

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA



Identificación de *Coccidioides* spp. en muestras ambientales:
Modelación espacial y escenarios potenciales relacionados con
Cambio Climático Regional en Baja California, México.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

Identificación de *Coccidioides* spp. en muestras ambientales:

Modelación espacial y escenarios potenciales relacionados con Cambio Climático
Regional en Baja California, México.

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
DOCTOR EN ECOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGIA

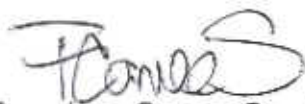
PRESENTA

RAÚL CUAUHTÉMOC BAPTISTA ROSAS

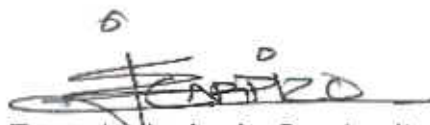
APROBADA POR:



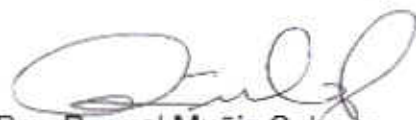
Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Directora



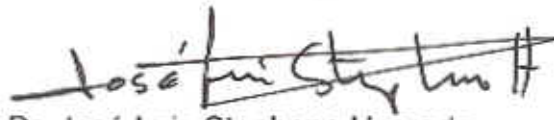
Dr. Francisco Correa Sandoval
Sinodal



Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte
Sinodal



Dra. Raquel Muñoz Salazar
Sinodal



Dr. José Luis Stephano Hornedo
Sinodal

Resumen

La coccidioidomicosis, también conocida como Fiebre del valle de San Joaquín, es una micosis sistémica endémica de las zonas desérticas de América que afecta principalmente mamíferos, incluyendo el hombre. Se sospecha que sólo en Estados Unidos este padecimiento afecta a más de 200,000 personas anualmente. Esta es una enfermedad altamente infecciosa en su hábitat natural que no se transmite entre individuos, y que solo puede adquirirse al respirar las estructuras asexuales del hongo en su medio ambiente natural. En la mayoría de los casos afectados, la micosis primaria es autolimitada y menos del 1% de los casos desarrolla la enfermedad diseminada, generalmente con alta morbilidad y mortalidad.

Uno de los principales problemas sobre esta micosis es que a pesar de las altas tasas de prevalencia de la enfermedad con distribución espacial aparentemente limitada a zonas áridas, los reportes de aislamientos positivos del agente causal, *Coccidioides*, en muestreos ambientales son muy escasos. Esta falta de correlación con la evidencia epidemiológica disponible ha persistido con el paso del tiempo hasta el momento. La identificación de algunos de los componentes del probable nicho ecológico de *Coccidioides* y la estructura de la comunidad fúngica relacionada serán fundamentales para poder resolver esta paradoja. Es por esto, que los principales propósitos de este estudio son explorar algunos aspectos sobre la ecología microbiana en suelos de áreas endémicas para *Coccidioides* spp. en Baja California. En este trabajo se identificó la presencia de *Coccidioides* spp. en muestras ambientales de suelo procedentes de biomas de transición entre ecosistemas desérticos y mediterráneos con ombrotipos secos asociados a alta evapotranspiración del suelo. Esto permitió correlacionar estas variables bioclimáticas con la prevalencia e incidencia de los casos reportados y la presencia de *Coccidioides* en estos ecosistemas. Así mismo, se exploraron aspectos relacionados con la estructura de las comunidades fúngicas residentes identificadas en las áreas de trabajo. A partir de bases de datos obtenidas de trabajos previos en los puntos de muestreo, se construyeron curvas de acumulación y rarefacción y se confirmó que estos suelos presentan una alta diversidad fúngica, con escasa similitud entre los diferentes filotipos caracterizados. Esto quiere decir que, de todas las muestras analizadas, los puntos donde se identificó *Coccidioides*, potencialmente tienen diferentes especies de ascomicetos poco relacionados taxonómicamente entre ellos.

Con la información obtenida y utilizando los puntos georeferidos espacialmente donde se identificó la presencia del patógeno, se modeló el nicho ecológico realizado de *Coccidioides* y se construyeron mapas de distribución potencial, identificando tres ecoregiones que correlacionan con la epidemiología y filogeografía conocida del patógeno: la ecoregión suroeste localizada en Valle de San Joaquín en California, la ecoregión central localizada en la parte Baja del desierto de Sonora y la ecoregión sureste en la zona de la Laguna/Bolson de Mapimí localizado en el desierto de Chihuahua. Finalmente, se llevaron a cabo análisis bioclimáticos empleando proyecciones de temperatura y precipitación para el próximo siglo, encontrando cambios a nivel regional favorables para el incremento en la incidencia y prevalencia para esta enfermedad infecciosa, así como redistribución espacial potencial incrementando su area de cobertura hacia áreas densamente pobladas en el norte de América.

Introducción

La coccidioidomicosis (CM), también conocida como Fiebre del valle de San Joaquín, es una enfermedad infecciosa endémica causada por hongos ascomicetos del género *Coccidioides*: *C. immitis* localizado en el sur de California, la zona endémica más importante de Estados Unidos, y *C. posadasii* localizado en el sur de Arizona, el norte de México y Sudamérica, con la mayor parte casos reportados en Argentina, Venezuela, y Brasil (Figura 1). En la República Mexicana, la mayor parte de los casos se reportan en los estados de Sonora, Nuevo León, Coahuila y Baja California. Específicamente, en Baja California, se identifica con mayor frecuencia *C. posadasii* y solo en algunos casos se relaciona a *C. immitis* (Laniado-Laborin y cols. 1991; Fisher y cols. 2001; Castañón-Olivares y cols. 2007, Luna-Isaac y cols. 2011). La distribución geográfica de las áreas endémicas para la enfermedad ya era conocida desde hace más de 40 años de acuerdo a la información epidemiológica disponible en ese entonces (Figura 2).

Investigaciones recientes han reportado tasas de incidencia de 150 casos/100,000 habitantes en regiones altamente endémicas del sur de California, específicamente en el condado de Kern, situado en el Valle de San Joaquín (Vugia y cols. 2009), con incrementos de más de 500 casos/100,000 habitantes durante brotes epidémicos (Zender y Talamantes 2006; Flaherman y cols. 2008). De manera similar, se reportan tasas de 159 casos/ 100,000 habitantes en el condado de Maricopa en Arizona (Komatsu y cols. 2003) con un incremento exponencial en el reporte de casos en los últimos 10 años, alcanzando tasas de incidencia y prevalencia tan elevadas como en California (Tabor 2009; Tabor y cols. 2011). En total, se estiman más de 200,000 casos anuales de la enfermedad solo en Estados Unidos (Buckley 2008), los cuales representan un incremento de seis veces más con respecto al reporte de casos del año 1995. La incidencia de la enfermedad en México es desconocida debido en gran parte a que su reporte epidemiológico no es obligatorio. Sin embargo, estudios preliminares recientes, han reportado casos y brotes epidémicos en áreas altamente pobladas de la frontera entre México y Estados Unidos (Ampel y cols. 1998; Hector y Laniado-Laborin 2005; Flaherman y cols. 2008; Engelthaler y cols. 2011). Las áreas altamente endémicas de California y Arizona comparten características bioclimáticas similares a áreas de Baja California, previamente identificadas como lugares potenciales para la presencia del hongo (Baptista-Rosas y cols. 2007; Baptista-Rosas y cols. 2010). Estas similitudes sugieren que la enfermedad podría tener una distribución epidemiológica comparable en los dos lados de la frontera norte (Figuras 3 y 4).

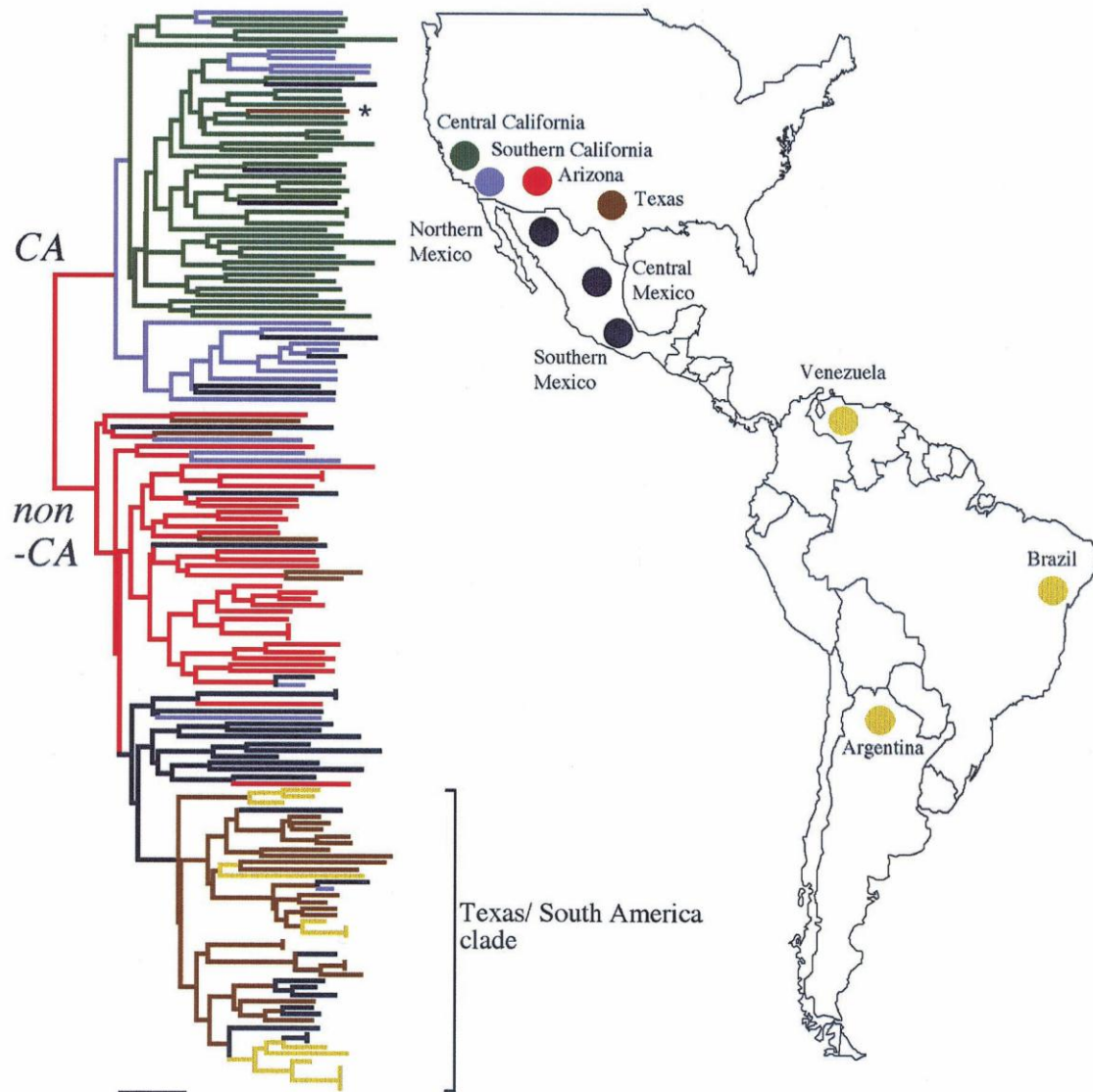


Figura 1. Filogenia y distribución de *Coccidioides* en América. Tomado de Fisher y cols. 2001.

La CM no se transmite de individuo a individuo, ya que necesita adquirirse directamente del ambiente donde habita este hongo patógeno, principalmente por inhalación de las artrosporas. El hongo ha sido aislado de suelos de sitios asociados a casos de humanos o animales en el pasado (Ajello *et al.* 1965; Ajello 1967; Lacy & Swatek 1974). Sin embargo, la escasa evidencia por aislamiento de *Coccidioides* spp. en muestras ambientales procedentes de estos lugares contrasta con las altas tasas de incidencia y prevalencia de la enfermedad. Solo algunos aislamientos positivos se han obtenido de sitios endémicos en Estados Unidos (Stewart y Meyer 1932; Emmons 1942; Maddy 1965). Se tiene reporte actualmente de solo 13 aislamientos a partir de muestras ambientales en California y 1 en Arizona después de extensos trabajos de campo empleando diferentes métodos, principalmente inoculación intraperitoneal de ratones y aislamiento por cultivo microbiológico convencional (Swatek 1970). Mas recientemente, solo 4 aislamientos positivos de 720 muestras de suelo obtenidas en California combinando técnicas de aislamiento selectivo y PCR a partir de suelo (Greene y cols. 2000) y ningún aislamiento positivo después del análisis utilizando un método semiselectivo y aislamiento genómico directo por PCR en Arizona (Tabor y cols. 2002). En otros estudios, más de 60 aislamientos ambientales positivos (específicamente 62 y 66 en cada reporte) procedentes de puntos de muestreo en el área de Tucson fueron obtenidos mediante la inoculación intraperitoneal de ratones BALB/c (Mandel y cols. 2007; Barker y cols. 2011). En México, empleando esta última metodología solo se tienen reportados dos aislamientos positivos, el primero en Hermosillo, Sonora (Sotomayor y cols. 1960), y otro en Valle de las Palmas (VDP), 27 kilómetros localizado al sur Tecate, Baja California (Cairns y cols. 2000). Recientemente se ha logrado identificar en muestras ambientales por PCR directamente de la extracción de DNA del suelo en áreas endémicas del sur de California y Sudamérica (Lauer y cols. 2011; de Macedo 2011), aunque con bajas tasas de éxito.

Esta baja tasa de aislamientos positivos en estudios previos puede estar relacionada a la estrategia de muestreo sin tomar en cuenta el nicho ecológico realizado de *Coccidioides* y su papel en la estructura dinámica de la comunidad microbiológica en suelos de ecosistemas desérticos, más que a los diferentes métodos empleados. A pesar de que las condiciones básicas para el desarrollo de *Coccidioides* in vitro en laboratorio han sido caracterizadas y se han estudiado variables fisiológicas de este microorganismo, las condiciones ambientales para su crecimiento no han sido caracterizadas (Fisher y cols. 2007; Barker y cols. 2007). Esto nos orienta a enfocar los esfuerzos de investigación en identificar el nicho ecológico realizado de *Coccidioides* (Maddy 1957; Maddy 1958; Fisher y cols. 2007). Por otro lado, las características climáticas y ambientales de la región son otro factor importante para el desarrollo de *Coccidioides* spp. (Maddy y Coccozza 1964; Comrie 2005). En las dos últimas décadas se han incrementado las tasas de incidencia y prevalencia correlacionadas directamente con la precipitación pluvial en regiones usualmente secas el sureste de Estados Unidos (Park y cols. 2005; Zender y Talamantes 2006). La evidencia disponible orienta a que los brotes epidémicos de la enfermedad se establecen dos años posteriores a anomalías meteorológicas relacionadas al incremento en la cantidad de lluvia después de periodos de sequía prolongados (Comrie 2005; Comrie y Glueck 2007; Baptista-Rosas y cols. 2010).

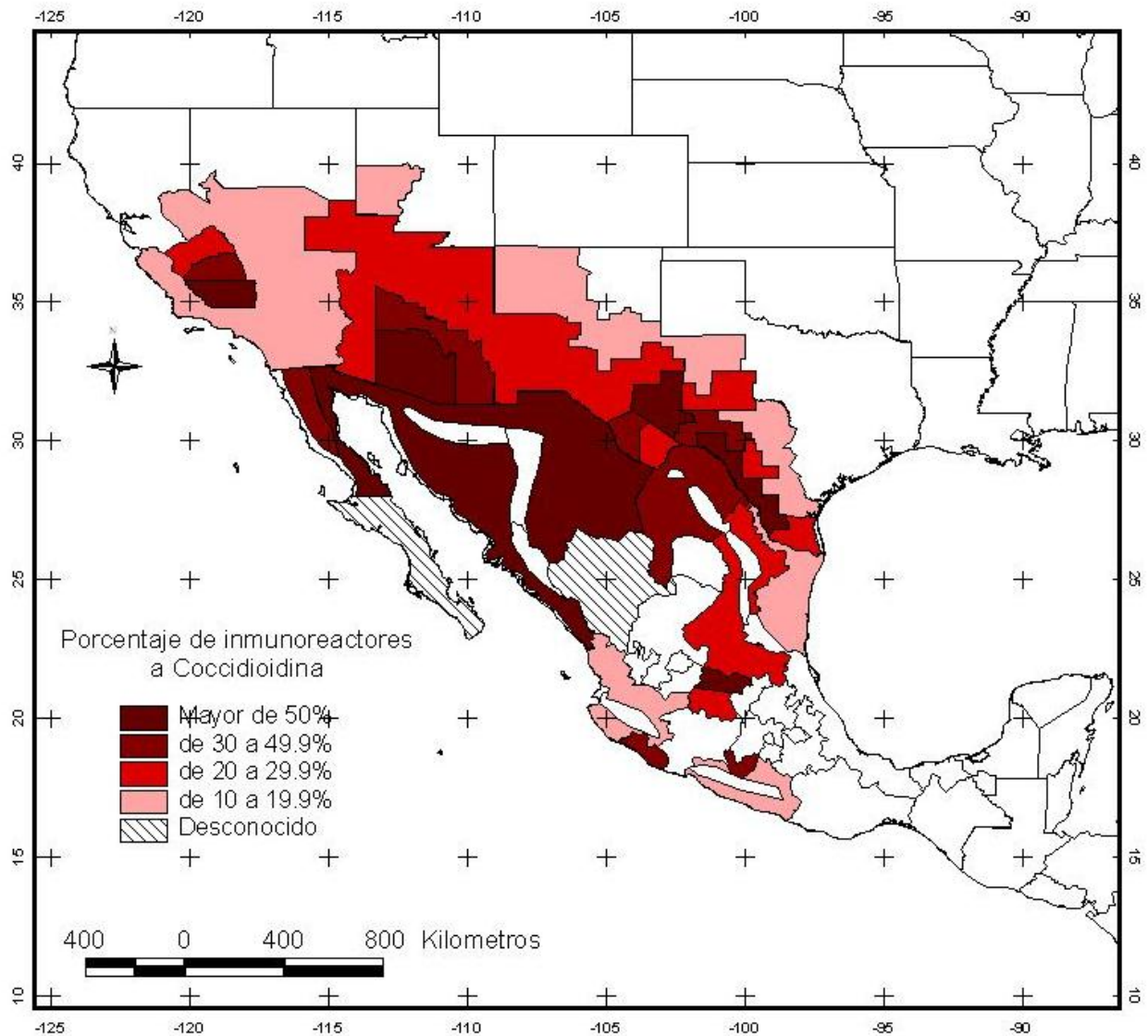


Figura 2. Probable Distribución de Coccidioidomicosis con base en intradermorreacciones con coccidioidina en poblaciones humanas. A partir del mapa original, se digitalizó y se llevó a cabo georeferenciación espacial empleando SIG ArcView 3.2 en Sistema de Coordenadas con Datum NAD 1927 y Esferoide de Clarke 1866. Modificada de González Ochoa 1967.

La situación actual de la enfermedad y su correlación con las condiciones áridas y semiáridas del Noroeste de México no han sido estudiadas con la atención que merecen. Teniendo esto en mente, se propuso llevar a cabo una estrategia de muestreo ambiental orientada para explorar el nicho ecológico fundamental en áreas endémicas de Baja California previamente señaladas como hotspots potenciales en base a estudios bioclimáticos (Baptista-Rosas *et al.* 2007) y mediante técnicas de biología molecular explorar la presencia de *Coccidioides* spp. en el ambiente.

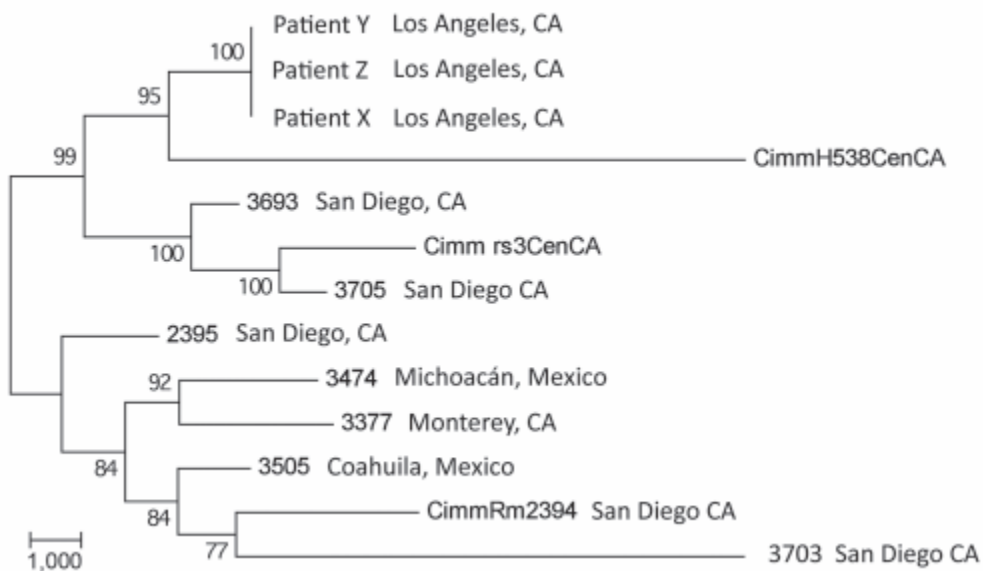


Figura 3. Análisis filogenético de máxima parsimonia de genomas de 13 cepas de *Coccidioides immitis*. Tomado de Engelthaler y cols. 2011.

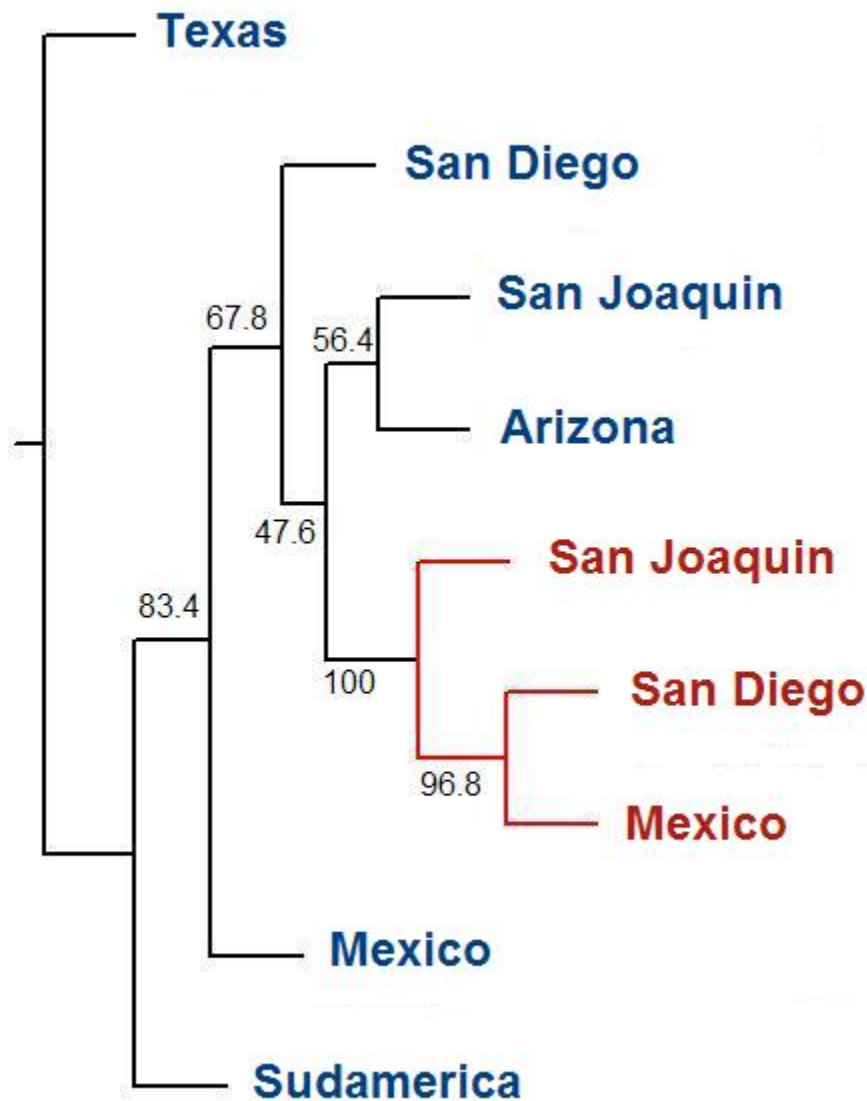


Figura 4. Árbol filogenético de *Coccidioides* obtenido a partir de 167 cepas empleando 9 micro satélites (GAC2, 621.2, GA37, GA1, ACJ, KO3, KO7, KO1, KO9). Las secuencias depositadas en *Nucleotide database Genebank NCBI* se editaron con MEGA 3.1 y GENEPOP y mediante algoritmo de máxima parsimonia con 1000 bootstraps con PHYLLIP. **Color azul:** *C. posadasii*, **Color rojo:** *C. immitis*. Tomado de Fisher y cols. 2002.

Marco Teórico

Taxonomía

Coccidioides pertenece a un grupo de hongos dimórficos termófilos del phylum *Ascomycota* familia *Onygenaceae* (Figura 5) (Guarro 1999, Mueller 2004, Sharpton y cols. 2009; Burmester y cols. 2011). Este género incluye dos especies identificadas hasta el momento, morfológicamente idénticas pero genética y epidemiológicamente diferentes: *Coccidioides immitis* y *C. posadasii* (Fisher y cols. 2002; Castañón y cols. 2007). Aunque desde hace tiempo se había reconocido que *Coccidioides* tiene polimorfismo genético, su descripción como especies separadas no ocurrió hasta el año de 2002 (Fisher y cols. 2002). Previamente, estos dos subgrupos simplemente eran conocidos como variantes Californiana y no Californiana de *C. immitis* y en la literatura se refería a ambas como una sola especie (Figura 2). No se ha determinado hasta el momento teleomorfismo en el género (Sutton y cols. 1998).

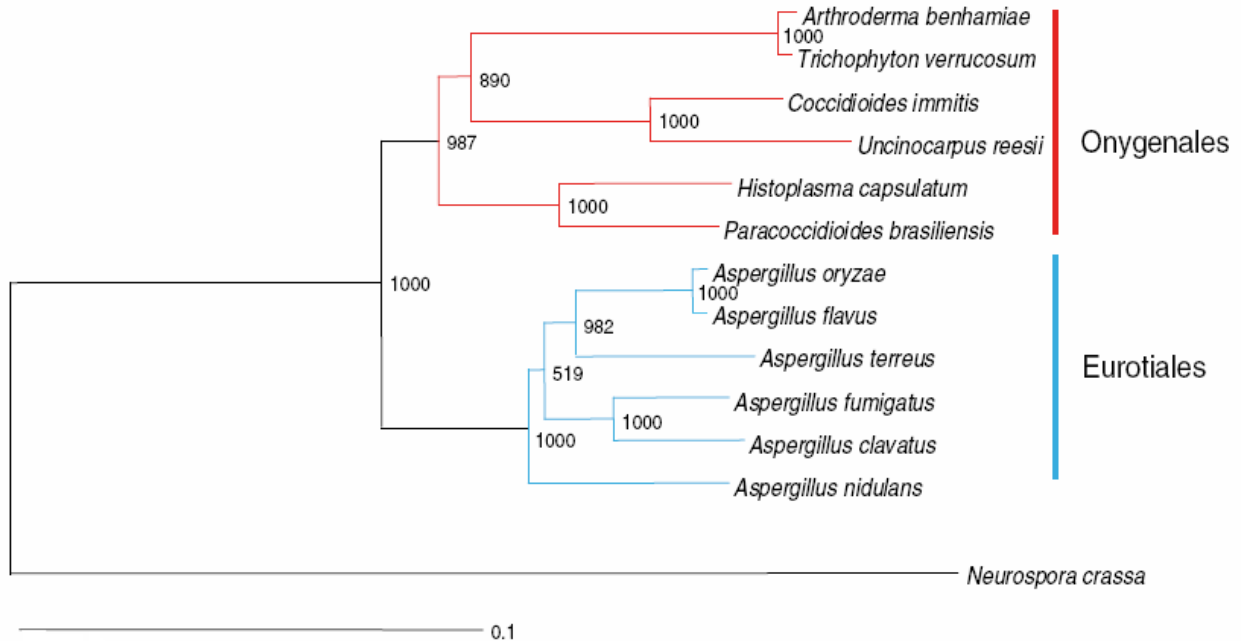


Figura 5. Árbol filogenético del genoma parcial del orden *Onygenales* y taxones relacionados cercanos. Tomado de Burmester y cols. 2011.

Coccidioides spp. tiene dos etapas de vida: una parasitaria y otra saprobia. En su forma parasitaria, en tejidos animales, forma esférulas que proliferan con forma esférica con tamaños entre 5 y 60 μm de diámetro, con una pared celular gruesa, retráctil, llena en su interior de abundantes endosporas de 2 a 4 μm de diámetro (Huppert y cols. 1982). La otra parte del ciclo de vida, la fase saprobia, se lleva a cabo en la matriz del suelo en donde forma un micelio que lleva a cabo su ciclo reproductivo asexual formando propágulos llamados artroconidios que se dispersan fácilmente a través del aire. La fase micelial está conformada por numerosas hifas septadas arborescentes que al fracturarse liberan estos artroconidios de forma rectangular elíptica o esférica de paredes gruesas de 2 a 4 μm de diámetro (Huppert y cols. 1982).

La etapa parasitaria se desarrolla en los animales hospederos, principalmente mamíferos. Se tienen reportes de diferentes especies afectadas de animales domésticos como ganado vacuno (Giltner 1918, Beck 1929, Beck y cols. 1931, Stiles y cols. 1933, Stiles y Davis 1942, Maddy y cols. 1960), ovejas, llamas, (Converse y Reed 1966, Pappagianis 1988), gatos y perros (Straub y cols. 1961, Reed y Converse 1966, Greene y Troy. 1995, Graupmann-Kuzma y cols. 2008). La CM también se ha identificado en diversas especies de animales no domésticos, en su mayoría en zoológicos o en cautiverio: primates como chimpancés (*Pan troglodytes*) (Vinette Herrin y cols. 2005), gorila de montaña (*Gorilla gorilla beringei*) (Hood y Galgiani 1985), el macaco rhesus (*Macaca mulatta*) (Converse y Reed 1966, Breznock y cols. 1975), diversas especies de mandriles y papiones: *Theropithecus gelada* (Rapley y Long 1974) y *Mandrillus sphinx* (Welshman y cols. 1981, Rosenberg y cols. 1984, Johnson y cols. 1998), *Papio cynocephalus anubis*/*Papio cynocephalus cynocephalus* (Bellini y cols. 1991) y el Mangabay gris (*Cercocebus atys*) (Pappagianis y cols. 1973); otras especies reportadas como afectadas son el oso hormiguero (*Orycteropus afer*), el tejón (*Meles meles*), el guepardo (*Acinonyx jubatus*), coyotes (*Canis latrans*), zorros (*Vulpes macrotis mutica*), (Pappagianis 1988; Reed 1985); marsupiales como el canguro gigante rojo (*Macropus rufus*); felinos exóticos como tigres (*Panthera tigris*) (Helmick y cols. 2006) y el puma americano (*Felis concolor*) tanto en cautiverio (Clyde y cols. 1990) como individuos salvajes (Adaska 1999); mamíferos ungulados artiodáctilos como el borrego cimarrón (*Ovis canadensis nelsoni*) (Jessup y cols. 1989), el tapir (*Tapirus terrestris*) y el pecarí de collar (*Tayassu tajacu*) (Lochmiller y cols. 1985), y perisodáctilos como equinos (Terio y cols. 2003, Higgins y cols. 2005) y el rinoceronte negro (*Diceros bicornis*) (Wallace y cols. 2009); otros reportes recientes reportan al armadillo (*Dasypus novemcinctus*) y la paca (*Cuniculus paca*) (Eulálio y cols. 2000, de Macêdo 2011). Se tienen también reportes de infección por *Coccidioides* en mamíferos marinos como delfines de nariz de botella (*Tursiops truncatus gilli*) (Reidarson y cols. 1998), leones marinos (*Zalophus californianus*) (Reed y cols. 1976; Fauquier y cols. 1996) y nutrias (*Enhydra lutris*) (Cornell y cols. 1979, Thomas y cols. 1996). Existe un reporte anecdótico de infección de *Coccidioides* en reptiles (Timm y cols. 1988), aunque la mayor parte de evidencia de campo y experimental orientan a que las serpientes de cascabel y otros reptiles endémicos de zonas desérticas son resistentes a la infección por este patógeno (Egeberg y cols. 1966).

Diversos animales se han usado como modelos para la infección experimental de la enfermedad: ratones, ratas, conejos, cobayos, primates y perros (Swatek & Omieczynski 1970; Brummer & Clemmons 1987; Bellini y cols. 1991; Sorensen y cols. 1999; Clemons y cols. 2007).

Sin embargo, los animales salvajes principalmente relacionados en el pasado con la presencia de *Coccidioides* en su ambiente natural en áreas endémicas, son los roedores, ya que se ha podido aislar el hongo a partir de sus tejidos y de sus madrigueras. Estudios de campo previos han identificado a las ratas canguro (*Dipodomys merriami*), los ratones de abazones (*Perognathus baileyi*, ahora *Chaetodipus baileyi*; y *Perognathus penicillatus intermedius*, ahora *Chaetodipus penicillatus*), y otros mamíferos silvestres como ratones *Peromyscus eremicus*, *Onychomys torridus* y ardillas antílope (*Citellus harrisi*, ahora *Ammospermophilus harrisi*) (Emmons 1942; Emmons y Ashburn 1942).

Existen reportes de aislamientos de *Coccidioides* directamente a partir de muestras de suelo asociadas principalmente a madrigueras de estos heterómidos (Stewart 1932; Emmons 1942; Egeberg y cols. 1956; Converse y Reed 1966; Lacy y Swatek 1974; Barker y cols. 2011; Lauer y cols. 2011) y recientemente de madrigueras de armadillos en áreas endémicas de Sudamérica tropical (de Macêdo 2011).

Ecología de *Coccidioides* spp.

Se sabe mucho más sobre la ecología de *Coccidioides* spp. que de cualquier otro agente etiológico de enfermedades respiratorias. Sin embargo, Huppert acertadamente señaló que “*nuestra mayor brecha en el conocimiento de C. immitis se debe a que este hongo se encuentra limitado a esa distribución natural*” (Huppert 1968). Las regiones endémicas más importantes delineadas y estudiadas se encuentran aparentemente limitadas a la zona baja del desierto de Sonora (Maddy 1965; Maddy y Crebelius 1960; 1967; Baptista y cols. 2007). Sin embargo, el área con tasas de incidencia y prevalencia más elevadas se encuentra localizada en la región más meridional del Valle de San Joaquín, en el condado Kern en California, por lo que se considera la región endémica más importante del mundo.

La evidencia disponible actualmente basada en análisis filogenéticos y biogeográficos hace evidente que este patógeno se encuentra en suelos de América desde hace 9,000 a 140,000 años durante el pleistoceno tardío (Fisher y cols. 2001). Reportes compatibles con lesiones óseas en la fauna del holoceno temprano (Morrow 2006) y restos antropológicos, indican que la enfermedad probablemente era prevalente entre grupos humanos amerindios precolombinos (Lacy y Swatek 1974; Reinhard 1985; Harrison y cols. 1991; Reinhard y Vaughn 1992; Temple 2006).

Coccidioides spp. está restringido a pequeñas áreas distribuidas en zonas desérticas caracterizadas por escasa pluviometría y suelos halógenos (Egeberg 1964; Swatek 1970; Swatek y Omieczynski 1970). El hongo sobrevive durante los periodos de sequía en la profundidad del suelo, a menos de 20 centímetros de la superficie, y no aparece sobre el suelo hasta después de transcurrida la época de lluvias entre invierno y primavera, y se multiplica al final de la época de verano y otoño, lo que incrementa el número de casos. El suelo es el hábitat natural del hongo y por esto ha sido objeto de numerosos estudios (Ajello 1967; Egeberg 1964; Huppert 1968; Fisher y cols. 2007).

Como ya se ha comentado antes, la distribución conocida de la enfermedad fue definida en el pasado con base a estudios epidemiológicos con intradermorreacciones en humanos y animales (González Ochoa 1967; Baptista Rosas y cols. 2007; Barker y cols. 2011). Los aislamientos en extensos muestreos ambientales han sido escasos y solo se tienen documentados dos registros en suelo mexicano: en Hermosillo, Sonora (Sotomayor y cols. 1960) y más recientemente en Tecate, Baja California (Cairns y cols. 2000).

Desde la descripción de Beck (1931) sobre el hábitat de *Coccidioides* spp. como saprobio en el suelo, diversas hipótesis se han postulado para tratar de explicar su particular distribución espacial que aparentemente limita su presencia a los desiertos del

continente americano.

Desde hace más de 60 años se ha propuesto que el probable reservorio de la enfermedad son los roedores silvestres, basándose en el aislamiento del patógeno en 6 especies de heterómidos (Swatek 1970). Evidencia consistente sugiere que el enriquecimiento del suelo con materia orgánica animal crea un medio adecuado para el desarrollo de diferentes especies de hongos (Mantovani 1978, Hawkins 1996). Estos hallazgos llevaron a la hipótesis de que restos orgánicos como las carcasas, esputos, orina, heces y material purulento excretado por ratones infectados eran la fuente del hongo en los suelos. Estudios posteriores han confirmado que las esférulas y endosporas protegidas en fluidos biológicos resisten largos periodos de tiempo incluso cuando son expuestas a condiciones ambientales extremas (Sorensen 1964). Sin embargo, hasta este momento, esta teoría no ha podido ser demostrada debido a los pobres aislamientos en extensos muestreos (Maddy 1965; Swatek y cols. 1967; Maddy y Crecelius 1967; Lacy y Swatek 1974; Grenne y cols. 2000). Sin embargo, existe alguna evidencia histórica de tasas mas elevadas de aislamientos en inmediaciones de madrigueras de roedores (Egeberg y Ely 1956) y cuevas de murciélagos (Kruttsch y Watson 1978). Recientemente, después de el análisis genómico comparativo de *Coccidioides* apoya esta evidencia ya que las enzimas y complejos proteicos de membrana del patógeno están más relacionados con la descomposición de materia orgánica animal que de plantas (Sharpton y cols. 2009).

Dipodomys spp. conforma el 80% de la biomasa animal en desiertos dentro de la zona baja del desierto de Sonora (Blair 1981). Sin embargo, durante los periodos de lluvias, se ha documentado la proliferación de *Perognathus* spp. motivando una sucesión en la poblaciones de estas comunidades (Mares 1981; Grenot y Serrano 1981).

Diversas especies de heterómidos están distribuidas ampliamente en el ecosistema desértico (Hall 1981; Price y Endo 1989; Koufopanou y cols. 1997) y en el último siglo han sido drásticamente reducidas por el desarrollo de la agricultura y la urbanización en el sur de California (Thomas 1975, USFWS 1971). Las condiciones microambientales en las madrigueras de estos roedores proveen las condiciones ideales para el desarrollo de varias especies de hongos saprotrofos (Desmet y Cowling 1999; Jennings y Lysek 1999) por lo que parte de los esfuerzos para la búsqueda del nicho ecológico de *Coccidioides* deben enfocarse en el análisis de la distribución espacial de la mastofauna en el área endémica. *Peromyscus* es el roedor más abundante y con distribución más amplia en las zonas áridas del norte del continente americano; sin embargo, algunas especies endémicas de heterómidos como *Dipodomys* sp. y *Perognathus* sp. tienen distribuciones bien delimitadas (Poopatanapong 1999). En muestreos en el desierto de Mojave el 95% de los resultados de censos poblacionales en estas comunidades estaban distribuidos solo en tres especies de roedores: *Dipodomys merriani*, *D. panaminitus* y *Perognathus inornatus*. *Perognathus inornatus* es una especie endémica del Valle de San Joaquín que se encuentra protegida por las leyes ambientales del estado de California.

Estas especies han demostrado variaciones temporales en la densidad de población relacionado con patrones climáticos, específicamente con las lluvias estacionales (Vale y cols. 1989; Laabs y cols 1997). Las lluvias incrementan la disponibilidad de alimento para los roedores; se ha observado que *Perognathus* sp. no lleva a cabo su ciclo reproductivo

cuando la temperatura mínima en invierno es menor al promedio y las precipitaciones pluviales son menores al 47% a lo normal (Kenagy & Bartholomew 1985). Principalmente son granívoros, pero también pueden desarrollar conductas oportunistas alimentándose de la abundante vegetación después de la época de lluvias. Sus patrones de distribución y abundancia parecen estar más relacionados con las características del sustrato del suelo que con la cobertura vegetal (Vale y cols. 1989; Bolger y cols. 1997). Generalmente sus madrigueras son excavadas en la base de los matorrales desérticos o en bancos rocosos. Se ha observado simpatria con *Neotoma lepida*, *Dipodomys merriami*, y *Perognathus longimembris*; es decir, que coincide su distribución en la misma área geográfica y evolutiva o filogenéticamente podrían estar relacionadas, sin embargo, esta claro que tienen diferentes nichos ecológicos y que estos heterómidos son más abundantes en ecosistemas no fragmentados (Thomas, 1975; Price y Endo 1989).

Por otro lado, Green y cols. (2004) después de estudiar la biodiversidad y la composición de las comunidades de hongos ascomicetos en ecosistemas de Australia, refieren que su distribución espacial no está relacionada con las características del paisaje y que la distancia geográfica de un punto de aislamiento a otro es un predictor más eficiente, lo que orienta más a que las condiciones a escala microscópica son más determinantes que interacciones con especies animales o vegetales del bioma.

Al igual que en suelos templados, en biomas desérticos la biomasa microbiana esta dominada usualmente por hongos (Zhou y cols. 2002). De las 1.5 millones de especies fúngicas que probablemente existen, en una muestra de suelo promedio se estiman entre 100 y más de 1000 especies distribuidas en comunidades completamente diferentes en cuadrantes continuos de suelos (Green y cols. 2004). En las zonas desérticas de Norteamérica se han aislado más de 288 especies de 87 géneros distintos (States 1978; Mueller y cols. 2004). Algunas de la especies frecuentemente encontradas son *Aspergillus ustus*, *A. niger*, *A. alliaceus*, *A. nivers*, *Ulocladium* spp, *Stachybotrys* spp, *Fusarium semitectum*, *Trimmatos troma*, *Chaetomium* sp., *Podaxis farlowii*, *Gyrophragmium delelei*, *Geastrum* sp. y *Tylostoma* (Jaeger 1965; Nakasone y Gilbertson 1978; Wicklow y Carroll 1981). La aparentemente falta de correlación entre las especies encontradas en muestras ambientales de las principales áreas afectadas por la enfermedad puede explicarse por la biodiversidad con distribución beta recientemente descrita después de estudios en ecológicos sobre ascomicetos en zonas desérticas (Green y cols. 2004), y que estos hallazgos sugieren la contribución de múltiples hábitats en escala microbiológica que explican la gran riqueza y diversidad de especies fúngicas en estas (Griffin 1972; Mueller y cols. 2004). Hasta el momento, no existen datos sobre abundancia de *Coccidioides* spp. en los suelos de las áreas afectadas (Zender y Talamantes 2006; Fisher y cols. 2007).

El hábitat o sustrato como es llamado en micología, es altamente específico para cada especie (Leger y cols. 2000) y se define como el espacio físico donde el hongo desarrolla sus ciclos vitales, así como el material que llena ese espacio y provee de nutrientes para su desarrollo (Jennings y Lysek 1999). Generalmente el sustrato es heterogéneo en el aspecto de que esta compuesto por diferentes materiales inertes mezclados en pequeñas partículas con restos orgánicos en diversas etapas de descomposición. Esos pequeños sustratos son llamados micro hábitats y normalmente contienen diversas especies de hongos, cuyo principal papel es el de descomponer la materia orgánica para incorporar

los elementos fijados en ella a los ciclos biogeoquímicos del ecosistema.

La distribución heterogénea en un sustrato aparentemente homogéneo, se debe en gran parte a que la actividad de descomposición de materia orgánica es más activa y eficiente en algunas áreas especiales, donde se concentra la mayor parte de biomasa fúngica, y que generalmente son ecotonos a escala microbiológica. Originalmente se han descrito 5 áreas principales: la drilosfera, la detritusfera, la porosfera, la agregaturosfera y la rizosfera.

La información sobre descomposición de restos de vertebrados en ambientes desérticos es escasa (Andrews y Whybrow 2005). Se sabe que en general, el proceso es dominado por sucesiones de hongos (Kendrick 2000), y esta determinado por la disponibilidad de agua y temperaturas prevalecientes. Se ha determinado que la proporción de carbono y Nitrógeno (C:N) en el sustrato puede afectar la abundancia relativa de hongos y bacterias, llegando a determinar que sustratos con razones mayores de 30 ($\geq$ C:N 30:1) favorecen al colonización fúngica (Moore y cols. 2004). Estudios previos sobre productividad primaria en suelos de áreas desérticas de Norteamérica han determinado proporciones C:N alrededor de 100:1, lo que nos hace proponer que en los suelos áridos existe una alta biodiversidad fúngica con redes tróficas intrincadas por competencia de nutrientes en el sustrato (Zak y cols. 1994).

También se ha encontrado que el proceso de humificación retrasa notablemente la descomposición de materia orgánica en esta zonas con escasa disponibilidad de agua libre en el sustrato de suelo. Después de la exhumación de restos cadavéricos, se ha encontrado que miembros del genero *Aspergillus* se encuentra usualmente asociado a las etapas iniciales del proceso; y al final de este, tejidos ricos en queratina como piel y cabello, así como tendones y huesos ricos en colágeno pueden persistir varios años bajo un lento proceso de integración al sustrato. Se ha propuesto, después del estudio de restos óseos de vertebrados, que probablemente las hifas penetran activamente a través de la estructura del hueso a través de la secreción de enzimas líticas (Hackett 1981; Piepenbrick 1986). Se ha documentado que algunos géneros de hongos como *Mucor* sp. tienen capacidad osteoclástica, es decir, de erosionar y reabsorber hueso compacto previamente formado (Marchiafava y cols. 1974), y se ha propuesto que este efecto probablemente sea secundario a la acción de colagenasas que degradan la matriz orgánica, dañando y debilitando la estructura microscópica del tejido óseo (Beisaw 1998).

El tejido óseo esta compuesto por una matriz orgánica de colágeno y una fase mineral principalmente conformada por calcio en forma de cristales hidroxiapatita. Se ha observado que la descomposición del hueso durante la diagénesis es llevado a cabo inicialmente por deterioro químico de la fase mineral exponiendo la matriz orgánica a biodegradación por hongos colagenofílicos (Collins y cols. 2002).

Los hongos elaboran una amplia variedad de proteasas ácidas, neutras y alcalinas activas muy específicas en el sustrato donde actúan (Rao y cols.1998; Leger y cols. 2000; Brouta y cols 2002). La familia de genes Mep codifican para metaloproteasas con actividad colagenolítica, elastinolítica y queratinolítica demostrada *in vitro* y con secuencias ortólogas en diferentes especies de hongos (Schenck y cols. 1980; Rao y cols. 1998; Brouta y cols. 2002; Parente y cols. 2005). En *C. immitis* se han aislado dos proteasas extracelulares en la fase parasitaria en la diferenciación a endospora, la

primera con una metaloproteasa con peso molecular de 56 Kd y la segunda una aspartil proteasa de 19 a 23 Kd, ambas con la capacidad de lisar inmunoglobulinas y gran parte de las proteínas de la matriz extracelular como elastina, fibronectina y colágeno tipo I (Resnick y cols. 1987; Hogan y cols. 1996; Hung y cols. 2005; Tarcha y cols. 2006).

La familia de genes MEP transcriben para colagenasas en diversas especies de hongos filamentosos filogenéticamente relacionados con *Coccidioides* spp. (Monod y cols. 1993; Rao y cols. 1998; Brouta y cols. 2002), Recientemente se ha caracterizado una colagenasa en *Coccidioides* que se ha implicado como factor de virulencia, y probablemente este relacionado con la definición de su microhábitat y establecimiento de su nicho ecológico (Hung y cols. 2005).

Debido a que el principal componente de la materia orgánica en el suelo de los ecosistemas está compuesto por celulosa, la degradación tiende a ser dominada por hongos que eficientemente incorporan los elementos fijados a los ciclos biogeoquímicos del ecosistema. Estudios previos sobre la exposición a niveles elevados de CO₂ atmosféricos en suelos de zonas desérticas del desierto de Mojave muestran cambios en el patrón de aprovechamiento de nutrientes en el sustrato en modelos experimentales en el campo. Se ha documentado previamente un incremento general de metabolismo microbiano bajo condiciones elevadas de CO₂ atribuido a un incremento en la biomasa microbiana en los espacios abiertos (Jin y cols. 2007).

Justificación del proyecto

El estudio de la biodiversidad de hongos en suelos de desiertos de Norteamérica y el diagnóstico molecular de *Coccidioides* en muestras ambientales tendrá un alto impacto en la estimación de la situación regional de esta enfermedad y el conocimiento general micológico en estos ecosistemas.

El trabajo es relevante ya que en base a estudios epidemiológicos previos en la población residente, se sabe que Tijuana y Mexicali, centros urbanos altamente poblados localizados en el norte del estado de Baja California, México, son áreas endémicas para Coccidioidomicosis. Sin embargo, se desconocen su prevalencia e incidencia, así como su morbilidad y mortalidad real en población abierta en el resto del estado. La situación epidemiológica actual de la Coccidioidomicosis en nuestro país supone un gran problema de salud pública, ya que el área endémica esta circunscrita a la frontera más transitada del mundo.

Este estudio es importante porque en Arizona, estado con condiciones biogeográficas similares al área de estudio propuesta, este problema constituye la cuarta enfermedad más frecuentemente reportada por agente infeccioso específico, superada solo por enfermedades de transmisión sexual y el virus de hepatitis C, por lo que desde 1997 es obligatorio su reporte epidemiológico a las autoridades sanitarias en ese estado de la unión americana. De 1990 a 1995, el numero de casos reportados de Coccidioidomicosis para Arizona se incremento en 144%. Este incremento significativo continuó hasta alcanzar una tasa de incidencia de 18 por 100,000 habitantes en 1997 a 42 por 100,000 en 2001. Durante 2002 y 2003, el número de casos de Coccidioidomicosis en California se incrementaron de 1,727 a 2,091 (CDC, Atlanta 2005). De acuerdo a la escasa evidencia en los reportes de la Secretaría de Salud en nuestro país, la tasa de incidencia nacional para la enfermedad durante el periodo de 1988 a 1994 fue de 1.05 por 100,000 habitantes, con la tasa más elevada para el estado de Nuevo León con 2.94 por 100,000 habitantes (Dirección General de Epidemiología SSA 2005). De acuerdo a esta información, Baja California tiene una tasa promedio ligeramente por arriba de la media nacional con 1.21 por 100,000 habitantes, mientras que las tasas promedios para California y Arizona son de 251.03 y 10.5 por 100,00 habitantes respectivamente. Sin embargo, durante los brotes epidémicos se tienen reportadas tasas tan elevadas como 561 por 100,000.

A pesar del notable y alarmante incremento de la incidencia y reporte de casos en Estados Unidos, en México aparentemente no se reportan pacientes con enfermedad diseminada ni se ha incrementado la detección de casos en la forma esperada. Hasta el momento, el nicho ecológico realizado y el reservorio de la CM en el ecosistema desértico no ha sido establecido. La diversidad fúngica en suelos de zonas áridas de Baja California prácticamente esta inexplorada.

Hipótesis

La presencia o ausencia de *Coccidioides* spp. en una muestra de suelo está relacionada con una estructura de la comunidad fúngica específica.

Objetivos

Objetivo principal

Investigar la distribución de *Coccidioides* spp. en muestras ambientales de suelo en probables áreas endémicas de Baja California, México.

Objetivos particulares

1. Estandarizar técnicas de diagnóstico molecular de *Coccidioides* spp. en muestras ambientales.
2. Con la información disponible generada previamente, evaluar la riqueza y diversidad de especies fúngicas y su potencial relación con la presencia o ausencia de *Coccidioides* en ecosistemas desérticos.
3. Generar escenarios potenciales de cambio climático regional de acuerdo a la información proporcionada por el Plan Estatal de Acción Climática para Baja California.
4. Modelar la distribución potencial del patógeno empleando puntos de identificación ambientales.

Metodología

Técnica para obtención de muestras de suelo

De acuerdo a la información epidemiológica disponible y empleando el modelo obtenido en el análisis espacial empleando el algoritmo *Genetic Algorithm for Rule Set Production* (GARP) y Sistemas de Información Geográfica (SIG) de acuerdo al método descrito por Baptista-Rosas y cols. (2007), se designaron dos polígonos en el estado de Baja California, México en áreas altamente endémicas para la enfermedad y dentro de los puntos previamente señalados por el modelo como de alta probabilidad para la presencia del microorganismo: Valle de las Palmas (VDP) a 27 km de la ciudad de Tecate, y San José de la Zorra (SJZ), situado a 38 km al norte de Ensenada (E). A partir de estos puntos, se construyeron perímetros para llevar a cabo muestreos aleatorios dentro de polígonos estimados de 150 metros por lado de acuerdo a la geografía del lugar en cada punto de trabajo. Se estimó un tamaño mínimo de muestra en base al número de madrigueras de heterómidos encontradas dentro del polígono de muestreo con el fin de estimar una tasa de infección de las madrigueras, tomando al menos 10 muestras por polígono de trabajo en cada salida de campo. Se llevaron a cabo los muestreos tomando en cuenta el modelo bioclimático descrito previamente (Baptista-Rosas y cols. 2010) y tomando en cuenta la última precipitación de la estación de lluvias de cada año, usualmente entre los meses de Mayo a Junio, ya que de acuerdo a esto, existe una mayor probabilidad de dispersión aérea de artroconidias coccidioidales en estas áreas endémicas. Las fechas de muestreo se definieron a partir de la relación entre el número de casos reportados de la enfermedad en Baja California y la precipitación media mensual entre 1971 y 1995 donde la mayor parte de casos reportados de la enfermedad se habían registrado en los periodos más secos del año, posteriores a las lluvias estacionales de invierno (Baptista-Rosas y cols. 2010), por lo que se llevaron a cabo trabajos de campo 8 a 12 semanas después del pico máximo de lluvia mensual acumulada estacional registrada durante los años 2006 a 2010.

Se tomaron muestras ambientales de suelo superficial y del acceso de madrigueras activas y letrinas de heterómidos, así como guaridas y escondrijos de mamíferos de mayor tamaño. Las muestras de suelo se tomaron a 10 centímetros de la superficie del suelo en cada una de las localidades. Por cada punto de muestreo, se colectaron 20 g. de tierra estandarizando la técnica de muestreo de acuerdo a las recomendaciones descritas en Mueller y cols. (2004). Se empleó una cuchara plástica desechable en cada punto y se almacenó en un frasco estéril para muestras. El utensilio (pala) para retirar la tierra superficial en cada una de las muestras fue higienizado previamente con hipoclorito de sodio.

Los puntos de muestreo fueron recopilados en una base de datos y registrados por medio de un Sistema de Posicionamiento Global (GPS) en coordenadas geográficas. Las muestras fueron transportadas a temperatura ambiente y almacenadas en oscuridad hasta su procesamiento en el laboratorio para la extracción de ácidos nucleicos.

Caracterización ecológica y análisis del paisaje de los puntos de muestreo

La cobertura vegetal de los polígonos seleccionados para el muestreo se describió de acuerdo a guías botánicas de campo para Baja California y al acervo de herbario de la Universidad Autónoma de Baja California. Se llevó a cabo un muestreo nocturno con trampas tipo Sherman para análisis de la mastofauna residente de los sitios. Las características de tipo de suelo se describieron de acuerdo a cartas edafológicas basadas en la clasificación FAO-UNESCO 1989 (INIFAP-CONABIO 1995).

Análisis bioclimático y ombrotérmico

Valores de Temperatura máxima (T_{max}), temperatura mínima (T_{min}) y precipitación acumulada de 1971 a 2010 obtenidas de estaciones meteorológicas históricas y activas en Baja California, México fueron obtenidas del Sistema Meteorológico Nacional (SMN) y la Comisión Nacional del Agua (CNA). Para VDP se encontraron reportes climatológicos de Abril a Diciembre de 1995. Para caracterizar la bioclimatología de los puntos de muestreo las temperaturas medias mensuales (T_m) y la precipitación mensual promedio (pp) fueron calculadas utilizando las bases de datos disponibles, graficando contra las tasas de incidencia reportadas medias mensuales de para CM en Baja California (Baptista-Rosas y cols. 2007). Se construyeron graficas ombrotérmicas de Gaussen para estimar evapotranspiración de la superficie del suelo de los puntos de muestreo.

El análisis ombrotérmico de Gaussen es una herramienta útil para evaluar periodos secos en los cuales pp es menos de la mitad del valor de T_m : la curva de la lluvia se encuentra por debajo de la curva de la temperatura y el área entre las dos curvas indican la duración y la intensidad de la sequia (Peinado *et al.* 1994).

Extracción de DNA de muestras ambientales

La extracción y purificación de DNA ambiental total se obtuvo directamente de cada una de las muestras por medio del *UltraClean soil DNA isolation kit* (Mobio Laboratories Inc.) de acuerdo al instructivo proporcionado por el fabricante. Se hicieron ensayos preliminares con otros kits para extracción y purificación de ácidos nucleicos a partir de muestras ambientales de suelo (*ZR Soil Microbe DNA MiniPrep kit* (Zymo Research) y *Power soil DNA isolation kit* (Mobio Laboratories Inc.), sin embargo, se decidió este último método debido a que permitió obtener mejores rendimientos en calidad y cantidad de DNA total obtenido. El protocolo de extracción se resume en los siguientes pasos:

1. Agregar 1 g de tierra en tubo con perlas.
2. Agitar en Vortex ligeramente.
3. Agregar 60 μ L de solución S1 e invertir dos veces.
4. Añadir 200 μ L de solución IRS.
5. Agitar en Vortex por 10 minutos.
6. Centrifugar 30 segundos a 10,000 g.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de 2 ml.
8. Añadir 250 μ L de solución S2.
9. Agitar en Vortex durante 5 segundos.
10. Incubar a 4°C durante 5 minutos.
11. Centrifugar durante 1 minuto a 10,000 g.
12. Transferir sobrenadante a otro tubo limpio de 2 ml.
13. Agregar 1.3 ml de S3 a cada tubo.
14. Agitar en Vortex durante 5 segundos.
15. Cargar 700 μ L en la columna con filtro.
16. Centrifugar durante 1 minuto a 10,000 g.
17. Descartar líquido que queda en tubo después del paso por el filtro de la columna.
18. Repetir los pasos 15 a 17 dos veces más.
19. Añadir 300 μ L de solución S4 a la columna con filtro.
20. Centrifugar 30 segundos a 10,000 g.
21. Transferir columna con filtro a un tubo limpio de 2 ml.
22. Agregar 50 μ L de solución S5.
23. Desechar la columna con filtro.
24. Resguardar el tubo con 50 μ L a -20°C

El DNA obtenido de la extracción se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm. La calidad del DNA se verificó por electroforesis en gel agarosa al 1%, 60 minutos a 75 mV teñido con bromuro de etidio (BrEt; 0.1 μ g/mL).

Diagnóstico molecular de *Coccidioides* spp. en muestras ambientales

Para reducir las posibilidades de una amplificación inespecífica, se diseñó una estrategia empleando cebadores para amplificar una región *ITS1-5.8s-ITS2* de 900 a 1000 pb del genoma fúngico de organismos pertenecientes al subreino *Dikarya* (Figura 6) por medio de PCR anidada. Este subreino alberga a los phyla *Ascomycota* y *Basidiomycota* (Hibbett y cols. 2007), donde se encuentran la mayor parte de los patógenos fúngicos de importancia. Filogenéticamente, los dos filos componentes del subreino constituyen un grupo monofilético (Lutzoni y cols. 2004; James y cols. 2006).

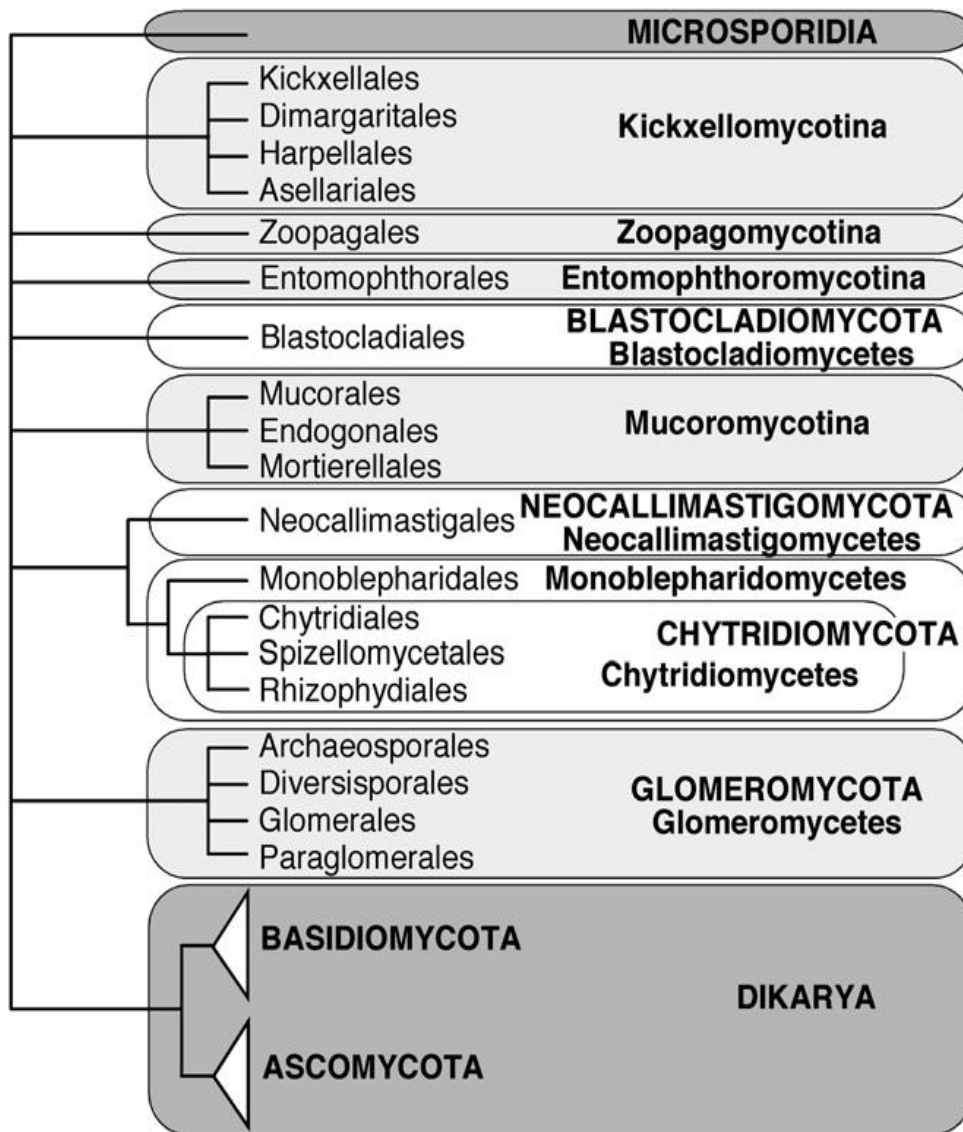


Figura 6. Filogenia y clasificación del reino *Fungi*. Las distancias entre los brazos del árbol no son proporcionales a las distancias genéticas. Tomado de Hibbett y cols. 2007.

Para llevar a cabo la PCR anidada, se emplearon para el primer paso de amplificación los oligonucleótidos diseñados por Martín & Rygiewicz (2005): NSA3 (5'-AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA-3') y NLC2(5'-GAGCTGCATTCCCAAACAACACTC-3') Para el segundo paso de la PCR anidada se emplearon los oligonucleótidos NSI1 (5'-GATTGAATGGCTTAGTGAGG-3') y NLB4 (5'-GGATTCTCACCCCTCTATGAC-3') utilizando como templado 1µL del producto de la reacción previa (Figuras 7 y 8). Para cada reacción se emplearon 2.5 mM MgCl₂, 0.6 µM de cada cebador, 0.2 mM de cada dNTP, 5x *GoTaq Flexi buffer* colorless (*Promega BioSciences, San Luis Obispo, CA*) y 1U *GoTaq Flexi* polymerase (*Promega BioSciences, San Luis Obispo, CA*).

Condiciones de reacción PCR anidada para un volumen final de 20 µL.

Reactivo	Volumen (µL)
DNA templado	1.0
dNTPs MIX 2.5 mM	1.5
oligonucleótido Foward 10 µM	1.25
oligonucleótido Reverse 10 µM	1.25
<i>GoTaq Flexi</i> polymerase (5 U/ µL)	0.25
MgCl ₂ 25 mM	2.0
5x <i>GoTaq Flexi buffer</i> colorless	4.0
H ₂ O HPLC	8.75

En este paso es importante señalar que hay que poner especial atención en utilizar el buffer SIN COLORANTE (*GoTaq Flexi* polymerase 5x *buffer* colorless), ya que los productos obtenidos de la PCR anidada fueron utilizados como templado para realizar el análisis de estructura de la comunidad fúngica mediante geles desnaturalizantes, y alguna de las sustancias empleadas en el buffer *Green Go Taq*, inhiben la adecuada migración de bandas de tamaño muy cercano, con diferencias de solo algunas pares de bases. Se recomienda utilizar solución *buffer colorless* convencional y utilizar *loading dye* en relación 1:5 volúmenes para realizar electroforesis control al final del proceso.

Para llevar a cabo la reacción se emplearon termocicladores *Multigene II* (*Labnet International Inc.*) y *MJ Mini*TM (*Bio Rad*), ambos equipados con sello caliente en la tapa. Los ciclos para la amplificación para la PCR anidada fueron los siguientes: 1 ciclo de 95°C durante 2 minutos; 35 ciclos con 95°C durante 45 y 30 segundos para la primera y segunda reacción respectivamente, 60°C por 40 segundos y 30 segundos para la primera y segunda reacción respectivamente 72°C durante 60 segundos; y finalmente 1 ciclo de extensión final a 72°C por 5 minutos.

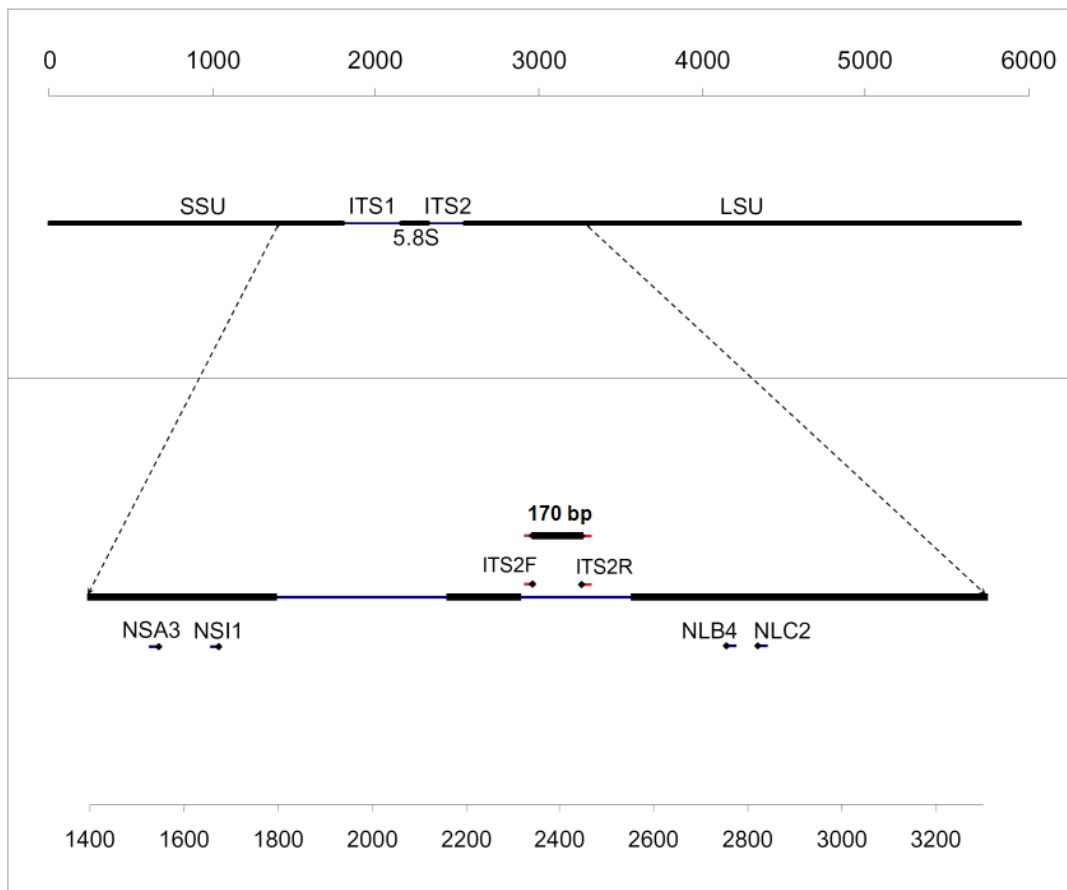


Figura 7. Diagrama de localización en el genoma fúngico de los oligonucleótidos empleados en este trabajo para amplificar las regiones ITS 1 e ITS2 del genoma fúngico y un amplicón de 170 pb específico para el género *Coccidioides*. Las distancias están representadas en pares de bases. Unidad pequeña ribosomal (18S), LSU: Unidad mayor ribosomal (28S); ITS: Región espaciadora intergénica. Adaptado de Martin & Rygielwics 2005.

Coccidioides immitis (A)

1	ggaagtaaaa	gtcgtaacaa	ggtttcgta	ggtgaacctg	cggaaggatc	attaaagtgg
61	cgtccggctg	cgcacctccc	ccgcgggggt	cgcgcggtcc	gtacctcca	cccgtgttta
121	ctgaactatt	gttgcttg	caggcctgcc	gggcctctgg	ctgccgggga	tcgccgcct
181	tgcgcggcgt	cccgggcgcg	cgctgccag	tggatcaatt	gaactcttat	gtgaagattg
241	tcagtctgag	catcatagca	aaaatcaaac	aaaacttca	acaacggatc	tcttggttcc
301	ggcatcgatg	aagaacgcag	cgaaatgcga	taagtaatgt	gaattgcaga	attccgtgaa
361	tcacgaatc	tttgaacgca	cattgcgccc	tctgttattc	cggggggcat	gcctgttcga
421	gcgtcattgc	aaac ccttca	agcacggctt	gtgtgttggg	ccaacgtccc	cgcttgtgtg
481	gacgggcctg	aaatgcagtg	gcggcaccga	gttcctgttg	tctgagtgtg	tgggaaatca
541	cttcacgct	caaagaccgg	atcggggccg	atctttttt	ttttaatat	ccggtttgac
601	ctcggatcag	gtaggagtag	ccgtgaact	taagcatatc	aataagcggg	ggaaaagaaa
661	ccaacagggg	ttgcctcagt	aacggcgagt	gaagcggcaa	aagctcaaat	ttgaaatctg
721	gctccatcgc	gagcccagat	tgtaatgtg	agaggacact	tcgggtgcgg	ccacggcata
781	agttccttg	aacaggacgt	catagagggt	gagaatcccg	tctttggctg	ctggaccgcg
841	cccatgcgaa	gttcctcga	cgagtcgagt	tgttgggaa	tgcagctcta	agtgggtggt
901	aaatttcac	taaagctaaa	tattggccgg	agaccgatag	cgcaacagta	gagtgatcga
961	aagggtaaaa	gcaccttgaa	aagggagtta	aatagcacgt	gaaattgttg	aaaggggaagc
1021	gcttgaacc	agactcggc	gtgggggctc	agcgggcatg	agtcccgtg	tactcccca
1081	tgctccgggc	cagcatcagt	tctggcggtt	ggttaaaggc	ctctggaatg	tatcgtctc
1141	cgggacgtct	tatagccagg	ggcgcaatgc	ggccagccgg	gactgaggaa	cgcgctcgg
1201	cacggatgct	ggcataatgg	ttgtaagcgg	cccgtcttga	aacacggacc	

Coccidioides posadasii (B)

1	ggaagtaaaa	gtcgtaacaa	ggtttcgta	ggtgaacctg	cggaaggatc	attaaagtgg
61	cgtccggctg	cgcacctccc	ccgcgggggt	tcgcgcggtc	cgtacctccc	accctgttt
121	actgaacat	gttgcttg	gcaggcctgc	cgggcctccg	gctgccggg	atcgccgcc
181	ttgcgcggcg	tccgggcgcg	gcgcctgcca	cgggatcaat	tgaactctta	tgtgaagatt
241	gtcagtctga	gcacatagc	aaaaatcaaa	caaaacttc	aacaacggat	ctcttggtc
301	cggcacgat	gaagaacgca	gcgaatgcg	ataagtaatg	tgaattgcag	aattccgtga
361	atcatcgaat	cttgaacgc	acattgcgcc	ctctgttatt	cgggggggca	tgccgtgtcg
421	agcgtcattg	caaac ccttc	aagcacggct	tggtgttgg	gccaacgtcc	ccgctgtgt
481	ggacgggcct	gaaatgcagt	ggcggcaccg	agttcctggt	gtctgagtgt	atgggaaatc
541	acttcacgc	tcaaagacc	gatcggggcc	gatctcttt	ttttattta	tccggttga
601	cctcgatca	ggtaggagta	cccgtgaac	ttaagcatat	caataagcgg	aggaaaagaa
661	accaacaggg	attgcctcag	taacggcgag	tgaagcggca	aaagctcaaa	ttgaaatct
721	ggctccatgc	ggagcccag	ttgtaattg	gagaggacac	ttcgggtgcg	gccacggcat
781	aagttccttg	gaacaggacg	tcatagaggg	tgagaatccc	gtctttggct	gctggaccgc
841	gccatgcga	agttcctcg	acgagtcgag	ttgttggga	atgcagctct	aagtgggtgg
901	taaatttcac	ctaaagctaa	atattggccg	gagaccgata	gcgcacaagt	agagtgcg
961	aaaggtaaaa	agcaccttga	aaagggagtt	aaatagcacg	tgaattgtt	gaaagggag
1021	cgcttgcac	cagactcgg	cgtgggggct	cagcgggcat	gcgtgccgt	gtactcccc
1081	atgctccggg	ccagcatcag	ttctggcggt	tggttaaagg	cctctggaat	gtatcgtct
1141	ccgggacgtc	ttatagccag	gggcgcaatg	cggccagccg	ggactgagga	acgcgctcg
1201	gcacggatgc	tggcataatg	gttgaagcgg	gccgtcttg	aaacacggac	c

Figura 8. Secuencias de *Coccidioides immitis* AB232894 (A) y *Coccidioides posadasii* AB232901 (B) (Nucleotide database Genbank NCBI) que contienen parte de RNAr 18S, ITS1, RNAr 5.8S mostrado en color gris), ITS2, y RNAr 28S. Los cebadores ITS2F (color magenta) e ITS2R (color azul) amplifican un producto de 170 pares de bases (mostrado en color amarillo).

Se empleó como control positivo DNA genómico de *Coccidioides posadasii* proporcionado por M. Orbach de la Universidad de Arizona y G. González de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Como control negativo se usó DNA genómico de *Neurospora crassa* cepa N1 FGSC #988 disponible en el laboratorio de M. Riquelme, Departamento de Microbiología CICESE y como control blanco agua desionizada estéril (dH₂O).

Para comprobar el producto de amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%, 45 mV por 80 minutos, obteniendo productos de 900 a 1000 pb. Las amplificaciones exitosas fueron diluidas 1:10 y se usó 1 µl para posteriormente emplearse como templado para la identificación molecular de *Coccidioides* spp. empleando oligonucleótidos fúngicos ITS2F (5'-CATCATAGCAAAAATCAAAC-3') e ITS2R (5'-AGGCCCGTCCACACAAG-3') específicos para amplificar una secuencia de 170 pb en la región ITS2 descrito según la técnica de Binniker y cols. (2007).

Condiciones de reacción PCR final para identificación de *Coccidioides* para un volumen final de 25 µL.

Reactivo	Volumen (µL)
DNA templado	2.0
dNTPs MIX 10 mM	2.5
ITS2F (oligonucleótido <i>Foward</i>)	1.25
ITS2R (oligonucleótido <i>Reverse</i>)	1.25
MgCl ₂ 25 mM	2.5
5x <i>Green GoTaq Flexi buffer</i>	5.0
<i>GoTaq Flexi</i> polymerase	0.25
H ₂ O HPLC	14.75

Los ciclos para la amplificación por PCR fueron los siguientes: 1 ciclo de 95°C durante 10 minutos; 45 ciclos con 95°C por 10 segundos, 59°C durante 15 segundos, y 72°C por 20 segundos; y finalmente 1 ciclo a 72°C durante 10 minutos (1 ciclo). Como controles para la PCR de diagnóstico, los productos de las reacciones controles obtenidos de la PCR anidada fueron usados como templado.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñida con BrEt 0.1 µL/ml a 75 mV durante 80 minutos, esperando un producto de 170 pb (171 pb para *C. immitis* y 179 pb para *C. posadasii* específicamente, aunque se requiere una electroforesis en gel de poliacrilamida para tener la resolución adecuada para visualizar esta diferencia de 8 pb). A pH 8.5 5x *Green GoTaq Flexi buffer* contiene colorantes azul y amarillo que permiten visualizar la migración de los ácidos nucleicos durante la electroforesis. El colorante azul migra a la misma velocidad que los fragmentos de DNA de 3–5 kb en un gel de agarosa al 1%. El colorante amarillo migra a una velocidad menor a 50 pb. Las bandas obtenidas como positivas fueron cortadas de la matriz del gel con una hoja de bisturí estéril y el DNA amplificado fue purificado empleando *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Germantown, MD) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Protocolo para purificación de DNA de gel de agarosa *QIAquick Gel Extraction Kit Qiagen*

1. Pesar un tubo tipo *Eppendorf* de 1.5 ml en báscula granataria.
2. Anotar el peso del tubo en mg.
3. Cortar la banda de gel de agarosa y pesar.
4. Calcular el peso de la banda conteniendo el DNA por diferencia de pesos.
5. Agregar 3 volúmenes de solución amortiguadora QG por cada volumen del gel (100 µg=100 µL) si el color de la mezcla es naranja o violeta, añadir 10 µL de acetato de sodio (CH₃COONa) 3M pH 5.0 y mezclar. El color de la mezcla se tornará amarillo.
6. Incubar a 50°C por 10 minutos (hasta que el gel se haya disuelto completamente). Para ayudar a disolver mas rápidamente, vortear el tubo cada 2 o 3 minutos durante la incubación. Para geles mayores al 2%, incrementar el tiempo de incubación.
7. Después de que el gel se haya disuelto completamente, checar que el color de la mezcla sea amarillo (similar a la solución amortiguadora QG, donde se disolvió la agarosa). Si el color de la mezcla es naranja o violeta, añadir 10 µL de CH₃COONa 3M pH 5.0 y mezclar. El color de la mezcla se tornará amarillo.
8. Anadir un volumen de isopropanol y mezclar.
9. Colocar en la columna de diálisis *QIA quick spin*.
10. Centrifugar por un minuto a 17,900 g (13,000 rpm).
11. Descartar el líquido en el fondo del tubo.
12. El máximo volumen de la columna es 800 µL. Para muestras mayores repetir este paso las veces necesarias
13. Añadir 0.5 mL (500 µL). de solución amortiguadora QG a la columna, centrifugar un minuto a 17,900 g y descartar el líquido.
14. Para lavar, agregar 0.75 ml (750 µL) de solución amortiguadora PE y reposar de 2 a 5 minutos.
15. Centrifugar por un minuto a 17,900 g.
16. Colocar la columna en un tubo limpio de 1.5 ml tipo *Eppendorf*.
17. Colocar 50 µL de solución amortiguadora EB (Tris HCL 10 mM pH 8.5) o dH₂O en el centro de la membrana de la columna, dejar reposar un minuto y centrifugar por un minuto a 17,900 g.
18. Si se desea más concentrado el DNA, agregar 30 µL de solución amortiguadora, dejar reposar un minuto y centrifugar durante un minuto a 17,900 g
19. Si se desea verificar la presencia y calidad del DNA purificado, se analiza en un gel de agarosa al 1% teñido con BrEt 1 µL/ml agregando un volumen de *Promega Blue/orange Loading Dye 6X* (*Promega BioSciences, San Luis Obispo, CA*) a 5 volúmenes de DNA purificado, mezclando la solución por pipeteo y corriéndose por electroforesis a 60 mv durante 60 minutos.

Una vez lograda la extracción y purificación de los productos de PCR finales, se llevaron a cabo reacciones de secuenciación por *Eton Bioscience Inc.* y *Retrogen Inc.*, San Diego, CA. Para las reacciones de secuenciación se emplearon los cebadores ITS2F e ITS2R previamente descritos. Las secuencias resultantes fueron editadas manualmente usando el software *CodonCode Aligner* (*CodonCode Corporation Dedham, MA*) y *Mega 5.05* (Tamura y cols. 2011), para posteriormente analizarse empleando BLAST, alinearse empleando ClustalX y compararse para identificación con la base de datos de *Genbank* (*National Center for Biotechnology Information, Rockville Pike, Bethesda MD*).

Análisis espacial de distribución potencial de *Coccidioides* en Norteamérica

Modelación de nicho ecológico

Se llevaron a cabo experimentos *in silico* para modelar la distribución potencial del patógeno utilizando coordenadas espacialmente georeferidas de puntos de identificación de presencia del patógeno obtenidos durante el proyecto, y empleando bases de datos de variables climáticas únicamente para poder tener una referencia visual de la distribución potencial actual mas fidedigna de *Coccidioides*. Para modelación del probable nicho ecologico se utilizó el software *Genetic Algorithm for Rule-set Prediction* (GARP) usando para tal efecto Desktop Garp version 1.1.6 desarrollado por University of Kansas Biodiversity Research Center. Se emplearon 11 variables ambientales: datos topográficos proporcionadas por *United States Geological Survey* (USGS) y datos climáticos promedios anuales de diversos parámetros obtenidos de *The Intergovernmental Panel on Climate Changes*; también se emplearon registros históricos de muestreos ambientales positivos descritos por Sotomayor & Madrid (1960) y Swatek (1970) y puntos de aislamientos o identificación molecular de *Coccidioides* en muestras ambientales de suelo; de esta manera se obtuvieron modelos predictivos con los cuales se analizó espacialmente y se buscaron puntos con mayor concordancia por método de sobreposicion de imágenes con SIG de acuerdo al método descrito por Baptista y cols. (2007).

Análisis del paisaje de los puntos de muestreo

Empleando imágenes satelitales se llevó a cabo la interpretación espacial de los puntos de muestreo durante el trabajo, tanto para VDPy SJZ, Baja California, México. Se analizaron con diferentes resoluciones y escalas empleando una imagen Landsat para VDP cortesía de Landsat image archive (glovis.usgs.gov); e imágenes satelitales de alta resolución obtenidas en el año 2008 cortesía de Digital Globe Image Library (www.digitalglobe.com). Los polígonos de puntos de muestreo para *Coccidioides* fueron georeferidos espacialmente a partir de las coordenadas obtenidas durante el trabajo de campo para situar especialmente los puntos de identificación de presencia de *Coccidioides* en muestras ambientales de suelo. Por lo que respecta a SJZ se empleó una imagen Landsat con una vista general cortesía de Landsat image archive (glovis.usgs.gov) y otra imagen satelital de alta resolución del año 2008 cortesía de Digital Globe Image Library (www.digitalglobe.com) para representar el polígono con los puntos de muestreo. Para el análisis espacial se emplearon softwares ENVI 3.4 (Research Systems, Inc. 2000), ArcMap 9.1 y ArcGIS 10 ESRI (Redlands, CA. Environmental Systems Research Institute, 1992-2005).

Proyecciones futuras de distribución potencial y tasas de incidencia de Coccidioidomicosis relacionadas al Cambio Climático Regional

Mediante la colaboración del Programa Estatal de Acción ante el Cambio Climático para el Estado de Baja California (PEACC BC), se obtuvieron bases de datos escaladas con mayor resolución espacial para generar modelos de distribución potencial y análisis

bioclimáticos con escenarios futuros a 40 y 80 años con dos tendencias de baja y alta emisión de gases de efecto invernadero.

Análisis para explorar la biodiversidad fúngica en muestras ambientales

Para explorar la biodiversidad fúngica en las muestras obtenidas se propuso llevar a cabo estrategias diseñadas con técnicas de biología molecular y ecología microbiana sin emplear aislamiento por cultivo convencional debido a su reproductibilidad y alto rendimiento (Smith y cols. 1999; Kennedy y Clipson 2003; Takada y cols. 2010). La diversidad genética de la comunidad fúngica se evaluó mediante estimación de la heterogeneidad del DNA de toda la comunidad microbiana a partir de los productos obtenidos de la PCR anidada, ya que el DNA recuperado representa el acervo genético de toda la comunidad fúngica de Ascomicetos y Basidiomicetos (Atlas y Bartha 2005).

Para explorar la biodiversidad fúngica en muestras ambientales en áreas endémicas para *Coccidioides* spp., nos propusimos llevar a cabo electroforesis en gradiente con geles desnaturalizantes para analizar la diversidad genética de poblaciones microbianas complejas.

Electroforesis en gradiente con geles desnaturalizantes

A partir de los productos obtenidos en la amplificación de la región *ITS1-5.8s-ITS2* de la PCR anidada se propuso realizar electroforesis con geles desnaturalizantes de poliacrilamida para separar los fragmentos de DNA que han sido amplificados previamente por PCR anidada y representan la estructura de la comunidad fúngica del subreino *Dikarya* en cada punto de muestreo. Este enfoque ayudaría a comprender la diversidad genética de las poblaciones microbianas no caracterizadas y nos permitiría explorar si existe un patrón respecto a la estructura de la comunidad fúngica y la presencia o ausencia de *Coccidioides* spp. en un punto dado.

Las técnicas empleadas para llevar a cabo este análisis fueron electroforesis en geles desnaturalizantes con gradiente químico de urea y formamida, y la electroforesis en geles desnaturalizantes por temperatura (DGGE y TGGE por sus siglas en inglés respectivamente) de acuerdo a las recomendaciones de Green y cols. (2009).

Los productos obtenidos del primer paso de la PCR anidada fueron preparados utilizando el protocolo descrito previamente y empleados como templado para llevar a cabo un paso de PCR para colocar colas de GC de 40 pb en el extremo 5' de los amplicones, con el fin de tener un *clamp* o pinza que facilita la migración y diferenciación de diferentes productos con 1 o 2 pb diferentes en la secuencia. Se emplearon los oligonucleótidos fúngicos NLB4 (5'-GGATTCTCACCTCTATGAC-3') diseñado por Martín & Rygiewicz (2005) e ITS3GC (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGCCGCCCCCGCCCCATTCCCCGTTACCCGTTG-3') (May y cols. 2001; Nikolcheva y cols. 2005) para amplificar una secuencia esperada de 500 a 600 pb.

Condiciones de reacción PCR *GCclamp* para un volumen final de 50 µL.

Reactivo	Cantidad (µL)
DNA templado	2.0
dNTPs MIX 10 mM	1.0
oligonucleótido sentido 10 µM	1.0
oligonucleótido antisentido 10 µM	1.0
MgCl ₂ 25 mM	3.0
BSA 10X	3.0
5x Colorless GoTaq Flexi buffer	5.0
GoTaq Flexi polymerase	0.5
H ₂ O HPLC	33.5

Los ciclos para la amplificación por PCR fueron los siguientes: Un ciclo a 95°C durante 10 minutos, 35 ciclos con 95°C por 30 segundos, 60°C por 40 segundos, y 72°C durante 40 segundos; y finalmente un ciclo de 72°C durante 5 minutos.

Para comprobar que la amplificación resultara exitosa, se cargaron directamente 5 µL de los productos obtenidos realizando una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñida con BrEt 0.1 µL/ml a 75 mV durante 80 minutos, esperando un producto de 600 pb.

Al final se deberían obtener 45 µL de productos listos para corrida, que pueden emplearse en dos experimentos para correr geles naturalizantes (20 µL cada uno).

Preparación de geles de poliacrilamida con condiciones desnaturalizantes

Gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante 40-100% con urea y formamida para DGGE.

1. Limpiar los vidrios (160 mm de largo por 1 mm de espesor) y los espaciadores con etanol al 96%.
2. Prepara una cara del vidrio con *gelbond*.
3. Poner agua para determinar el lado hidrofóbico que fue tratado con *gelbond*.
4. Colocar los espaciadores y el vidrio pequeño. Colocar los broches a cada lado, alinear perfectamente. Ajustar los broches firmemente.
5. Preparar las soluciones de acrilamida-bisacrilamida y la solución desnaturalizantes al 0%.
6. Preparadas las soluciones se ponen en reposo en una cama con hielo.
7. Adicionar el Temed (N', N', N', N'-tetrametil-etilenodiamonio) y mezclar.
8. Asegurar que las llaves de paso de los compartimentos de la cámara vertical de electroforesis este cerradas y la bomba peristáltica detenida.
9. Adicionar 38 µL de APS a la solución altamente desnaturalizante, mezclar y poner en el primer compartimiento.
10. Adicionar 38 µL de APS a la solución media desnaturalizante, mezclar y poner en el segundo compartimiento.
11. Encender la bomba peristáltica a baja velocidad y abrir al mismo tiempo las llaves de paso de las cámaras.

12. Cuando estén vacíos los compartimentos cerrar la llave.
13. Adicionar 18 µL de APS a la solución 0% desnaturalizante, mezclar y poner en el primer compartimiento.
14. Encender la bomba peristáltica a baja velocidad.
15. Al terminar de adicionar la solución 0% despolarizante, se coloca el peine.
16. Dejar polimerizar el gel durante 2 horas y posteriormente en reposo durante 12 horas a temperatura ambiente cubierto con plástico e polivinilo para evitar que se deshidrate.

% desnaturalizante	Volumen final	Solución desnaturalizante 0% (ml)	Solución desnaturalizante 100% (ml)	Temed µL	APS µL
0	6	6	-	6	18
40	12	7.20	4.8	12	38
42	12	6.95	5.05	12	38
44	12	6.70	5.30	12	38
46	12	6.50	5.50	12	38
48	12	6.25	5.75	12	38
50	12	6.00	6.00	12	38
52	12	5.75	6.25	12	38
54	12	5.50	6.50	12	38
56	12	5.30	6.70	12	38

Gel de poliacrilamida desnaturalizante 100% con urea y formamida para TGGE

1. Limpiar los vidrios (160 mm de largo por 1 mm de espesor) y los espaciadores con etanol al 96%.
2. Prepara una cara del vidrio con *gelbond*.
3. Poner agua para determinar el lado hidrofóbico que fue tratado con *gelbond*.
4. Colocar los espaciadores y el vidrio pequeño. Colocar los broches a cada lado, alinear perfectamente. Ajustar los broches firmemente.
5. Preparar solución de acrilamida-bisacrilamida con urea 6M y formamida al 25%.
6. Preparadas la solución se pone en reposo en una cama con hielo.
7. Adicionar 38 µL de APS
8. Adicionar 12 µL Temed (N', N', N', N'-tetrametil-etilenodiamonio) y mezclar.
9. Encender la bomba peristáltica a baja velocidad y abrir al mismo tiempo las llaves de paso de las cámaras.
10. Al terminar de adicionar la solución se coloca el peine.
11. Dejar polimerizar el gel durante 2 horas y posteriormente en reposo durante 12 horas a temperatura ambiente cubierto con plástico e polivinilo para evitar que se deshidrate.

Los geles se prepararon 12 horas antes de su uso y fueron envueltos en plástico de polivinilo dejándolos en reposo a temperatura ambiente. Una vez realizado esto, los pozos del gel de poliacrilamida se lavaron mediante pipeteo vigoroso inicialmente con agua destilada y posteriormente una vez introducido el chasis con los geles en el equipo de TGGE se lavaron los pozos con buffer de carga TAE 1x.

Preparación de equipo de electroforesis para corrida

1. Llenar la cámara de electroforesis del equipo TTGEK-2401-220 Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis System (C. B. S. Scientific Company Inc. San Diego, CA) con 24 litros de TAE1x.
2. Encender el equipo de electroforesis durante dos horas hasta alcanzar una temperatura de 60°C.
3. RETIRAR LA PARTE INFERIOR DEL SELLO DE GOMA DE LOS VIDRIOS
4. Cambiar los broches de fijación por los broches de sujeción del chasis.
5. Colocar los geles de acrilamida con gradiente desnaturizante en el recipiente de la cámara de electroforesis.
6. Calentar del gel corriendo 125 V durante 10 minutos SIN MUESTRAS CARGADAS.
7. Mezclar las muestras obtenidas de la PCR anidada con colas de GC (*ITS1-5.8s-ITS2+GCclamp*) con 4 µL el amortiguador de carga (relación 1:5). Es importante evitar emplear marcas comerciales que contengan *Ficoll*, ya que impide la adecuada migración de los productos en el gel.
8. Llenar cada uno de los carriles del gel con 20 µL de las muestras problema (*ITS1-5.8s-ITS2+GCclamp*).
9. Colocar los cables de la fuente de poder de la cámara de electroforesis e iniciar a 125 V por 5 minutos. Posteriormente bajar a 75V por 18 horas.
10. En el caso de emplear un gel con gradiente desnaturizante 40-100% con Urea-Formamida la temperatura será constante (60°C).
11. En caso de de emplear un gel desnaturizante 100% de Urea-Formamida la temperatura tendrá un gradiente de 55 a 65 °C en 18 horas.

Revelado del gel de poliacrilamida

1. Retirar los broches y los vidrios, cuidando de no dañar el gel.
2. Con la parte del gel hacia arriba colocarlo en la charola con 200 ml de destilada para quitar los restos no polimerizados de acrilamida y el exceso de urea.
3. Agitar a 26 rpm por 15 minutos.
4. Colocar el agua destilada en un vaso de precipitado.
5. Agregar 200 ml de solución de bromuro de etidio al 10 %.
6. Agitar por 15 minutos a 26 rpm.
7. Lavar el gel por 10 minutos con agua destilada y disponer de los desechos adecuadamente en un envase especial de acuerdo a normatividad.
8. Retirar el gel de la charola apoyándose con un vidrio de soporte.
9. Visualizar el gel bajo observación directa con luz ultravioleta y proceder a foto documentar.

Una vez obtenidos los productos se cargaron 20 µL mezclados con 1 µL de buffer de carga 6X en el gel de poliacrilamida al 6% previo calentamiento a 45°C del buffer de corrida. Se llevó a cabo en geles de poliacrilamida empleando un gradiente de 45 a 60°C en 18 horas. Una vez terminada la corrida, se apaga el equipo y las alarmas, se saca el chasis de la inmersión en TAE 1x y se procede a quitar los vidrios con mucho cuidado para no rasgar el gel, marcando el extremo inferior derecho como referencia. Se lavan mediante agitación gentil en agua destilada durante 15 minutos y se dejan revelando en

una solución con Bromuro de etidio 10% durante 15 minutos, se enjuaga nuevamente con agua destilada durante 10 minutos y se procede a su observación y foto documentación bajo luz ultravioleta para ver el patrón de bandas.

Se propuso cortar del gel las bandas más características de cada uno de los patrones encontrados, tomando en cuenta intensidad de la banda, que se interpretara como reflejo de abundancia de especies y por lo tanto dominantes en cada una de las muestras procesadas. Las bandas cortadas del gel de poliacrilamida serían purificadas y secuenciadas para comparar con las bases de datos disponibles para identificar por taxón, y construir una estructura de la comunidad en cada una de las muestras, analizando la asociación entre especies y la similitud entre comunidades de acuerdo a los criterios comentados más adelante.

Análisis de la comunidad fúngica

La comunidad es un nivel de organización natural que incluye todas las poblaciones de un área dada y en un tiempo dado, la comunidad y el medio ambiente no viviente funcionan juntos como un sistema ecológico o ecosistema. A nivel microbiológico, una comunidad es una unidad relativamente independiente compuesta por microorganismos que viven interactuando de una u otra manera de manera intra e interespecifica. Como en otras comunidades bióticas, los miembros están especializados en tareas particulares como productores, consumidores y descomponedores, organizados en una compleja red trófica. Una manera de analizar la estructura de la comunidad es el empleo de índices que nos arrojan información valiosa sobre su estructura, diversidad, riqueza y similitud entre diferentes comunidades que puede ser interpretada en el contexto de nuestro análisis.

Curvas de acumulación de filotipos

Para los fines de este trabajo, debemos entender como **filotipo** a la secuencia distinta obtenida de la amplificación de la región ITS1-5.8s-ITS2 del genoma fúngico de ascomicetos y basidiomicetos a partir de ácidos nucleicos obtenidos de muestras ambientales de suelo. Cada filotipo diferente potencialmente nos representa un individuo distinto a nivel taxonómico. La relación entre el número de filotipos observados y el esfuerzo del muestreo nos da información sobre la estructura de la comunidad fúngica que desea estudiarse (Escalante 2007). Esto puede graficarse mediante el método de acumulación que consta en representar en el eje de las X el esfuerzo de trabajo mediante el número de muestreos en el campo y en el eje de las Y el número acumulativo de filotipos observados. Este método representa la calidad del muestreo, ya que cualquier ecosistema contienen un número finito de individuos, los cuales pueden ser representados mediante muestreos continuos que eventualmente alcanzarán el número de filotipos de la población, representado en la grafica como una asíntota paralela al eje de la x mientras se desplaza hacia la derecha. En la mayoría de los estudios publicados sobre análisis de comunidades microbianas en la literatura disponible no se alcanza la asíntota de las curvas debido a la enorme diversidad que existe (Escalante 2007).

Curvas de Rarefacción

Este método ha sido adoptado recientemente por varios microbiólogos en el estudio de comunidades fúngicas (Schloss y cols. 2005, Unterseher, Porras-Alfaro y cols. 2011). Las curvas de rarefacción estiman la diversidad documentada entre los lugares que no han sido explorados equitativamente. Para poder comparar de manera mas uniforme dos lugares de muestreo con diferentes tamaños de muestras obtenidos durante el trabajo de campo, este método consiste esencialmente en obtener subpoblaciones de la población mayor y estimando la diversidad en estos conjuntos mas pequeños. La curva de rarefacción representa la variación en el valor esperado de diversidad de individuos, o filotipos en nuestro caso de estudio, de acuerdo al tamaño de la muestra obtenida (Ricklefs y Miller 2000, Escalante 2007).

Estimación de diversidad de especies fúngicas

La diversidad de una comunidad depende de número de especies, que definimos como **riqueza**, y de la equitatividad o abundancia relativa de éstas (Escalante 2007). Los índices de diversidad son importantes pues nos permiten determinar la riqueza de una zona en relación con la ausencia o presencia de una especie de interés, que en este caso es el hongo patógeno *Coccidioides* spp y las similitudes de las poblaciones de comunidades de diferentes muestras obtenidas durante el trabajo de campo.

Métodos paramétricos

Los estimadores paramétricos analizan el número de filotipos potenciales no documentados en la población al ajustar los datos mediante métodos estadísticos. En estudios de comunidades microbianas, los algoritmos empelados con mayor frecuencia son los modelos *lognormal* y *Poisson* (Escalante 2007). Al ajustar variables de cuerdo a este metodo pueden obtenerse el polinomio que modela, con el mejor ajuste, obteniendo un coeficiente de regresión *R* cercano a 1.0 en el mejor de los casos. Sin embargo, algunos de los problemas de estos métodos es la presunción previa de la distribución potencial de abundancia. A pesar de que muchas comunidades parecen tener una abundancia con distribución **aleatoria**, persiste la controversia sobre el modelo que se ajusta mejor en comunidades fungicas (Quesada-Moraga y cols. 2007, Unterseher y cols. 2008, Vacher y cols. 2008, Unterseher y cols. 2010). El problema es la ausencia de bases de datos sobre diversidad y abundancia, por lo que no está claro si estos modelos se ajustan a la distribución real en el estudio de hongos ambientales. Otra limitación aparente es que los estimadores paramétricos requieren grandes series de datos sobre abundancia para evaluar los parámetros de la distribución y en el caso de microorganismos las series de datos más grandes que existen incluyen sólo algunos cientos de individuos (Unterseher y cols. 2008, Unterseher y cols. 2010).

Estimadores no paramétricos

Los métodos no paramétricos estiman mediante métodos estadísticos diferentes a las filotipos abundantes en relación con las especies infrecuentes. La medida que se emplea con mayor frecuencia a través de esta metodología es el **índice de diversidad de Simpson (*D*)**, el cual calcula a partir de la proporción de filotipos diferentes *i* que contribuyen al total de la muestra, donde el límite superior *S* se refiere al número total de filotipos en la población estudiada (Escalante 2007), donde:

$$D = 1 - \sum (p_i)^2$$

El resultado varía entre 0 y 1, donde valores cercanos a 1 indican que sólo unas pocas especies predominan en la muestra, mientras que los valores cercanos a 0 nos indican mayor riqueza de especies en una muestra.

El **índice de Shannon** o **índice de Shannon-Weaver** (H') calcula la probabilidad de predecir la especie de un individuo tomado al azar de la comunidad, donde:

$$H' = - \sum p_i \cdot \ln p_i$$

Donde p_i = proporción de individuos de la especie i respecto al total de individuos (es decir la abundancia relativa de la especie i). De esta forma, el índice contempla la cantidad de especies presentes en el área de estudio (riqueza de especies), y la cantidad relativa de individuos de cada una de esas especies (abundancia).

El resultado se expresa con un número positivo, que en la mayoría de los ecosistemas naturales varía entre 1 y 5, donde el índice va de 0 para comunidades con una sola especie hasta valores altos para comunidades con muchas especies, cada una con pocos individuos (Escalante 2007). Excepcionalmente puede haber ecosistemas con valores mayores (bosques tropicales, arrecifes de coral) o menores (algunas zonas desérticas). La mayor limitante de este índice es que no tiene en cuenta la distribución de las especies en el espacio.

Diferentes métodos no paramétricos han sido adaptados a partir de estadísticos de captura-recaptura para calcular el tamaño de poblaciones. Estos algoritmos consideran la proporción de filotipos que han sido observados antes en relación a aquellas que han sido observados sólo una vez. En poblaciones diversas, la probabilidad de que filotipos diferentes sean reportados más de una vez será poco frecuente por lo que la mayor parte de los filotipos serán representados por un solo individuo. Los estimadores denominados **Chao**, **Chao2** y **ACE** están determinados por abundancia y usan esto para calcular tanto diversidad como riqueza de una población determinada al un factor de corrección definido previamente (Chao 2005, Escalante 2007). De esta manera, el estimador **Chao1 clásico** calcula la riqueza total de especies de la siguiente manera:

$$S_{Chao1} = S_{obs} + (n_1^2 / 2n_2)$$

En donde S_{Chao1} es la riqueza total de especies, S_{obs} es el número de especies observadas, n_1 es el número de especies observadas una vez y n_2 es el número de especies observadas dos veces, solo en los casos cuando $n_1 > 0$ y $n_2 > 0$.

En los casos en que $n_1 > 0$ y $n_2 = 0$

ó

$n_1 = 0$ y $n_2 > 0$ ó $n_1 = 0$ y $n_2 = 0$

Entonces se emplea la fórmula corregida:

$$S_{Chao1} = S_{obs} + n_1 (n_1 - 1) / 2n_2(n_2 + 1)$$

Ecología Molecular y Biotecnología
Universidad Autónoma de Baja California

Este índice es particularmente útil para series de datos que tengan poca abundancia en sus clases, como es el caso de los microbios (Hughes y cols. 2001).

En cambio, el estimador **ACE** incorpora datos de todas las especies con menos de 10 individuos en lugar de sólo vistas 1 o 2 veces:

$$S_{ACE} = S_{abund} + (S_{rare}/C_{ACE}) + (F_1/C_{ACE})$$

donde S_{ACE} es la riqueza total de especies, S_{abund} es el número de muestras abundantes (>10), S_{rare} es el número de muestras raras (≤ 10), C_{ACE} es la cobertura de la muestra (proporción de especies raras). Tanto *Chao1* como *ACE* subestiman la riqueza verdadera cuando los tamaños de muestra son pequeños (Colwell y Coddington 1994).

El estimador **Chao 2 clásico** calcula la de la siguiente manera:

$$S_{Chao2} = S_{obs} + Q_1^2/2Q_2$$

En donde S_{Chao2} es la riqueza total de especies, S_{obs} es el número de especies observadas, Q_1 = la frecuencia de los filotipos únicos y Q_2 = a la frecuencia de los filotipos duplicados, solo en los casos cuando $n_1 > 0$ y $n_2 > 0$.

En los casos en que $n_1 > 0$ y $n_2 = 0$

ó

$n_1 = 0$ y $n_2 > 0$ ó $n_1 = 0$ y $n_2 = 0$

Entonces se emplea la formula corregida:

$$S_{Chao2} = S_{obs} + [(m-1/m)] [Q_1 (Q_1 -1)/ 2Q_2 (Q_2 +1)]$$

Chao 2 es considerado más consistente y exacto para predecir la riqueza total de especies fúngicas en muestras ambientales de suelo (Unterseher y cols. 2008).

Asociación entre especies

La estimación de patrones de distribución de las especies que constituyen una comunidad es una manera directa de evaluar algunas de las características estructurales de la misma. Es indudable que la distribución de las especies es el resultado de las características eco fisiológicas de la especie y la interacción con las características fisicoquímicas del ambiente (nicho ecológico fundamental), y con las otras especies presentes (nicho ecológico realizado); por ello, se observa con frecuencia que la presencia de una especie se puede determinar por la ausencia o presencia de alguna(s) otra(s) que constituyen la comunidad.

En una comunidad se presentan asociaciones significativas que invalidan la hipótesis de una distribución independiente entre las especies, ya que esta puede estar determinada por requerimientos semejantes, o definida por un antagonismo en cuanto a la utilización de recursos (espacio o nutrientes en el sustrato) que implique que la presencia de una especie signifique la ausencia de otra. Ambos casos son ejemplo de las dos posibles alternativas que se derivan de la asociación entre especies en una comunidad microbiana, que esta sea inclusiva o excluyente.

La inferencia de esta asociación, a pesar de ser una prueba estadística, esta íntimamente relacionada con los métodos de clasificación de la estructura de la comunidad, que parten en la mayoría de los casos de la evaluación de los grados de asociación posibles entre las especies de la comunidad.

Un método comúnmente empleado para valorar la asociación entre un par de especies, A y B, consiste en tomar un numero de muestras y contar el numero donde se encuentra la especie A pero no la especie B, las unidades donde ocurre B pero no A, el numero donde aparecen ambas y el numero donde no aparece ninguna de las dos. De esta manera y empleando una tabla de contingencia podemos demostrar si la distribución es independiente.

	Espece B presente	Espece B ausente	
Espece A presente	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a+b</i>
Espece A ausente	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>c+d</i>
	<i>a+b</i>	<i>c+d</i>	<i>n</i>

A partir de los datos observados se puede calcular el número de unidades en cada clase y si las dos especies están distribuidas independientemente. Basándonos de la hipótesis de independencia de las dos especies, los valores esperados se comparan con los valores en cada clase (*a*, *b*, *c*, y *d*) mediante una prueba de χ^2 mediante la siguiente expresión algebraica:

$$\chi^2 = \frac{(a-b)^2}{a+b} + \frac{(c-d)^2}{c+d}$$

Este estadístico se compara con un valor C con 95% de confianza, y si:

- $\chi^2 < C$ se acepta la hipótesis de la distribución independiente y por lo tanto se deduce que no hay asociación.
- $\chi^2 > C$ Se rechaza la hipótesis de distribución independiente y se infiere que existe algún grado de asociación.

La prueba de χ^2 demuestra si la presencia de dos especies es independiente o no, pero no mide la magnitud de la asociación en su caso, si esta es negativa o positiva.

A partir de la tabla de contingencia se estima la magnitud de la asociación entre

dos especies mediante el coeficiente de asociación definido por

$$V = \frac{abc}{\sqrt{a^2b^2 + a^2c^2 + b^2c^2}}$$

Para una comunidad con un determinado número de especies, es necesario realizar los cálculos para todas las parejas de especies, colocando los resultados en una matriz simétrica y en forma de dendrograma, donde se expresan las asociaciones entre las especies en relación a una escala gráfica.

Similitud entre comunidades

La descripción entre una comunidad nos lleva necesariamente a la comparación con otra o con ella misma en diferentes tiempos, mediante la evaluación de semejanzas o diferencias de sus partes homólogas. Cuando se dispone de censos, la composición de una comunidad puede expresarse mediante una lista de especies. Mas aun, la muestra de una comunidad inventariada, se puede comparar con muestras adyacentes a la misma comunidad, lo que revele, con base a las especies existentes, la similitud entre las áreas muestreadas, y por lo tanto, la heterogenicidad ambiental en la cual se asienta la comunidad.

Este aspecto puede ser representado en una matriz de similitud, donde de acuerdo a todas las combinaciones posibles entre las muestras, se indica la similitud existente entre los puntos en donde se tomaron las muestras.

Los datos de un inventario para una comunidad o para distintas muestras de una comunidad suelen presentarse en una tabla, donde en cada renglón hay una especie y en las columnas una muestra, figurando una marca de ausencia presencia.

Índices de similitud

El **Coeficiente de similaridad de Jaccard (J)**:

$$J = a/(b+c+d)$$

En donde:

a = filotipos comunes

b = exclusivos de grupo 1

c = exclusivos de grupo 2

d = filotipos ausentes en común

El **índice de Sørensen**, también conocido como coeficiente de similaridad, es una herramienta estadística cualitativa empleada para comparar la similitud de dos muestras:

$$QS = 2C / A + B$$

Donde A y B son el número de filotipos en las muestras respectivas y C el número de

filotipos compartidos por las dos muestras. Esta expresión se define fácilmente con la abundancia mediante la presencia o ausencia de filotipos. Tanto el índice de Jaccard como el de Sorensen son estimadores cuantitativos que describen el grado de asociación o semejanza entre los elementos comparados, expresado en valor numérico, entre 0 y 1, o en porcentaje (0 y 100%, respectivamente).

Para el análisis estadístico y la construcción de curvas de acumulación y rarefacción se emplearon *EstimateS* Version 8.2. (Colwell 2009) y *Statistica* data analysis software system version 8.0. (StatSoft Inc. 2008) www.statsoft.com

Resultados

Obtención de muestras de suelo

Se obtuvieron 100 muestras de suelo (n=100) colectadas entre los años 2006 y 2010. Setenta muestras fueron colectadas en VDP (18 en Mayo de 2007, 10 en Junio de 2008, 23 in Enero y Mayo 2009, y 19 en Junio de 2010); 20 muestras para SJZ (10 en Mayo de 2006, y 10 en Junio de 2010); y finalmente 10 muestras en Ensenada obtenida en Junio de 2010 como control. Se tienen registros bien documentados de casos de la enfermedad en VDP, así como aislamientos de *Coccidioides* spp. en el suelo con técnicas microbiológicas (Cairns y cols. 2000), y un caso reciente de enfermedad diseminada grave en un inmigrante menor de 3 años de edad, residente a menos de 600 metros del punto (R. Baptista, comunicación personal). No se tienen reportes ni casos documentados para SJZ.

Extracción de DNA de muestras ambientales

Las mejores condiciones para obtener DNA ambiental total de muestras de suelo se obtuvieron con *UltraClean soil DNA isolation kit (MoBio Laboratories Inc.)*. No fue necesario realizar pasos adicionales para purificación previa a la PCR.

Cantidades de DNA genómico total fueron obtenidas en tres diferentes locaciones del estudio: 6 ng/μL para VDP, 2 ng/μL para SJZ and 4 ng/μL en Ensenada en promedio las concentraciones de DNA genómico variaron con respecto a la temporada de muestreo siendo mayor la concentración en promedio durante la época de secas (Figura 8).

En algunas muestras ambientales, no fue posible obtener suficiente DNA genómico, por lo que no fueron procesadas posteriormente para la identificación molecular de la presencia de *Coccidioides* (Figura 8).

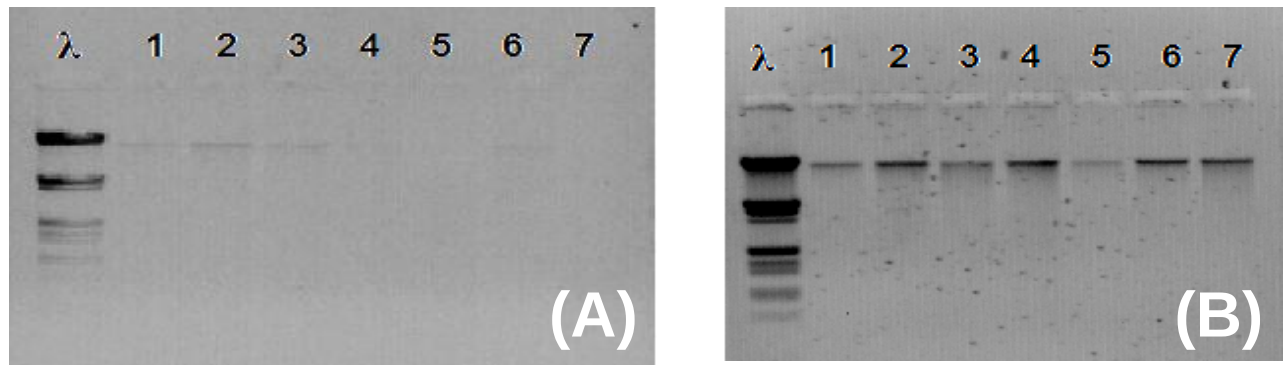


Figura 8. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa (0.8%) de extracción obtenida de muestras ambientales de suelo. (A) Valle de las Palmas (B) San José de la Zorra. (λ) Referencia con escalera *Lambda HindIII/EcoRI*.

Diagnóstico molecular de *Coccidioides* spp. en muestras ambientales

Después de la primera ronda de PCR en la mayor parte de los casos no se aprecia producto visible en electroforesis en gel de agarosa control (no se muestran datos). Sin embargo, 1 µL fue empleado directamente como templado para la segunda ronda de PCR anidada. Después de este paso, amplicones de 900-1000 pb fueron obtenidos en 71 de las 100 muestras de suelo colectadas: 53 procedentes de VDP (colectadas los días 15 de Mayo 2007, 9 de Junio de 2008, 8 de Enero del 2009, 8 de Mayo 2009 y 14 de Junio de 2010), 12 procedentes de SJZ (colectadas los días 10 de Mayo del 2006 y el 2 de Junio de 2010), y finalmente 5 obtenidas en Ensenada.

A pesar de este resultado, todas las muestras, tanto positivas como negativas fueron sometidas al tercer paso de PCR para identificación molecular para *Coccidioides* (Figuras 9-11). Amplicones esperados de 170 pb fueron obtenidos en 43 muestras procesadas procedentes de VDP, en 5 muestras de SJZ y solo en 2 muestras obtenidas en Ensenada (Tabla A; Figura 12).

Todos los amplicones obtenidos en la PCR diagnóstica (n=50) fueron purificados a partir del gel y secuenciados. Sólo seis reacciones de secuenciación no arrojaron resultados evaluables (datos no mostrados). Doce secuencias fueron identificadas por BLAST como *Aphanoascus* spp (Figura 13). de las cuales, 7 correspondieron a *A. canadensis*, todas procedentes de VDP (4 madrigueras, 1 de suelo, 1 de un lecho de mamífero mayor y 1 de letrina de heterómido), 3 de *A. keratinophilus* (obtenida a partir de madrigueras en VDP) y 2 de *A. verrucosus* (en suelos de Ensenada). Las restantes 32 secuencias fueron identificadas como *Coccidioides* spp. (5 procedentes de SJZ y 27 de VDP). Todas las muestras procedentes de SJZ se obtuvieron de madrigueras mientras que en VDP de las 27 muestras identificadas como positivas para *Coccidioides* spp, 3 prevenían de suelos, 17 de madrigueras, 5 lechos y 2 de letrinas de heterómidos (A1).

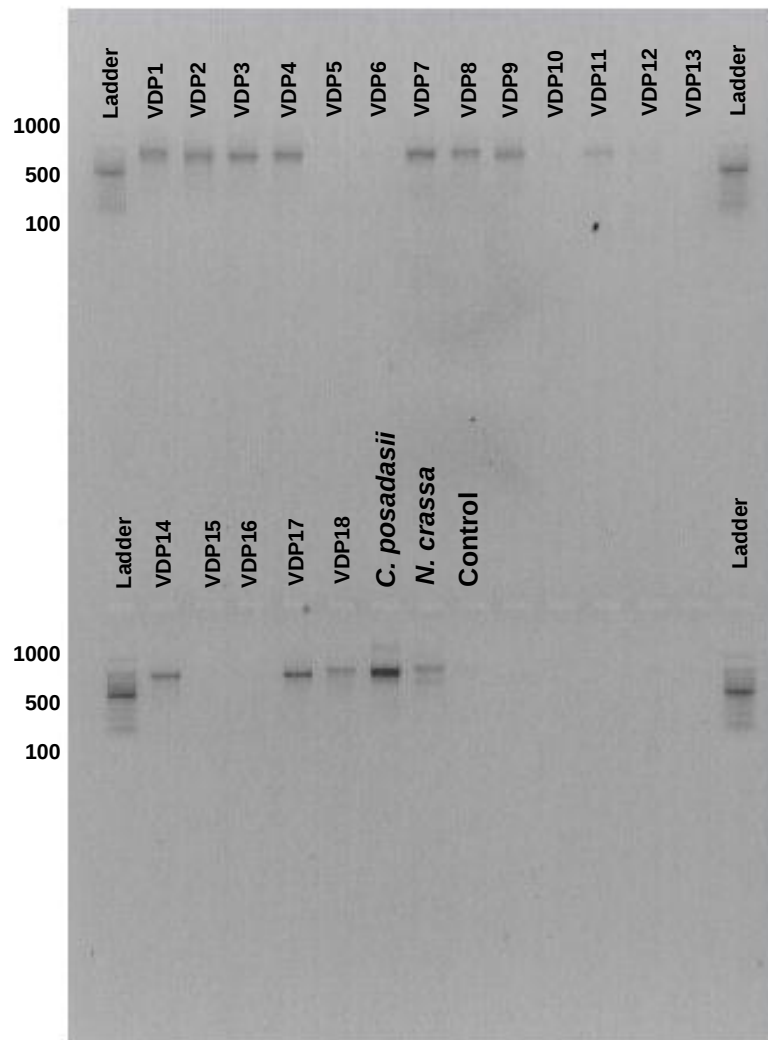


Figura 9. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR anidada. Línea 1 a 10 se empleo como templado DNA genómico obtenidos de la extracción de muestras ambientales de suelos de Valle de las Palmas, Baja California (VDP), área endémica conocida para *Coccidioides*. DNA genómico de *C. immitis* y *N. crassa* fueron empleados como controles positivo y negativo respectivamente. Referencia con escalera 100 bp Promega (Ladder).

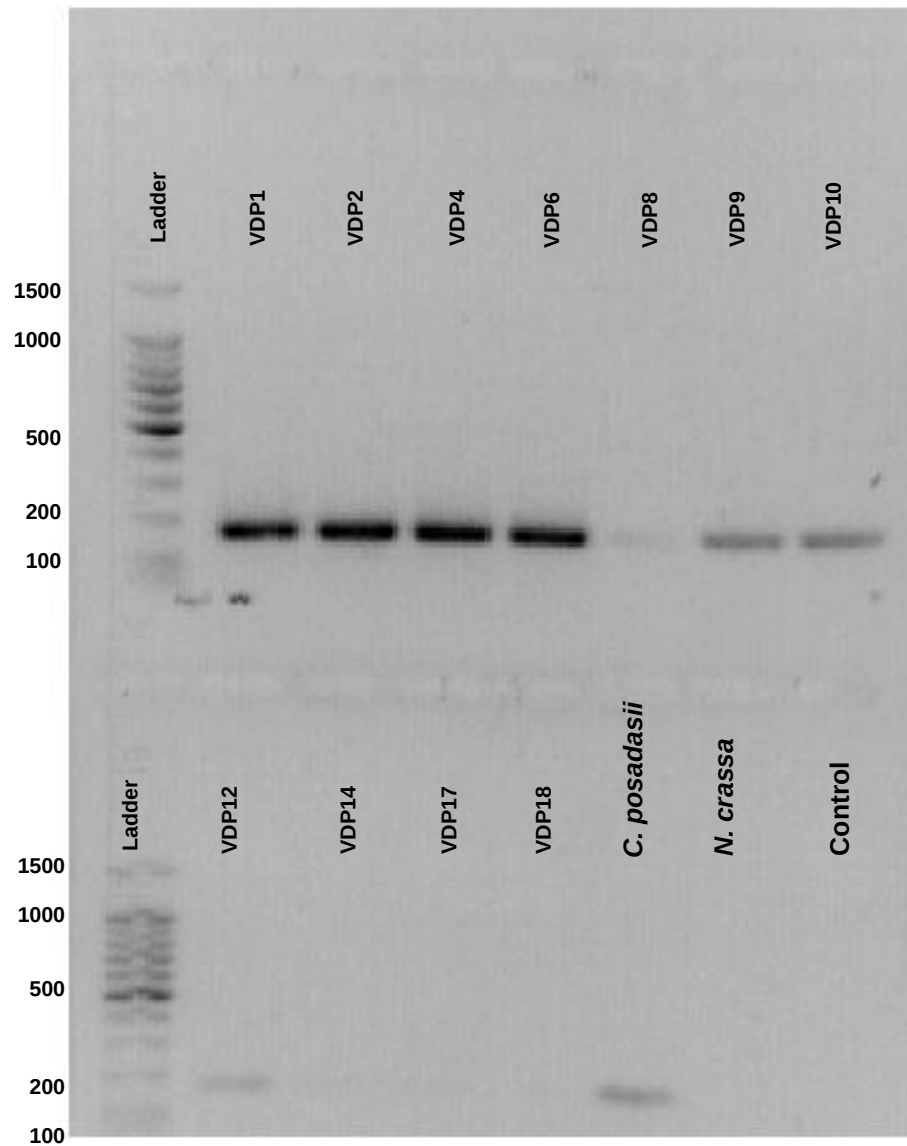


Figura 10. Procedimiento diagnóstico para identificación de *Coccidioides* en muestras de suelos de Valle de las Palmas (VDP), Baja California. Se llevó a cabo electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa (1.2%) de los productos obtenidos de PCR con cebadores ITS2 y empleando como templando los productos de PCR anidada. Así mismo, se emplearon como controles positivo y negativo amplicones con el mismo procedimiento a partir de DNA genc162mico de *C. immitis* y *N. crassa*. Referencia con escalera 100 bp Promega (Ladder).

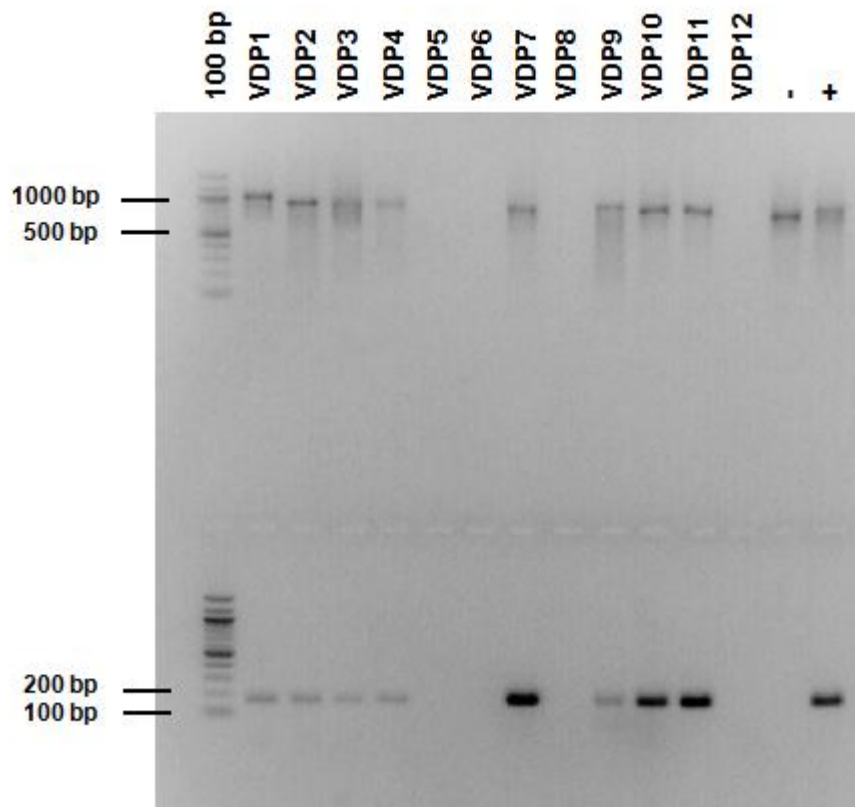


Figura 11. Identificación de *Coccidioides* en muestras de suelos de Valle de las Palmas, Baja California (VDP). Se llevó a cabo electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa (2.0%) de los productos obtenidos de PCR. En la línea superior se muestran los productos de la PCR anidada para amplificar la región ITS1-5.8s-ITS2 de organismos del subreino *Dykaria* con productos esperados de 900-1000 pb. En la línea inferior se muestran los productos obtenidos empleando cebadores ITS2 empleando como templando los productos de PCR anidada con un tamaño esperado de 170 pb y. Se emplearon como controles positivo y negativo *C. immitis* y *N. crassa* respectivamente. Referencia con escalera 100 bp Promega (Ladder).

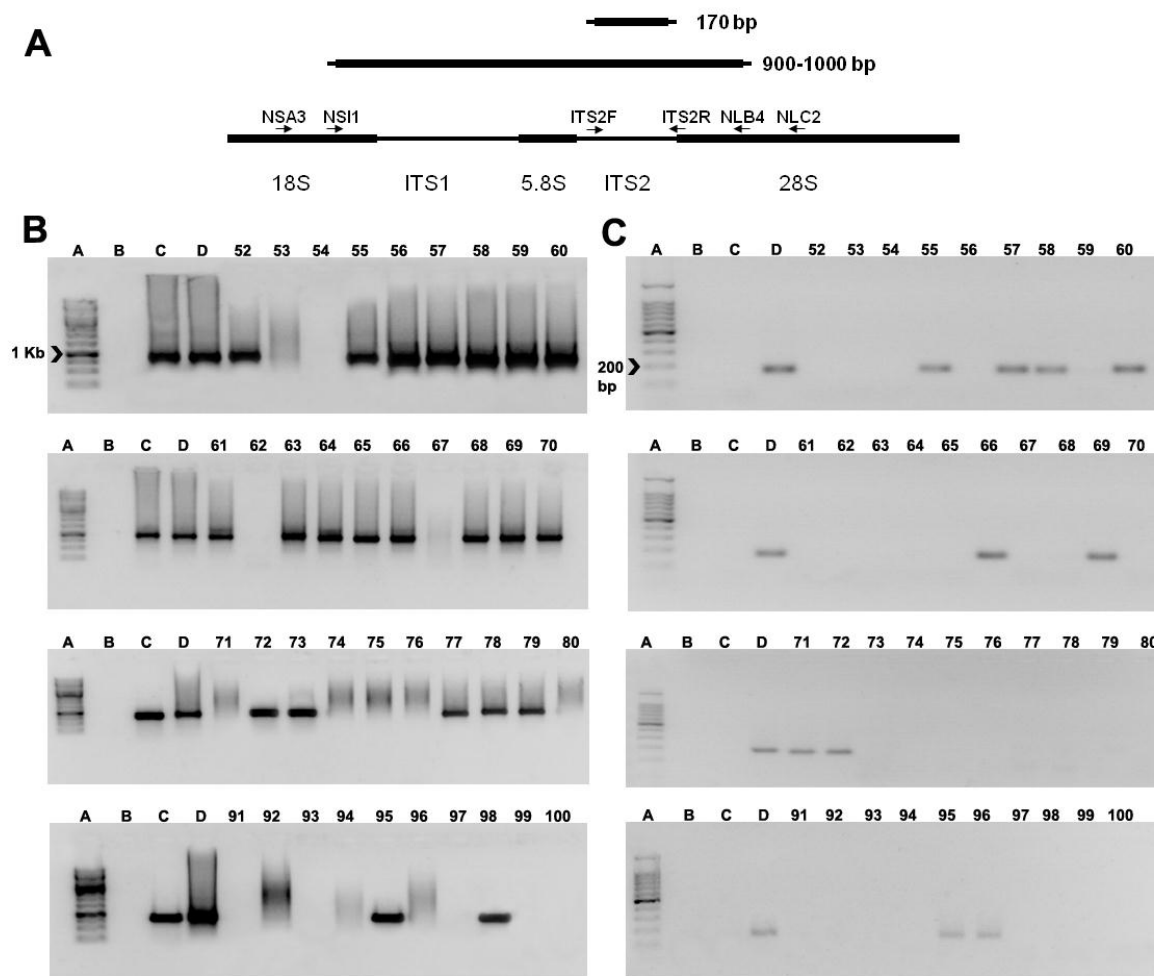


Figura 12. Detección molecular of *Coccidioides* spp. en muestras ambientales de suelos de Baja California (A) se muestra la región del genoma Coccidioidal que contiene la región espaciadora de transcripción 1 (ITS1), la región exónica 5.8S que transcribe para uno de los componentes de la subunidad pequeña ribosomal y la región espaciadora de transcripción 2 (ITS2). Cebadores NSA3-NLC2 y NSI1-NLB4 para la PCR anidada permiten la amplificación de productos entre 900-1000 bp de la región ITS1-5.8s-ITS2 específicamente para Ascomycetos and Basidiomycetos. Cebadores ITS2F y ITS2R diseñados para amplificar una amplicon de 170bp en la región intrónica ITS2. 18s (DNA subunidad ribosomal pequeña), 28s (DNA subunidad ribosomal grande). La imagen no esta a escala. (B) Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones ITS1-5.8s-ITS2 obtenidos de la segunda ronda de la PCR anidada de muestras colectadas en Junio 2010. (C) Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones ITS2 obtenidos de PCR diagnóstica de muestras colectadas en Junio 2010. Para líneas B y C, carril 52 a 70 corresponde a muestras obtenidas en Valle de las Palmas (VDP), carriles 71 a 80 a muestras controles obtenidas de suelos de Ensenada (E) y carriles 91 a 100 a muestras obtenidas en San José de la Zorra (SJZ). El carril A contiene el marcador de referencia (GeneRuler 1 kb DNA Ladder). Tomado de Baptista-Rosas et al., 2011. En los carriles para controles tanto negativos como positivo se emplearon dH₂O (B), DNA genómico de *Neurospora crassa* (C) y *C. immitis* (D) respectivamente.

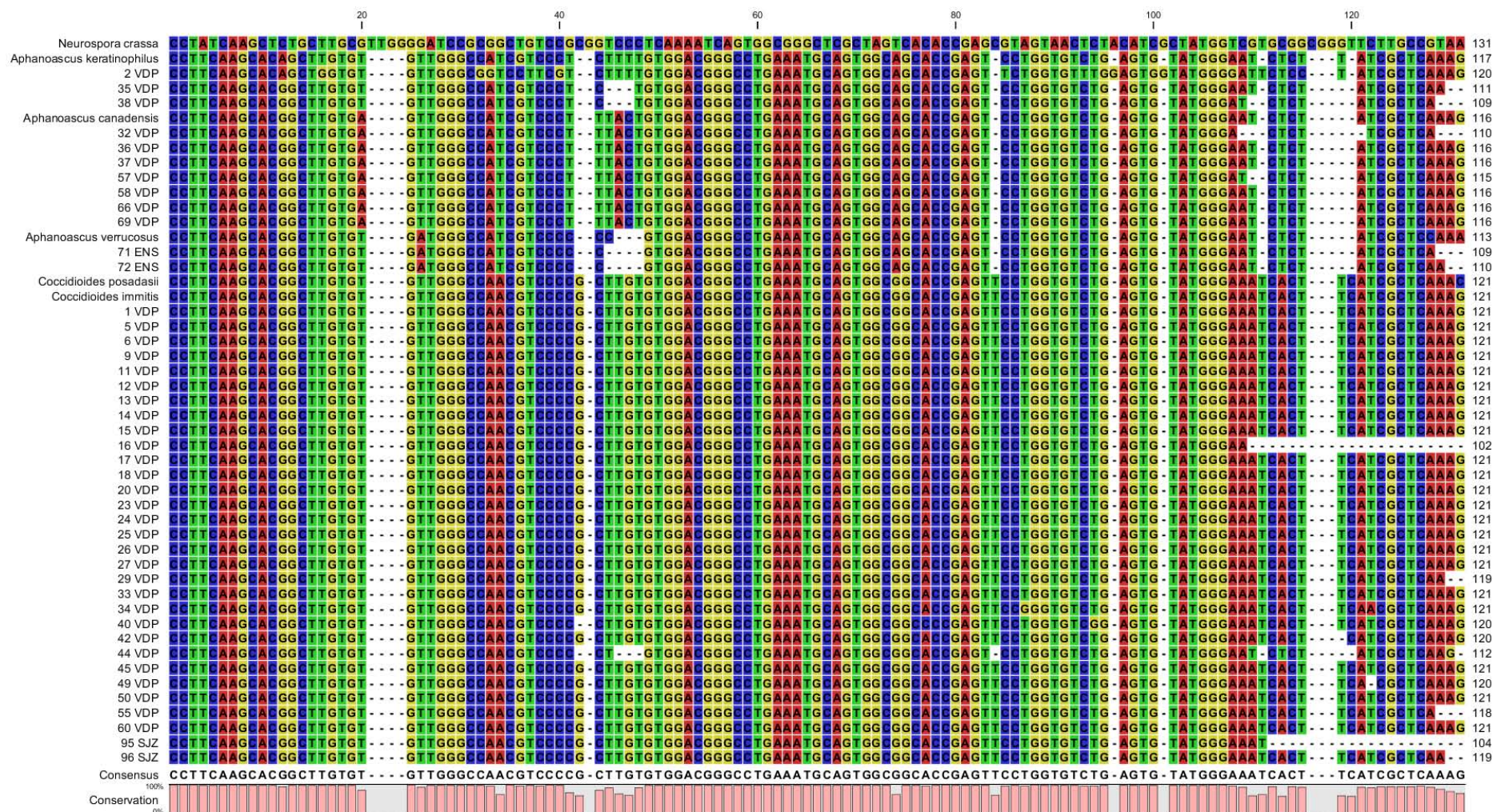


Figura 13. Alineamiento múltiple de las secuencias editadas correspondientes a los amplicones obtenidos de la PCR diagnóstica en cada locación de muestreo. Los nombres de las secuencias corresponden a los amplicones identificados en la Tabla 1. Secuencias ITS2 previamente reportadas para *Coccidioides immitis* (EF186783), *C. posadasii* (U18360), *Aphanoascus keratinophilous* (AJ390380.1), *A. canadensis* (AJ439435.1), *A. verrucosus* (AJ439444.1) y *Neurospora crassa* (AY681193) se emplearon como controles en el alineamiento. Las secuencias fueron editadas manualmente y alineadas empleando CLUSTAL W mediante paquetería MEGA 5. Tomado de Baptista-Rosas et al., 2011.

Tabla A. Identificación Molecular de *Coccidioides* spp. por PCR anidada a partir de muestras ambientales de Baja California, México.

Fecha de recolección	Muestra	Características	Amplicones por PCR		Resultados de secuenciación
			900 pb	170 pb	
Mayo 2007	1 VDP	Madriguera	+	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	2 VDP	Madriguera	+	++	<i>Aphanoascus keratinophilus</i>
	3 VDP	Madriguera	+	-	
	4 VDP	Lecho	-	-	
	5 VDP	Lecho	+	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	6 VDP	Lecho	+	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	7 VDP	Madriguera	++	-	
	8 VDP	Madriguera	+	-	
	9 VDP	Madriguera	++	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	10 VDP	Lecho	+	-	
	11 VDP	Lecho	++	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	12 VDP	Letrina	++	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	13 VDP	Lecho	+	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	14 VDP	Lecho	++	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	15 VDP	Madriguera	+/-	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	16 VDP	Letrina	+/-	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	17 VDP	Madriguera	++	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	18 VDP	Pasto seco	++	++	<i>Coccidioides</i> spp.
Junio 2008	19 VDP	Madriguera	+	-	
	20 VDP	Madriguera	++	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	21 VDP	Madriguera	++	-	
	22 VDP	Madriguera	+	-	
	23 VDP	Madriguera	+/-	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	24 VDP	Madriguera	+	++	Falló
	25 VDP	Madriguera	+	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	26 VDP	Madriguera	++	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	27 VDP	Madriguera	++	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	28 VDP	Madriguera	++	-	
Enero 2009	29 VDP	Madriguera	+	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	30 VDP	Madriguera	++	-	
	31 VDP	Madriguera	+	++	Falló
	32 VDP	Madriguera	++	++	<i>Aphanoascus canadensis</i>
	33 VDP	Madriguera	+/-	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	34 VDP	Madriguera	-	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	35 VDP	Madriguera	++	++	<i>Aphanoascus keratinophilus</i>
	36 VDP	Madriguera	++	++	<i>Aphanoascus canadensis</i>
	37 VDP	Madriguera	++	++	<i>Aphanoascus canadensis</i>
	38 VDP	Madriguera	++	++	<i>Aphanoascus keratinophilus</i>

Mayo 2009	39 VDP	Madriguera	++	-	
	40 VDP	Madriguera	-	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	41 VDP	Madriguera	+	++	Falló
	42 VDP	Madriguera	+/-	++	Falló
	43 VDP	Madriguera	++	++	Falló
	44 VDP	Madriguera	++	++	Falló
	45 VDP	Madriguera	+/-	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	46 VDP	Madriguera	++	-	
	47 VDP	Madriguera	+/-	-	
	48 VDP	Madriguera	++	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	49 VDP	Madriguera	++	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	50 VDP	Madriguera	+/-	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	51 VDP	Madriguera	+	-	
Junio 2010	52 VDP	Madriguera	++	-	
	53 VDP	Suelo	+/-	-	
	54 VDP	Madriguera	-	-	
	55 VDP	Suelo	++	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	56 VDP	Suelo	++	-	
	57 VDP	Madriguera	++	++	<i>Aphanoascus canadensis</i>
	58 VDP	Letrina	++	++	<i>Aphanoascus canadensis</i>
	59 VDP	Madriguera	++	-	
	60 VDP	Suelo	++	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	61 VDP	Madriguera	+/-	-	
	62 VDP	Madriguera	-	-	
	63 VDP	Suelo	++	-	
	64 VDP	Madriguera	++	-	
	65 VDP	Suelo	++	-	
	66 VDP	Suelo	++	++	<i>Aphanoascus canadensis</i>
	67 VDP	Madriguera	-	-	
	68 VDP	Madriguera	++	-	
	69 VDP	Lecho	++	++	<i>Aphanoascus canadensis</i>
	70 VDP	Suelo	++	-	
Junio 2010	71 E	Suelo	+/-	++	<i>Aphanoascus verrucosus</i>
	72 E	Suelo	++	++	<i>Aphanoascus verrucosus</i>
	73 E	Suelo	++	-	
	74 E	Suelo	+/-	-	
	75 E	Suelo	+/-	-	
	76 E	Suelo	+/-	-	
	77 E	Suelo	++	-	
	78 E	Suelo	++	-	
	79 E	Suelo	++	-	
	80 E	Suelo	+/-	-	

Mayo 2006	81 SJZ	Madriguera	+	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	82 SJZ	Madriguera	+	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	83 SJZ	Madriguera	+	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	84 SJZ	Madriguera	+	-	
	85 SJZ	Madriguera	+	-	
	86 SJZ	Madriguera	+	-	
	87 SJZ	Madriguera	+	-	
	88 SJZ	Madriguera	+	-	
	89 SJZ	Madriguera	+	-	
	90 SJZ	Madriguera	+	-	
Junio 2010	91 SJZ	Madriguera	-	-	
	92 SJZ	Madriguera	+/-	-	
	93 SJZ	Suelo perturbado	+/-	-	
	94 SJZ	Madriguera	+/-	-	
	95 SJZ	Madriguera	++	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	96 SJZ	Madriguera	+/-	++	<i>Coccidioides</i> spp.
	97 SJZ	Madriguera pequeña	-	-	
	98 SJZ	Suelo	++	-	
	99 SJZ	Suelo	-	-	
	100 SJZ	Lecho	-	-	

VDP Valle de las Palmas, E Ensenada, SJZ San Jose de la Zorra.

++ Banda intensa; + banda débil; +/- barrido; - sin amplificación.

Análisis bioclimático

Datos de temperatura media, mínima y máxima así como pluviometría acumulada de Enero de 1949 a Diciembre de 2008 consultadas en la base de datos climáticos del Noroeste de México del Programa Estatal de Acción ante el Cambio Climático para Baja California (PEACC-BC) (<http://peac-bc.cicese.mx/datosclim/index.html>). Se pudo observar que en el Valle de las Palmas (VDP) se caracteriza por una temperatura mínima promedio de 8.3°C con una tendencia a disminuir 0.04°C y una temperatura media de 12.5°C con una tendencia a disminuir 0.14°C anualmente con significancia estadística (Figura 15). La temperatura máxima promedio para este periodo fue 26.0°C que se mantuvo sin variaciones durante todo el tiempo analizado.

Respecto a las temperaturas promedio mensuales se encontró un patrón estacional con temperaturas medias máximas durante los meses veraniegos de Julio y Agosto con 18.8°C y temperaturas medias mínimas invernales durante Diciembre y Enero con 8.2°C, sin llegar las temperaturas mínimas extremas menores a 4.0°C, por lo que las heladas son poco frecuentes (Figura 16).

La pluviometría documentada con precipitaciones anuales acumuladas escasas con 207 mm promedio, con una ligera tendencia a incrementar 1.1 mm/añal sin significancia estadística (Figura 17). Se registraron precipitaciones pluviales mensuales promedio escasas con la mayor cantidad de lluvia en el mes de enero con 43.9 mm.

Baja California tiene un clima muy diverso, que va desde Mediterráneo hasta árido pero generalmente caracterizado por una estación seca entre abril y Octubre con lluvias durante el invierno (Figura 18) (García 2003). De los tres sitios analizados la característica común es el clima mediterráneo. SJZ, localizado a 320 m por arriba del nivel del mar, tiene una Tm de 17.3°C (Tmax 39°C y Tmin 9 °C) y cerca de 230 mm/año de lluvia precipitada. VDP es parte del estuario del rio Tijuana compartida por México y Estados Unidos. Esta Cuenca esta localizada a 280 m sobre el nivel del mar, con una Tm de 17.5°C (Tmax 34.9°C y Tmin 4.1°C) así como 212 mm/año de lluvia acumulada, con la mayor parte de la escasas lluvias presentes en la estación invernal (Figura 19). Ensenada, localizada a nivel del mar, tiene una Tm de 18.1°C (Tmax 21°C y Tmin 12°C) así como 285 mm/año de lluvia (Reyes Coca y cols. 1990; Miranda Reyes y cols. 1991; Reyes Coca y cols. 2004).

La mayor parte de los casos de Coccidioidomicosis reportados en el estado de Baja California ocurren durante la estación seca después de las lluvias estacionales. El análisis de las condiciones climáticas en VDP y la epidemiología disponible en Baja California indican que la mayoría de los casos en las áreas endémicas ocurren 8 a 12 semanas después de las ultimas lluvias estacionales invernales, durante la estación seca entre Mayo y Julio, y un segundo pico ocurre asociado a escasas lluvias episódicas al final del verano (Figuras 18 y 19) (Baptista-Rosas y cols. 2010). Las características bioclimáticas en VDP corresponden a regiones de transición entre pisos infra termo mediterráneo con ombrotipo seco (Figura 20). Las características bioclimáticas que aparentemente favorecen la dispersión de este hongo patógeno son las escasas precipitaciones pluviales, veranos secos y alta evapotranspiración del suelo.

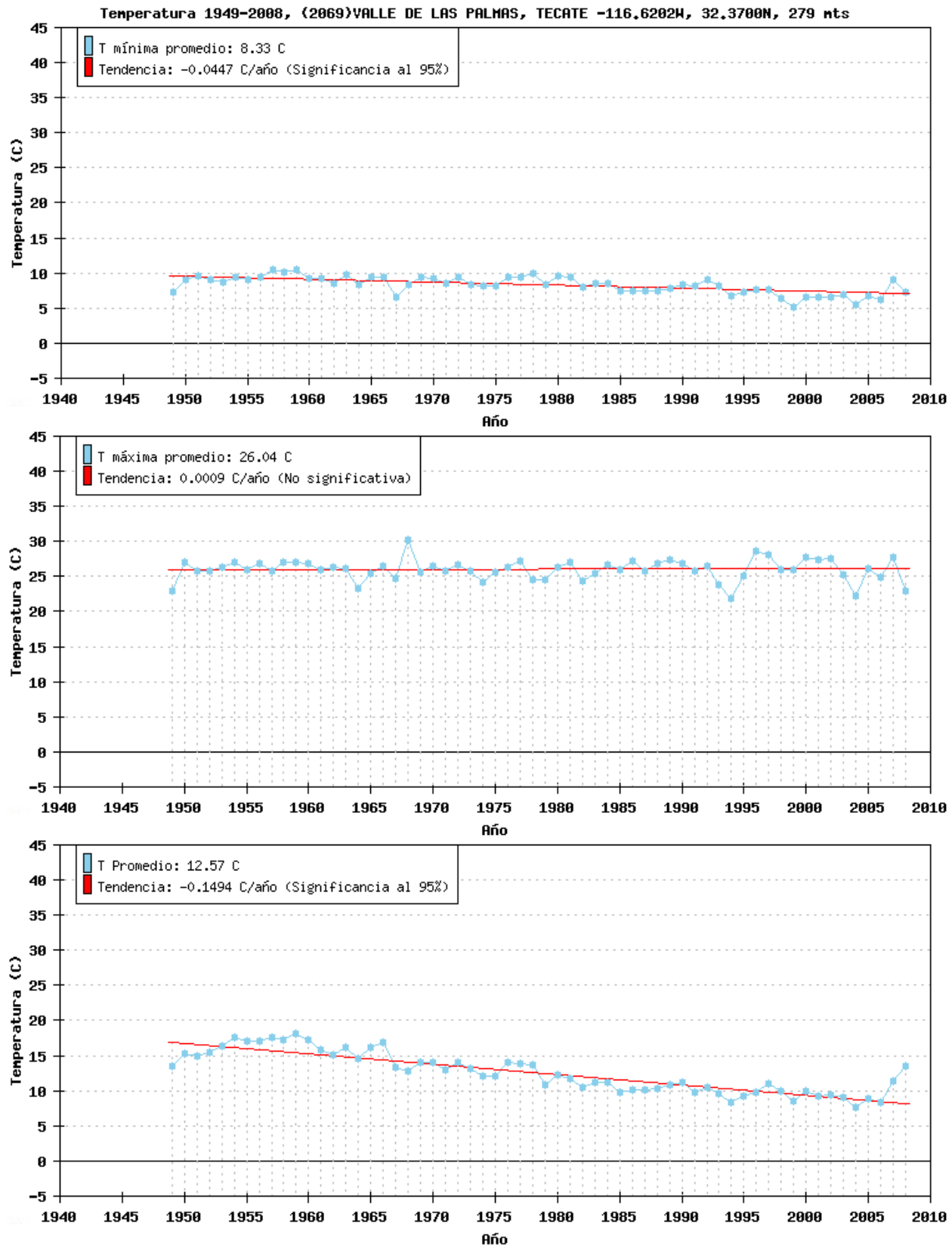


Figura 15. Climatología en Valle de las Palmas, Baja California, México durante 1949-2008. (A) Temperatura mínima promedio; (B) Temperatura máxima promedio; (C) Temperatura media (<http://peac-bc.cicese.mx/datosclim/index.html>).

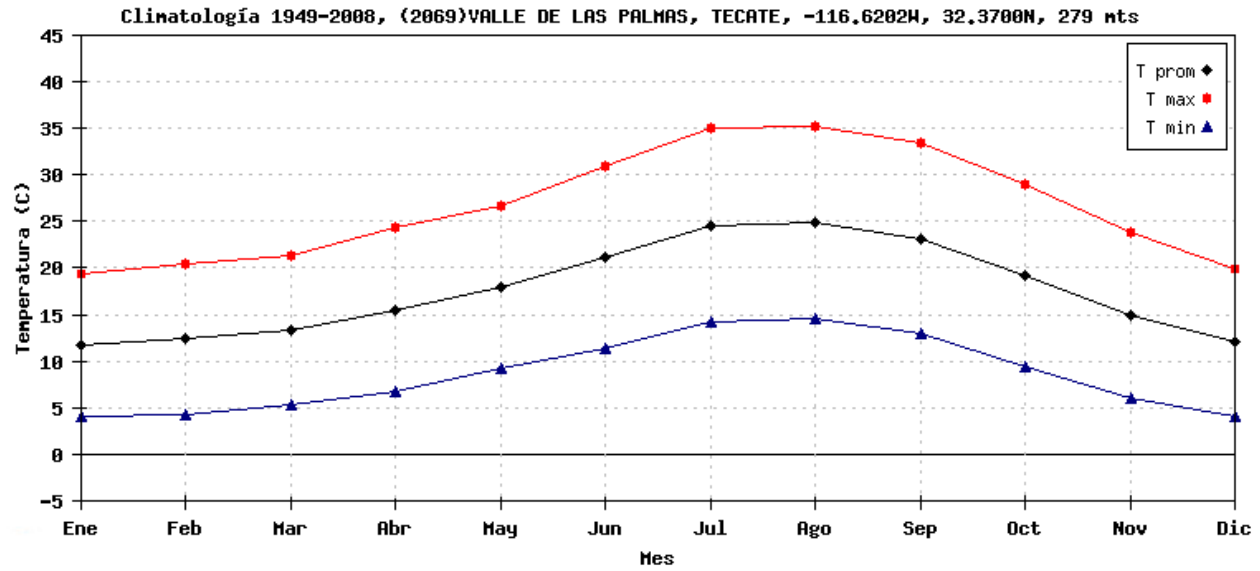


Figura 16. Temperaturas mensuales promedio en Valle de las Palmas, Baja California, México durante 1949-2008. Tprom (Temperatura promedio); Tmax (Temperatura máxima); Tmin (Temperatura mínima). Temperatura en grados Celcius. (<http://peac-bc.cicese.mx/datosclim/index.html>).

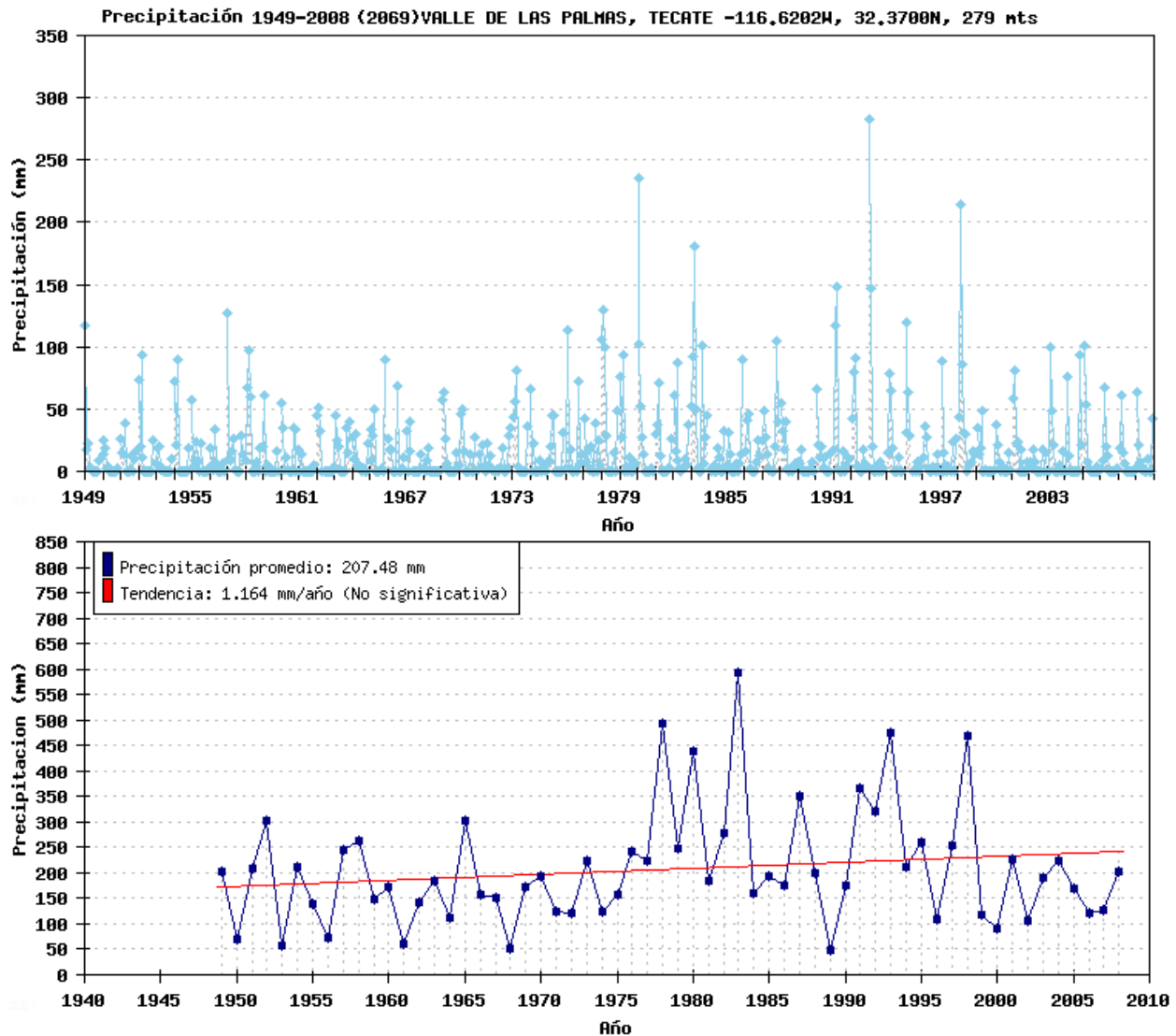


Figura 17. Pluviometría en Valle de las Palmas, Baja California, México durante 1949-2008. (A) Precipitación mensual promedio (B) Precipitación anual acumulada. Las figuras se obtuvieron de la Base de datos climáticos del Noroeste de México del Programa Estatal de Acción ante el Cambio Climático para Baja California (PEACC-BC) (<http://peacc-bc.cicese.mx/datosclim/index.html>).

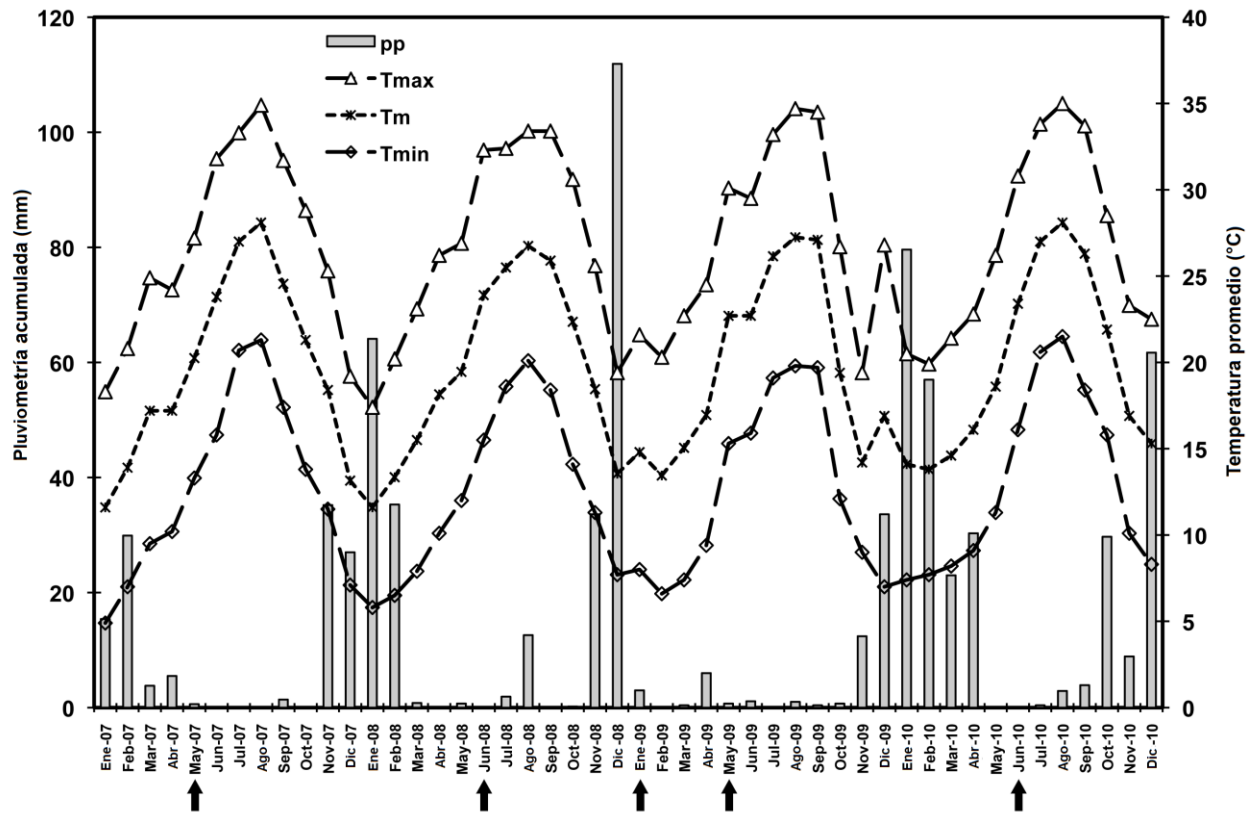


Figura 18. Climatología de Baja California durante 2007 a 2010. Precipitación mensual promedio (pp), temperatura máxima promedio mensual (Tmax) y temperatura mínima promedio mensual (Tmin) fueron graficadas. La temperatura media (Tm) fue estimada. Las flechas indican las fechas de trabajo de campo para muestreo ambiental en Valle de las Palmas.

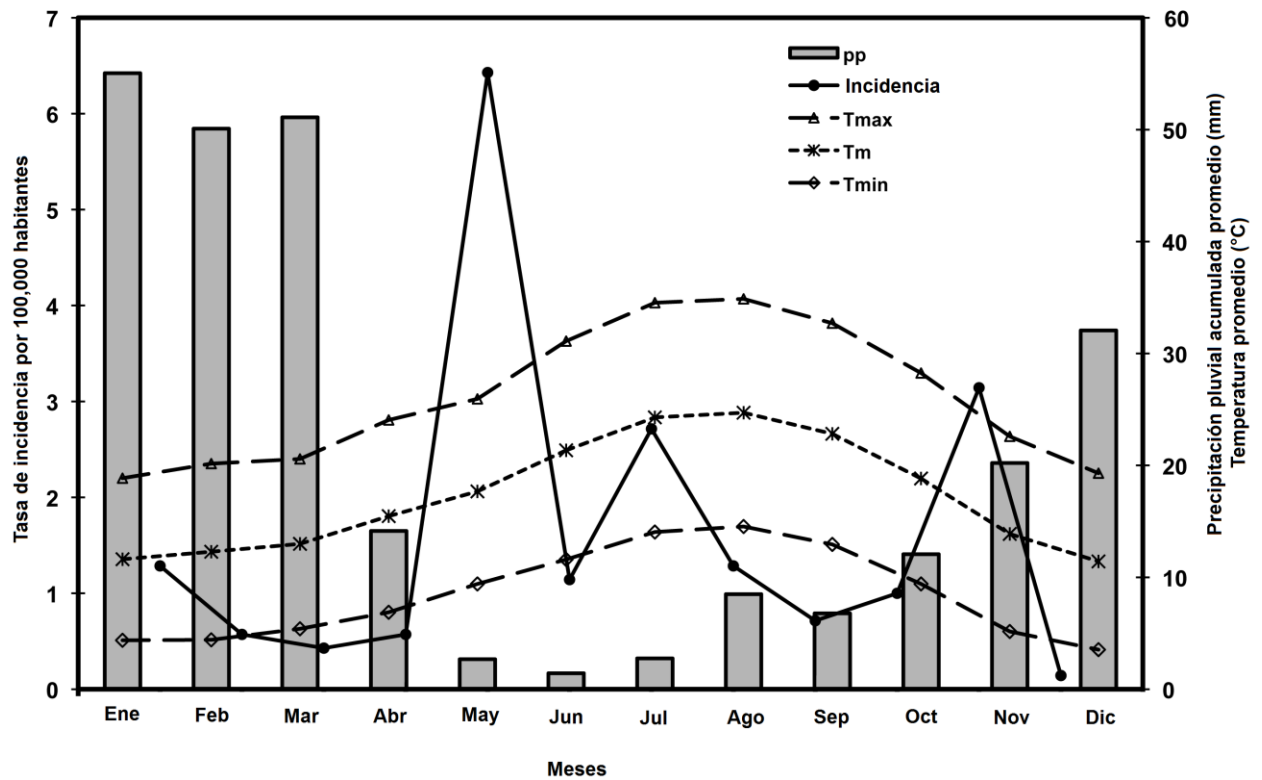


Figura 19. Incidencia de Coccidioidomicosis en Baja California y climatología de Valle de las Palmas (VDP). La incidencia media mensual de la enfermedad en Baja California para el periodo de 1988 a 1994 fueron graficados para comparar su relación con la precipitación media mensual (pp) y la temperatura, ambas promedios obtenidos en el periodo de 1971 a 1995, reportada para VDP. Las variables climáticas fueron obtenidas del Sistema Meteorológico Nacional/Comisión Nacional de Agua (<http://smn.cna.gob.mx/>) y de la Base de Datos Climáticos del Noroeste (<http://peac-bc.cicese.mx/datosclim/index.html>). Casos reportados de Coccidioidomicosis se encuentran disponibles en la base de datos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (<http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>).

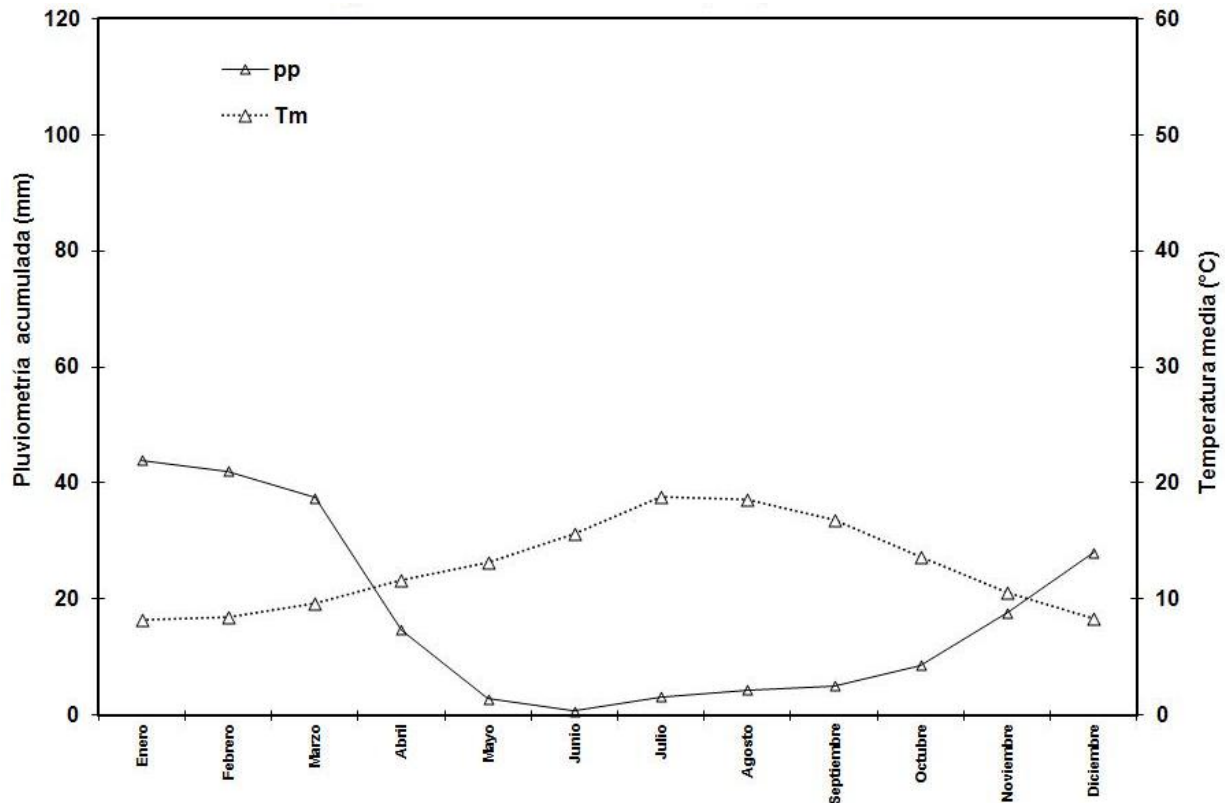


Figura 20. Bioclimatología para Valle de las Palmas (Baja California, México). Análisis Ombrotérmico de Gaussen construido mostrando la precipitación media mensual (pp) y dos veces la temperatura media (2Tm) son graficadas en el tiempo en meses. Durante el periodo seco, la línea de precipitación esta por debajo de la línea 2Tm. El área entre las dos líneas muestran la intensidad de la sequia en el lugar. Las variables climáticas fueron obtenidas de la Base de Datos Climáticos del Noroeste (<http://peac-bc.cicese.mx/datosclim/index.html>).

Proyecciones futuras de distribución potencial y tasas de incidencia de Coccidioidomicosis relacionadas al Cambio Climático Regional

De acuerdo a los escenarios de cambio climático generados por el PEACC-BC, se estima que en el noroeste de Baja California se mantendrá el patrón climático característico de climas mediterráneos con lluvias estacionales en invierno y periodo de secas durante verano y otoño. Sin embargo, los escenarios del PEACC-BC muestran evidencias de aumentos en la temperatura (Figura 21) y disminución en las lluvias en el Valle de Las Palmas (Figura 22) para el periodo 2000-2099. En general, se observa un cambio en el patrón respecto al incremento de la temperatura y disminución de la cantidad total acumulada de humedad obtenida por precipitación (Figura 22), con mayor incertidumbre derivada de oscilaciones más frecuentes de picos de lluvias intensos, alternando con periodos de sequías más prolongados e intensos. Por otro lado, se indentifican incrementos de 1 a 1.5°C y temperatura media estimada para el año 2040 de 16.5°C y para el año 2099 de 17.5°C para escenarios de baja emisión (B1) (Figura 23); mientras que en escenarios de altas emisiones (A2) se hacen evidentes incrementos de temperatura aun más intensos con incremento en las temperaturas medias mayores a 4°C con respecto a la temperatura media actual y una notable disminución en la precipitación en los próximos 100 años (Figura 24 y 25).

Las lluvias bajo escenarios de bajas emisiones (B1) de gases de efecto invernadero, tendrán oscilaciones con periodos de incremento habituales para esta región no mayores a 350 mm/anuales, alternadas con sequías más prolongadas y precipitaciones totales acumuladas entre 140 y 240 mm/anuales. Se estima un periodo prolongado de sequía entre 2060 y 2070 en esta región (Figura 22 y 23). Por otro lado, los escenarios de altas emisiones (A2) muestran mayor oscilación con una tendencia a sequías intensas a partir de 2050 con las más intensa cerca de 100 mm/anuales para 2065 (Figura 22).

Respecto a la precipitación mensual promedio, se mantendrá el patrón observado hasta el momento, con un discreto incremento de 10 mm durante los meses de Enero y Febrero tanto en escenarios de alta y baja emisión de gases de efecto invernadero (Figura 24).

Mediante el análisis Ombrotérmico de Gaussen se estimó que en esta región existe una alta evapotranspiración del suelo durante los meses de Abril a Noviembre, con un pico máximo durante el mes de Julio (Figura 25). Al compararse con los escenarios planteados es evidente que la evapotranspiración será mayor en los dos casos, tanto para A2 como para B1. Sin embargo, en escenarios de baja emisión (B1) se observa un incremento notable en la precipitación tanto en el modelo generado para 2040 como para 2099, con lluvias acumuladas promedio mayores a 100 mm en el mes de Febrero (Figura 25), lo que plantea un escenario con condiciones favorables para el desarrollo de *Coccidioides* en suelos de estas regiones altamente endémicas.

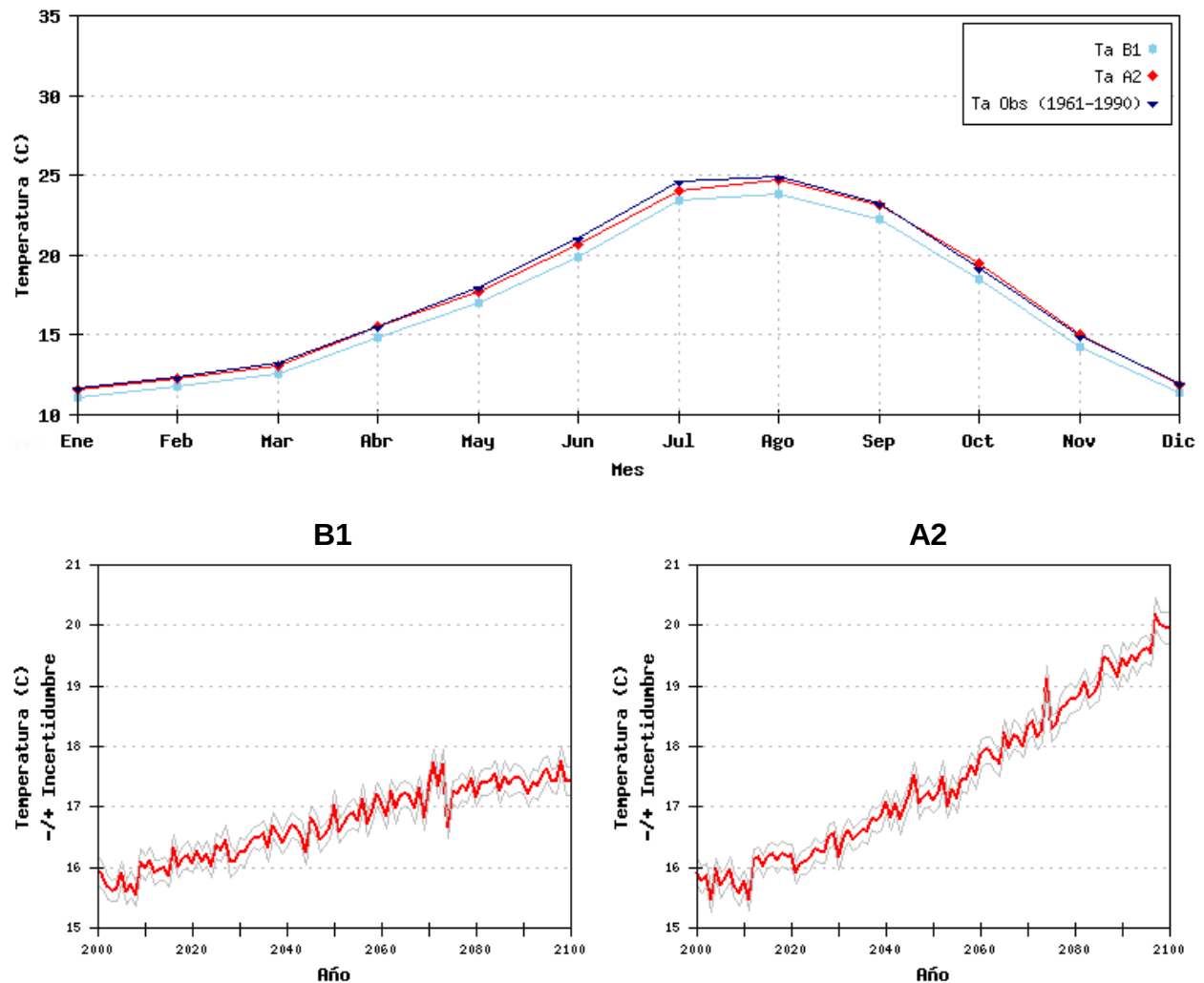


Figura 21. Proyecciones de temperatura media asociada a cambio climático regional para Valle de las Palmas, Baja California, México durante 2000-2099. Las figuras en el lado izquierdo corresponden a escenarios con bajas emisiones (B1) y a la derecha a altas emisiones (A2). Las figuras se obtuvieron de la Base de datos climáticos del Noroeste de México del Programa Estatal de Acción ante el Cambio Climático para Baja California (PEACC-BC) (<http://peac-bc.cicese.mx/datosclim/index.html>).

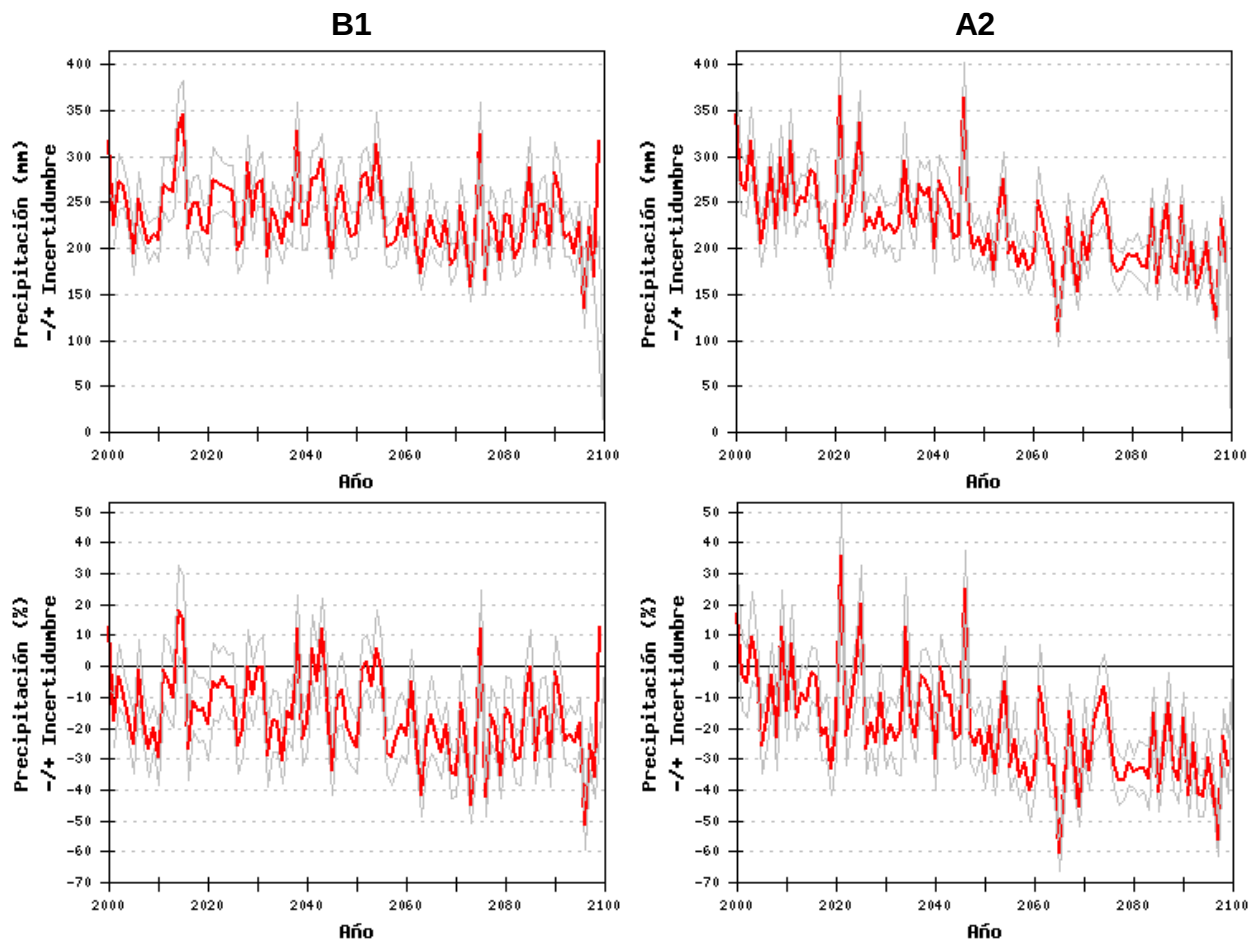


Figura 22. Proyecciones de cambio (%) de precipitación pluvial acumulada asociada a cambio climático regional para Valle de las Palmas, Baja California, México durante el periodo 2000-2099. Las figuras en el lado izquierdo corresponden a escenarios con bajas emisiones (B1) y a la derecha a altas emisiones (A2). Las figuras se obtuvieron de la Base de datos climáticos del Noroeste de México del Programa Estatal de Acción ante el Cambio Climático para Baja California (PEACC-BC) (<http://peac-bc.cicese.mx/datosclim/index.html>).

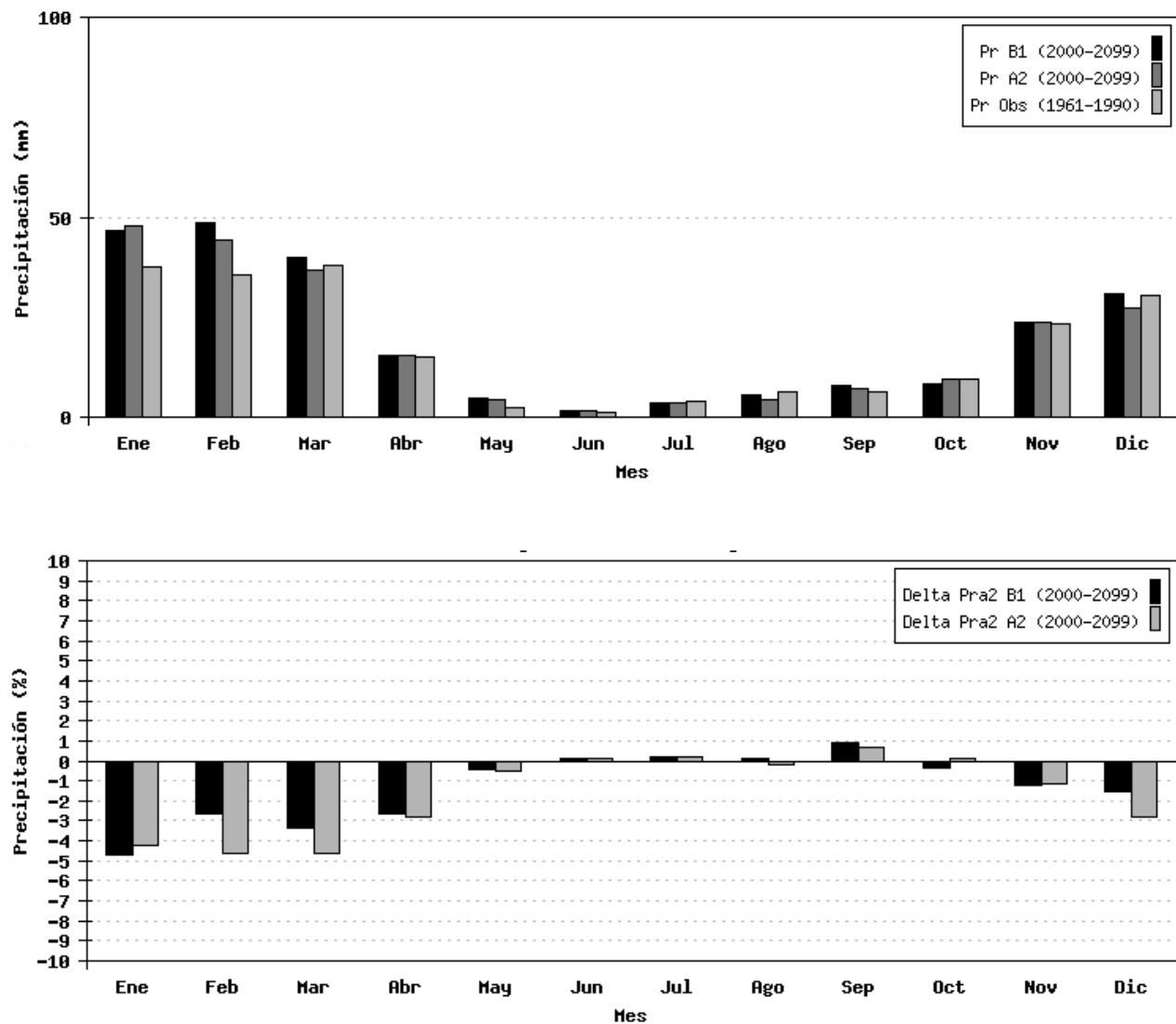


Figura 23. Proyecciones de cambio (%) de precipitación mensual promedio asociada a cambio climático regional para Valle de las Palmas, Baja California, México durante 2000-2099. Las figuras se obtuvieron de la Base de datos climáticos del Noroeste de México del Programa Estatal de Acción ante el Cambio Climático para Baja California (PEACC-BC) (<http://peac-bc.cicese.mx/datosclim/index.html>).

Flora y Fauna en VDP

La cobertura vegetal en VDP fue dominada por *Artemisia californica* (Chamizo Californiano), *Baccharis sarathroides* (Romerillo), *Haplopappus juarezensis* (*Ericameria juarezensis* Hierba del pasmo) y *Viguiera laciniata* (Girasol de San Diego). Otras especies identificadas fueron *Cylindropuntia californica* (Cholla), *Eriogonum fasciculatum* var. *fasciculatum* (Gordolobo, Figura 26G), *Ferocactus viridescens* (Biznaga costera), *Lycium californicum* (Frutilla), *Mirabilis laevis* (Hierba del empacho), *Prosopis glandulosa* var. *glandulosa* (Mesquite, Figura 26H) and *Simmondsia chinensis* (Jojoba) (Roberts 1989, Linghtner 2006). Dos especies de heterómidos fueron atrapados en VDP e identificados como *Dipodomys simulans* (Rata canguro de Dulzura, Figura 26E) y *Chaetodipus fallax* (Ratón de abazones de San Diego, Figura 26F).

Edafología de los puntos de muestreo

Las características edáficas de VDP son fluvisoles eutricos, que contienen material no consolidado con un horizonte A con escaso carbono de origen orgánico, y un estrato delgado y duro cuando se encuentra seco. El grado de saturación estimado entre 50% o más por arriba de 20-50 cm del suelo, sin carbonato de calcio significativo en los agregados del suelo. El material edáfico original es geológicamente reciente originado por depósitos pluviales. Diferentes características fueron encontradas en SJZ con regosoles eutricos de textura media.

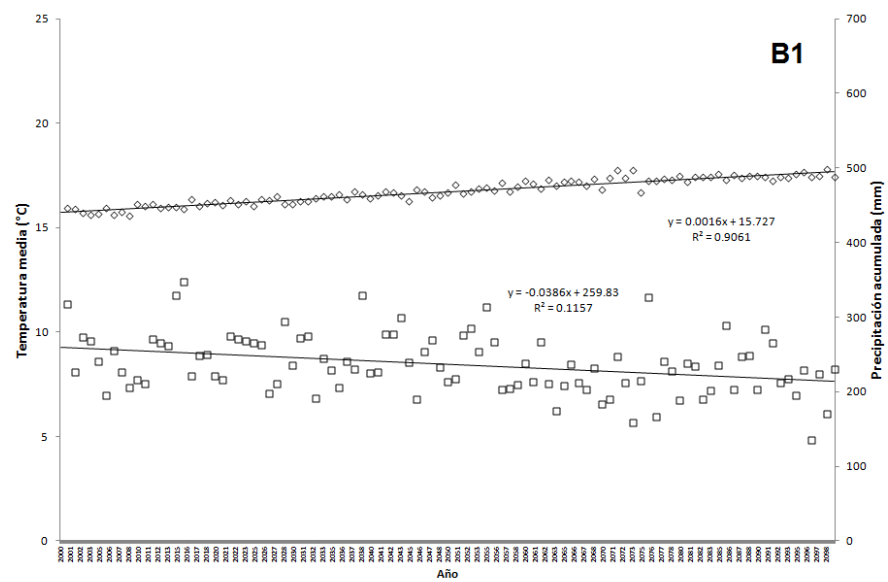
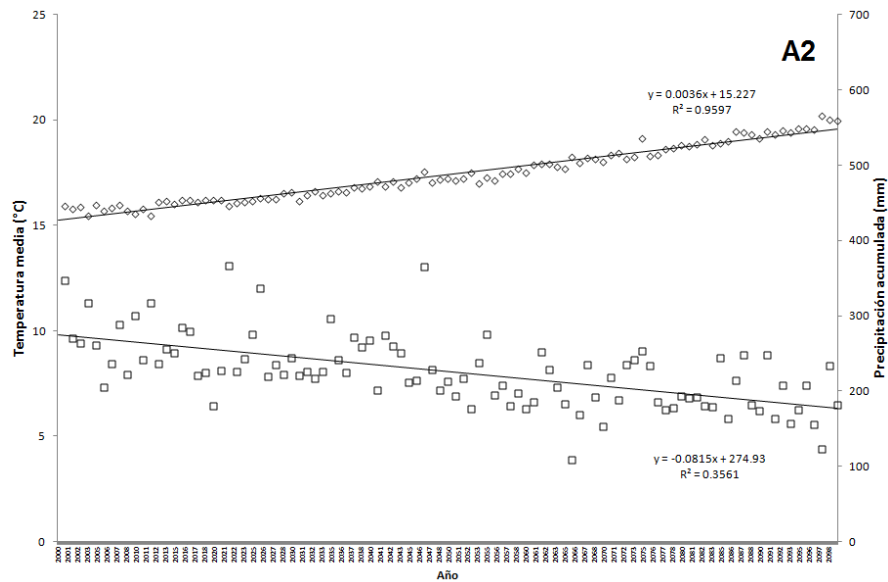
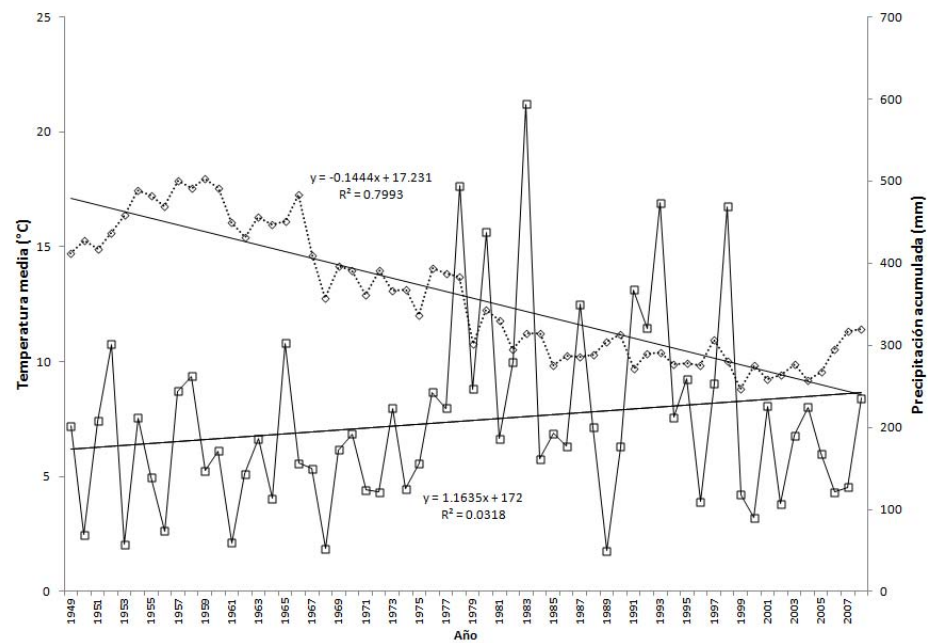


Figura 24. Climatología para Valle de las Palmas (Baja California, México). La precipitación anual y la temperatura promedio fueron graficadas. La grafica superior analiza el periodo 1949-2008; en la parte inferior se representan (A2) escenarios de alta emisión para 2000-2099 y (B1) escenarios de baja emisión para 2000-2099. Las variables climáticas fueron obtenidas de la Base de Datos Climáticos del Noroeste (<http://peac-bc.cicese.mx/datosclim/index.html>).

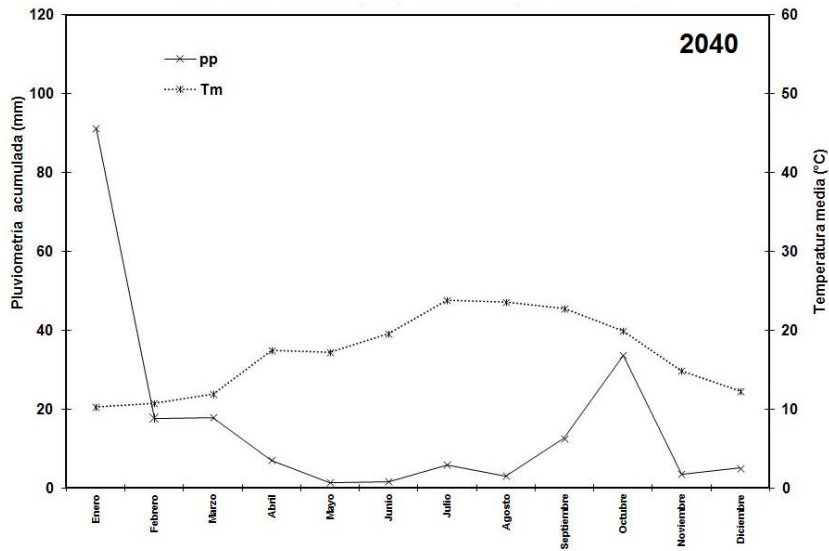
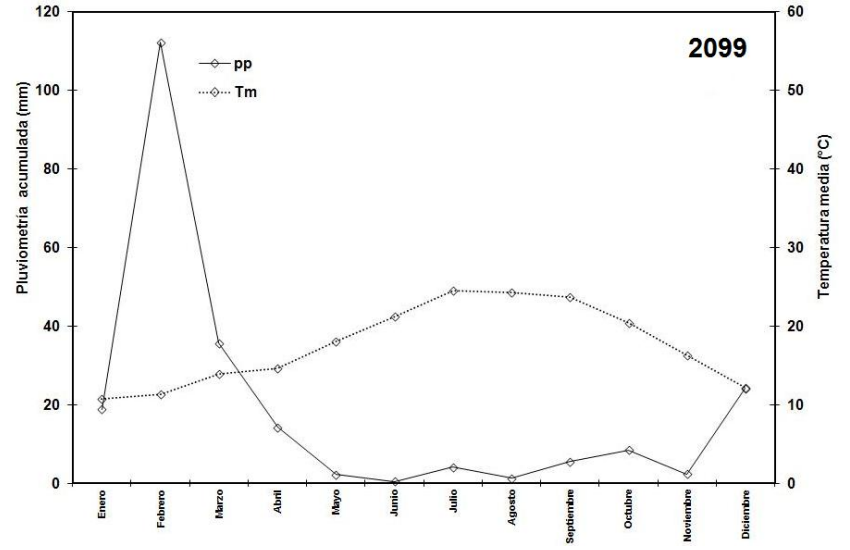
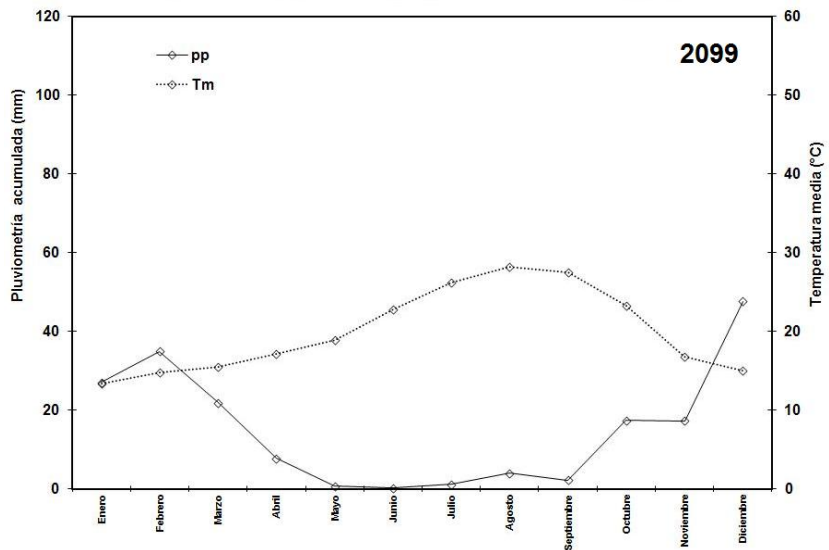
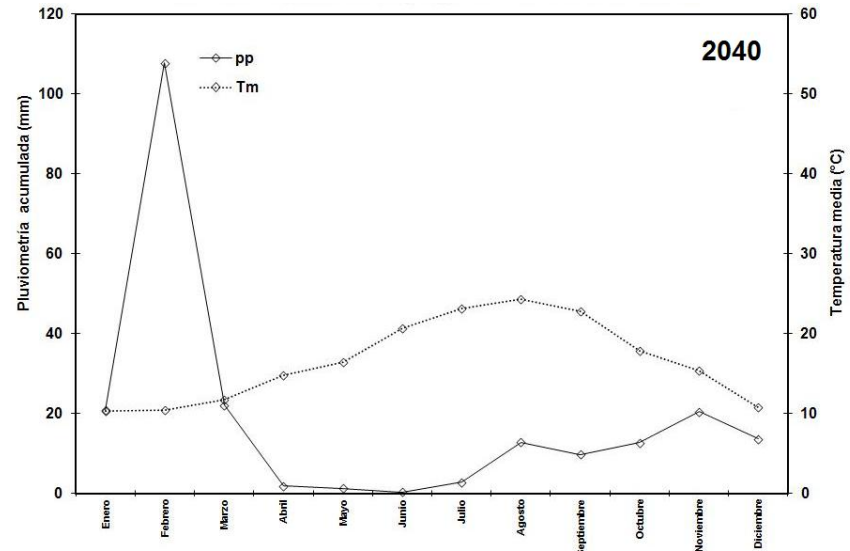
A2**B1**

Figura 25. Bioclimatología para Valle de las Palmas (Baja California, México) mediante análisis Ombrotérmico de Gaussen empleando como variables las proyecciones de precipitación y temperatura media. Las gráficas del lado izquierdo corresponden a las proyecciones con escenarios de alta emisión (A2) para los años 2040 y 2099 y las del lado derecho para baja emisión (B1). Las variables climáticas fueron obtenidas de la Base de Datos Climáticos del Noroeste (<http://peac-bc.cicese.mx/datosclim/index.html>).

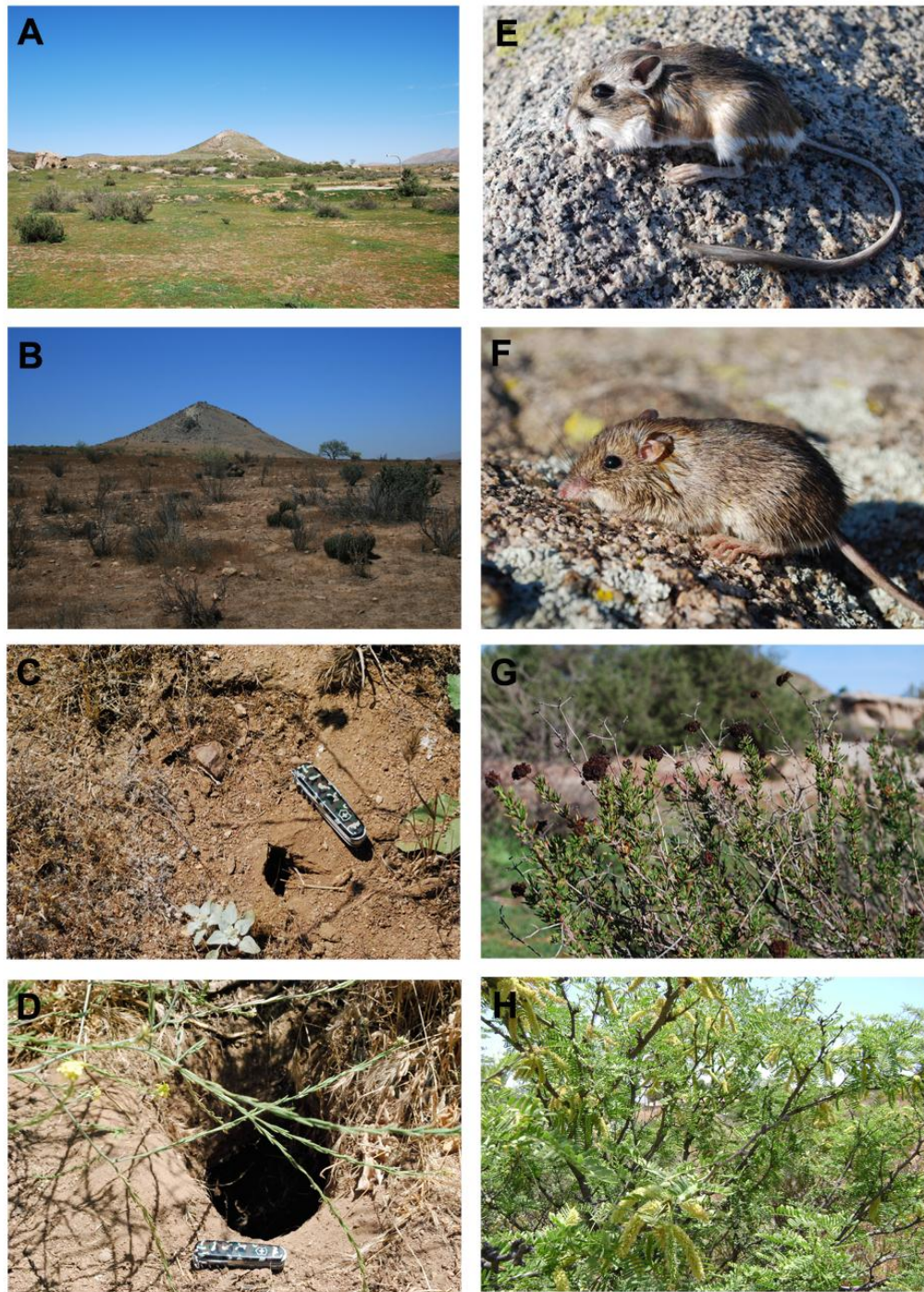


Figura 26. Perspectiva del paisaje, flora y fauna en Valle de las Palmas, Baja California. (A, B) Características del paisaje en VDP en Enero 2009 y Junio de 2010 respectivamente. (C, D) Ejemplos de madrigueras muestreadas. (E) Rata canguro (*Dipodomys simulans*). (F) Ratón de abazones (*Chaetodipus fallax*). (G) Gordolobo (*Eriogonium fasciculatum*). (H) Mezquite (*Prosopis glandulosa*).

Análisis del paisaje de los puntos de muestreo

Se llevó a cabo el análisis de imágenes satelitales (cortesía de Landsat y Digital Globe Image Library) de los puntos de muestreo de este trabajo, tanto para VDPy SJZ, Baja California, México, tomando en cuenta diferentes resoluciones y escalas. El polígono con puntos de muestreo con identificación positiva de la presencia de *Coccidioides* en muestras ambientales de suelo en todos los casos se encontraron relacionados con las zonas más bajas asociadas a riparios con suelos sedimentarios lacustres. Estos cursos de agua temporales característicos de la zona son parte del mismo sistema hidrológico de la cuenca del Río Tijuana (Figura 27).

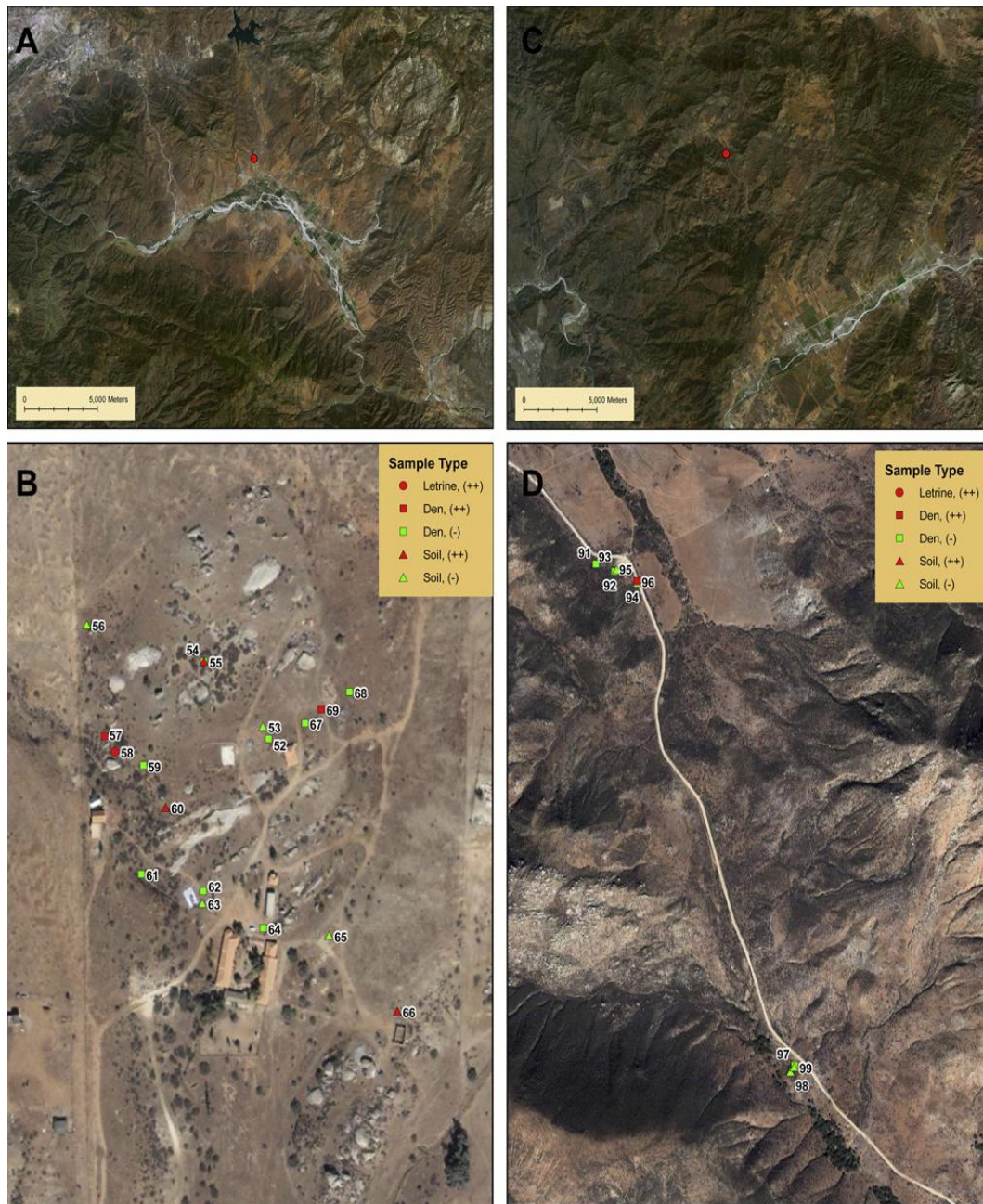


Figura 27. Imagen de Satélite de puntos de muestreo en Valle de las Palmas (VDP) y San José de la Zorra (SJZ), Baja California, México. (A) Imagen Landsat con una vista general de VDP (cortesía de Landsat image archive, glovis.usgs.gov). (B) Imagen satelital de alta resolución 2008 con polígonos de puntos de muestreo para *Coccidioides* en VDP (imagen cortesía de Digital Globe Image Library, www.digitalglobe.com). (C) Imagen Landsat con una vista general de SJZ (cortesía de Landsat image archive, glovis.usgs.gov). (D) Imagen satelital de alta resolución 2008 con polígonos de puntos de muestreo para *Coccidioides* en SJZ (imagen cortesía de Digital Globe Image Library, www.digitalglobe.com).

Modelación espacial de distribución espacial potencial de *Coccidioides*

Con la información obtenida en este trabajo, se llevó a cabo un experimento *in silico* para modelar la distribución potencial del patógeno empleando 62 coordenadas espacialmente georeferidas de aislamientos recientes de *Coccidioides* en muestras ambientales de suelo: 11 puntos en Arizona proporcionados por B. Barker (comunicación personal) y 51 puntos en Baja California, México empleando bases de datos de variables climáticas, donde se distribuye el probable nicho ecológico realizado de *Coccidioides* en Norteamérica. Se definen 3 ecoregiones bien definidas que corresponden geográficamente al sur del Valle de San Joaquín en California, donde se distribuye *C. immitis*; y por otro lado la parte Baja del desierto de Sonora y el desierto de Chihuahua donde se distribuye *C. posadasii* (Figura 28).

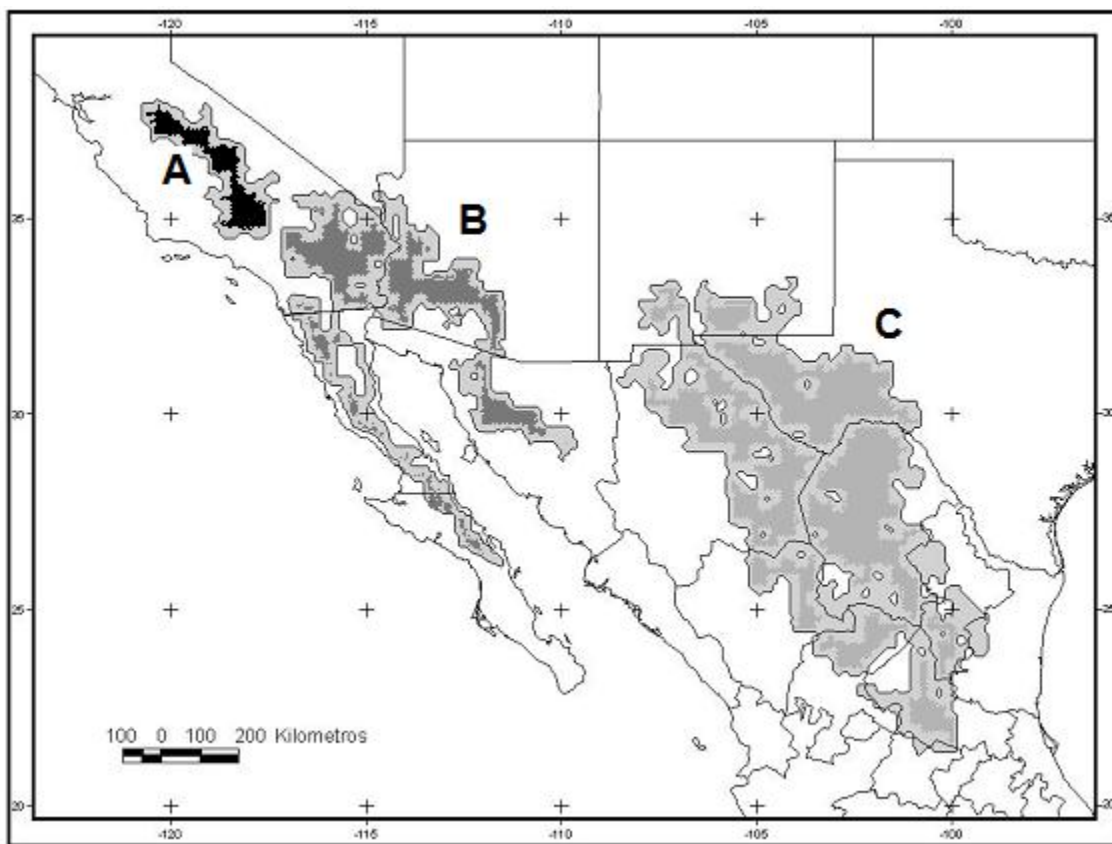


Figura 28. Probable nicho ecológico realizado de *Coccidioides* en Norteamérica. Se definen 3 ecoregiones bien definidas geográficamente: el sur del Valle de San Joaquín en California (A), donde se distribuye *C. immitis*; y por otro lado la parte Baja del desierto de Sonora (B) y el desierto de Chihuahua (C) donde se distribuye *C. posadasii*.

Esta distribución potencial obtenida de la modelación corresponde con la filogeografía reciente de cepas obtenidas de aislamientos clínicos en México mediante la amplificación de 8 secuencias de microsatelites (Figura 29).

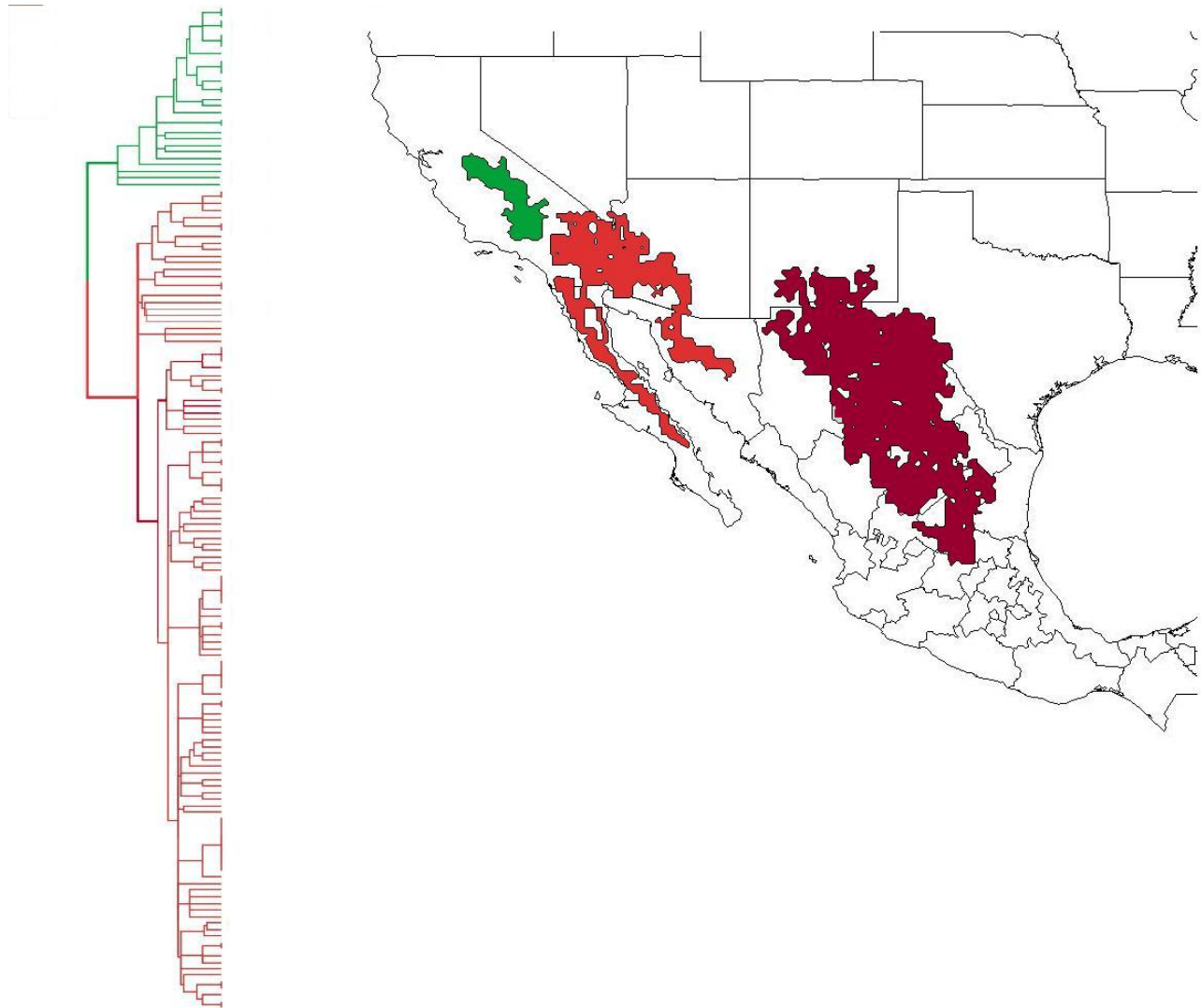


Figura 29. Filogeografía de *Coccidioides* en México. La regionalización de la distribución potencial es compatible con la información reciente sobre estudios filogenéticos realizados en nuestro país analizando 8 secuencias de microsatelites. Adaptado de Luna-Isaac 2011.

Análisis de la comunidad fúngica

Estimación de diversidad de especies fúngicas

A pesar de los múltiples esfuerzos de obtener geles desnaturalizantes mediante DGGE y TGGE para analizar la diversidad fúngica en el área de estudio, se encontraron diversos problemas técnicos, principalmente relacionados con la estandarización de la técnica y la formación de quimeras durante los múltiples pasos de PCR. Estos problemas son ampliamente descritos en la literatura (Wang y Wang 1996, Wang y Wang 1997, Qiu y cols. 2001) y no pudieron ser resueltos a pesar de implementar modificaciones a la técnica de acuerdo las recomendaciones al respecto (Kuske y cols. 1998.). Otro problema fue el tamaño de los amplicones obtenidos para el análisis mediante TGGE, ya que se encuentra en el límite aceptado para la técnica, entre 500 y 600 pb.

Sin embargo, con información disponible obtenida recientemente de trabajos simultáneos de colaboradores del mismo proyecto, pudimos lograr una aproximación que nos permite sentar las bases para trabajos futuros respecto al análisis de diversidad fúngica en estos ecosistemas. En el trabajo de Romero Olivares (2011) donde se analizó la biodiversidad fúngica de ascomicetos y basidiomicetos mediante clonación de amplicones obtenidos de la región ITS1-5.8s-ITS2 y construcción de una genoteca a partir de muestras de suelo obtenidas en los mismos puntos de muestreo de nuestro trabajo de campo en VDP y en cuatro puntos adicionales del norte de la península de Baja California con diferentes características bioclimáticas y ecológicas: Laguna Salada, Santa Catarina, El Rosario y Cataviña. Laguna Salada que forma parte del sistema de río Colorado, es una depresión arenosa desértica que se encuentra a 3 m por debajo del nivel del mar que comienza en la inmediación suroeste del cerro El Centinela y se extiende hacia el sur, entre la sierra Cucapá y la sierra de Juárez, situada a 40 km al suroeste de la ciudad de Mexicali; Santa Catarina situada en el Municipio de Ensenada a 1142 metros de altitud es una mesa rodeada de valles irrigados enclavados en la zona montañosa y caracterizada por bosques de *Quercus-Juniperus* que se localiza en la vertiente occidental de la Sierra Juarez, aproximadamente a 100 km al sureste de Ensenada; El Rosario, que forma parte de la cuenca del sistema hidrológico que se vierte en la costa del Pacífico, situada a 260 km al sur de la ciudad de Ensenada, y caracterizada por el ecotono de transición más meridional entre la región mediterránea y la región desértica peninsular; y finalmente Cataviña, localizada a 125 kilómetros al sur de El Rosario y a 110 kilómetros al norte del Paradero Punta Prieta, de donde parte la carretera hacia Bahía de los Ángeles, enclavada en la zona natural protegida de la Biosfera del Valle de los Cirios, definida por su alto nivel de endemismo representativo de las zonas planas desérticas de Baja California; incluye varias asociaciones vegetales como matorral de *Bursera*, aunque se destaca particularmente el matorral rosetófilo (al norte y sur de la región) y las asociaciones de cirios, especie característica del matorral sarco-crasicaule.

En el punto de nuestro interés de estudio situado en VDP 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 *Basidiomycota*) y 4 no han sido identificados (Tabla B). De los filotipos identificados por lo menos hasta taxón, 14 son Ascomicetos y 5 son Basidiomicetos. El filotipo más

común en ésta localidad ha sido identificada solo hasta el nivel de taxón (*Ascomycota*) con 25 repeticiones de su patrón de restricción.

VDP se caracterizó por presentar la mayor diversidad de filotipos y mayor diversidad cuando se compara con localidades similares geográficamente relacionadas, mientras que el resto de las localidades presentaron en promedio 13 filotipos distintos. A su vez, el sustrato de VDP, rico en materia orgánica y con rizosferas más desarrolladas por la cobertura vegetal asociada al ecotono entre el bioma mediterráneo y desértico, facilita el desarrollo fúngico. De los filotipos de VDP, la mayor parte fueron exclusivos de ese punto, ya que los filotipos presentes en esta localidad no se repitieron en otras localidades estudiadas, lo que nos orienta a que existe una gran biodiversidad fúngica aún por explorar en estos ambientes (Romero Olivares 2011).

Tabla B. Índice de diversidad de Shannon para la localidad de Valle de las Palmas, Baja California. Tomado de Romero Olivares 2011.

Filotipo	Repeticiones en el patrón de restricción	P _i	lnP _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>Phialophora hyalina</i> V25	1	0.007246	-4.9972	-0.03621
Total	138			-2.56139

A partir de la información obtenida por Olivares (2011) se construyeron matrices de presencia y ausencia para 73 filotipos identificados en 25 puntos de muestreo en Valle de las Palmas y 10 puntos de muestreo para cada polígono de trabajo de campo localizados en Laguna Salada, Santa Catarina, El Rosario y Cataviña situados en Baja California, México. Se obtuvieron de esta manera listados de filotipos por punto de muestreo y por filotipo identificado. Con los resultados recopilados, se construyeron gráficas de comparación de estimadores no paramétricos para calcular el tamaño de las poblaciones fúngicas potenciales (Figuras 30-31). Se analizó el modelo que mejor se ajustó a los muestreos obtenidos, encontrando que *Bootstrap* se ajusta de mejor manera (Figura 32). Asimismo, se construyó una gráfica para modelar la acumulación de filotipos, donde se obtuvo el algoritmo polinomial con un coeficiente de determinación (R_2) de 0.999656788 (Figura 33), que nos indica un buen ajuste del modelo, ya que es cercano a 1.0. Con los parámetros de la función del polinomio a (4.717891) y b (0.039108) obtenidos, evaluamos la calidad del inventario calculando la pendiente al final de la curva mediante la fórmula de Clench, donde la pendiente (en un punto n) donde

$$n = a/(1+b \cdot n)^2$$

por tanto,

$$4.717/(1+0.03 \cdot 25)^2 = 4.71/674.84 = 0.0069$$

Esta pendiente, menor de 0.1, nos indica que hemos logrado un inventario bastante completo y altamente fiable.

La proporción de diversidad fúngica registrada también nos da idea de la calidad del inventario:

$$S_{obs}/(a/b) = 25/(4.71/0.03) = 25/120.63 = 0.20 = 20\%$$

Por otra parte, podemos estimar el esfuerzo de muestreo necesario para registrar una determinada proporción de la fauna (n_q), muy útil a la hora de planificar trabajos de campo para muestreos futuros. En este ejemplo, si quisiéramos registrar un 95% de la fauna:

$$n_{0.95} = 0.95/[0.039108 \cdot (1-0.95)] = 485.83$$

Es decir, deberíamos de llevar a cabo 485 unidades de esfuerzo de muestreo. A medida que el inventario se va completando se hace más difícil capturar especies nuevas; cuando los inventarios poseen un alto grado de fiabilidad, el esfuerzo necesario para aumentar la proporción de diversidad fúngica encontrada puede ser desproporcionadamente elevado. Otro punto importante es que en este punto es donde cruza la asíntota y a partir de esta ordenada, la línea se prolonga al infinito perpendicular al eje X sin cambiar a pesar de incrementar el número de muestreos (Figura 34).

Es muy probable que la relación entre el costo beneficio (temporal, económico, y mano de obra técnica) y la mejora en los resultados no compense el esfuerzo de trabajo; ya que hay que realizar 26 unidades de esfuerzo más para aumentar el conocimiento en

un 50% y hasta 230 unidades para el 90% del conocimiento de la biodiversidad fúngica. Sin embargo, para conocer el 95% se requiere más del doble de esfuerzo con respecto a este último para aumentar tan solo 5% (Figura 35 y Tabla C).

Si esto representa el 20% de la riqueza de especies de acuerdo a nuestro análisis de rarefacción, estimamos 380 filotipos potenciales en muestras de suelo en Valle de las Palmas no identificados, de un total de 456 filotipos. De acuerdo al estimado final de resultados, de los 76 filotipos incluidos en el análisis, solo han sido identificados 35 especies potenciales por lo que solo se tiene un registro del 7% del total de filotipos potenciales.

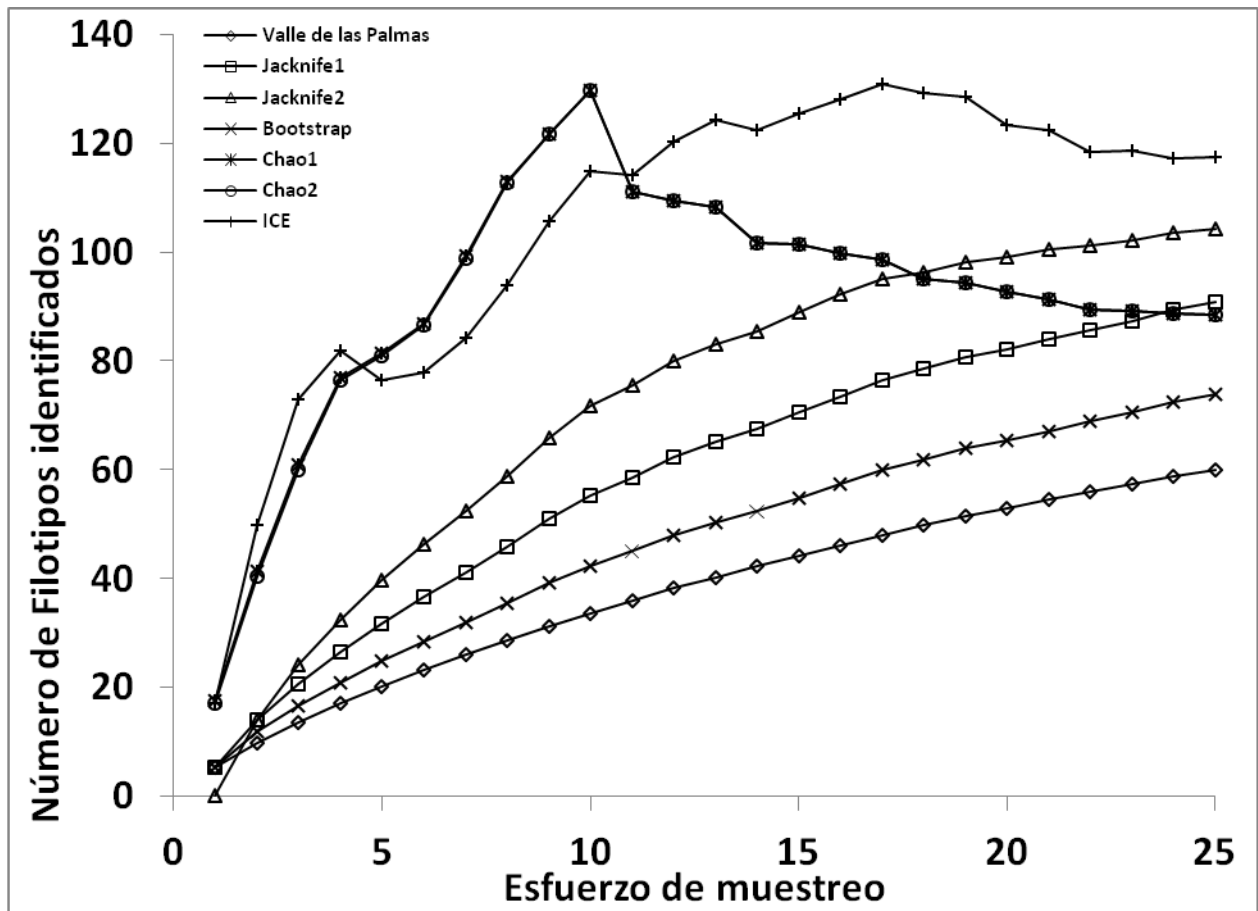


Figura 30. Comparación de estimadores no paramétricos para calcular el tamaño de poblaciones fúngicas en muestras ambientales de suelo en Valle de las Palmas, Baja California.

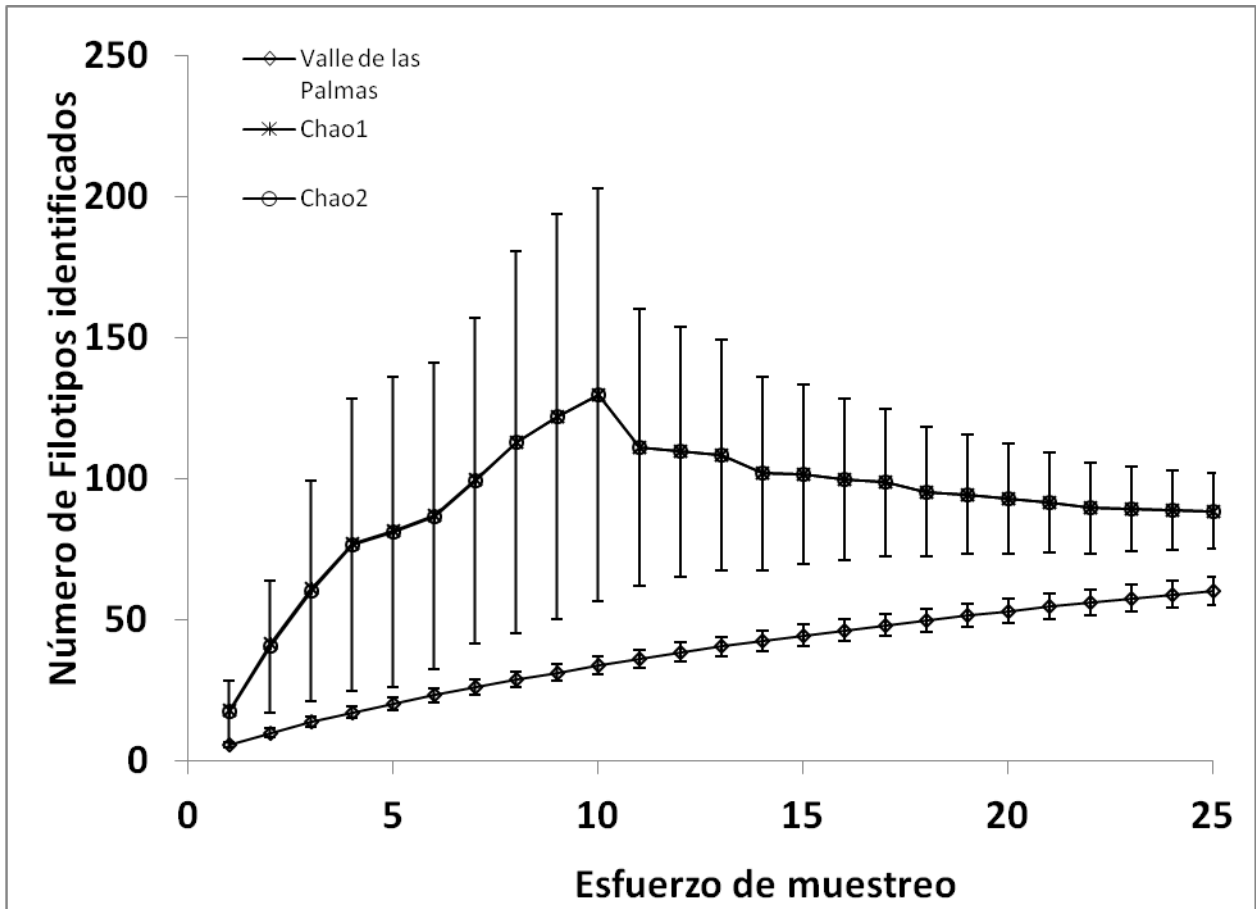


Figura 31. Comparación de estimadores no paramétricos Chao 1 y Chao 2 para calcular el tamaño de poblaciones fúngicas en muestras ambientales de suelo en Valle de las Palmas, Baja California. En todos los casos sobreestiman la poblaciones.

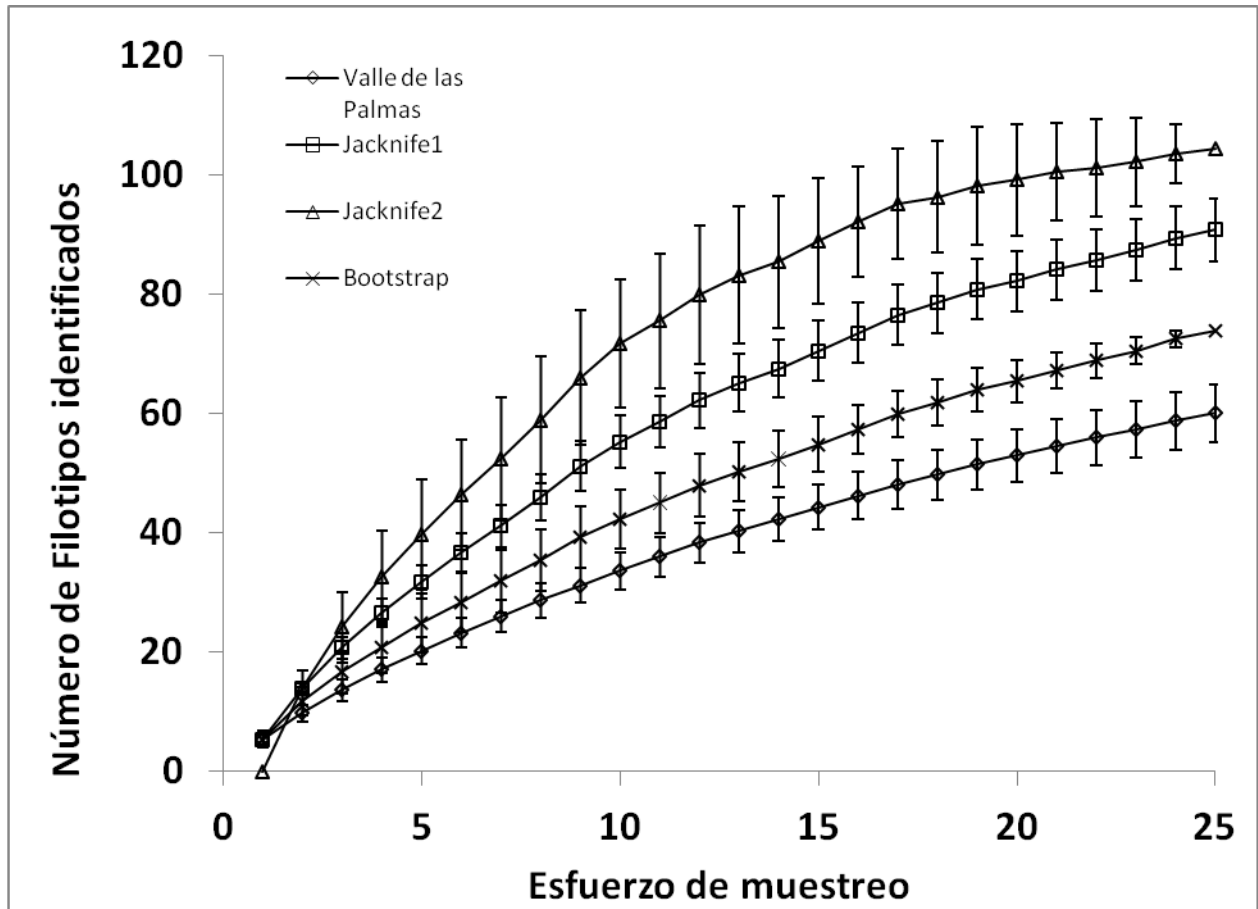


Figura 32. Comparación de estimadores no paramétricos Bootstrap, Jackknife 1 y 2 para calcular el tamaño de poblaciones fúngicas en muestras ambientales de suelo en Valle de las Palmas, Baja California. El modelo que mas se ajusta al muestreo es Bootstrap.

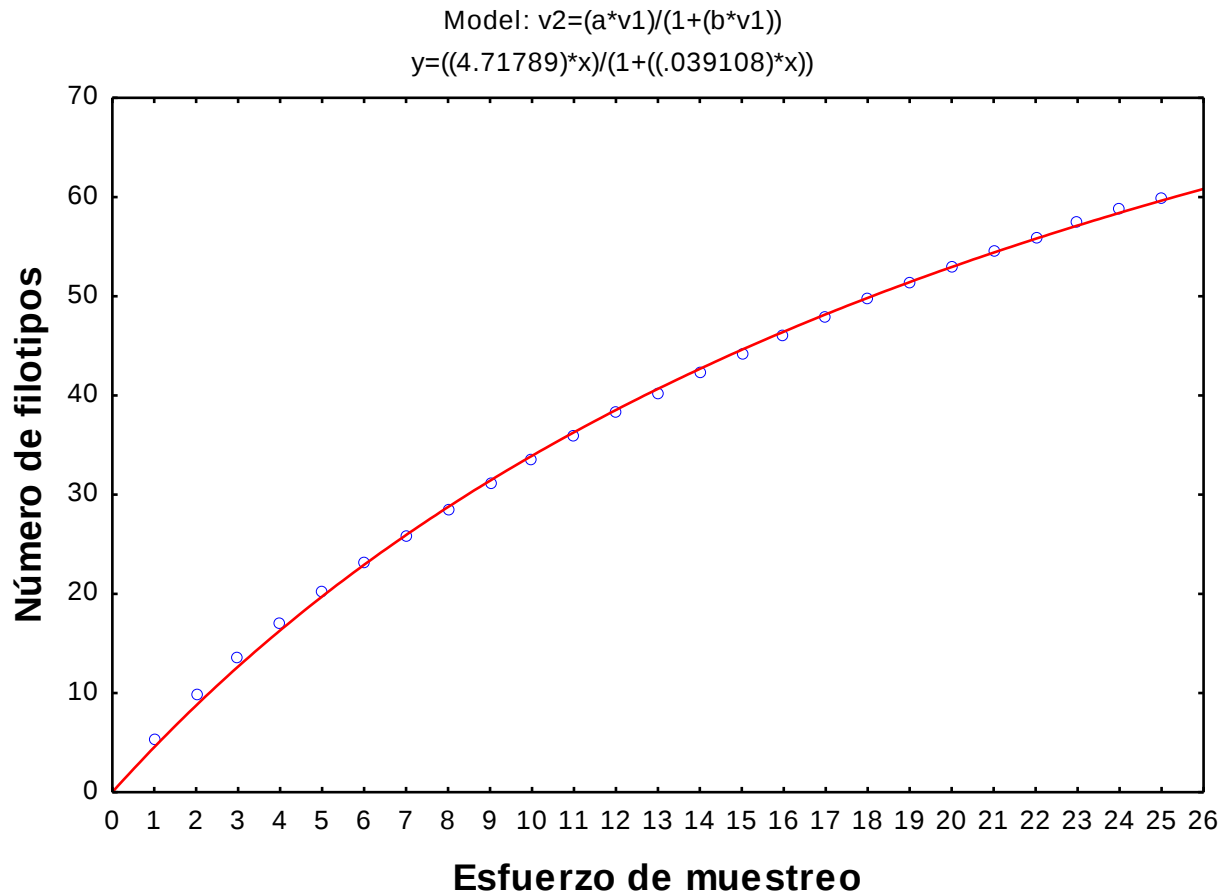


Figura 33. Curvas de acumulación de filotipos de poblaciones fúngicas en muestras ambientales de suelo en Valle de las Palmas, Baja California.

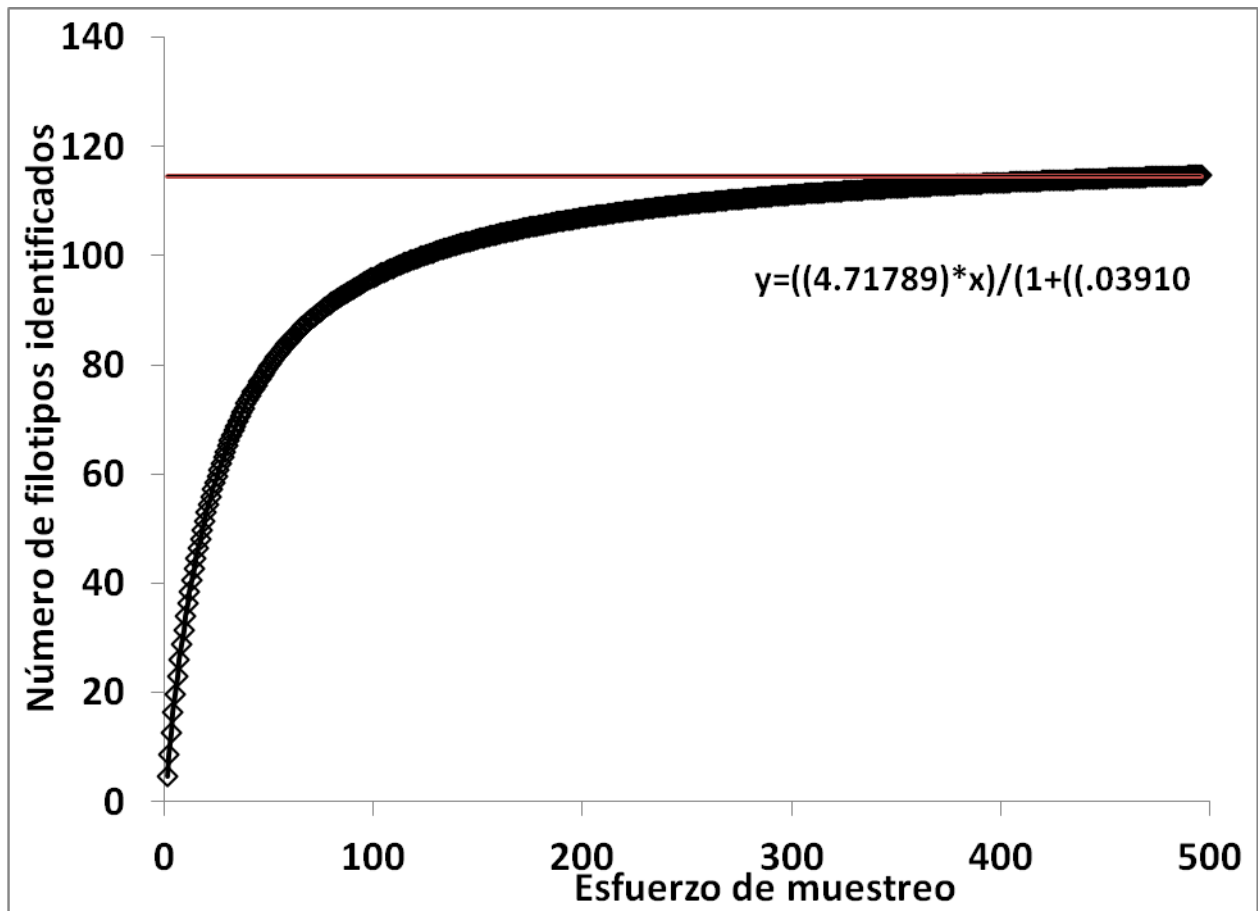


Figura 34. Curvas de rarefacción de poblaciones fúngicas en muestras ambientales de suelo en Valle de las Palmas, Baja California. La asintota se alcanza de acuerdo al modelo después de 485 muestreos con 114 filotipos potenciales identificados.

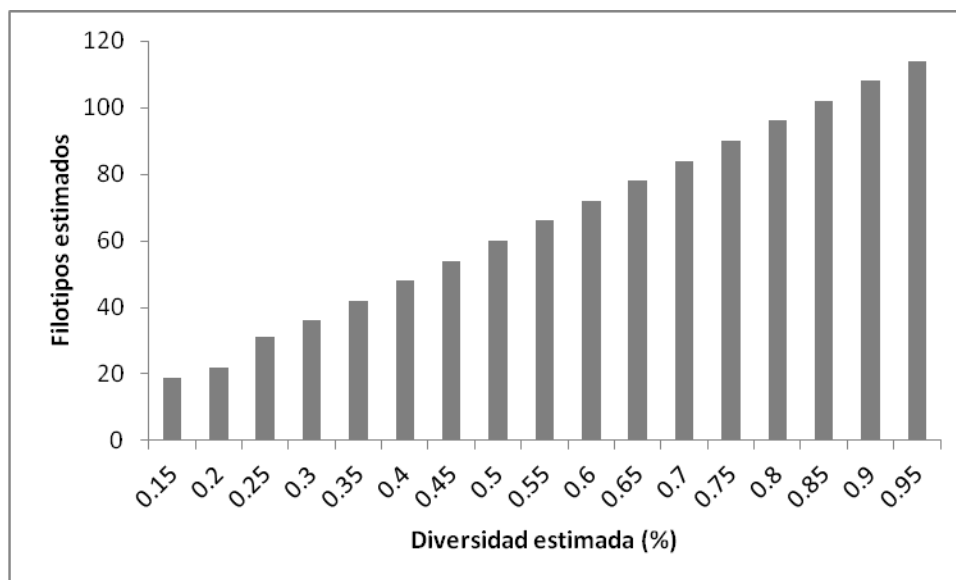


Figura 35. Estimación de diversidad fúngica en Valle de las Palmas, Baja California a partir de a la formula de Clench.

Tabla C. Estimación de esfuerzo de trabajo estimado para estudiar la diversidad fungica en Valle de las Palmas, Baja California a partir de a la formula de Clench aplicada en resultados de curva de rarefacción.

Diversidad estimada	Esfuerzo de trabajo	Filotipos estimados
0.95	486	114
0.9	230	108
0.85	145	102
0.8	102	96
0.75	77	90
0.7	60	84
0.65	47	78
0.6	38	72
0.55	31	66
0.5	26	60
0.45	21	54
0.4	17	48
0.35	14	42
0.3	11	36
0.25	9	31
0.2	6	22
0.15	5	19

Estimación de riqueza de filotipos

A partir de los resultados recopilados, encontramos que las poblaciones fúngicas de la subfamilia *Dykaria* en Valle de las Palmas son más diversas con respecto a Laguna Salada, Santa Catarina, El Rosario y Cataviña en el estado de Baja California, en el Noroeste de la República Mexicana (Figuras 36 y 37).

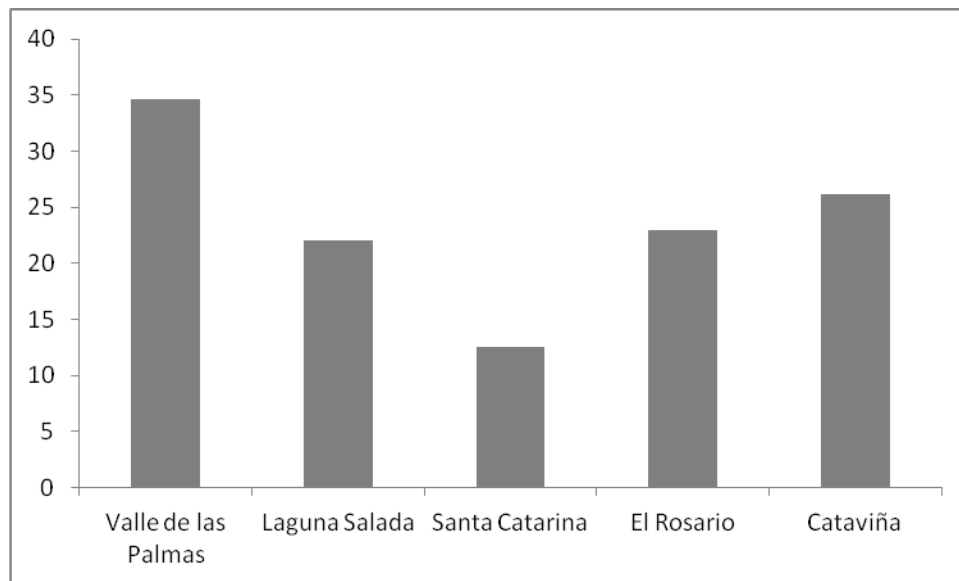


Figura 36. Índice de Simpson (D) estimado para ascomicetos y basidiomicetos en muestras ambientales de suelos de Baja California; México.

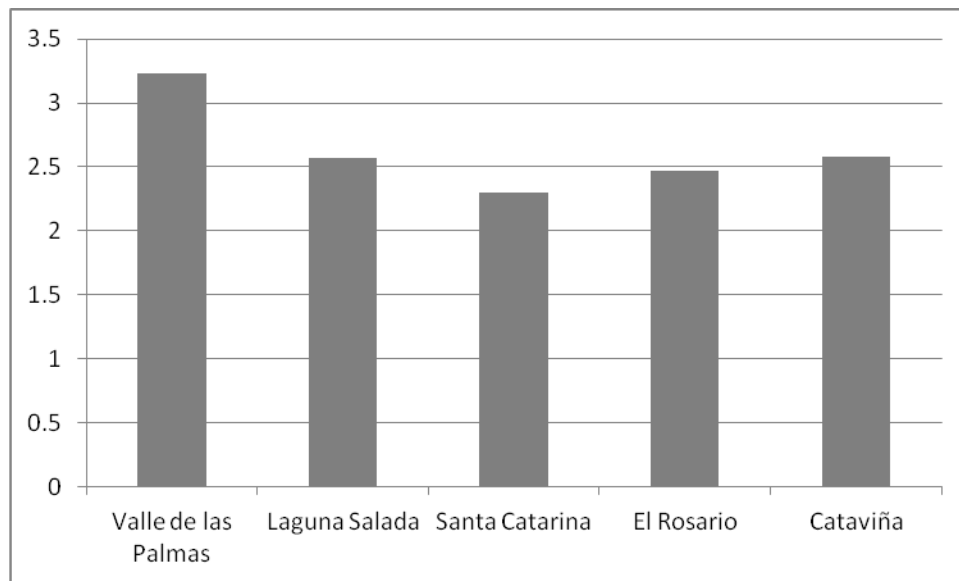


Figura 37. Índice de Shannon-Weaver (H') estimado para ascomicetos y basidiomicetos en muestras ambientales de suelos de Baja California; México.

Similitud entre comunidades

Después del análisis de similitud con la información disponible encontramos que Valle de las Palmas es un punto donde existen las poblaciones más diversas con menores semejanzas al compararlas con las poblaciones fúngicas de Laguna Salada, Santa Catarina, El Rosario y Cataviña, Baja California, encontrando una similitud entre los diferentes filotipos entre 11 y 17%. Por otro lado, las poblaciones de Santa Catarina son las más homogéneas, con poblaciones similares entre un 31 a 45% (Figuras 38 y 39). Esto era de esperarse, ya que el ecosistema en este punto es más eutrófico y húmedo con mayor proporción de basidiomicetos asociados a bosques de coníferas y vegetación Baja de *Quercus-Juniperus*.

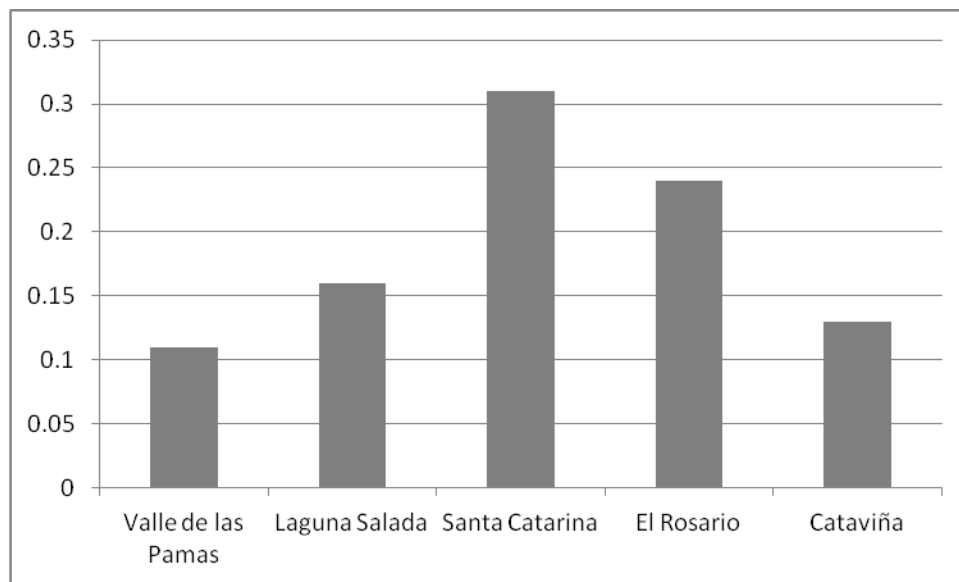


Figura 38. Coeficiente de similaridad de Jaccard (J) para ascomicetos y basidiomicetos estimado en muestras ambientales de suelos de Baja California; México.

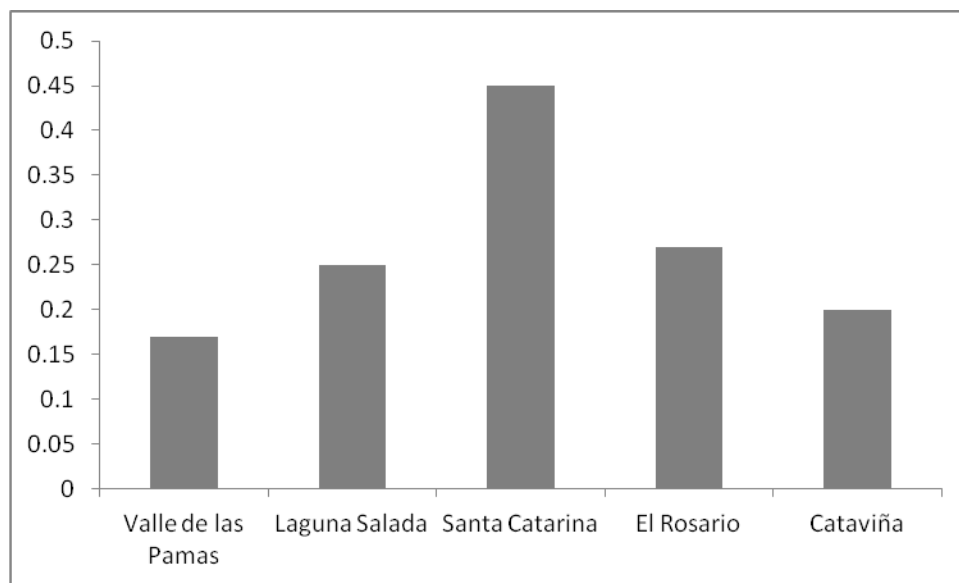


Figura 39. Coeficiente de similaridad de Sorensen (QS) estimado en muestras ambientales de suelos de Baja California; México.

Discusión

Se logró diseñar un método exitoso, reproducible, y relativamente rápido para hacer evidente la presencia de DNA Coccidioidal en muestras ambientales de suelo. De los tres puntos de muestreo durante el trabajo de campo, VDP, previamente reportado como una área endémica para la enfermedad (Cairns y cols. 2000), presentó un mayor número de identificaciones positivas para *Coccidioides* spp. (38%). En contraste, en SJZ se encontró solo un 25% de las muestras positivas. Este alto porcentaje de muestras identificadas como positivas puede estar relacionado con el muestreo más extenso y exhaustivo en el lugar. Un diseño experimental para estudios posteriores para continuar explorando la distribución del patógeno en el medio ambiente en estos lugares es necesario para comparar de manera más fidedigna ambos sitios. No se encontraron muestras ambientales positivas procedentes de Ensenada. Esto solo puede ser corroborado hasta obtener la secuenciación de 2 de 10 muestras y poder establecer falsos positivos que correspondieron finalmente a *Aphanoascus* spp. Es así que podemos establecer que la PCR anidada no puede ser empleado como método diagnóstico por si solo hasta tener la secuenciación complementaria o un gel de de alta resolución como PAGE debido a que la diferencia en longitud de los amplicones obtenidos de la región ITS2 perteneciente a *Coccidioides* spp. y *Aphanoascus* spp. difieren aproximadamente en 10 nucleótidos. Sin embargo, el método de PCR anidada sin secuenciación puede ser empleado como una herramienta de prueba para tamizaje de áreas sospechosa de presencia de *Coccidioides* spp.

Los oligonucleótidos empleados como cebadores en la PCR anidada, ITS2F e ITS2R son extremadamente sensibles y específicos para *Coccidioides* spp. Cuando se emplean en ensayos de PCR de tiempo real para detección de *Coccidioides* spp. directamente de especímenes y muestras clínicas (Binnicker *et al.* 2007). Sin embargo en muestras de suelo, los cebadores no demostraron ser los suficientemente sensibles para emplearse directamente en la PCR diagnóstica, por lo que fue necesario correr un primer ciclo de PCR para poder obtener resultados, lo que nos sugiere la probabilidad de que existía escasa cantidad de DNA coccidioidal en el extracto de DNA genómico ambiental empleado inicialmente como templado. Recientemente, utilizando otros cebadores diseñados para amplificar la región 28S rDNA, empleando métodos de PCR convencional y semi-anidada se logró identificar positivamente de manera eficiente *Coccidioides* spp. en 24 muestras ambientales de suelo (de Macedo *et al.* 2011). Aunque en este estudio se reporta una eficiencia de recuperación de 100%, no se muestran resultados de secuenciación. Dado la alta probabilidad de secuencias muy similares entre especies cercanamente relacionadas de la familia *Onygenaceae* (Millar y cols. 2003), sería recomendable confirmar mediante secuenciación los resultados para evitar falsos positivos en la identificación.

La mayor parte de las muestras de suelo procedentes de VDP, SJZ y E tuvieron en promedio menos cantidad de DNA genómico que el reportado previamente en ambientes con mayor humedad (Miller y cols. 1999; Fierer y cols. 2007). Esta evidencia sugiere pistas sobre el volumen de biomasa de la microbiota adaptada a estos ambientes extremos.

Sólo dos especies *Coccidioides* son conocidas hasta el momento: *C. immitis* y *C. posadasii*. En el análisis BLAST realizado en este trabajo se obtuvieron secuencias identificadas como idénticas con valores similares para *C. immitis* y *C. posadasii*. Evidencia biogeográfica previa muestra la distribución espacial de *Coccidioides* spp. en América, *C. immitis*, previamente llamada como cepa Californiana, se encuentra exclusivamente en el Valle de San Joaquín en el sur de California, y el noroeste de Arizona, mientras que *C. posadasii* se distribuye en el resto de la zonas desérticas de sureste de Estados Unidos y Norte de México, así como en la áreas endémicas de Sudamérica (Fisher y cols. 2001; Barker y cols. 2007; Barker y cols. 2011). Estudios previos reportaron el aislamiento de *C. immitis* en muestras de suelo en VDP (Cairns *et al.* 2000). La secuenciación de la región ITS2 ha sido útil para la identificación básica taxonómica, pero no para diferenciar especies del mismo género. Para distinguir una especie de otra y llevar a cabo análisis biogeográficos y filogenéticos se requerirá mayor resolución analizando regiones que contenga *loci* con micro satélites y mutaciones en genes codificantes para proteínas fúngicas.

La distribución espacial de *Coccidioides* en VDP es muy similar a la observada en áreas altamente endémicas de las cuencas del Valle de San Joaquín en el sur de California y Santa Cruz en Arizona, lo que sugiere una probable distribución espacial preferentemente en corredores a lo largo de lechos secos de cursos de agua intermitentes. No se encontró *Larrea tridentata*, cuya presencia en inmediaciones de puntos de aislamiento positivo de este hongo patógeno en reportes previos, ha sido históricamente relacionada a esta enfermedad. (Maddy y Crecelius 1967; Swatek 1970).

La modelación obtenida del nicho ecológico potencial de *Coccidioides* empleando variables climáticas y topográficas coincide con la epidemiología y filogeografía conocida de la enfermedad hasta el momento, donde resaltan tres zonas geográficamente separadas: El Valle de San Joaquin, el desierto de Sonora y el desierto de Chihuahua.

El Valle de San Joaquin en el sur de California se extiende desde el delta de los ríos San Joaquín y Sacramento al norte, de la sierra de Tehachapi en el sur y de varias Sierras Costeras de California al oeste, desde la Sierra del Diablo al noroeste hasta la Sierra del Temblor en el suroeste; y al este limitada con la sierra Nevada.

Por otro lado las regiones potenciales obtenidas en la modelación localizadas en región central y sureste de Norteamérica se encuentran geográficamente aisladas por la sierra madre occidental, caracterizada por montañas con relieve y disección vertical de ligera (100 a 250 m/km²) a moderada (250 a 500 m/km²) (Priego Santander y cols. 2003). La primera región, coincide precisamente con la ecoregión localizada en la parte Baja del Desierto de Sonora y coincide con la descripción original de Maddy y Cocozza (1964), y que incluye el desierto de *Mojave Cleveland National Forest* y *Anza Borrego State Desert Park* en los condados de San Diego, Imperial, Riverside y Orange en el sur de California, y las planicies desérticas del suroeste de Arizona en los Estados Unidos; así como a lo largo de la península de Baja California, la costa del golfo de Cortez en Baja California Sur y la llanuras áridas del norte de Sonora en México. Por otro lado, la segunda ecoregión localizada al sureste, y que coincide con la distribución del desierto de Chihuahua, y que involucra la región Trans Pecos en Nuevo México y Texas en Estados Unidos y la región de la Laguna/Bolson de Mapimí en los estados de Coahuila, Durango y

Chihuahua, las regiones sur y noroeste áridas de Nuevo León, la región Nazas-Aguanaval en el estado de Zacatecas y la región antiplano de San Luis Potosí en la República Mexicana (Figura 20). Esta regionalización es compatible con los resultados más recientes sobre filogeografía de *Coccidioides* en México empleando microsatélites, agrupándose en tres clados: el primero *C. immitis* exclusivo para California y dos clados para *C. posadasii* en las regiones desérticas distribuidas ampliamente en la zona baja del desierto de Sonora y el desierto de Chihuahua (Figura 21).

Es ampliamente aceptado que el suelo es el hábitat natural de *Coccidioides* spp. (Emmons 1942; Maddy 1965; Fishery y cols. 2007; Barker y cols. 2007; Barker y cols. 2011; de Macêdo y cols. 2011; Lauer y cols. 2011). A pesar de esto, desde que *Coccidioides* fue descrito como un microorganismo saprobio de suelo, diversas hipótesis han sido postuladas para explicar su distribución espacial aparentemente limitada a regiones áridas del continente Americano. Algunos autores, basados en el aislamiento del patógeno en 6 especies de heterómidos diferentes, han aceptado la correlación con pequeños mamíferos desérticos (Stewart y cols. 1932; Emmons 1942; Swatek 1970). Evidencia reciente sugiere que el enriquecimiento del suelo con material orgánica proporciona las condiciones ideales para el desarrollo de diversos patógenos fúngicos dentro de las madrigueras de heterómidos en zonas áridas (Hawkins 1996). En este sentido, los detritus orgánicos y carcasas animales puede mantener el ciclo de vida de *Coccidioides* debajo de la superficie del suelo. Análisis previos confirman que las esférulas y endosporas coccidioidales expuestas a fluidos biológicos sobreviven por largo tiempo expuestas a diferentes condiciones ambientales. Evidencia mas reciente apoya esta hipótesis, ya que el análisis genómico comparativo muestra que *Coccidioides* no es saprofito del suelo, sino que ha evolucionado asociado a restos de animales del suelo (Sharpton y cols. 2009). Sin embargo, esto no ha podido ser confirmado hasta el momento en el campo debido a la escasa información del patógeno en su ambiente natural y a los escasos reportes de aislamiento en los ambientes desérticos altamente endémicos después de extensos muestreos (Swatek y Omieczynski 1967; Maddy y Crecelius 1967; Lacy y Swatek 1974; Greene y cols. 2000). La evidencia histórica sugiere que altas tasas de aislamiento están correlacionadas con la presencia de madrigueras de heterómidos (Egeberg y Ely 1956). Es bien conocido que las condiciones microambientales en las madrigueras de heterómidos proporcionan las condiciones ideales para el desarrollo fúngico (Reichman y cols. 1985; Hawkins 1996, Herrera y cols. 1997, Porras-Alfaro y cols. 2011). En este trabajo no se encontró correlación entre el lugar de muestreo (madriguera, echadero, letrina o superficie del suelo) y la presencia de *Coccidioides* spp. en VDP y SJZ. Sin embargo, ambas localidades positivas a la identificación tienen abundante evidencia de presencia de heterómidos como madrigueras activas que fue demostrada posteriormente al lograr captura y recaptura de diferentes especies endémicas de heterómidos.

De la infección por *Coccidioides* en mamíferos, los heterómidos salvajes son los más reportados en la literatura. Estudios previos muestran aislamientos positivos con mayor prevalencia en ratas canguros (*Dipodomys merriami* con 17%) y ratones de abazones (*Chaetodipus penicillatus*, previamente conocido como *Perognathus penicillatus* con 15% de prevalencia). Otras especies de mamíferos asociadas a la enfermedad son *C. baileyi*, *C. intermedius*, *C. formosus*, así como ardillas antilope (*Citellus leucurus* y *Citellus harrisi*, ahora *Ammospermophilus harrisi*); y el ratón saltamontes (*Onychomys torridus*) (Ajello

1967; Emmons 1942; Emmons y Ashburn 1942). De las especies de heterómidos identificadas en este trabajo, *Dipodomys simulans* y *Chaetodipus fallax* se encuentran taxonómicamente relacionadas con estas especies descritas previamente (<http://pir.uniprot.org/taxonomy/>).

Dipodomys spp. constituye el 80% de la mastofauna desértica en el ecosistema de la parte Baja del desierto de Sonora, definida hace mas de 40 años como el área de distribución de la enfermedad (Maddy y Coccozza 1964).

La investigación de la comunidad de heterómidos ha documentado la sucesión poblacional de *Perognathus* spp. durante las lluvias estacionales y los monzones en el desierto (Mares 1981). La biomasa se incrementa y su subsecuente integración a los ciclos biogeoquímicos por la acción de los detritívoros y descomponedores, probablemente aumentan la disponibilidad de fuentes de C y N en los “hotspots” microbianos. Este planteamiento podría explicar la correlación entre *Coccidioides* y las condiciones climáticas en regiones altamente endémicas previamente descritos en los análisis bioclimáticos (Kolivras & Comrie 2003; Park *et al.* 2005; Zender & Talamantes 2006, Baptista-Rosas y cols. 2010). Probablemente, la humedad del suelo y el aumento de la disponibilidad de agua en microambientes de estas áreas endémicas, pueden tener importantes consecuencias en la presencia o ausencia de *Coccidioides* en el ambiente.

Una secuencia alterante de humedad y sequía lleva al desarrollo fúngico y a la formación de conidios (Comrie y Glueck 2007). Revisiones recientes del tema sugieren que la combinación de veranos tibios y secos seguidos de lluvias intensas invernales en el ecotono desierto-mediterráneo proporcionan condiciones ideales par la propagación de esporas fúngicas (Greer y cols. 2008). En este trabajo se encontró evidencia de *Coccidioides* spp. en muestras de suelo en todos los muestreos realizados en diferentes tiempos, incluyendo en Invierno de 2009 en VDP. La ecología y los cambios meteorológicos relacionados a la variabilidad climática podrían afectar la estructura de las comunidades microbianas en el sentido de favorecer las condiciones de algunas poblaciones para sobrevivir y propagarse en condiciones menos adversas.

Nuestros resultados orientan a que el patrón fenológico que se observa en estas áreas localizadas en el norte de la península de Baja California son similares a los reportados previamente en otras regiones endémicas para *Coccidioidomycosis* en Norte América (Kolivras y Comrie 2003, Kolivras y Comrie 2004, Park y cols. 2005, Zender y Talamantes 2006; Baptista-Rosas y cols. 2010). Usualmente la costa oeste y la región elevada es más fría y húmeda, mientras que la costa del golfo de California es extremadamente árida con pp por debajo de 80 mm/anual. La región Noroeste de la península de California se encuentra en la transición entre el clima mediterráneo y desértico. A lo largo de la costa del pacifico norte domina el clima mediterráneo con lluvias con Tm que van de 15.7 y 18.1°C. El clima desértico se encuentra al este de la región mediterránea, extendiéndose hasta el Golfo de California al sur de la península, caracterizado por Tm entre 22.6 and 23°C (Reyes Coca y cols. 1990; Miranda Reyes y cols. 1991, Reyes Coca y Troncoso Gaytán 2004). La región mediterránea se encuentra poco expuesta a huracanes tropicales, la lluvias en verano son escasas y presentan escasas precipitaciones asociadas al monzón de Norteamérica y a sistemas de convección: por lo que no se consideran hidrológicamente significativos como son las

lluvias estacionales invernales y la tasas evapotranspiración elevadas (Minnich y cols. 2000). Esta variabilidad en la precipitación, así como el microclima hace sutiles diferencias en los ecosistemas, alterando la composición de la química de los suelos y la composición de la biota (Amudson y cols. 1994).

Hay que considerar que el método empleado en ese trabajo para estimar la diversidad fungica asociada a la presencia o ausencia del género *Coccidioides* en muestras ambientales de áreas altamente endémicas de Baja California, México tiene la desventaja de contener sesgos en la interpretación resultados ya que los filotipos con patrones de migración electroforéticos muy similares pueden estimarse como idénticos aunque correspondan a organismos distintos. Al no poder secuenciar todos los filotipos obtenidos, se seleccionaron los más representativos, por lo que las abundancias estimadas pueden ser relativas y con un sesgo importante.

Conclusiones

Muestras ambientales positivas para la presencia de *Coccidioides* spp. fueron identificadas en biomas de transición entre ecosistemas desérticos y mediterráneos con ombrotipos secos asociados a alta evapotranspiración del suelo. Estas condiciones se relacionan a ecosistemas extremos con alta especiación y biomasas microbianas limitadas definidas por agentes estresantes ambientales determinantes en zonas áridas: humedad y temperatura.

Para el análisis de las poblaciones fúngicas en las áreas de trabajo, a partir de bases de datos obtenidos por nuestro equipo de trabajo, se construyeron matrices de presencia y ausencia para 73 filotipos identificados en 25 puntos de muestreo en Valle de las Palmas y 10 puntos de muestreo para cada polígono de trabajo de campo localizados en Laguna Salada, Santa Catarina, El Rosario y Cataviña situados en Baja California, México. Con los resultados recopilados, se construyeron curvas de acumulación y rarefacción donde confirmamos que estos suelos son característicos respecto a una alta diversidad fúngica con poca similitud respecto a filotipos caracterizados, logrando identificar como una muestra representativa de la comunidad fúngica no explorada previamente en estos ambientes relacionada con la presencia del patógeno en suelos de zonas endémicas del norte de la península de Baja California.

Estos resultados apoyan la relación que tiene el nicho ecológico de *Coccidioides* spp. y patrones de sequía-lluvia que sugieren una correlación muy importante entre el clima regional y la epidemiología de este patógeno fúngico en zonas altamente endémicas de Norteamérica. Reportes previos relacionan a la CM con condiciones asociadas al fenómeno El Niño/Oscilación del sur (ENSO), manifestados por sequias intensas seguidas de inundaciones torrenciales en regiones previamente áridas (Colwell & Patz 1998). En nuestro estudio los periodos asociados a condiciones El Niño en el invierno 2006-2007 y 2009-2010, caracterizadas por un aumento en la lluvia total acumulada, podrían favorecer la incidencia del patógeno. Sin embargo, bajo escenarios de calentamiento asociado a fenómenos de Cambio Climático Regional, eventos extremos podrían ser mucho mas frecuentes (IPCC 2007), y las regiones áridas y semiáridas de las regiones subtropicales se volverían más secas aún (Seager y cols. 2007); de esta manera, escenarios con condiciones extremas pueden incrementar el riesgo de adquirir CM (Bernard y cols. 2001; Gamble y cols. 2008). El calentamiento climático regional asociado a la emisión de gases de efecto invernadero, los cambios en el patrón de lluvias y otros fenómenos meteorológicos pueden cambiar la distribución espacial, la temporalidad y los hospederos naturales de enfermedades infecciosas (Kolivras y Comrie 2004; English y cols. 2009). Esto se ha convertido en una importante línea de investigación de diversas disciplinas científicas debido a que las regiones áridas de Norteamérica son extremadamente vulnerables e estos impactos resultados del cambio Climático Global, que incluyen el incremento en eventos climáticos extremos con altas temperaturas, sequias mas prolongadas e incremento en las precipitaciones asociados a monsoones (Patz y Kovats 2002; Diffenbaugh y cols. 2008). Todos estos cambios proporcionan un escenario altamente favorable para la redistribución espacial de las áreas endémicas para CM actualmente conocidas con los subsecuentes cambios en la epidemiología de esta enfermedad, conocida como la micosis sistémica más importante de Norteamérica.

Referencias

1. Adaska JM. Peritoneal coccidioidomycosis in a mountain lion in California. *J Wildl Dis* 1999; 35: 75-77.
2. Aberdeen JEC. Quantitative Methods for Estimating the Distribution of Suelo Fungi. The University of Queensland Press, Brisbane 1955.
3. Ajello L. Comparative ecology of respiratory mycotic disease agents. *Bacteriol Rev* 1967; 31: 6-24.
4. Ampel NM, Mosley DG, England B, Vertz PD, Komatsu K, Hajjeh RA. Coccidioidomycosis in Arizona: Increase in incidence from 1990 to 1995. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 1528–1530.
5. Amundson R, Franco-Vizcaíno E, Graham RC, DeNiro M. The relationship of precipitation seasonality to the flora and stable isotope chemistry of Suelos in the Vizcaíno desert, Baja California, México. *J Arid Environm* 1994; 28: 265-279.
6. Andrews P, Whybrow P. Taphonomic Observations on a camel skeleton in a desert environment in Abu Dhabi. *Palaeontologia Electronica* 2005 Vol. 8, Issue 1; 23A:17p, 1.5MB; http://palaeo-electronica.org/paleo/2005_1/andrews23/issue1_05.htm
7. Atlas, Ronald M, Bartha, Richard. *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. 4ª. Edicion. Editorial Pearson/Addison Wesley 2005. pg. 192-194.
8. Baptista-Rosas RC. Coccidioidomycosis en México. Bioclimatología y modelación de probable nicho ecológico. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Baja California, México 2006.
9. Baptista-Rosas RC, Hinojosa A, Arellano E, Riquelme M. Epidemiología de la Coccidioidomycosis en México. *Rev Iberoam Micol* 2007;24: 100-105.
10. Baptista-Rosas RC, Hinojosa A, Riquelme M. Ecological niche modeling of *Coccidioides* sp. in Western North American deserts. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1111: 35-46.
11. Baptista-Rosas RC, Arellano E, Hinojosa A, Riquelme M. Bioclimatología de la Coccidioidomycosis en Baja California, México. *Investigaciones Geográficas. Boletín del Instituto de Geografía* 2010; 71: 21-30.
12. Barker BM, Jewell KA, Kroken S, Orbach MJ, The population biology of *Coccidioides*: epidemiologic implications for disease outbreaks. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1111: 147-163.
13. Barker BM, Tabor JA, Shubitz LF, Perrill R, Orbach MJ. Detection and phylogenetic analysis of *Coccidioides posadasii* in Arizona Suelo samples. *Fungal Ecology* 2011; doi:10.1016/j.funeco.2011.07.010
14. Beck MD. Diagnostic laboratory procedure, Coccidioidal granuloma; epidemiology. California State Dept. of Public Health 1931; 57:16-25.
15. Beisaw AM. Differential preservation and recovery: taphonomy of bone preservation at the Thomas/Luckey site, Ashland, NY. Thesis Submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Arts in Anthropology in the Graduate School Binghamton University State, University of New York 1998.
16. Bellini S, Hubbard GB, Kaufman L. Spontaneous fatal coccidioidomycosis in a native-born hybrid baboon (*Papio cynocephalus anubis/Papio cynocephalus cynocephalus*). *Lab Anim Sci* 1991; 41: 509-511.
17. Beck MD. Occurrence of *Coccidioides immitis* in lesions of slaughtered animals. *Proc Soc Exper Biol Med* 1929; 26: 534-536.
18. Beck, MD, Traum J, Harrington ES. Coccidioidal granuloma: occurrence in animals.

- J Am Vet Med Assoc 1931; 78: 490-499.
19. Bernard SM, Samet JM, Grambsch A, Ebi KL, Romieu I. The potential impacts of climate variability and change on air pollution-related health effects in the United States. *Environ Health Persp* 2001 ; 109: 199-209.
 20. Blair CF. Effects of Larrea on the local distribution of small mammals. En Campos-Lopez R, Mabry TJ, Fernandez-Tavizon S. *Larrea* CONACYT, Mexico, 2ª edición 1981; pg 95-100.
 21. Blair CF. Effects of Larrea on the local distribution of small mammals. En Campos-Lopez R, Mabry TJ, Fernandez-Tavizon S. *Larrea* CONACYT, Mexico, 2ª edición 1981; pg 95-100.
 22. Bolger DT, Alberts AC, Sauvajot RM, Potenza P, McCalvin C, Mazzoni S, Soulée ME. Response of rodents to habitat fragmentation in coastal southern California. *Ecological Applications* 1997; 7: 552–563.
 23. Breznock AW, Henrickson RV, Silverman S, Schwartz LW. Coccidioidomycosis in a rhesus monkey. *J Am Vet Med Assoc* 1975; 167: 657-661.
 24. Brouta F, Descamps F, Monod M, Vermout S, Losson B, Mignon B. Secreted Metalloprotease Gene Family of *Microsporium cani*. *Infection and Immunity* 2002; 70: 5676–5683.
 25. Brummer E, Clemons KV. Animal models of systemic mycoses. En *Animal Models in Medical Mycology*. Miyaji, M. (Ed). CRC Press. Boca Raton, FL. 1987. pp. 79-95.
 26. Buckley M, 2008. *The Fungal Kingdom: Diverse and Essential Roles in Earth's Ecosystem*. American Academy of Microbiology, Washington DC.
 27. Burmester A, Shelest E, Glöckner G, Heddergott C, Schindler S, Staib P, Heide A, Felder M, Petzold A, Szafranski K, Feuermann M, Pedruzzi I, Priebe S, Groth M, Winkler R, Li W, Kniemeyer O, Schroeckh V, Hertweck C, Hube B, White TC, Platzer M, Guthke R, Heitman J, Wöstemeyer J, Zipfel PF, Monod M, Brakhage AA. Comparative and functional genomics provide insights into the pathogenicity of dermatophytic fungi. *Genome Biol* 2011; 12: R7.
 28. Cairns L, Blythe D, Kao A, Pappagianis D, Kaufman L, Kobayashi J, Hajjeh R. A Outbreak of Coccidioidomycosis in Washington State Residents Returning from Mexico. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 61-64.
 29. Castañón-Olivares LR, Güereña-Elizalde D, González-Martínez MR, Licea-Navarro AF, González-González GM, Aroch-Calderón A. Molecular identification of *Coccidioides* isolates from Mexican patients. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1111: 326-335.
 30. Chao A. Species richness estimation. En: Balakrishnan N, Read CB, Vidakovic B (eds). *Encyclopedia of Statistical Sciences*. New York, Wiley 2005. Pg. 7909-7916.
 31. Clemons KV, Capilla J, Stevens DA. Experimental animal models of coccidioidomycosis. *ANYAS* 2007; 1111: 208-224.
 32. Clyde LH, Kollias KV, Roelke ME, Wells MR. Disseminated coccidioidomycosis in a western cougar (*Felis concolor*). *J Wildl Dis* 1990; 21: 200-205.
 33. Colwell, R. K. 2009. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 8.2 <http://purl.oclc.org/estimates>
<http://viceroy.eeb.uconn.edu/EstimateS>
 34. Collins MJ, Nielsen-Marsh CM, Hiller J, Smith CI, Roberts JP, Prigodich RV, Wess TJ, Csapò J, Millard AR, Turner-Walker G. The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry* 2002; 44: 383-394.
 35. Colwell RK, Coddington JA. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation.

- Phil Trans R Soc London B. 1994; 345: 101-118.
36. Comrie AC, 2005. Climate factors influencing Coccidioidomycosis seasonality and outbreaks. *Environmental Health Perspectives* **113**: 688–692.
 37. Comrie AC, Glueck M Model sensitivity for assessing climatologic effects on the risk of acquiring Coccidioidomycosis. 2007. *An NY Acad Sci* 2007; 1111: 83-95.
 38. Converse JL, Reed RE. Experimental Epidemiology of Coccidioidomycosis. *Bacteriol Rev* 1966; 33: 678-694.
 39. Cornell LH, Orborn KG, Antrim JE, G SJ. Coccidioidomycosis in California Sea Otter (*Enhydra lutris*). *J Wildl Dis* 1979; 15: 373-378.
 40. de Macêdo RCL, Rosado AS, da Mota FF, Cavalcante MAS, Eulálio KD, Filho AD, Martins LMS, Lazéra MS Wanke B. Molecular identification of *Coccidioides* spp. in Suelo samples from Brazil. *BMC Microbiology* 2011, 11: 108.
<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/108>
 41. Desmet PG, Cowling RM. Patch rodents: a key process in the revegetation of phytotoxic arid Suelos creation by fossorial J *Arid Environments* 1999; 43: 35–45.
 42. Diffenbaugh NS, Giorgi F, Pal JS. Climate change hotspots in the United States. *Geoph Res Lett* 2008; 35.
 43. Egeberg RO, Elconin AE, Egeberg MC. Effect of salinity and temperature on *Coccidioides immitis* and three antagonistic Suelo saprophytes. *J Bacteriol* 1964; 88: 473-476.
 44. Egeberg RO, Ely AF *Coccidioides immitis* in the Suelo of the southern San Joaquin Valley. *Am J Med Sci* 1956; 23: 151-154.
 45. Egeberg RO, Elconin A, Egeberg MC. *C. immitis*--vicissitudes of its environment. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 1966; 77: 20–24.
 46. Emmons CW: Isolation of *Coccidioides* from Suelo and rodents. *Pub Health Rep* 1942, 57:109-111.
 47. Emmons CW, Ashburn LL. The isolation of *Haplosporangium parvum* n. sp and *Coccidioides immitis* from wild rodents. Their relationship to coccidioidomycosis. 1942; 57:1715-1727.
 48. Engelthaler DM, Chiller T, Schupp JA, Colvin J, Beckstrom-Sternberg SM, Driebe EM, Moses T, Tembe W, Sinari S, Beckstrom-Sternberg JS, Christoforides A, Pearson JV, Carpten J, Keim P, Peterson A, Terashita D, Balajee SA. Next-generation sequencing of *Coccidioides immitis* isolated during cluster investigation. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 227-232.
 49. English PB, Sinclair AH, Ross Z, Anderson H, Boothe V, Davis C, Ebi K, Kagey B, Malecki K, Shultz R, Simms E. Environmental health indicators of climate change for the United States: Findings from the state environmental health indicator collaborative. *Environ Health Persp* 2009 ; 117:1673-1681.
 50. Escalante AE. Ecología molecular en el estudio de comunidades bacterianas. En: *Ecología molecular*. Eguiarte LE, Souza V, Aguirre X. (Compiladores). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales/Instituto Nacional de Ecología/Universidad Nacional Autónoma de México/Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad 2007 pg. 582.
 51. Eulálio KD, de Macedo RL, Cavalcanti MA, Martins LM, Lazéra MS, Wanke B. *Coccidioides immitis* isolated from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the state of Piauí, northeast Brazil. *Mycopathologia*. 2000; 149: 57-61.
 52. Fauquier D, Gulland F, Trupkiewicz J, Spraker T, Lowenstine L. Coccidioidomycosis in free living California Sea Lions (*Zalophus californianus*) in

- Central California. J Wildl Dis 1996; 32:707-10.
53. Fierer N, Breitbart M, Nulton J, Salamon P, Lozupone C, Jones R, Robeson M, Edwards RA, Felts B, Rayhawk S, Knight R, Rohwer F, Jackson RB. Metagenomic and Small-Subunit rRNA Analyses Reveal the Genetic Diversity of Bacteria, Archaea, Fungi, and Viruses in Suelo. Appl Environ Microbiol 2007; 73: 7059-7066.
54. Fisher MC, Koenig GL, White TJ, San-Blas G, Negroni R, Gutiérrez-Alvarez I, Wanke B, Taylor JW. Biogeographic range expansion into South America by *Coccidioides immitis* mirrors New World patterns of human migration PNAS 2001; 98: 4558-4562.
55. Fisher MC, Koenig GL, White TJ, Taylor JW. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. Mycologia 2002; 94: 73-84.
56. Fisher F, Bultman M, Johnson S, Pappagianis D, Zaborsky E. *Coccidioides* niches and habitat parameters, Southwestern U.S. - a matter of scale. Ann NY Acad Sci 2007; 1111: 47-72.
57. Flaherman VJ, Hector R, Rutherford GW. Estimating severe Coccidioidomycosis in California. Emerg Infect Dis 2008; 13: 1087-1090.
58. Franco López J, de la Cruz Aguero A, Cruz Gómez A, Rocha Ramírez A, Navarrete Salgado N, Flores Martínez G, Kato Miranda E, Sánchez Colon S, Abarca Arenas LG, Bedia Sánchez CM. Manual de Ecología. Editorial Trillas 1985.
59. Frosco M, Chase T, Macmillan JD. Purification and properties of the elastase from *Aspergillus fumigatus*. Infection and Immunity 1992; 60: 728-734.
60. García E. Distribución de la precipitación en la República Mexicana. Investigaciones Geográficas. Investigaciones Geográficas. Boletín del Instituto de Geografía 2003; 50: 67-76.
61. Giltner LT. Occurrence of coccidioidial granuloma (coccidioimycosis) in cattle. J Agric Res 1918, 14: 533-541.
62. Gamble JL, Ebi KL, Grambsch AE, Sussman FG, Wilbanks TJ. Analyses of the effects of global change on human health and welfare and human systems. Climate Change Science Program, Environmental Protection Agency. Washington, DC. 2008.
63. Gonzalez Ochoa A. Coccidioidomycosis in Mexico. En: Ajello L (ed.) Proceedings of the Symposium on Coccidioidomycosis. 1967. University of Arizona Press, Phoenix, Arizona.
64. Graupmann-Kuzma A, Valentine BA, Shubitz LF, Dial SM, Watrous B, Tornquist SJ. Coccidioidomycosis in dogs and cats: a review. J Am Anim Hosp Assoc 2008; 44: 226-235.
65. Green JL, Holmes AJ, Westoby M, Oliver I, Briscoe D, Dangerfield M, Gillings M, Beattie AJ. Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. Nature 2004; 432: 747-750.
66. Green SJ, Leigh MB, Neufeld JD. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis. En: Timmis KN. (Ed) Microbiology of Hydrocarbons, Oils, Lipids, and Derived Compounds. Springer (Heidelberg, Germany) 2009. Pg. 4137-4158.
67. Greene RT, Troy GC. Coccidioidomycosis in 48 cats: a retrospective study (1984-1993) J Vet Intern Med 1995; 9: 86-91.
68. Greene DR, Koenig G, Fisher MC, Taylor J. Suelo isolation and molecular identification of *Coccidioides immitis*. Mycologia 2000; 92: 406-410.

69. Greer A, Ng V, Fisman D. Climate change and infectious diseases in North America: The road ahead. *Can Med Assoc J* 2008; 178: 715-722.
70. Grenot C, Serrano V. Ecological organization of small mammal communities at the Bolsom of Mapimi. En Barnault R, Halffner G, Ecology of Chihuahua Desert. Instituto de Ecologia Mexico 1981.
71. Griffin DM. Ecology of Suelo fungi. Syracuse University Press 1972
72. Guarro J, Gené J, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. *Clin Micro Rev* 1999; 12: 454-500.
73. Gunde-Cimerman N, Frisvad JC, Zalar P, Plemenitas A. Halotolerant and halophilic fungi. En: Deshmukh SK, Rai MK. Biodiversity of fungi. Their role in Human Life. Science Publisehr Inc 2005. pg 70-127.
74. Hackett CJ. Microscopical focal destruction (tunnels) in exhumed human bones. *Med Sci Law* 1981; 21:243-265.
75. Hall, E.R., 1981. The mammals of North America. Vol. I, second ed. John Wiley & Sons, New York, New York.
76. Harrison WR, Merbs CF, Leathers CR. Evidence of coccidioidomycosis in the skeleton of an ancient Arizona Indian. *J Infect Dis* 1991; 164, 436-437.
77. Hawkins LK. Burrows of kangaroo rats are hotspots for desert Suelo fungi. *J Arid Enviroment* 1996; 32: 239-249.
78. Hector RF, Laniado-Laborin R. Coccidioidomycosis - A fungal disease of the Americas. *PLoS Medicine* 2005; 2: e2.
79. Helmick KE, Koplos P, Raymond J. Disseminated coccidioidomycosis in a captive Indochinese tiger (*Panthera tigris corbetti*) with chronic renal disease. *J Zoo Wildl Med* 2006; 37: 542-544.
80. Herrera J, Kramer CL, Reichman OJ. Patterns of Fungal Communities That Inhabit Rodent Food Stores: Effect of Substrate and Infection Time. *Mycologia* 1997; 89: 846-857.
81. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüssler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N. A higher level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* 2007; 111: 509-547.
82. Higgins JC, Pusterla N, Pappagianis D. Comparison of *Coccidioides immitis* serological antibody titles between forms of clinical coccidioidomycosis in horses. *Vet J* 2005; 173: 120-125.
83. Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. Virulence Factors of Medically Important Fungi. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 469-488.
84. Hood HB; Galgiani J. Treatment of a male lowland gorilla for coccidioidomycosis with ketoconazole at the Phoenix Zoo. Proceedings of the 4th International Conference on Coccidioidomycosis. Einstein HE, Catanzaro A. (eds.).- Washington, D.C. (USA): National Foundation for Infectious Diseases, 1985.- ISBN 09-614-

52005. pp. 288-291.
85. Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannan JM. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 4399-4406.
 86. Hung CY, Seshan KR, Yu JJ, Schaller R, Xue J, Basrur V, Gardner MJ, Cole GT. A Metalloproteinase of *Coccidioides posadasii* Contributes to Evasion of Host Detection *Infect Immun* 2005; 73: 6689-6703.
 87. Huppert M. Recent developments in coccidioidomycosis. *Rev Med Vet Mycol* 1968; 6: 279-94.
 88. Huppert M, Sun SH, Harrison JL. Morphogenesis throughout saprobic and parasitic cycles of *Coccidioides immitis*. *Mycopathologia*. 1982; 78:107-122.
 89. Instituto Nacional de investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) - Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), (1995). "Edafología" escala 1:250,000 y 1:1,000,000.
 90. IPCC-AR4, 2007, Climate Change 2007: The physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. In Solomon et al. (eds.). Cambridge University Press, UK, NY, 996 pp.
 91. Jaeger EC. The California Desert. 4th edition. Stanford University Press 1965.
 92. James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung GH, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schüssler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossman AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lücking R, Büdel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin DJ, Spatafora JW, Vilgalys R. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 2006; 443: 818-822.
 93. Jennings DH, Lysec G. Fungal Biology. Understanding the fungal life style. 2nd ed. Bios Scientific Publisher Limited 1999.
 94. Jessup DA, Kock N, Berbach N. Coccidioidomycosis in a desert bighorn sheep (*Ovis canadensis nelsoni*) from California. *J Zoo Wildl Med* 1989; 20: 471-473.
 95. Jin V, Evans R. Elevated CO₂ increases microbial carbon substrate use and nitrogen cycling in Mojave Desert Suelos. *Global Change Biology* 2007; 13: 452-465.
 96. Johnson JH, Wolf AM, Edwards JF, Walker MA, Homco L, Jensen JM, Simpson BR, Taliaferro L. Disseminated coccidioidomycosis in a mandrill baboon (*Mandrillus sphinx*): a case report. *J Zoo Wildl Med* 1998; 29: 208-213.
 97. Kenagy GJ, Bartholomew GA. Seasonal Reproductive Patterns in Five Coexisting California Desert Rodent Species. *Ecological Monographs*:1985 Vol. 55, No. 4, pp. 371-397.
 98. Kendall JM, Rygielwicz PT. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology* 2005, 5:28.
 99. Kendrick B. The Fifth Kingdom Third edition, Focus Publishing 2000.
 100. Kennedy N, Clipson N. Fingerprinting the fungal community. *Mycologist* 2003;

- 17: 158-164.
101. Kogan TV, Jadoun J, Mittelman L, Hirschberg K, Osherov N. Involvement of secreted *Aspergillus fumigatus* Proteases in Disruption of the Actin Fiber Cytoskeleton and Loss of Focal Adhesion Sites in Infected A549 Lung Pneumocytes JID 2004;189: 1965-1973.
 102. Kolivras KN, Comrie AC.. Modeling Valley Fever (*Coccidioidomycosis*) incidence on the basis of climate conditions. Int J Biometeorol 2003; 47: 87-101.
 103. Kolivras KN, Comrie AC. Climate and infectious disease in the Southwestern United States. Prog Phys Geo 2004; 28: 387-398.
 104. Komatsu K, Vaz V, McRill C, Colman T, Comrie A, Sigel K, Clark T, Phelan M, Hajjeh R, Park B. Increase in *Coccidioidomycosis* - Arizona, 1998 – 2001. Morb Mortal Wkly Rep 2003; 52: 109-112.
 105. Koufopanou V, Burt A, Taylor JW. Population Biology Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 5478–5482.
 106. Krutzsch PH, Watson RH. Isolation of *Coccidioides immitis* from bat guano and preliminary findings on laboratory infectivity of bats with *Coccidioides immitis*. Life Sci 1978; 22: 679-684.
 107. Kuske CR, Banton KL, Adorada DL, Stark PC, Hill KK, Jackson PJ Small-scale DNA sample preparation method for field PCR: detection of microbial cells and spores in soil. Appl Environ Microbiol 1998; 64: 2463–2472.
 108. Laabs DM, Allaback MI, Mitchell DR. Population dynamics and habitat characteristics of the Mojave desert form of the San Joaquin pocket mouse at Edwards Air Force Base, California. Air Force Flight Test Center Environmental Management Office Edwards AFB, California 1997.
 109. Lacy GH, Swatek FE. Suelo ecology of *Coccidioides immitis* at Amerindian middens in California Appl Microbiol 1974; 27: 379-388.
 110. Lacy GH, Swatek FE. Suelo Ecology of *Coccidioides immitis* at Amerindian Middens in California. Appl Microbiol 1974; 27: 379–388.
 111. Laniado-Laborín R, Cardenas Moreno RP, Álvarez Cerro M. Tijuana zona endémica de infección por *Coccidioides immitis*. Salud Pub Mex 1991; 33: 235-239.
 112. Lauer A, Baal JC, Verma M, Chen JM. Detection of *Coccidioides immitis* in Kern County, California by multiplex PCR. Mycologia 2011 en prensa. <http://www.mycologia.org/content/early/2011/09/20/11-127.abstract>
 113. Leger RJ, Screen SE, Shams-Pirzadeh B. Lack of host specialization in *Aspergillus flavus*. Appl Environ Microbiol 2000; 66: 320–324.
 114. Linghtner J. San Diego county native plants. San Diego Flora, 2006. pp. 320.
 115. Lochmiller R, Hellgren E, Hannon P, Grant W, Robinson R. *Coccidioidomycosis* (*Coccidioides immitis*) in the Collared Peccary (*Tayassu tajacu*: *Tayassuidae*) in Texas. J Wildl Dis 1985; 21: 305-309.
 116. Luna-Isaac JA, Muñiz-Salazar R, Baptista-Rosas RC, Castañón-González LR, Contreras-Pérez C, Bazán-Mora E, González GM, González MR. Genetic analysis of the fungal pathogen *Coccidioides posadasii* and *C. immitis* in Mexico. 2011. En prensa.
 117. Lutzoni F, Kauff F, Cox CJ, McLaughlin D, Celio G, Dentinger B, Padamsee M, Hibbett D, James TY, Baloch E, Grube M, Reeb V, Hofstetter V, Schoch C, Arnold AE, Miadlikowska J, Spatafora J, Johnson D, Hambleton S, Crockett M,

- Shoemaker R, Sung GH, Lücking R, Lumbsch T, O'Donnell K, Binder M, Diederich P, Ertz D, Gueidan C, Hansen K, Harris RC, Hosaka K, Lim YW, Matheny B, Nishida H, Pfister D, Rogers J, Rossman A, Schmitt I, Sipman H, Stone J, Sugiyama J, Yahr R, Vilgalys R. Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *Amer J Bot* 2004; 91: 1446-1480.
118. Maddy KT. Ecological factors of the geographic distribution of *Coccidioides immitis*. *J Am Vet Med Assoc* 1957; 130: 475-476.
119. Maddy KT. The geographic distribution of *Coccidioides immitis* and possible ecologic implications. *Arizona Med* 1958; 15: 178-188.
120. Maddy KT. Observations on *Coccidioides immitis* found growing naturally in Suelo. *Ariz Med* 1965; 22: 281-288.
121. Maddy KT, Coccozza J. The probable distribution of *Coccidioides* in Mexico. *Bol OSP PAHO* 1964; 57: 44-54.
122. Maddy KT, Crecelius HG, Cornell RG. Distribution of *Coccidioides immitis* determined by testing cattle. *Public Health Reports* 1960; 75: 955-962.
123. Maddy KT, Crecelius HG. Establishment of *Coccidioides immitis* in negative Suelo following burial of infected animals and animal tissues. In: Ajello L, editor. *Coccidioidomycosis. Papers from the Second Symposium on Coccidioidomycosis*. Tuscon (AZ): University of Arizona Press; 1967. p. 309-312.
124. Mandel MA, Barker BM, Kroken S, Rounsley SD, Orbach MJ. Genomic and population analyses of the mating type loci in *Coccidioides* species reveal evidence for sexual reproduction and gene acquisition. *Eukaryotic Cell* 2007; 6: 1189-1199.
125. Mantovani A. The role of animals in the epidemiology of the mycoses. *Mycopathologia*. 1978; 65:61-66.
126. Marchiafava V, Bonnucci E Ascenzi A. Fungal osteoclasia: a model of dead bone resorption. *Calcified Tissue International* 1974; 14: 195-210.
127. Mares MA. Small mammals and Creosote Bush. Patterns of richness. En Campos-Lopez R, Mabry TJ, Fernandez-Tavizon S. *Larrea CONACYT, Mexico*, 2ª edición 1981; pg 57-94.
128. Martin KJ, Rygiewicz PT. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology* 2005; 5: 28.
129. May LA, Smiley B, Schmidt MG. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Can J Microbiol* 200;47: 829-841.
130. Millar BCh, Jiru X, Walker MJ, Evans JP, Moore JE. False Identification of *Coccidioides immitis*: Do Molecular Methods Always Get It Right? *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5778-5780.
131. Miller DN, Bryant JE, Madsen EL, Ghiorse WC. Evaluation and Optimization of DNA Extraction and Purification Procedures for Suelo and Sediment Samples. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4715-4724.
132. Minnich RA, Franco Vizcaino E, Dezzani RJ. The El Niño/Southern oscillation and precipitation variability in Baja California, México. *Atmósfera* 2000; 13: 1-20.
133. Miranda Reyes F, Reyes Coca S, Espinoza JG, García López J. Climatología de la región noroeste de México (Baja California, Baja California Sur, Sonora y Sinaloa), *Parte II.-Temperatura: series de tiempo del valor total mensual y estadísticas del año climatológico*, Reporte técnico CIOFT9108 Centro de Investigación científica y de educación superior de Ensenada, 1991. México. pp.160.

134. Monod M, Paris S, Sanglard D, Jaton-Ogay K, Bille J, Latge JP, Isolation and characterization of a secreted metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity* 1993; 61: 4099-4104.
135. Moore JC, Berlow EL, Coleman DC, et al. Detritus, trophic dynamics and biodiversity. *Ecol Lett* 2004; 7: 584–600.
136. Morrow W. Holocene coccidioidomycosis: Valley Fever in early Holocene bison (*Bison antiquus*). *Mycologia*. 2006; 98: 669-677.
137. Mueller GM, Bills GF, Foster MS. Biodiversity of fungi. Elsevier Academic Press 2004.
138. Nakasone KK, Gilbertson RL. Cultural and other studies of fungi that decay Ocotillo in Arizona. *Mycologia* 1978; 70: 266-299.
139. Nikolcheva LG, Bourque T, Bärlocher F. Fungal diversity during initial stages of leaf decomposition in a stream. *Mycological Research* 2005; 109: 246–225.
140. Pappagianis D, J. Vanderlip and ,Bessie May. Coccidioidomycosis naturally acquired by a monkey, *Cercocebus atys*, in Davis, California. *Medical Mycology*, 1973; 11: 52-55.
141. Pappagianis D. Epidemiology of coccidioidomycosis. En *Current topics in medical mycology*, M. R. McGinnis (ed). Springer-Verlag 1988, New York, pp. 199-237.
142. Parente JA, Costa M, Pereira M, de Almeida-Soares CM. Transcriptome overview of *Paracoccidioides brasiliensis* proteases *Genet Mol Res* 2005; 4: 358-371.
143. Park BJ, Sigel K, Vaz V, Komatsu K, McRill C, Phelan M, Colman T, Comrie AC, Warnock DW, Galgiani JN, Hajjeh RA. An epidemic of Coccidioidomycosis in Arizona associated with climatic changes, 1998–2001. *J Infect Dis* 2005; 191: 1981-1987.
144. Patz JA, Kovats RS. Hotspots in climate change and human health. *Brit Med J* 2002; 325:1094-1098.
145. Peinado M, Alcaraz F, Delgadillo J, Aguado I Fitogeografía de la península de Baja California, México. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 1994; 51: 255-277.
146. Piepenbrink H. Two examples of biogenous dead bone decomposition and their consequences for taphonomic interpretation. *J Archeol Scie* 1986; 13:417-430.
147. Poopatanapong A. Management of small mammals in a relict grassland in California's central valley. *Trans West Sect Wildl Soc* 1999; 35: 15-21.
148. Porras-Alfaro A, Herrera J, Natvig DO, Lipinski K, Sinsabaugh RL. Diversity and distribution of Suelo fungal communities in a semiarid grassland. *Mycologia* 2011; 103: 10–21.
149. Price, M.V., Endo, P.R., 1989. Estimating the distribution and abundance of a cryptic species, *Dipodomys stephensi* (*Rodentia: Heteromyidae*), and implications for management. *Conserv Biol* 3, 293–301.
150. Priego-Santander AG, Isunza-Vera E, Luna-González N y Pérez-Damián JL. Tipos Morfométricos del Relieve de México, escala 1:250 000. Dirección General de Investigaciones en Ordenamiento Ecológico y Conservación de Ecosistemas. Instituto Nacional de Ecología SEMARNAT 2003.
http://mapas.ine.gob.mx/est_vertical.htm
151. Quesada-Moraga E, Navas-Cortes JA, Maranhao EAA, Ortiz-Urquiza A, Santiago-Alvarez C. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycol Res* 2007; 111: 947–966.

152. Qiu X, Wu L, Huang H, McDonel PE, Palumbo AV, Tiedje JM, Zhou J. Evaluation of PCR-Generated Chimeras, Mutations, and Heteroduplexes with 16S rRNA Gene-Based Cloning. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 880–887.
153. Rao MB, Tanksale AP, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 597–635.
154. Rapley WA, Long JR. Coccidioidomycosis in a baboon recently imported from California. *Can Vet J* 1974; 15: 39-41.
155. Reed RE, Converse JL. The seasonal incidence of canine coccidioidomycosis. *Am J Vet Res* 1966; 27: 1027-1030.
156. Reed RE, Mikagi G, Cummings JA. Coccidioidomycosis in a California sea lion (*Zalophus californianus*). *J Wildl Dis* 1976; 12: 372-375.
157. Reed RE, Bicknell EJ, Hood HB. A thirty year record of coccidioidomycosis in exotic pets and zoo animals in Arizona. In *Coccidioidomycosis*. H. E. Einstein and A. Catanzaro (eds.). National Institute for Infectious Diseases 1985, Washington D.C., pp. 275–281.
158. Reidarson TH, Griner LA, Pappagianis D, McBain J. Coccidioidomycosis in a bottlenose dolphin. *J Wildl Dis* 1998; 34: 629-631.
159. Reinhard KJ, Vaughn MB Jr. Coprolite Analysis: A Biological Perspective on Archaeology. En *Papers in Natural Resources*, University of Nebraska - Lincoln 1992
160. Reinhard KJ. Recovery of Helminths from Prehistoric Feces: The Cultural Ecology of Ancient Parasitism. M.S. thesis, Department of Biology, Northern Arizona University 1985.
161. Rementeria A, López-Molina N, Ludwig A, Vivanco AB, Bikandi J, Pontón J, Garaizar J. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence *Rev Iberoam Micol* 2005; 22: 1-23.
162. Resnick S, Pappagianis D, McKerrow JH. Proteinase production by the parasitic cycle of the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Infect Immun* 1987; 55:2807–2815.
163. Reyes Coca S, Miranda Reyes F, García López J. Climatología de la región noroeste de México (Baja California, Baja California Sur, Sonora y Sinaloa, *Parte I*.-Precipitación: series de tiempo del valor total mensual y estadísticas del año climatológico, Reporte técnico CIOFOT9001 Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, México. 1990. pp.170.
164. Reyes Coca S, Troncoso Gaytán R. Modulación multidecenal de la lluvia invernal en el noroeste de Baja California. *Ciencias Marinas* 2004; 30: 99-108.
165. Ricklefs RE, Miller GL. *Ecology*. W.H. Freeman and Company, New York, N.Y. 2000.
166. Roberts NC. *Baja California Plant Guide*. Natural History Publishing Company. La Jolla, California, 1989, pp 309.
167. Romero Olivares AL. Caracterización de la biodiversidad fúngica de ecosistemas áridos de Baja California, Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Ecología Molecular y Biotecnología, Universidad Autónoma de Baja California, México 2011.
168. Rose RE, Miller JG. Some Sampling Variations in Suelo Fungal Numbers 1954 *J Gen Microbiol* 1954; 10: 1-10.
169. Rosenberg DP, Gleiser CA, Carey KD. Spinal coccidioidomycosis in a baboon. *J Am Vet Med Assoc* 1984; 185: 1379-1381.

170. Schenck S, Chase T, Rosenzweig WD, Pramer D. Collagenase production by nematode-trapping fungi. *Appl Environ Microbiol* 1980; 40: 567-570.
171. Schloss PD, Handelsman J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microb* 2005; 71: 1501–1506.
172. Seager, R., M. Ting, I. Held, Y. Kushnir, J. Lu, G. Vecchi, H-P Huang, N. Harnik, A. Leetmaa, N-C. Lau, C. Li, J. Velez, and N. Naik. Model projections on an imminent transition to a more arid climate in the Southwestern North America. *Scienceexpress* 2007; 10.1126, 4 pp.
173. Sharpton TJ, Stajich JE, Rounsley SD, Gardner MJ, Wortman JR, Jordar VS, Maiti R, Kodira CD, Neafsey DE, Zeng Q, Hung CY, McMahan C, Muszewska A, Grynberg M, Mandel MA, Kellner EM, Barker BM, Galgiani JN, Orbach MJ, Kirkland TN, Cole GT, Henn MR, Birren BW, Taylor JW. Comparative genomic analyses of the human fungal pathogens *Coccidioides* and their relatives. *Genome Res* 2009; 19: 1722-1731.
174. Smit E, Leeflang P, Glandorf B, van Elsas JD, Wernars K. Analysis of Fungal Diversity in the Wheat Rhizosphere by Sequencing of Cloned PCR-Amplified Genes Encoding 18S rRNA and Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 2614–2621.
175. Sorensen RH. Survival characteristics of diphasic *Coccidioides immitis* exposed to the rigors of a simulated natural environment *Proc. 2nd Coccidioidomycosis symp* University of Arizona Press. Tucson 1967, pp 313-317.
176. Sorensen KN, Clemons KV, Stevens DA. Murine models of blastomycosis, coccidioidomycosis, and histoplasmosis. *Mycopathologia*. 1999; 146: 53-65.
177. Sotomayor C, Madrid GS, Torres EA. Aislamiento de *coccidioides immitis* del suelo de Hermosillo, Sonora México. *Rev Latinoamericana Microbiol* 1960; 3-4:237-238.
178. States JS. Suelo fungi of cool desert plant communities in northern Arizona and southern Utah. *J Az Nev Acad Sci* 1978; 13: 13-17.
179. Stewart RA, Meyer KF: Isolation of *Coccidioides immitis* (Stiles) from the Suelo. *Proc Soc Exp Biol Med* 1932, 29:937-938.
180. Stiles GW, Davis CL. Coccidioidal granuloma (coccidioidomycosis). *J Am Med Assoc* 1942; 119: 765-769.
181. Stiles GW, Shaian MS, Davis CL. Coccidioidal granuloma in cattle in Colorado. *J Am Vet Med Assoc* 1933; 82: 928-930.
182. Straub M, Trautman RJ, Reed RE, Schwars J. Canine coccidioidomycosis in Arizona. *Arch Pathol* 1961; 72: 674-687.
183. Suryanarayanan TS, Hawksworth DL. Fungi from little explored and extreme habitats. En: Deshmukh SK, Rai MK. Biodiversity of fungi. Their role in Human Life. Science Publisher Inc 2005. pg 34-48.
184. Suryanarayanan TS, Wittlinger S, Faeth SH. Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. *Mycological Research* 2005; 109:635-639.
185. Sutton DB, Harmon NP. Fundamentos de ecología. Editorial Limusa 1995 pp 201-202.
186. Swatek FE. Ecology of *Coccidioides immitis*. *Mycopathol Mycol App* 1970; 40: 3-12.
187. Swatek FE, Omieczynski DT, Plunkett OA. Coccidioidomycosis in California. En: 2nd Symposium on Coccidioidomycosis Ajello L. The University of Arizona Press.

- 1967: 255-264.
188. Swatek FE, Omieczynski DT. Isolation and Identification of *Coccidioides Immitis* from Natural Sources. *Mycopathologia et Mycologia applicata* 1970; 41: 155-166.
189. Tabor JA, Orbach M, Shubitz L, Hutchinson C, O'Rourke MK, Lebowitz M, 2002. Final report: Disease prevention through detection of *Coccidioides immitis* in the environment (Project TS 325). Arizona College of Public Health, College of Agriculture and Life Sciences, & Valley Fever Center for Excellence, University of Arizona, Tucson.
190. Tabor JA. Epidemiological study of coccidioidomycosis in greater Tucson, Arizona. PhD Dissertation Mel and Enid Zuckerman College of Public Health. The University of Arizona 2009
191. Takada Hoshino Y, Morimoto S. Soil clone library analyses to evaluate specificity and selectivity of PCR primers targeting fungal 18S rDNA for denaturing-gradient gel electrophoresis (DGGE). *Microbes Environ* 2010; 25: 281-287.
192. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 2011; 28: 2731–2739. 2011
193. Tarcha EJ, Basrur V, Hung CY, Gardner MJ, Cole GT.. A Recombinant Aspartyl Protease of *Coccidioides posadasii* Induces Protection against Pulmonary Coccidioidomycosis in Mice. *Infect Immun* 2006; 74: 516-527.
194. Temple D. A possible case of coccidioidomycosis from the Los Muertos site, Tempe, Arizona. *Int J Ostarcheol* 2006; 16: 316-327.
195. Terio KA, Stalis IH, Allen JL, Stott JL, Worley MB. Coccidioidomycosis in Przewalski's horses (*Equus przewalskii*). *J Zoo Wildl Med* 2003; 34: 339-345.
196. Thomas, J.R., 1975. Distribution, Population Densities, and Home Range Requirements of the Stephens' Kangaroo Rat (*Dipodomys stephensi*). MA thesis, California State Polytechnic University, Pomona, California.
197. Thomas NJ, Pappagianis D, Creekmore LH, Duncan RM. Coccidioidomycosis in southern sea otters. In *Coccidioidomycosis*, Einstein HE, Catanzaro A. (eds.). Proceedings of the 5th International Conference, National Foundation for Infectious Diseases, 1996. Washington D.C., pp. 163-173.
198. Timm KI, Sonn RJ, Hultgren BD. Coccidioidomycosis in a Sonoran gopher snake, *Pituophis melanoleucus affinis*. *J Med Vet Mycol* 1988; 26: 101-104.
199. Unterseher M, Schnittle M, Dormann C, Sickert A. Application of species richness estimators for the assessment of fungal diversity. *FEMS Microbiol Lett* 2008; 282: 205–213.
200. Unterseher M, Jumpponen A, Opik M, Tedersoo L, Moora M, Dormann CF, Schnittler M. Species abundance distributions and richness estimations in fungal metagenomics--lessons learned from community ecology. *Mol Ecol* 2011; 20: 275-285.
201. USFWS (United States Fish and Wildlife Service), 1997. Recovery Plan for the Stephen's Kangaroo Rat (*Dipodomys stephensi*) Portland, Oregon.
202. Vacher C, Vile D, Helion E, Piou D, Desprez-Loustau ML. Distribution of parasitic fungal species richness: influence of climate versus host species diversity. *Divers Distrib* 2008; 14: 786–798.
203. Vale TR, Parker KC, Parker AJ. Terrestrial vertebrates and vegetation structure in the western United States. *The Professional Geographer* 1989; 41: 450.

204. Wang GC Y, Wang Y. The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16s rRNA genes from different bacterial species. *Microbiology* 1996; 142: 1107-1114.
205. Wang GC Y, Wang Y. Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 4645–4650.
206. Welshman MD, Fleming MP, Tribe GW. Coccidiomycosis in a baboon. *Vet Rec* 1981; 108: 62.
207. Wicklow DT, Carroll GE. The fungal community. Its organization and role in the ecosystem. *Micology series volume 2*. Marcel Dekker Inc 1981. pg 218.
208. Zak DR, Tilman D, Parmenter RR, et al. Plant production and Suelo microorganisms in late-successional ecosystems: a continental-scale study. *Ecology* 1994; 75:2333-2347.
209. Zender CS, Talamantes J. Climate control in Valley Fever in Kern County California. *J Biometeorol* 2006; 50:174-182.
210. Zhou Z, Takaya N, Nakamura A, Yamaguchi M, Takeo K, Shoun H. Ammonia Fermentation, a Novel Anoxic Metabolism of Nitrate by Fungi *J Bio Chem* 2002; 277: 1892–1896.

Anexo 2. Preparación de soluciones y reactivos

Solución SSC

NaCl 0.15 M y Citrato de sodio 0.015 M

Amortiguador TAE 50x

Pesar 242 g de TRIS base. Agregar 500 ml de agua destilada, 57.1 ml de ácido acético glacial, 100 ml de EDTA 0.5 mM a pH8 y aforar con agua destilada a 1 L.

Solución desnaturalizante al 0%

Mezclar 50 ml de solución de Acrilamida-Bisacrilamida (37.5:1) al 40%, agregar 2.5 ml de amortiguador TAE 50x, adicionar 5 ml de glicerol y aforar a 250 ml con agua destilada.

Solución desnaturalizante al 100%

Pesar 105.4 g de urea, agregar 50 ml de solución de Acrilamida-Bisacrilamida (37.5:1) al 40%, adicionar 100 ml de formamida y mezclar hasta que disuelva perfectamente la urea. Agregar 5 ml de amortiguador TAE 50x, adicionar 5 ml de glicerol y aforar con agua destilada hasta 250 ml.

Solución 8x

Mezclar 200 ml de etanol al 96% con 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua destilada.

Solución para preservación

Mezclar 250 ml de etanol al 96% con 20 ml de glicerol y 130 ml de agua destilada.

Solución para fijar

Se emplean 50 ml de solución 8x y se agregan 350 ml de agua destilada.

Solución para revelado

Pesar 10 mg NaBH₄ y adicionar 200 ml de NaOH al 1.5%, disolver y agregar 750 µL de formaldehído.

Solución de persulfato de amonio (APS) al 10%

Amortiguador TAE 1x.

Se toman 20 ml de solución TAE50x y se diluye en 1000 ml con agua destilada.

