbol filogenético (figura 23) las dos muestras están dentro del mismo clado y poseen porcentajes de máxima identidad y cobertura similares (tabla IX). Por lo

anterior, podría decirse que se trata del mismo filotipo para ambas localidades. El clado en el que se ubican las muestras *Tulostoma kotlabae* V22 y *Tulostoma kotlabae* S1 está compartido con otros basidiomicetos que forman dos subclados entre sí. Uno de esos subclados está conformado por dos filotipos pertenecientes a la localidad de Santa Catarina y ambos "Basidiomicetos sin cultivar" (S6 y S11) y el otro subclado está formado por dos filotipos distintos, uno perteneciente a la localidad de Santa Catarina (*Coprinellus* sp.) y otro a Cataviña (*Psathyrella candolleana*). Todos los filotipos poseen porcentajes de identidad y cobertura por encima de los ochenta. Los patrones de restricción distintos pudieron deberse a fallos de digestión por parte de la enzima o a pequeñas diferencias en la secuencia de ADN resultado de errores de lectura de la taq polimerasa.

Las muestras L11 y C10 también se alinearon al mismo filotipo (*Alternaria alternata*) a pesar de presentar patrones de restricción distintos. Sus valores de máxima identidad y porcentaje de cobertura son iguales (tabla IX) y en el árbol filogenético (figura 23) se encuentran agrupados dentro del mismo clado. Las diferencias en los patrones de restricción se pudieron deber a pequeñas variaciones en la secuencia de ADN que podrían estar asociadas a la distancia geográfica que los separa.

La mayoría de los filotipos no identificados se agruparon entre sí, pero ninguno de ellos compartió patrón de restricción, excepto las muestras C9 y E8. La muestra "Hongo sin cultivar L3" se agrupó en el mismo clado que el filotipo "Hongo

sin cultivar V19", sus porcentajes de máxima identidad y cobertura fueron idénticos, por lo que probablemente se trate de especies cercanamente emparentadas. Los filotipos "Hongo sin cultivar V17" y "Hongo sin cultivar V20" poseen porcentajes altos de máxima identidad, pero porcentajes bajos de cobertura, por lo que probablemente se trate de especies emparentadas que aún no han sido descritas. Las muestras "Ascomiceto sin cultivar E8" y "Ascomiceto sin cultivar V21", poseen valores muy similares de máxima identidad y cobertura por lo que al estar agrupados en el mismo clado podría tratarse de variedades dentro de la misma especie. El mismo caso se dio para las muestras "Ascomiceto sin cultivar V8" y "Ascomiceto sin cultivar V11", así como para las muestras "Ascomiceto sin cultivar V9" y "Ascomiceto sin cultivar V16", también para las muestras "Hongo sin cultivar E3" y "Especie de hongo E7" y lo mismo sucedió para las muestras "Basidiomiceto sin cultivar S6" y "Basidiomiceto sin cultivar S11". Por otro lado un filotipo no identificado ("Especie de hongo C4") se agrupó en el mismo clado que el filotipo perteneciente a *Emmonsia parva* C2, por lo que probablemente el filotipo no identificado pertenece a alguna especie hermana del género *Emmonsia* que aún no ha sido reportado. El mismo caso se dio para la muestra "Especie de hongo E13" que se agrupó en el mismo clado que el filotipo *Neonectria* sp.

Cada una de las localidades presentó características específicas en cuanto a la composición de filotipos fúngicos. En La Salada se observaron cuatro filotipos distintos pertenecientes al género *Penicillium*, así como dos filotipos distintos

pertenecientes al género *Alternaria*. Las condiciones climáticas tan extremas que se presentan en dicha localidad, pudieran estar favoreciendo el fenómeno de especiación simpátrica, dando origen a diferentes especies dentro de un mismo género. De la misma forma se podrían explicar los distanciamientos dentro del árbol filogenético (figura 23) de las muestras *Penicillium dipodomycicola* L10 y la muestra *Phoma medicaginis* L7, que no se agruparon dentro de los clados de filotipos iguales o similares. Como se mencionó con anterioridad, todos los filotipos identificados en esta localidad son Ascomicetos, esto no es extraño, ya que las condiciones climáticas tan áridas probablemente dificultan el desarrollo de Basidiomicetos, que se caracterizan por ser hongos de climas más templados y en muchos casos se desarrollan solo en presencia de mucha biomasa perteneciente a la madera (Heilmann – Clausen y Boddy, 2008).

Valle de las Palmas se caracterizó por presentar la mayor diversidad de filotipos. Mientras que el resto de las localidades presentaron en promedio 13 filotipos distintos, Valle de las Palmas presentó 25 filotipos diferentes. A su vez, el sustrato de Valle de las Palmas, rico en humus y con un sistema de raíces muy desarrollado, lo cual podría facilitar el desarrollo de hongos. En esta localidad, aunque hubo presencia predominantemente de Ascomicetos, también hubo presencia de Basidiomicetos, (aunque en menor cantidad) debido a que los recursos maderables no son tan escasos como en La Salada, a que la temperatura no es tan elevada y a que la disponibilidad de agua no es tan limitada. De los 25 filotipos de Valle de las Palmas más de la mitad se clasificaron como no

identificados y la mayoría fueron exclusivos para Valle de las Palmas ya que los filotipos presentes en esta localidad no se repitieron en otras localidades, a excepción del Basidiomiceto *Tulostoma kotlabae* en Santa Catarina y *Phoma medicaginis* en La Salada. Lo anterior, probablemente se deba a las características climáticas tan exclusivas de Valle de las Palmas, que puede haber propiciado el desarrollo de ciertas especies que probablemente no sean tan comunes en otros ecosistemas un poco más convencionales.

La localidad de Santa Catarina se caracterizó por presentar solamente Basidiomicetos. De los ecosistemas áridos muestreados éste es el menos árido, la disponibilidad de agua y materia orgánica es mayor y las temperaturas son templadas. Estas características, contrarias a la localidad de La Salada, pueden hacer a Santa Catarina la localidad óptima para el desarrollo exclusivo de Basidiomicetos. Por los filotipos encontrados en Santa Catarina, podría decirse que fue el ecosistema más distinto en composición fúngica. Esto debido a que solamente posee un filotipo en común con el resto de las localidades el cual es compartido con Valle de las Palmas (*Tulostoma kotlabae*). Sin embargo, en esta localidad sucedió algo similar a lo observado en La Salada, ya que hubo dos filotipos pertenecientes al género *Tulostoma*, así como otros dos filotipos pertenecientes al género *Coprinellus*. Además los "Basidiomicetos sin cultivar" (S6, S11, S12, S13 y S14) se agruparon en los clados pertenecientes a esos géneros (*Tulostoma* y *Coprinellus*), por lo que probablemente se trate de filotipos cercanamente emparentados o bien especies distintas dentro de un mismo

género. El exceso de recursos (tales como agua t materia orgánica en descomposición) dentro de esta localidad, probablemente esté favoreciendo a esos dos géneros, los cuales gracias a las condiciones adecuadas han podido desarrollarse en comunidades grandes, fraccionarse y especializarse hasta formar variedades distintas dentro de una misma especie o bien especies diferentes dentro de un mismo género.

En El Rosario, hubo una proporción aproximada de 1:1 de Ascomicetos: Basidiomicetos. En materiales y métodos se detallaron las características climáticas de dicha localidad, mencionando que es un importante punto de transición de provincias biogeográficas florísticas de climas mediterráneos y desérticos. Por lo tanto, las condiciones climáticas no son tan áridas como en La Salada, pero tampoco son templadas como en Santa Catarina. Por lo tanto, la presencia de filotipos en igual cantidad de Basidiomicetos y Ascomicetos va de acuerdo al hecho de que dicho sitio es una localidad de transición entre dos tipos de climas. Así, se facilita el desarrollo de Ascomicetos debido a las condiciones áridas, pero aún así hay presencia de Basidiomicetos debido a los elementos climáticos de los desiertos mediterráneos. Sin embargo, el sustrato de El Rosario se caracteriza por ser típico de ecosistemas impactados y la dominancia muy marcada de un solo filotipo (Hongo sin cultivar E10) lo corroboró. A pesar de lo anterior, la localidad de El Rosario fue la única que presentó filotipos tanto del norte como del sur del estado. Este fue el caso de los filotipos pertenecientes a *Penicillium dipodomyicola*, presentes también en La Salada y Cataviña, así como

el caso del filotipo *Phoma nebulosa*, el cual también estuvo presente en Cataviña y el género *Coprinus* que se observó también en la localidad de Santa Catarina. Estos resultados van de acuerdo a lo predicho; debido a la ubicación geográfica en un punto de transición de provincias biogeográficas, El Rosario, tiende a presentar filotipos tanto de ecosistemas áridos del norte, como de ecosistemas áridos del sur. Asimismo, en comparación al resto, esta localidad compartió más filotipos con otras localidades.

En Cataviña se observaron filotipos en su mayoría pertenecientes al taxón Ascomycota pero también hubo presencia de algunos Basidiomicetos. Cataviña fue la localidad con más filotipos distintos después de Valle de las Palmas, pero a diferencia de éste último, la mayoría de los filotipos sí fueron identificados. Entre La Salada y Cataviña (ambos ecosistemas con características climáticas similares) hubo algunos filotipos compartidos, tal es el caso de *Penicillium dipodomycola*, *Alternaria alternata* y el género *Phoma*, así como filotipos únicos para dicha localidad como: *Hohenbuehelia grisea* y *Emmonisa parva*. Por lo anterior, podría decirse que aunque La Salada y Cataviña comparten características climáticas muy similares y a pesar de que poseen filotipos en común, la diversidad fúngica tiende a cambiar después del paralelo 28.

Por los resultados observados en cada una de las localidades, podría decirse que los hongos no son cosmopolitas en el sentido de que no todos los hongos están en todas partes, sino que más bien, parecen mostrar patrones de

distribución similares a los descritos en plantas, por lo menos para el estado de Baja California. Esto podría estar ocurriendo por la razón de que muchos hongos están asociados a plantas, tal es el caso de los géneros *Phoma*, *Emmonsia*, *Ulocadium*, *Alternaria* y *Penicillium* (en el caso del filotipo pertenecientes a *Penicillium expansum*), por lo que su distribución podría estar directamente relacionada con la distribución de las plantas con las cuales se asocian. O bien podría estar ocurriendo el caso contrario: que los hongos crezcan en el sustrato adecuado (con nutrientes específicos para cada planta) para que sólo ciertas plantas se desarrollen en cada localidad.

En cuanto a la abundancia de filotipos en las localidades muestreadas, si seguimos el principio de que la polimerasa tiende a amplificar por azar las secuencias más comunes en una muestra de ADN, se podría decir que los patrones de bandas que se repitieron constantemente en los RFLPs fueron aquellos para el hongo más abundante de cada localidad, mientras que los patrones de bandas que solo se observaron una vez o un par de veces, pertenecen a hongos poco abundantes de la localidad. Utilizando éste principio, se calcularon los índices de diversidad para cada localidad (Tabla X). En la tabla X se puede observar que la localidad con un mayor índice de diversidad corresponde a Valle de las Palmas con un valor de 2.5613. Esto significa que Valle de las Palmas posee un nivel moderado de diversidad, ya que aunque posee la mayor cantidad de filotipos estos no están distribuidos uniformemente, sino que hay dominancia de uno de ellos en particular (Ascomiceto sin cultivar V16). Este resultado se

repitió en todas las localidades en diferente magnitud. El índice de diversidad más bajo lo presentó El Rosario, con un valor de 1.8543. Lo anterior se debe a que aunque El Rosario presentó riqueza similar al resto de las localidades, hubo dominancia muy marcada de un hongo en particular (Hongo sin cultivar E10). La Salada y Santa Catarina presentaron valores más o menos similares: 2.0203 y 2.1146 respectivamente. Ambas localidades presentaron dominancia de un filotipo: *Penicillium dipodomyicola* para La Salada y *Coprinellus sp.* para Santa Catarina. Cataviña se situó en un punto intermedio, presentando un índice de diversidad de 2.2424. Los valores de diversidad obtenidos tendieron estar sesgados hacia valores bajos, esto se debió a la predominancia muy marcada de un filotipo en particular por localidad. En el caso de Valle de las Palmas y El Rosario, el filotipo más común pertenece a un hongo que aún no ha sido identificado. Esto nos muestra la falta de información en la caracterización de comunidades fúngicas, ya que los componentes más abundantes de ciertas localidades aún no se conocen. Por otro lado, en el caso de La Salada y Cataviña el filotipo predominante fue *Penicillium dipodomyicola*, caracterizado por ser un hongo generalista, es decir que puede desarrollarse fácilmente bajo cualquier condición climática. Debido a que este hongo fue el más común en los ecosistemas más extremos, podría decirse que probablemente sea el que mejor se ha adaptado a las condiciones extremas o bien que ha sido la única especie que ha podido sobrevivir exitosamente. Sin embargo, los resultados de diversidad obtenidos como consecuencia de los RFLPs son un primer estimado de la

diversidad real que existe en los ecosistemas áridos de Baja California. Como se mencionó anteriormente, los análisis de restricción poseen una gran cantidad de sesgos asociados a la acción enzimática, por lo que la selección de la enzima a utilizar debe de ser cuidadosamente seleccionada o puede generar resultados poco fiables al momento de obtener los patrones de restricción. En este trabajo ese fue uno de los principales problemas ya que se encontró que muchas de las secuencias ITS no eran digeridas por la enzima *Rsal*. A pesar de que la enzima *EcoRI* fue la segunda alternativa, ésta tampoco resultó ser de mucho éxito. El principal problema se debió a que las secuencias ITS se encontraban insertadas dentro de un plásmido y éste tendía a ser digerido en muchos fragmentos por la mayoría de las enzimas, por lo cual los fragmentos ITS se perdían dentro de los patrones de bandas y eran prácticamente imposibles de diferenciar (ver apéndice). La alternativa más adecuada hubiera sido la liberación de la secuencia ITS del plásmido, la purificación del fragmento y la posterior digestión con un conjunto de enzimas. Sin embargo, esta opción no fue del todo viable ya que la única enzima que libera el fragmento inserto en el plásmido pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen, Co.) es la enzima *EcoRI* que a la vez, posee una secuencia de reconocimiento común dentro de las secuencias ITS de hongos, por lo que rara vez, el fragmento insertado es liberado por completo. Otra alternativa hubiera sido llevar a cabo una PCR para cada uno de los plásmidos (utilizando los cebadores de Martin y Rygiewicz, 2005) y una vez amplificado el inserto, purificarlo y digerirlo. Sin embargo, dicha alternativa requería de mucha mano de obra y recursos. Por la

misma razón de que los RFLPs no poseen una alta resolución, no se puede asignar un patrón de bandas exclusivo para la identificación de un filotipo y a la vez los índices de diversidad obtenidos con el índice de diversidad de Shannon no son un indicativo fiable de la verdadera biodiversidad de las localidades muestreadas. Aunado a esto, el tamaño de muestra fue muy pequeño para la determinación definitiva de índices de diversidad, por lo tanto, para obtener un índice más significativo se requiere de un muestreo mucho más exhaustivo.

La cantidad de filotipos obtenidos en cada una de las localidades de esta investigación son muchas más, en comparación a los antecedentes descritos para Baja California. Sin embargo, probablemente existen muchos más filotipos que los descritos en este trabajo que están pasando desapercibidos debido a la gran cantidad de sesgos que produce la metodología utilizada. Lo anterior es resultado de no utilizar la cantidad completa de las extracciones de ADN genómico, así como la reacción completa de PCR y la reacción completa de clonación; para cada reacción los templados van disminuyendo y los sesgos aumentando. Un claro ejemplo de este sesgo es que anteriormente, las muestras de ADN genómico de Valle de las Palmas utilizadas en éste trabajo, fueron utilizadas para amplificar la región ITS del hongo patógeno *Coccidioides sp.* utilizando cebadores específicos para dicho organismo y los resultados obtenidos fueron positivos (resultados no mostrados). Sin embargo, de los filotipos obtenidos en este trabajo, ninguno se alineó al filotipo perteneciente a *Coccidioides sp.* No obstante, dentro de las metodologías más accesibles para el estudio de microorganismos sin cultivar, ésta

es la más viable en cuanto a resolución y costo. Asimismo, gracias a los resultados obtenidos en muchas investigaciones en las cuales se utilizó como base la PCR y clonación, se han obtenido grandes avances en el conocimiento de los microorganismos sin cultivar.

Actualmente, existen metodologías más sofisticadas como la secuenciación de alto rendimiento, en la cual los resultados se obtienen directamente de la extracción de ADN genómico total, desapareciendo los sesgos ocasionados por la PCR y la clonación. Sin embargo, éste método aún es muy novedoso por lo que sus precios no son del todo accesibles. No obstante, los resultados que se han obtenido con dicha tecnología parecen ser muy prometedores para el área de ecología microbiana.

Por otro lado, el cultivo de las muestras de suelo de las localidades muestreadas podrían revelar colonias que no han sido designadas a un filotipo en particular o bien que pertenecen a filotipos desconocidos como (p.e. "hongo sin cultivar") y aislando ADN de dichas colonias y amplificando la región ITS de éstas podrían caracterizarse en definitivo ciertas secuencias ITS.

Los filotipos encontrados en este trabajo, en su mayoría no han sido reportados para Baja California. Estos no solo son de importancia ecológica sino que algunos de ellos también poseen importancia económica. Los hongos *Phoma sojicola* (Kövics, 1999), *Phoma nebulosa* (Guske, 2004), *Gibberella moniliformes* (Jurgenson, 2002), *Alternaria tenuissima* (Blodgett, 2002), *Alternaria alternata*

(Trujillo, 2007) y *Penicillium expansum*²³, son fitopatógenos para diferentes especies de plantas, que en su mayoría poseen importancia económica para la región, como: el maíz, la soya y la fresa. Por otro lado, se encontraron filotipos pertenecientes a hongos patógenos para humanos, tal es el caso de: *Paracoccidioides brasiliensis* (Restrepo, 1985) y *Emmonsia parva* (Peterson y Sigler, 1998), los cuales se han reportado que ocasionan enfermedades respiratorias. Asimismo, se encontraron filotipos pertenecientes a especies de hongos con importancia biotecnológica y biomédica como es el caso del hongo: *Penicillium griseofulvum*, del cual se ha aislado el compuesto griseofulvina el cual es un inhibidor de la mitosis en células tumorales (Panda, 2005). Esto nos muestra el potencial de los ecosistemas áridos de Baja California para la bioprospección de especies fúngicas con utilidad en diversos campos de importancia económica.

²³ http://www.caf.wvu.edu/kearneysville/disease_month/bluemold0199.html

CAPITULO V

5. CONCLUSIONES

- La biodiversidad fúngica de ecosistemas áridos de Baja California se distribuye en función de las características climáticas y edafológicas de cada localidad, ya que se observó, que los filotipos de hongos que conforman la comunidad fúngica no son iguales a lo largo del estado sino que tienden a seguir patrones de distribución similares a los reportados en plantas por Delgadillo para el estado de Baja California (1995).
- El ecosistema árido con características climáticas y edafológicas más exclusivas, tales como: alta tasa de endemismos, suelo muy desarrollado y época de lluvias muy marcada, presentó mayor diversidad de filotipos.
- Los ecosistemas áridos con características climáticas y edafológicas similares pero situados al norte y sur del estado mostraron en general filotipos distintos, aunque hubo presencia de algunos filotipos compartidos.
- El ecosistema árido con características climáticas menos exclusivas, tales como disponibilidad de agua todo el año, temperaturas templadas y suelos ricos en materia orgánica, mostró menor diversidad de filotipos.
- El ecosistema que posee características climáticas y edafológicas de transición entre ecosistemas del norte y sur del estado fue el ecosistema con mayor número de filotipos compartidos entre localidades.

- Las herramientas moleculares utilizadas en esta investigación han aportado mucha más información de la diversidad fúngica de ecosistemas áridos de Baja California que la reportada anteriormente por otros autores, la cual estuvo basada en la observación de cuerpos fructíferos.
- Se requiere de un muestreo más amplio para la evaluación y estimación precisa de la biodiversidad fúngica de ecosistemas áridos de Baja California, así como un trabajo complementario no sólo utilizando herramientas moleculares sino herramientas clásicas como lo son, la recolección de cuerpos fructíferos y el aislamiento en medios de cultivo.
- Los ecosistemas áridos de Baja California poseen potencial para la bioprospección de especies fúngicas.
- Este trabajo sirve como pauta para futuros estudios de diversidad fúngica de ecosistemas áridos de Baja California.

6. REFERENCIAS

Alabouvette, C., 1990. Biological control of Fusarium wilt pathogens in suppressive soils. IN: Hornby, D (ed.) Biological Control of Soil-Borne Pathogens. CAB International, United Kingdom; 27 – 34.

Alvarado, P., J. L. Manjón, 2009. Selection of enzymes for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of fungal internally transcribed spacer sequences. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (14): 4747 – 4752.

Anderson, I. C., C. D. Campbell, J. I. Prosser, 2003. Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environmental Microbiology*. 5 (1): 36 – 47.

Ayala, N., C. Ochoa. Hongos conocidos de Baja California. 1998. Universidad Autónoma de Baja California, México. 118-129.

Ayala, N., C. Ochoa., 1991. Desconocidos del desierto: los hongos. *ConCiencia Revista Bimestral de Divulgación Científica*. 2 (9): 28 – 30.

Barrow, J. R., M., Lucero, P., Osuna-Ávila, I., Reyes-Vera, R. E., Aaltonen, 2004. Fungal Genomes that Influence Basic Physiological Processes of Black Grama and Fourwing Saltbush in Arid Southwestern Rangelands. IN: Sosebee R. E., D. B. Wester; C. M. Britton; E. D. McArthur; S. G. Kitchen (ed.) *Shrubland Dynamics – Fire and Water*. Proceedings RMRS-P-47, U.S. Department of Agriculture, Forest Service; 123-13.

Bates, S. T., G. S. N., Reddy, F. Garcia-Pichel, 2006. *Exophiala crusticola anam. nov.* (affinity Herpotrichiellaceae), a novel black yeast from biological soil crusts in the Western United States. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 2697- 2702.

Bent, S. J., L. J. Forney, 2008. The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *The ISME Journal*. 2: 689 – 695.

Berbee, M. L., J. W. Taylor, 2001. Fungal molecular evolution: gene, trees and geologic time. IN: McLaughlin D, E. McLaughlin, P. Lemke. (ed.) *The Mycota: Systematic and Evolution*. Berlin: Springer – Verlag. 229 – 245.

Bhatnagar, A., M. Bhatnagar, 2005. Microbial diversity in desert ecosystems. *Current Science*. 89 (1): 91 – 100.

Binga, E. K., R. S. Lasken, J. D. Neufeld, 2008. Something from (almost) nothing: the impact of multiple displacement amplification on microbial ecology. *The ISME Journal*. 2: 233 – 241.

Blackwood, C. B., A. Oaks, J. S. Buyer, 2005. Phylum and class - specific PCR primers for general microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (10): 6193 – 6198.

Blodgett, J. T., W. J. Swart, 2002. Infection, colonization and disease of *Amaranthus hybridus* leaves by the *Alternaria alternata* group. *Plant Disease*. 86 (11): 1199 – 1205.

Borneman, J., R. J. Hartin, 2000. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (10): 4356 – 4360.

Brady, N. R. *The Nature and Properties of Soil*, 2002. New Jersey Pearsons Education Inc.

Bridge, P., K. K. Newshama, 2009. Soil fungal community composition at Mars Oasis, a southern maritime Antarctic site assessed by PCR amplification and cloning. *Fungal Ecology*. 2 (2): 66 – 74.

Bruns, T. D., T. J. White, J. W. Taylor, 1991. Fungal Molecular Systematics. *Annual Review of Ecology Systematics*. 22: 525 – 564.

Buchan, A., S. Y. Newell, J. I. L. Moreta, M. A. Moran, 2002. Analysis of internal transcribed spacer (ITS) region of rRNA genes in fungal communities in a southeastern U.S. salt marsh. *Microbial Ecology*. 43: 329 – 340.

Cannon, P. F, 1999. Options and constraints in rapid diversity analysis of fungi in natural ecosystems. *Journal of Fungal Diversity*. 2: 1 – 15.

Cooke, D. E. L., J. M. Duncan, 1997. Phylogenetic analysis of Phytophthora species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. *Mycological Research*. 101: 667 – 677.

Delgadillo, J., 1992. *Florística y Ecología del Norte de Baja California*, Universidad Autónoma de Baja California, México.

Daniel, R., 2005. The metagenomics of soil. *Nature*. 3: 470 – 478.

Egger, K. N., 1995. Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. *Canadian Journal of Botany*. 73: 1415 – 1422.

Fierer, N., M. Breitbart, J. Nulton, P. Salamon, C. Lozupone, R. Jones, M. Roberson, R. A. Edwards, B. Felts, S. Rayhawk, R. Knight, F. Rohwer, R. B. Jackson, 2007. Metagenomics and small subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of Bacteria, Archaea, Fungi and Viruses in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (21): 7059 – 7066.

Fierer, N., L. Zongzhi, M. Rodríguez-Hernández, R. Knight, M. Henn, M. T. Hernández, 2008. Short-term temporal variability in airborne bacterial and fungal populations. *Applied and Environmental Microbiology*. 74 (1): 200 – 207.

Fierer, N., R. B. Jackson, 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Science*. 103: 626 – 631.

Gardes, M., T. D. Bruns, 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*. 2: 113 – 118.

Gomes, E. A., M. Catarina, M. Kasuya, E.G. de Barros, A.C. Borges, E. E. Araujo, 2002. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. *Genetics and Molecular Biology*. 25 (4): 477 – 483.

Goodall, D. W., R. A. Perry., 1979. Arid Land Ecosystems: Structure Functioning and Management, London Cambridge University Press.

Google Earth, 2009. 5.1.3533.1731 Version. Mountain View, CA: Google Inc.

Guske, S., B. Schulz, C. Boyle, 2004: Biocontrol options for *Cirsium arvense* with indigenous fungal pathogens. *Weed Research*. 44 (2): 107 – 116.

Hartmann, M., F. Widmer, 2006. Community structure analysis are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (12): 7804 – 7812.

Hawksworth, D. L., A. Y. Rossman, 1997. Where are all the undescribed Fungi? *Phytopatology*. 87: 888 – 891.

Head, I., J. R. Saunders, R. W. Pickup, 1998. Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultured microorganisms. *Microbial Ecology*. 35: 1 – 21.

van der Heijden M. G. A., J. N., Klironomos, M., Ursic, P. Moutoglis, R. Streitwolf-Engel, T. Boller, A. Wiemken, I. R., Sanders, 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69–72.

Heilmann – Clausen, J., L. Boddy, 2008. Distribution patterns of wood-decay Basidiomycetes. IN: Boddy, L., J. C. Frankland, P. West (ed.) *Ecology of*

Saprotrophic Basidiomycetes. Vol. 28, British Mycological Society Press, United Kingdom, 265.

Hibbett, D. D. and M. J. Donoghue, 1996. Implications of phylogenetic studies for conservation of genetic diversity in shiitake mushrooms. *Conservations Biology*. 10: 1321 – 1327.

Hill, M. O., 1973. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology*. 54: 427 – 432.

Horner-Devine, M., M. Lage, J. B. Hughes, B. J. M. Bohannan, 2004. A taxa – area relationship for bacteria. *Nature*. 432: 750–753.

Hugenholtz, P., 2002. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology*. 3 (2): 1 – 8.

Jampachaisri, K., L. Valinsky, J. Borneman, S. J. Press, 2005. Classification of oligonucleotide fingerprints: application for microbial community and gene expression analyses. *Bioinformatics*. 21 (14): 3122 – 3130.

Jeewon, R., K. D. Hyde, 2007. Detection and diversity of Fungi from environmental samples: traditional versus molecular approaches. IN: Varma, A., R. Oelmüller (ed.) *Soil Biology* Vol. 11. Springer – Verlag Heidelberg.

Jones, D. L., 1998. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant Soil*. 205: 25 – 44.

Jurgenson, J. E., K. A. Zeller, J. F. Leslie, 2002. Expanded genetic map of *Gibberella moniliformis* (*Fusarium verticillioides*). *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (4): 1972-1979.

Kövics, G. J., J. De Gruyter, H. A. Van Der Aa, 1999. *Phoma sojicola* comb. nov. and other hyaline - spored coelomycetes pathogenic on soybean. *Mycological Research*, 103 (8): 1065 – 1070.

Kowalchuck, G. A., 1999. New perspectives towards analyzing fungal communities in terrestrial environments. *Current Opinion in Biotechnology*. 10: 247 – 251.

Kowalchuck, G. A., S. Gerards, J. W. Woldendorp, 1997. Detection and characterization of fungal infections of *Ammophila arenaria* (marram grass) roots by denaturing gradient gel electrophoresis specifically amplified 18S rDNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (10): 3858 – 3865.

Kuhlman, K. R., W. G. Fusco, M. T. La Duc, L.B. Allenbach, C. L. Ball, G. M. Kuhlman, R. C. Anderson, I. K. Erickson, T. Stuecker, J. Benardini, J. L. Strap, R. L. Crawford, 2006. Diversity of Microorganisms within Rock Varnish in the Whipple Mountains, California. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (2): 1708 – 1715.

Lai, X., L. Cao, H. Tan, S. Fang, Y. Huang, S. Zhou, 2007. Fungal communities from methane hydrate-bearing deep-sea marine sediments in South China Sea. *The International Society for Microbial Ecology Journal*. 1: 756 – 762.

Leger, R. J., S.E. Screen, B. Shams-Pirzadeh, 2000. Lack of host specialization in *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 320 – 324.

Leininger, S., T. Ulrich, M. Schloter, L. Schwark, J. Qi, G. W. Nicol, J. I. Prosser, S. C. Schuster, C. Schleper, 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soil. *Nature*. 442: 806 – 809.

Liesack, W., E. Stackebrandt, 1992. Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *Journal of Bacteriology*. 174: 5072 – 5078.

Lopez-Garcia, P., D. Moreira, 2008. Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology. *Research in Microbiology*. 156: 67 – 73.

Lodish, H., A. Berk, S. Lawrence Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell, 2003. *Molecular Cell Biology*, 5th ed. W.H. Freeman, New York. 525.

Martos, S., 2008. El decaimiento de la vid enfermedades de la madera relacionadas con hongos de la familia Botryosphaeriaceae. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.

Martin, K. J., 2007. Introduction to molecular analysis of ectomycorrhizal communities. *Molecular Approaches to Soil Microbiology Symposium*. 71 (2): 601 – 610.

Martin, K. J., P. T. Rygielwicz, 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*. 5:28.

Mills, D. K., K. Fitzgerald, C. D. Litchfield, P. M. Gillevet, 2003. A comparison of DNA profiling techniques for monitoring nutrient impact on microbial community composition during bioremediation of petroleum-contaminated soils. *Journal of Microbiological Methods*. 54: 57-74.

Mueller, G. M., 2004. *Biodiversity of Fungi: inventorying and monitoring methods*. Elsevier Academic Press.

Mueller, G. M., J. P. Schmit, 2007, Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodiversity Conservation*. 16: 1 – 5.

Nagy, M. L., A. Pérez, F. García-Pichel, 2005. The prokaryotic diversity of biological soil crusts in the sonoran desert (Organ Pipe Cactus National Museum, AZ). *FEMS Microbiology Ecology*. 54: 233 – 245.

Nikolcheva, L. G., A. M. Cockshutt, F. Bärlocher, 2003. Determining diversity of freshwater fungi on decaying leaves: comparison of traditional and molecular approaches. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (5): 2548 – 2554.

Nikolcheva, L. G., F. Bärlocher, 2005. Season and substrate preferences of fungi colonizing leaves in streams: traditional versus molecular evidence. *Environmental Microbiology*. 7 (2): 270 – 280.

Noguez, A. M., H. T. Arita, A. E. Escalante, L. J. Forney, F. García-Oliva, V. Souza, 2005. Microbial macroecology: highly structured prokaryotic soil

assemblages in a tropical deciduous forest. *Global Ecology and Biogeography*. 14: 241 – 248.

O'Brien, H. E., J. L. Parrent, J. A. Jackson, J. M. Moncalvo, R. Vilgalys, 2005. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (9): 5544 – 5550.

O' Donnell, A. G., H. E. Görres, 1999. 16S rDNA methods in soil microbiology. *Current Opinion in Biotechnology*. 10: 225 – 229.

O'Donnell, K., T. J. Ward, D. M. Geiser, H. C. Kistler, T. Aoki, 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology*. 41: 600 – 623.

Panda, D., K. Rathinasamy, M. K. Santra, L. Wilson, 2005. Kinetic suppression of microtubule dynamic instability by griseofulvin: implications for its possible use in the treatment of cancer. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 102 (28): 9878 – 9883.

Pang, K. L., J. I. Mitchell, 2005. Molecular perspectives on assessing fungal diversity from marine substrates. *Botanica Marina*. 48: 332 – 347.

Pennanen, T., L. Paavolainen, J. Hantula, 2001. Rapid PCR-based method for the direct analysis of fungal communities in complex environmental samples. *Soil Biology & Biochemistry*. 33: 697–699.

Perry, R. S., J. Dodsworth, J. T. Staley, M. H. Engel, 2004. Bacterial diversity in desert varnish. Proceedings of the Third European Workshop on Exo/Astrobiology, Mars: the search for life ESA Publications SP – 545. Nov 18 – 20. 2003. Netherlands. 259 – 260.

Persoh, D., G. Rambold, 2003. Fungal diversity in the host lichen *Letharia vulpine*. IN: Stadler, J., I. Hensen, S. Klotz, H. Feldmann (ed.) Biodiversity – from patterns to processes. Kurzfassungen der Beiträge zur 33. Jahrestagung der Gesellschaft für Ökologie, 161. Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie. Halle/Salle, Germany.

Peterson, S. W. and L. Sigler, 1998. Molecular genetic variation in *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, etiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens. Journal of Clinical Microbiology. 36 (10): 2918 – 2925.

Prewitt, M. L., S. V. Diehl, T. C. McElroy, W. J. Diehl, 2008. Comparison of general fungal Basidiomycete-specific ITS primers for identification of wood decay fungi. Forest Products Journal. 58 (10312): 66-71.

Quince, C., T. P., Curtis, W. T. Sloan, 2008. The rational exploration of microbial diversity. The ISME Journal. 2: 997 – 1006.

Ranjard, L., F. Poly, J. C. Lata, C. Mougel, J. Thioulouse, S. Nazaret, 2001. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (10): 4479 – 4487.

Restrepo, M. A., 1985. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Medical Mycology*. 23 (5): 323 – 334.

Reysenbach, A. L., L. J. Giver, G.S. Wickham, N.R. Pace, 1992. Differential amplification of rRNA by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*. 58 (10): 3417 – 3418.

Robinson, C. H., T. M. Szaro, A. D. Izzo, I., C. Anderson, P. I. Parkin, T. D. Bruns, 2009. Spatial distribution of fungal communities in a coastal grassland soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 41 (2): 414 – 416.

Ryberg, M., E. Kristiansson, E. Sjökvist, H. Nilsson, 2009. An outlook on the fungal internal transcribed spacer sequences in GenBank and the introduction of a web-based tool for the exploration of fungal diversity. *New Phytologist*. 181: 471 – 477.

Samaniego Gaxiola, J. A., Y. Chew Madinaveitia, 2007. Diversidad de géneros de hongos en suelo en tres campos con diferente condiciones agrícola en la Laguna, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 78: 383 - 390.

Satyanarayana, T., 2005. Microbial Diversity. *Current Science*. 89 (6): 926 – 928.

Seifert, K. A., 2009. Barcoding fungi: progress towards DNA barcoding fungi. *Molecular Ecology Resources*. 9 (1): 83 – 89.

Shaw, P. J. A., 1992. Fungi, fungivores and fungal food webs. IN: Carroll, G.C., D. T. Wicklow (ed.) *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*. New York; 295 – 310.

Schneegurt, M. A., S. Y. Dore, S. S. Kulpa, Jr., 2003. Direct extraction of DNA from soils for studies in microbial ecology. *Current Issues in Molecular Biology*. 5: 1 – 8.

Schneider, S., M. Hartmann, J. Enkerli, F. Widmer, 2010. Fungal community structure in soils of conventional and organic farming systems. *Molecular Ecology*. 3 (3): 215 – 224.

Smit, E., P. Leeflang, B. Glandorf, J. D. Van Elsas, K. Wernars, 1999. Analysis of fungal diversity in wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rDNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (6): 2614 – 2621.

Spatafora, J. W., B. Robberste, 2010. Phylogenetics and phylogenomics of the fungal tree of life. IN Borkovich, K. A., D. J. Ebbole (ed.) *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*. ASM Press, Washington, DC; 36 – 49.

Staley, J. T., 2007. Biodiversity: are microbial species threatened. *Current Opinion in Biotechnology*. 340 – 345.

Tao, G., Z. Y. Liu, K. D. Hyde, Z. N. Yu, 2008. Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae). *Fungal Diversity*. 101 – 122.

Torres, E., M. A. El Bakali, J. Luque, S. Martos, R. Raposo, A. Aroca, F. García, J. Reyes, G. Barrios, 2003. Detección específica y sensible de *Phaeomoniella chlamydospora* mediante PCR cooperativa. Departament d' Agricultura, Alimentació i acció rural, serveis territorials a Barcelona, España.

Trujillo, I., A. Díaz, A. Hernández, M. Heydrich, 2007. *Revista Protección Vegetal*. 22 (1): 41 – 46.

Tsai, Y., B. H. Olson, 1992. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*. 58 (7): 2292 – 2295.

Valinsky, L., G. Della Vedova, T. Jiang, J. Borneman, 2002. Oligonucleotide fingerprinting of rRNA genes for analysis of fungal community composition. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (12): 5999 – 6004.

Vandenkoornhuyse, P., S. L. Baldauf, C. Leyval, J. Straczek, P. W. Young, 2002. Extensive fungal diversity in plant roots. *Science*. 295 (5562): 2051.

Vincze, T., J. Posfai, R. J. Roberts, 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*. 31: 3688 – 3691.

White, T. J., T. D. Bruns, S. Lee, J. Taylor, 1990. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. IN: Innis, M. A., D.H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White (ed.) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc. New York, 315 – 322.

Whitaker, R. J., D. W. Grogan, J. W. Taylor, 2003. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic Archaea. *Science*. 301: 976–978.

Whitford, W. G., 1996. The importance of the biodiversity of soil biota in arid ecosystems. *Biodiversity and Conservation*. 5: 185 – 195.

Woese, C. R., O. Kandler, M. L. Wheelis, 1990. Towards a natural system of organisms: A proposal for domains Archaea and Eukarya. *Proceeding of the National Academy of Science*. 87: 4576 – 4579.

Zak, J. C., M. R. Willig, 2004. Fungal biodiversity patterns. IN: Mueller, G. M., G. F. Bills, M. S. Foster (ed.) *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press, Inc. Oxford, 59 – 75.

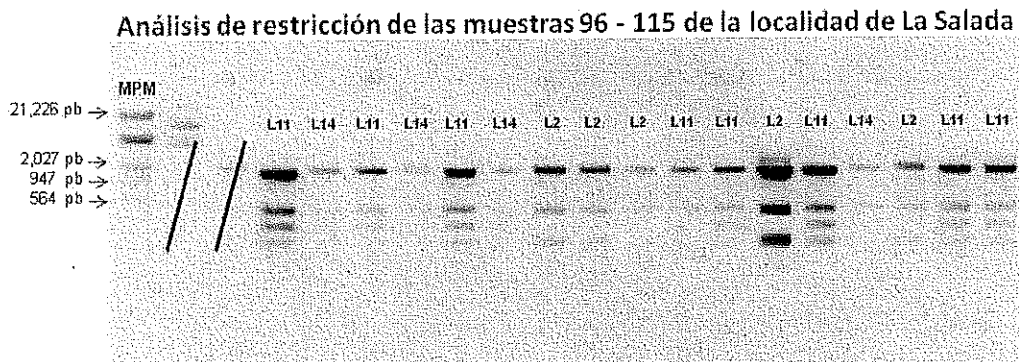
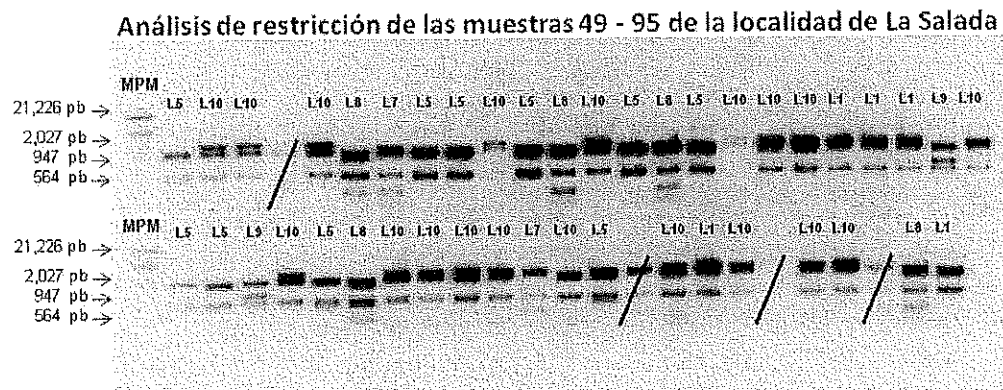
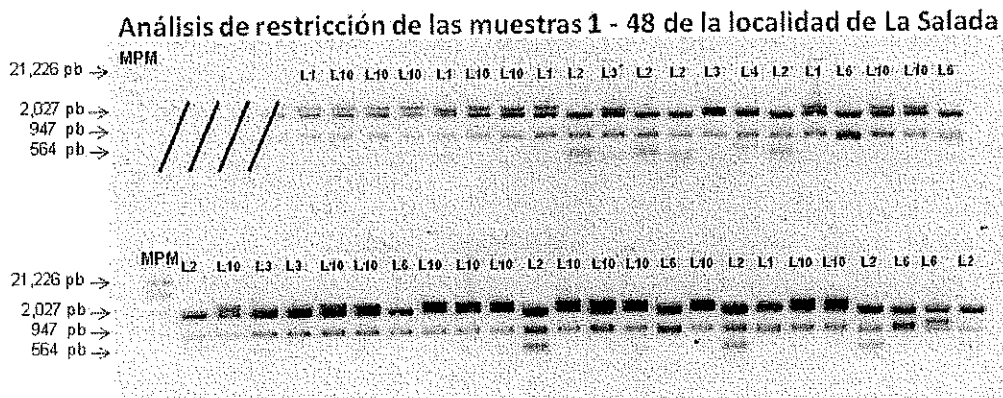
Zhou, X., C. J., Brown, Z., Abdo, C. C., Davis, M. A., Hansmann, P. Joyce, 2007. Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *ISME Journal*. 1: 121–133.

Zvelebil, M., J. O. Baum. *Understanding Bioinformatics*, 2008. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. 310.

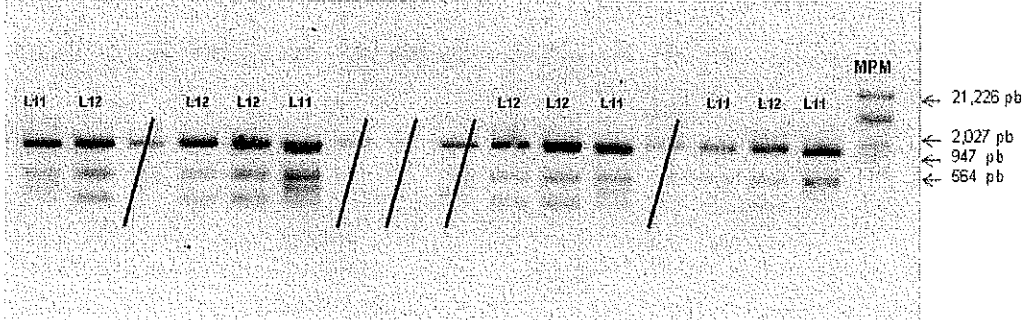
7. APÉNDICE

7.1 Patrones de restricción

Patrones de restricción de las muestras pertenecientes a la localidad de La Salada. L: abreviación para La Salada.

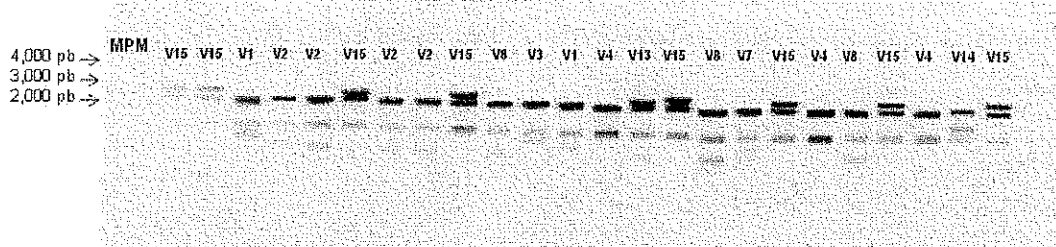


Análisis de restricción de las muestras 116 - 131 de la localidad de La Salada

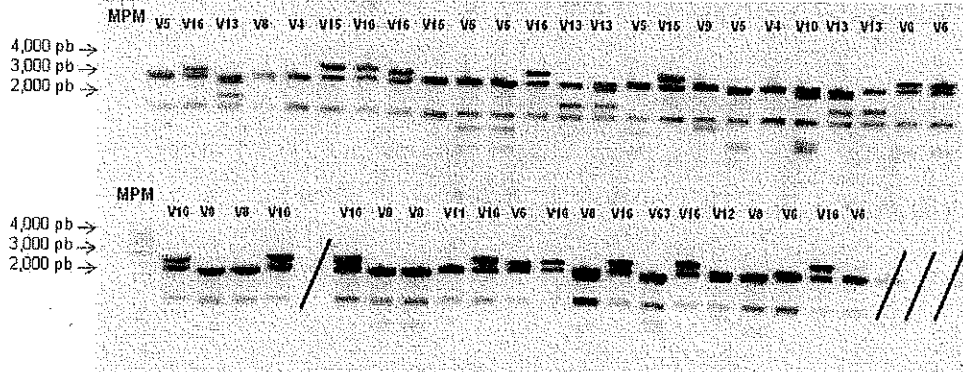


Patrones de restricción de las muestras pertenecientes a la localidad de Valle de las Palmas. V: abreviación para Valle de las Palmas.

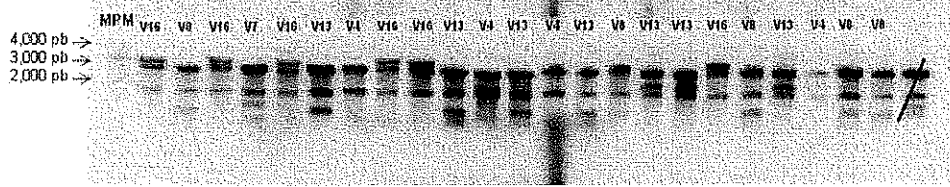
Análisis de restricción de las muestras 1 - 24 de la localidad de Valle de las Palmas



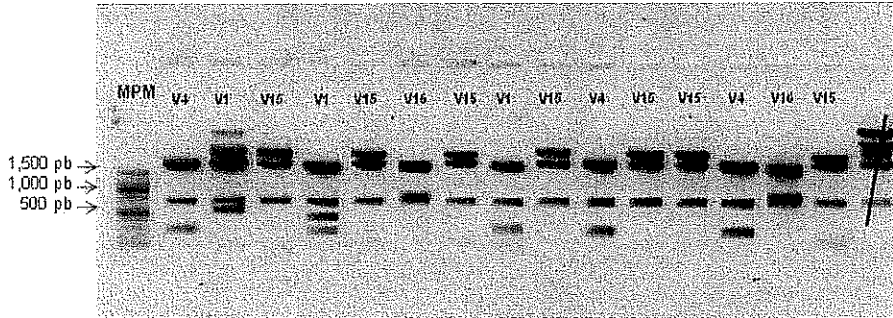
Análisis de restricción de las muestras 25 - 72 de la localidad de Valle de las Palmas



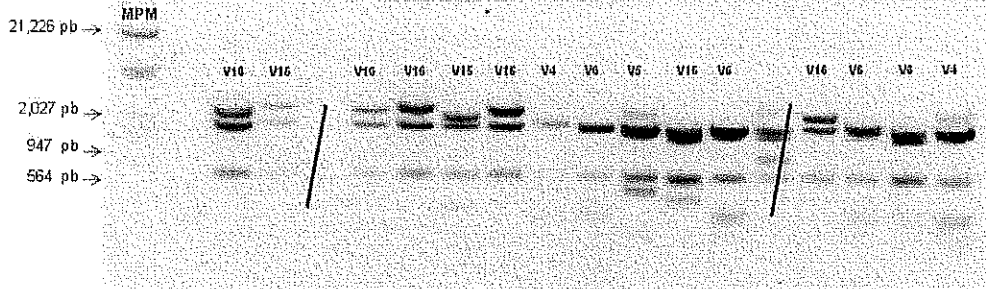
Análisis de restricción de las muestras 73 - 96 de la localidad de Valle de las Palmas.



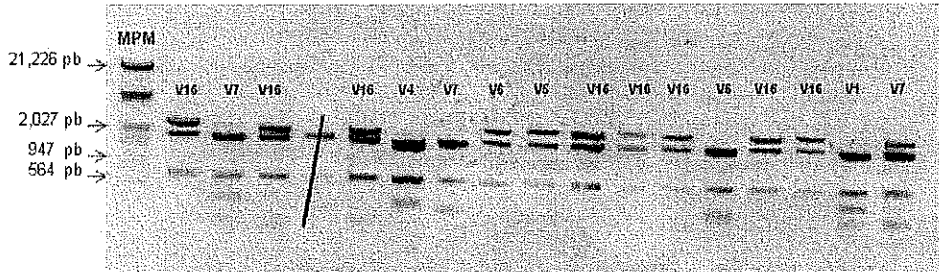
Análisis de restricción de las muestras 96 - 112 de la localidad de Valle de las Palmas



Análisis de restricción de las muestras 113 - 130 de la localidad de Valle de las Palmas

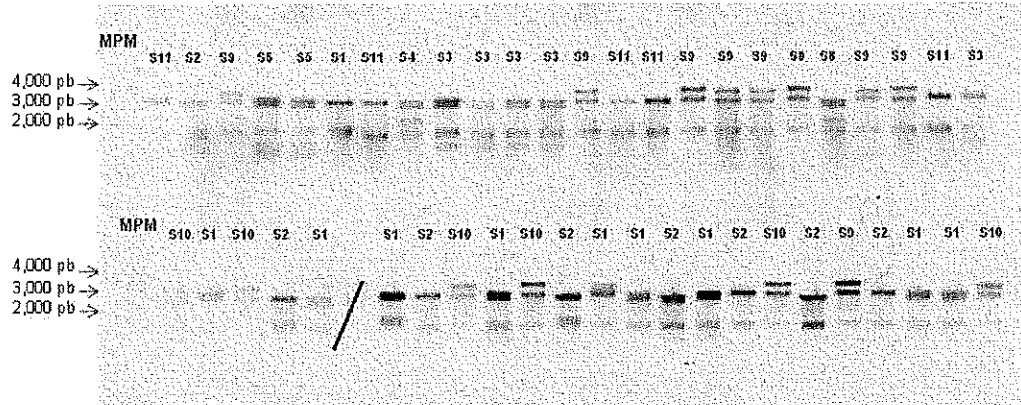


Análisis de restricción de las muestras 114 - 147 de la localidad de Valle de las Palmas

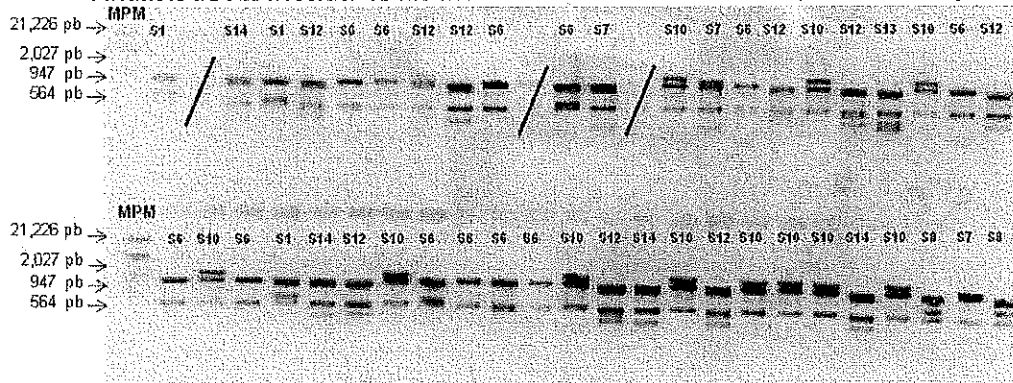


Patrones de restricción de las muestras pertenecientes a la localidad de Santa Catarina. **S:** abreviación para Santa Catarina.

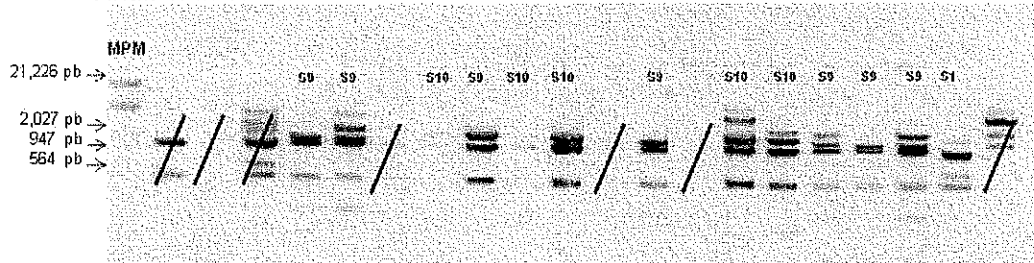
Análisis de restricción de las muestras 1 - 48 de la localidad de Santa Catarina



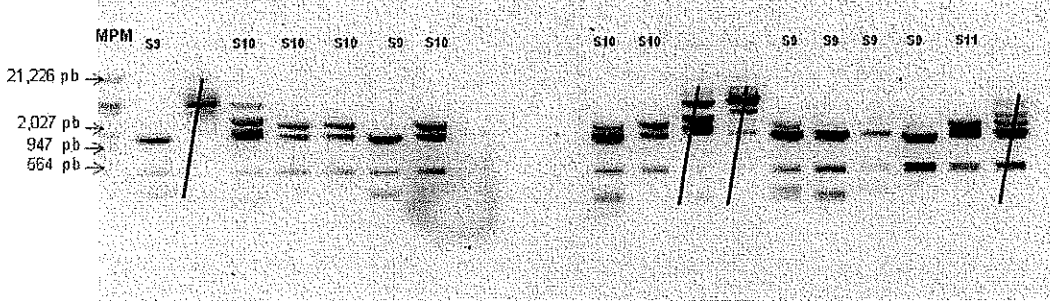
Análisis de restricción de las muestras 49 - 96 de la localidad de Santa Catarina



Análisis de restricción de las muestras 97 - 116 de la localidad de Santa Catarina

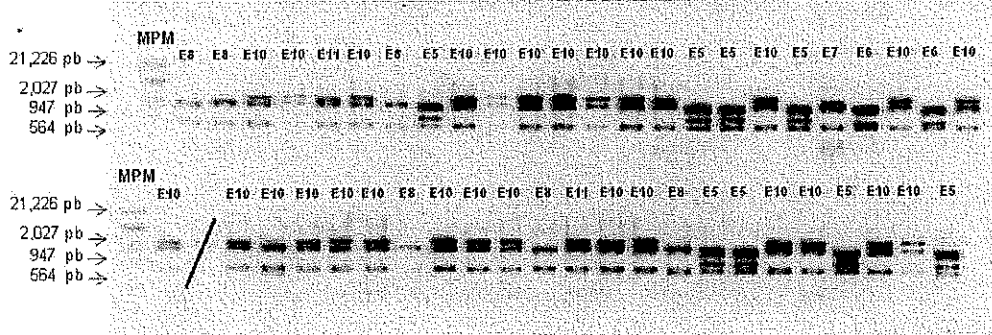


Análisis de restricción de las muestras 117 - 133 de la localidad de Santa Catarina

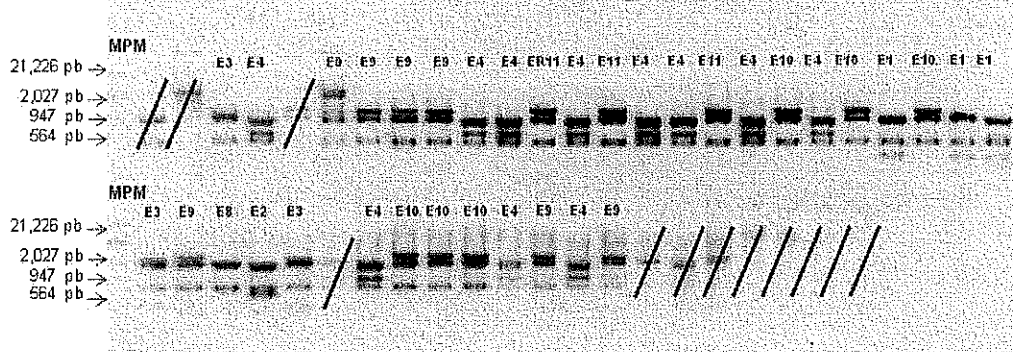


Patrones de restricción de las muestras pertenecientes a la localidad de El Rosario. **E:** abreviación para El Rosariò.

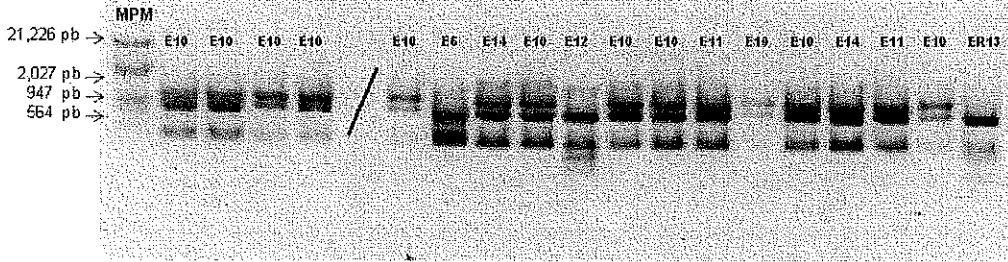
Análisis de restricción de las muestras 1 - 48 de la localidad de El Rosario



Análisis de restricción de las muestras 49 - 96 de la localidad de El Rosario



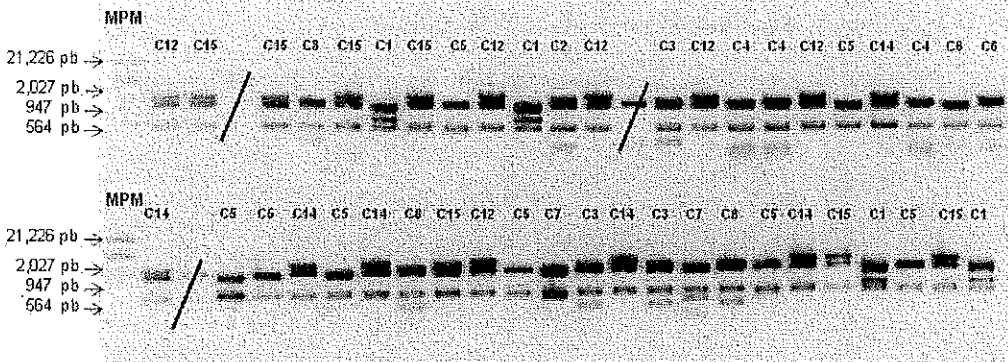
Análisis de restricción de las muestras 97 - 115 de la localidad de El Rosario



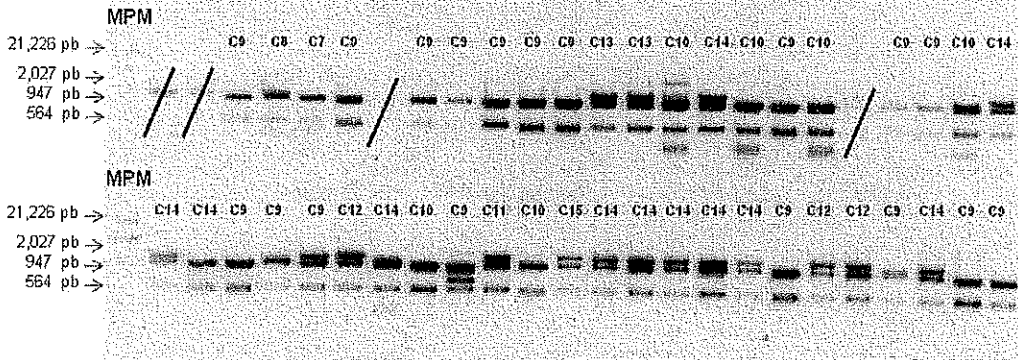
Patrones de restricción de las muestras pertenecientes a la localidad de Cataviña.

C: abreviación para Cataviña.

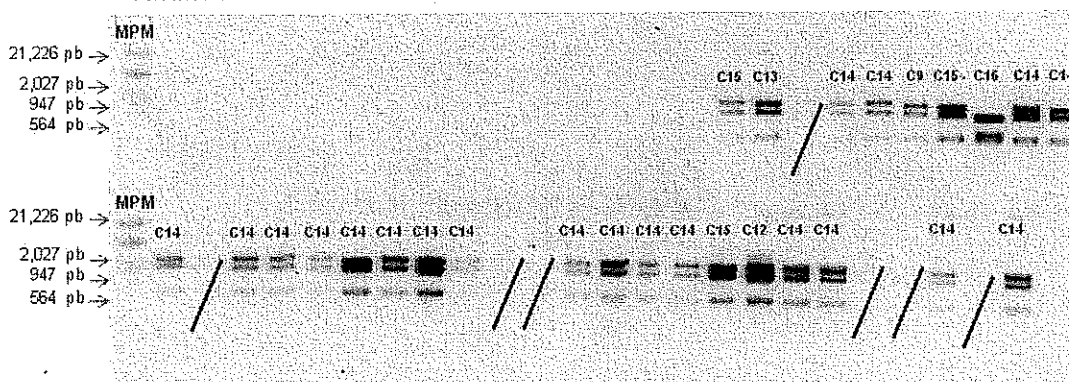
Análisis de restricción de las muestras 1 - 48 de la localidad de Cataviña



Análisis de restricción de las muestras 49 - 96 de la localidad de Cataviña

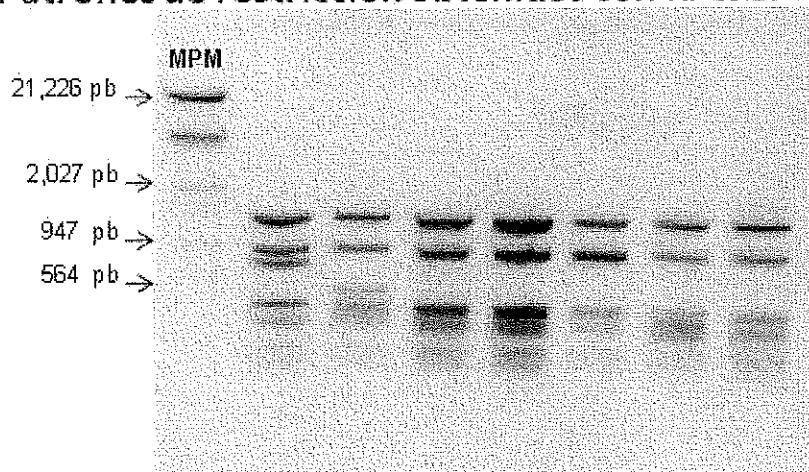


Análisis de restricción de las muestras 97 - 130 de la localidad de Cataviña



Patrones de restricción obtenidos con la enzima Mse I para los RFLPs de las secuencias ITS insertas en el plásmido pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen, Co.).

Patrones de restricción obtenidos con la enzima MseI



7.2 Índice de diversidad de Shannon

Índice de diversidad de Shannon para la localidad de La Salada

Filotipo	Repeticiones en el patrón de restricción	P_i	$\ln P_i$	$P_i \ln(P_i)$
Hongo sin cultivar L1	9	0.084906	-2.37954	-0.20204
Ascomiceto sin cultivar L2	13	0.122642	-2.11718	-0.25965
Hongo sin cultivar L3	4	0.037736	-3.2958	-0.12437
<i>Penicillium clavigerum</i> L4	1	0.009434	-4.682	-0.04417
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> L5	9	0.084906	-2.3795	-0.20203
<i>Penicillium sp.</i> L6	6	0.056604	-2.8900	-0.16358
<i>Phoma medicaginis</i> L7	2	0.018868	-3.9889	-0.07526
<i>Penicillium expansum</i> L8	5	0.04717	-3.0726	-0.14493
<i>Penicillium dipodomyicola</i> L10	38	0.358491	-1.044	-0.37426
<i>Alternaria tenuissima</i> L11	13	0.122642	-2.11718	-0.25965
<i>Alternaria alternata</i> L12	6	0.056604	-2.8903	-0.1636
Total	106			-2.01356

Valor de H = 2.0203

Índice de diversidad de Shannon para la localidad de Valle de las Palmas

Filotipo	Repeticiones en el patrón de restricción	P_i	$\ln P_i$	$P_i \ln(P_i)$
Dotideomiceto V1	5	0.036232	-3.387	-0.12272
<i>Phoma medicaginis</i> V2	4	0.028986	-3.6109	-0.10466
<i>Geastrum campestre</i> V3	1	0.007246	-4.997	-0.03621
Ascomiceto sin cultivar V4	12	0.086957	-2.2891	-0.19905
Pleosporal sin cultivar V5	5	0.036232	-3.20545	-0.11614
<i>Penicillium griseofulvum</i> V6	10	0.072464	-2.7999	-0.20289
<i>Ulocladium atrum</i> V7	4	0.028986	-3.387	-0.09817
Ascomiceto sin cultivar V8	13	0.094203	-2.2891	-0.21564
Ascomiceto sin cultivar V9	1	0.007246	-4.9972	-0.03621
Ascomiceto sin cultivar V10	1	0.007246	-4.997	-0.03621
Ascomiceto sin cultivar V11	1	0.007246	-4.30406	-0.03119
Basidiomiceto sin cultivar V12	1	0.007246	-4.997	-0.03621
Basidiomiceto sin cultivar V13	12	0.086957	-2.43226	-0.2115
<i>Penicillium variable</i> V14	1	0.007246	-4.9972	-0.03621
<i>Ceratobasidium sp.</i> V15	17	0.123188	-2.0527	-0.25287
Ascomiceto sin cultivar V16	36	0.26087	-1.4136	-0.36877
Hongo sin cultivar V17	2	0.014493	-4.304	-0.06238
Hongo sin cultivar V18	2	0.014493	-4.304	-0.06238
Hongo sin cultivar V19	2	0.014493	-4.304	-0.06238
Hongo sin cultivar V20	1	0.007246	-4.9972	-0.03621

Ascomiceto sin cultivar V21	2	0.014493	-4.304	-0.06238
<i>Tulostoma kotlabae</i> V22	1	0.007246	-4.9972	-0.03621
<i>Phoma sojicola</i> V23	1	0.007246	-4.9972	-0.03621
Ascomiceto sin cultivar V24	2	0.014493	-4.304	-0.06238
<i>Phyalophora hyalina</i> V25	1	0.007246	-4.9972	-0.03621
Total	138			-2.56139
Valor de H = 2.5645				

Índice de diversidad de Shannon para la localidad de Santa Catarina

Filotipo	Repeticiones en el patrón de restricción	P_i	$\ln P_i$	$P_i \ln(P_i)$
<i>Tulostoma kotlabae</i> S1	15	0.135135	-2.0014	-0.27046
Especie de hongo S2	7	0.063063	-2.7636	-0.17428
<i>Tulostoma brumale</i> S4	1	0.009009	-4.70953	-0.04243
Basidiomiceto sin cultivar S6	12	0.108108	-2.22462	-0.2405
Hongo sin cultivar S7	3	0.027027	-3.61092	-0.09759
<i>Coprinellus radians</i> S8	3	0.027027	-3.61092	-0.09759
<i>Dothidea muelleri</i> S9	22	0.198198	-1.61849	-0.32078
<i>Coprinellus sp.</i> S10	28	0.252252	-1.37733	-0.34743
Basidiomiceto sin cultivar S11	6	0.054054	-2.91777	-0.15772
Basidiomiceto sin cultivar S12	9	0.081081	-2.51231	-0.2037
Basidiomiceto sin cultivar S13	1	0.009009	-4.70953	-0.04243
Basidiomiceto sin cultivar S14	4	0.036036	-3.32324	-0.11976
Total	111			-2.11467
Valor de H = 2.1146				

Índice de diversidad de Shannon para la localidad de El Rosario

Filotipo	Repeticiones en el patrón de restricción	P_i	$\ln P_i$	$P_i \ln(P_i)$
Basidiomiceto sin cultivar E2	2	0.021505	-3.83945	-0.08257
Hongo sin cultivar E3	3	0.032258	-3.43399	-0.11077
<i>Sphaerobolus iowensis</i> E4	11	0.11828	-2.1347	-0.25249
<i>Coprinus sterquilinus</i> E5	7	0.075269	-2.58669	-0.1947
Basidiomiceto sin cultivar E6	2	0.021505	-3.83945	-0.08257
Especie de hongo E7	1	0.010753	-4.5326	-0.04874
Ascomiceto sin cultivar E8	6	0.064516	-2.74084	-0.17683
<i>Psathyrella candolleana</i> E9	7	0.075269	-2.58669	-0.1947
Hongo sin cultivar E10	44	0.473118	-0.74841	-0.35409
<i>Phoma nebulosa</i> E11	6	0.064516	-2.74084	-0.17683
<i>Ochrocladosporium elatum</i> E12	1	0.010753	-4.5326	-0.04874
Especie de hongo E13	1	0.010753	-4.5326	-0.04874
<i>Penicillium dipodomycicola</i> E14	2	0.021505	-3.83945	-0.08257
Total	93			-1.85432
Valor de H = 1.8543				

Índice de diversidad de Shannon para la localidad de Cataviña

Filotipo	Repeticiones en el patrón de restricción	P_i	$\ln P_i$	$P_i \ln(P_i)$
<i>Hohenbuehelia</i> sp. C1	4	0.034188	-3.37588	-0.11541
<i>Emmonsia parva</i> C2	1	0.008547	-4.76217	-0.0407
Ascomiceto sin cultivar C3	3	0.025641	-3.66356	-0.09394
Especie de hongo C4	3	0.025641	-3.66356	-0.09394
Basidiomiceto sin cultivar C5	8	0.068376	-2.68273	-0.18343
<i>Gibberella moniliformes</i> C6	2	0.017094	-4.06903	-0.06956
Especie de hongo C7	3	0.025641	-3.66356	-0.09394
<i>Geomyces</i> sp. C8	4	0.034188	-3.37588	-0.11541
Hongo sin cultivar C9	20	0.17094	-1.76644	-0.30196
<i>Alternaria alternata</i> C10	6	0.051282	-2.97041	-0.15233
<i>Hohenbuehelia</i> sp C11	1	0.008547	-4.76217	-0.0407
<i>Hohenbuehelia</i> sp C12	10	0.08547	-2.45959	-0.21022
<i>Phoma nebulosa</i> C13	3	0.025641	-3.66356	-0.09394
<i>Penicillium dipodomycicola</i> C14	36	0.307692	-1.17865	-0.36266
<i>Neonectria</i> sp. C15	12	0.102564	-2.27727	-0.23357
<i>Psathyrella candolleana</i> C16	1	0.008547	-4.76217	-0.0407
Total	117			-2.24241
Valor de H = 2.2424				

7.3 Reactivos y soluciones

NaOH 1M (100 ml)

Hidróxido de Sodio	4 g
Agua destilada	100 ml

Tris-HCl pH = 8.0 (50 ml)

Tris-base	6.05 gr
Agua destilada	Aforar a 50 ml

EDTA 0.5 M pH = 8.0 (50 ml)

EDTA	9.30 g
Agua destilada	Aforar a 50 ml

SDS 20% (50 ml)

SDS	10 g
Agua destilada	Aforar a 50 ml

Solución P1

Tris-HCl 50 mM, pH=8.0	2.5 ml para una concentración final de 1 M
EDTA 10mM	1 ml para una concentración final de 0.5 M
Agua destilada	Aforar a 50 ml

Solución P2

NaOH 1M	10 ml para una concentración final de [200mM]
SDS 20%	2.5 ml para una concentración final de 1%
Agua destilada	Aforar a 50 ml

Solución P3

Acetato de Potasio	14.72 gr
Agua destilada	Aforar a 50 ml después de haber ajustado el pH a 5.5 con ácido acético glacial (aproximadamente 6 ml)

Medio LB-agar/ampicilina [100µg/ml] (500 ml)

Bacto-triptona	5 g
Extracto de levadura	2.5 g
NaCl	2.5 g
Agar	7 g
NaOH 1M	0.5 ml
Agua destilada	Aforar a 500 ml

Esterilizar 10 minutos a 121°C

Agregar 500 µl de ampicilina [100 mg/ml] para una concentración final de [100 µg/ml]

Medio LB líquido/ampicilina [100µg/ml] (500 ml)

Bacto-triptona	5 g
Extracto de levadura	2.5 g
NaCl	2.5 g
NaOH 1M	0.5 ml
Agua destilada	Aforar a 500 ml

Esterilizar 10 minutos a 121°C

Agregar 500 µl de ampicilina [100 mg/ml] para una concentración final de [100 µg/ml]