

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias e Ingeniería

Identificación molecular y microscópica de hongos en suelos antes y después del tratamiento con 1,3 Dicloropropeno y Cloropicrina

Mónica Denisse Romo González

Antonio León, Ph.D. Director de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniera en Agroempresas

Quito, mayo 2014

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias e Ingeniería

HOJA DE APROBACION DE PROYECTO FINAL

Identificación molecular y microscópica de hongos en suelos antes y después del tratamiento con 1,3 Dicloropropeno y Cloropicrina

Mónica Denisse Romo González

Antonio León, Ph.D.
Director de Tesis

.....

Raúl de la Torre, Ph.D.
Miembro de Comité de Tesis

.....

Carlos. Rúales, Msc.
Miembro de Comité de Tesis

.....

Mario Caviedes, Ph.D.
Coordinador de Agroempresas

.....

Ximena Córdova, Ph.D.
Decana Escuela de Ingeniería
Colegio de Ciencias e Ingeniería

.....

Quito, mayo 2014

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

Nombre: **Mónica Denisse Romo González**

C. I.: **050217214-1**

Fecha: **20 de mayo de 2014**

Dedicatoria

Con todo cariño para mi familia, mi madre Albita, y mis hermanos David, Jonathan y Juan que han sido mi apoyo incondicional en buenos y malos momentos, que hicieron todo para que yo pudiera alcanzar mis metas. Este trabajo va especialmente dedicado a mi padre que marco en mi vida enseñanzas y virtudes. Siempre lo recordaré con emoción, alegría y eternamente vivirá en mi corazón.

Agradecimientos

A mi Albita por su sacrificio y dedicación para que nunca me falte nada y brindarme siempre lo que he necesitado, siendo madre y padre a la vez. Mi ejemplo a seguir.

A mi hermano David que más que un hermano ha sido un padre, mi apoyo incondicional. Su familia y él me han enseñado que no existe nada que no se pueda alcanzar si lo haces con perseverancia y sacrificio.

A mi hermano Jonathan por estar siempre que lo necesito, quien con su actitud y sus locuras siempre brinda alegría a la familia.

A Diego por traer más alegría a mi vida y por su ayuda en el diseño de esta tesis.

A mi director de tesis Antonio, por su paciencia y dedicación para que pudiera realizar este trabajo.

A mis profesores Eduardo, Carlos, Mario y Raúl por impartir en mí sus vivencias y conocimientos.

Resumen

En este estudio se analizó la diferencia fenotípica en las poblaciones de hongos antes y después de la aplicación de gas biocida 1-3 Dicloropropeno y Cloropicrina, a dos profundidades del perfil del suelo (0-20 y 20-40 cm). Se evaluó también la efectividad de los medios selectivos para el crecimiento de hongos (Papa dextrosa agar PDA, medio V8 y Czapek CZ) mediante la cuantificación de colonias. Para la identificación de los hongos cultivados se utilizó la técnica estándar (microscopía, coloración y claves taxonómicas) y métodos moleculares a base de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el secuenciamiento del ADN ribosomal. Se encontró que las poblaciones y biodiversidad de hongos en los suelos cambiaron significativamente luego del tratamiento con gas biocida. El medio PDA fue mucho más efectivo para el cultivo de muestras con alta diversidad que los medios V8 y CZ que funcionan solo para ciertas especies. Se extrajo el ADN de 18 muestras, de las cuales 12 rindieron una cantidad suficiente de muestra para la secuenciación. De éstas sólo 5 pudieron ser identificadas con el programa BLAST obteniendo dos especies de hongos: *Trichoderma asperellum* que no es patógeno y más bien es considerado benéfico para la salud de suelo y *Aspergillus niger* que es un hongo saprófito degradador de materia orgánica y en algunos casos es un fito-patógeno. Hubieron discrepancias en la identificación microscópica y molecular entre las 4 muestras seleccionadas donde no se obtuvo ADN lo suficientemente puro para la secuenciación. Se deberían repetir estudios de este tipo para mejorar las técnicas de extracción y amplificación de ADN, así como buscar los cambios de biodiversidad de suelo en suelos agrícolas. .

Abstract

This study analyzed the phenotypic differences in fungi populations before and after the application of 1-3 Dichloropropene and Chloropicrin used as a biocide gas. The treatment was applied at 0-20 and 20-40 cm depth into the soil. The effectiveness of different culture media was also measured (Potato Dextrose Agar PDA, V8 and Czapek CZ) by colony counting. To identify the cultivated fungi we used the standard technique (microscopy, coloration and taxonomic keys) and molecular methods based on the polymerase chain reaction (PCR) and the sequencing of ribosomal DNA. We found that the populations and diversity of fungi changed significantly after the application of the biocide gas. PDA proved to be a more effective media for samples with high diversity of fungi, while V8 and CZ recipes worked only for certain species. We extracted DNA from 18 samples. 12 of those generated enough DNA for sequencing. Only 5 of these samples were identified as a fungus using BLAST. Only two species. *Trichoderma asperellum* which is not a pathogen but rather consider beneficial for soil health, and *Aspergillus niger* which is a saprophytic fungus that degrades organic mater but also acts as a plant pathogen. There were discrepancies between 4 of the fungus identified by standard methods and the molecular method. Another 4 samples could not be used because DNA was not entirely pure. We suggest that this type of studies need to be repeated in order to improve the DNA extraction and amplification techniques and maybe find more specific primer for soil fungi

ÍNDICE DE CONTENIDO

Dedicatoria.....	5
Agradecimiento.....	6
Resumen.....	7
Abstract.....	8
Índice de contenido.....	9
Índice de tablas.....	10
Índice de figuras.....	10
Índice de anexos.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo general.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1 Localización y recolección de muestras de suelo.....	16
3.2 Medios de cultivo para hongos del suelo.....	16
3.2.1 Medio PDA.....	16
3.2.2 Medio V8	16
3.2.3 Medio Czapek.....	17
3.3 Siembra y cuantificación de los hongos.....	17
3.4 Análisis estadístico.....	18
3.5 Aislamiento e identificación microscópica de hongos.....	19
3.6 Extracción de ADN de hongos de suelo.....	19
3.6.1 Visualización del ADN.....	20
3.6.2 Proceso de electroforesis.....	20
3.7 Amplificación de ADN.....	21
3.8 Secuenciación de ADN.....	21
4. RESULTADOS	22
4.1 Siembra y caracterización fenotípica-microscópica.....	22
4.2 Cuantificación y análisis estadístico.....	25
4.3 Extracción y amplificación de ADN.....	29
4.4 Secuenciación de ADN.....	32
5. DISCUSIÓN.....	34
6. CONCLUSIONES.....	40
7. RECOMENDACIONES.....	41
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	42
9. ANEXOS.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Elaboración de buffer de extracción de ADN.....	20
Tabla 2. Detalle de posibles hongos encontrados en las diferentes muestras de suelo analizadas usando microcopia.....	24
Tabla 3. Detalle de valores estadísticos analizados mediante la prueba t para muestras pareadas. Se usaron los datos de la cuantificación de colonias encontradas en muestras de suelo agrícola.....	29
Tabla 4. Valor de análisis de concentraciones con fluorometro QUBIT.....	30
Tabla 5. Concentraciones de contenido de ADN en las muestras analizadas con el espectrofotómetro NanoDrop.....	31
Tabla 6. Resultados de la secuencia de nucleótidos con el programa BLAST.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Descripción gráfica de dilución seriada de muestras de suelo. La metodología implica llegar hasta la séptima dilución.....	18
Figura 2. Aumento de la población de hongos en una muestra de perfil 0-20 cm, antes y después de la aplicación de gas biocida.....	22
Figura 3. Siembra de suelo de una muestra de perfil 20-40 cm, antes y después de la aplicación de gas biocida.....	23
Figura 4. Comparación de población de hongos en los diferentes medios de cultivo antes y después de la aplicación de gas biocida.....	26
Figura 5. Representación de la población y biodiversidad de hongos encontrados en suelo agrícola a profundidad de 0-20 cm.....	27
Figura 6. Representación de la población y biodiversidad de hongos encontrados en suelo agrícola después de la aplicación de gas biocida a profundidad de 0-20 cm.....	27
Figura 7. Representación de la población y biodiversidad de hongos encontrados en suelo agrícola a profundidad de 20-40 cm.....	28
Figura 8. Representación de la población y biodiversidad de hongos encontrados en suelo agrícola después de la aplicación de gas biocida a profundidad 20-40 cm.....	28
Figura 9. Gel de agarosa donde se diferencia banda de ADN proveniente de los hongos aislados de las muestras de suelo.....	30
Figura 10. Visualización de amplicon después de PCR en gel de agarosa. Marcador molecular 100 pb <i>invitrogen</i>	31
Figura 11. Visualización de picos de buena calidad identificados por la intensidad media de cada fila de nucleótidos definidos por el método de Sanger. Este gráfico representa una buena lectura.....	32
Figura 12. Visualización de picos de buena calidad identificados por la intensidad media de cada fila de nucleótidos definidos por el método de Sanger. Este gráfico representa una mala lectura.....	32

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Siembra de suelo muestra 2 sin y con la aplicación de gas biocida a profundidad de 0-20cm.	45
Anexo 2. Siembra de suelo muestra 2 sin y con la aplicación de gas biocida a profundidad de 20-40 cm.....	45
Anexo 3. Siembra de suelo muestra 3 sin y con la aplicación de gas biocida a profundidad de 0-20 cm.	45
Anexo 4. Siembra de suelo muestra 3 sin y con la aplicación de gas biocida a profundidad de 20-40 cm.....	46
Anexo 5. Siembra de suelo muestra 4 sin y con la aplicación de gas biocida a profundidad de 0-20 cm.....	46
Anexo 6. Siembra de suelo muestra 4 sin y con la aplicación de gas biocida a profundidad de 20-40 cm.....	46
Anexo 7. Componentes del mix para PCR.....	47
Anexo 8. Detalle de ciclos, temperaturas y tiempos programados en el termociclador.....	47



1. INTRODUCCIÓN

Ecuador se designa a sí mismo como un país fundamentalmente agrícola ya que los ingresos provenientes de este sector constituyen aproximadamente al 50% de las exportaciones. Los rubros del sector agrícola de importancia internacional son: banano, flores, productos del mar, derivados de café y cacao. En el año 2012, el banano y el plátano contribuyeron con en 29% de las exportaciones agrícolas (FAO, 2005 y Osorio, 2013).

El cambio climático, la forma en que se manejan los cultivos, los organismos hospederos y los métodos de control convencionales, favorecen al crecimiento de plagas y enfermedades que afectan el rendimiento en los cultivos (Thorn, 1997). A diferencia del año 2011, el Ecuador importó 6% de agroquímicos en los primeros cuatro meses del 2012, en relación al mismo periodo del 2011(cerca de 70 millones de dólares). Las importaciones de agroquímicos se distribuyeron en 55% de fungicidas, 25% de herbicidas, 15% de insecticidas y 5% otros no especificados (FAO, 2012). Aparentemente no existen estimaciones generales de las pérdidas causadas por enfermedades en la agricultura, aunque datos estimados para el banano en el año 2012, en base al volumen de exportaciones, estiman que éstas cayeron en un 13% en comparación al año 2011. Estas pérdidas se deben al hongo *Mycosphaerella fijiensis* causante de la enfermedad conocida como Sigatoka negra y que destruye el tejido foliar, afecta al crecimiento de la planta y su producción (Revista el Agro, 2013). Las plagas y enfermedades son las causantes del 40 % de la pérdida de suministro de alimentos a nivel mundial junto con las malezas. En América Latina las enfermedades de cacao, plátano, yuca y papas son las más importantes. Ejemplos de esas enfermedades son en el cacao la Mazorca Negra causada por *Phytophthora*, la Buba de Puntos Verdes por *Fusarium*, la Moniliasis causada por el hongo *Moniliophthora*, y en el banano o plátano el Mal de Panamá causado por *Fusarium oxysporum*. Estas enfermedades cada vez son más comunes y difíciles de controlar por métodos convencionales (FAO, 2014).

El hongo *Rhizoctonia*, es causante de la podredumbre de raíz y damping-off, ocasionando pérdidas importantes en cultivos de hortalizas, algunos frutales, y plántulas; otras enfermedades causadas por este hongo son la costra negra en la papa, el tizón de la vaina en arroz. Otro microorganismo causante de pérdidas económicas importantes es *Pythium*, con la pudrición del tallo en maíz, pudrición radicular en soya, al igual que el hongo

Fusarium, en los cultivos es causante de pudrición del tallo en maíz, la necrosis vascular y marchitez tardía. (Carrillo, 2003 y Besano *et al.*, 2010).

De acuerdo a su forma de vida, los hongos se clasifican como saprófitos (que se alimentan de materia orgánica muerta), parásitos (se alimentan de otros organismos), mutualistas (se relacionan con otro organismo y obtienen beneficio mutuo). Los saprófitos del suelo contribuyen en la descomposición de materia orgánica y aportan a la fertilidad del suelo (Thorn, 1997). Los hongos son morfológicamente y estructuralmente muy parecidos entre sí, pero su composición génica y metabólica difiere entre géneros y especies. Los microorganismos del suelo forman un grupo heterogéneo de seres vivos que es muy abundante, teniendo una característica en común que es la ausencia de clorofila, por lo tanto, no pueden realizar fotosíntesis y deben nutrirse de azúcares provenientes de los exudados de las plantas o la materia orgánica ya presente en el suelo (Arenas, 1993). Los hongos tienen aproximadamente 103 órdenes, 484 familias, 4.979 géneros y unas 80.000 especies descritas. Se divide en cuatro grupos o filos: Ascomycota es el más grande ya que el 99% de las especies conocidas corresponden a este filo. Agrupa una gran cantidad de hongos patógenos de plantas, animales y aquellos que crecen sobre alimentos. Basidiomycota agrupa hongos que tienen aspecto polvoriento o con manchas, crecen sobre diversas estructuras de las plantas y microscópicamente es reconocido por tener las esporas de forma externa. Chytridiomycota agrupa principalmente a hongos acuáticos microscópicos cuyas esporas poseen flagelos para poder moverse en medios líquidos. Finalmente, Zygomycota con hongos que se desarrollan sobre materia orgánica en descomposición. Aquí está el conocido moho negro del pan. Estos hongos son parásitos de las moscas, otros insectos y protistas microscópicos. (Curtis *et al.*, 2000 y Sosa *et al.* 1997).

Por muchos años los agricultores usaron Bromuro de Metilo (BrMe) como método fumigante-biocida para contrarrestar los daños causados por las enfermedades que se encuentran en el suelo. Este producto fue prohibido por el Protocolo de Montreal, acuerdo firmado para proteger y recuperar la capa de ozono. La forma de eliminarlo fue progresiva y hasta la fecha 196 países han logrado con éxito reducir el uso BrMe. De igual manera la FAO, determina que en los alimentos el nivel de tolerancia es de 0.3 mg por kg de BrMe de peso corporal. Fue imprescindible buscar otras alternativas químicas para la desinfección del suelo como Metam Sodio, 1.3 Dicloropropeno, Disulfito de Carbono,

Cloropicrina, Dazomet, e incluso trataron los suelos por inyección de agua caliente o vapor de agua (Colin, 2008).

En Ecuador el producto que se utiliza con frecuencia para la fumigación del suelo es Agrocelhone (nombre comercial), con registros a partir de 1996. Este producto es una alternativa técnica y económicamente viable compuesta de una mezcla de Cloropicrina + 1.3 Dicloropropeno. Las aplicaciones del producto se las hace por goteo o inyección mecánica a profundidad, para después de la aplicación sellar con lámina de polietileno al menos 10 días, eliminando los microorganismos que existan en ese suelo por su efecto fumigante-biocida (Serrano, 2013).

La metodología para determinar la población de microorganismos del suelo es usar medios de cultivo enriquecidos con agar que ayudan al crecimiento de varios hongos hospederos del suelo (Griffin, 1994) y se reporta el número de colonias por gramo de suelo analizado. Los medios usados comúnmente son Papa Dextrosa Agar (PDA), que ayuda al crecimiento de un número grande de especies de hongos, como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Verticillium*, *Metarhizium*, *Beauveria*, *Acremonium*, *Rhizopus*. (Agrios, 1988). El medio V8 está compuesto por extractos de 8 vegetales: tomate, zanahoria, apio, remolacha, perejil, lechuga, puerro y espinaca además de sal, vitamina C y ácido cítrico, los hongos que crecen en este medio son *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhynchosporium* (Sosa, et. al, 1997). Mientras que el medio Czapek (CZ), utiliza nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno y los microorganismos que se desarrollan bien en este medio son *Aspergillus* y *Penicillium* (Echandi, 1967).

Uno de los métodos más confiables para la identificación de microorganismos se basa en el análisis del material genético (ADN). En resumen, una vez obtenido el aislamiento del hongo, se realiza la extracción de ADN rompiendo las estructuras de la membrana y pared de la célula. Luego se utiliza la técnica denominada Reacción en Cadena de la Polimerasa por sus siglas en inglés (PCR) que permite la amplificación de un fragmento de ADN específico que se encuentra en el ADN molde. El segmento amplificado debe ser la región 18s ribosomal o segmento ITS (Internal Transcribe Spacers), que pertenece al grupo de organismos eucariotas y forma parte de una subunidad menor siendo componente de la subunidad ribosómica eucariota 40S (Herveg et al., 2006). Posteriormente, el fragmento amplificado por la PCR o amplicon, es secuenciado para obtener el orden de las bases y así

determinar mediante bioinformática el género y la especie del microorganismo analizado (Herveg et. al. 2006).

En este contexto, es importante poder aplicar nuevas metodologías para identificar qué especies están presentes en el suelo y si los biocidas que estamos ocupando tienen o no efecto sobre dichas especies. En un país como Ecuador que ha sido reconocido por su altísima biodiversidad, es de esperarse que el suelo también sea rico en especies de microorganismos. Si no podemos identificar los hongos de manera precisa, es decir hasta el nivel de especie, es posible que estemos matando hongos cuya presencia no sea patógena o lo inverso, es decir que matamos a los benéficos y sobreviven los patógenos. Se vuelve imperioso por lo tanto, investigar sobre la utilidad local y aplicabilidad de técnicas modernas de identificación.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar los cambios en diversidad de hongos antes y después de la aplicación conjunta de 1,3 Dicloropropeno y Cloropicrina al suelo como tratamiento preventivo a la siembra mediante unidades formadoras de colonias, microscopia y en base de técnicas moleculares.

2.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la efectividad de medios para la siembra *in vitro* de hongos provenientes de muestras de suelo.
2. Determinar la eficiencia del 1,3 Dicloropropeno y Cloropicrina mediante cuantificación de la población de hongos en las muestras de suelo antes y después de la aplicación del gas biocida.
3. Identificar de forma fenotípica las diferentes poblaciones de hongos existentes antes y después de la aplicación de gas biocida.
4. Realizar la extracción y amplificación del ADN de los hongos recolectados.
5. Identificar mediante técnicas moleculares la región ITS de los hongos aislados de las muestras recolectadas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización y recolección de muestras de suelo

El muestreo de suelo se realizó en la Hacienda La Victoria, finca "Latitud 0° Farms" ubicada en Guayllabamba, Panamericana Norte Km 21 en Quito-Pichincha-Ecuador. Para la recolección se tomaron muestras aleatorias en zig-zag, obteniendo de cada punto una submuestra de un lote de 5000 m². Se recolectaron 25 submuestras a cada profundidad (0-20 y 20-40), que se mezclaron entre sí formando una muestra compuesta. De esta muestra compuesta se colectaron 4 submuestras de cada profundidad. Se realizó el mismo proceso de recolección después de la aplicación del gas biocida. Al final se obtuvieron 16 muestras. Cada una fue empacada en una bolsa plástica y transportada en forma aséptica al laboratorio donde permanecieron en refrigeración hasta su análisis (Carillo *et al.*, 1995).

3.2. Medios de cultivo para aislamiento de hongos del suelo

3.2.1 Medio PDA

Para la preparación del medio papa dextrosa agar (PDA), se usaron 39 gramos de PDA (DifcoTM) en 1000 ml de agua destilada, posteriormente se agitó y se llevó hasta punto de ebullición. Luego se añadieron 4 gotas de ácido láctico al 25%, se esterilizó en autoclave por 30 minutos y se dispensó en cajas Petri previamente esterilizadas por 1 hora (Echandi, 1967).

3.2.2 Medio V8

Se usaron 800 ml de agua destilada, 200 ml de jugo V8 (Clamato), 20 gramos de maltosa (DifcoTM), 1 gramo de asparagina (MERCK), 10 gramos de extracto de malta (MERCK), 3 gramos de carbonato de calcio (Mallinckrodt) y 15 gramos de agar-agar (BactoTM). Todos estos ingredientes se mezclaron en un Erlenmeyer para posteriormente llevarlos a punto de ebullición agitando constantemente. Luego se añadió 4 gotas de ácido láctico al 25%, se autoclavó por 30 minutos y se dispensó en cajas Petri previamente autoclavadas por 1 hora (Echandi, 1967).

3.2.3 Medio Czapek

Se usaron 1000 ml de agua destilada, 30 gramos de sacarosa, 30 gramos de nitrato de sodio (H.V.O.), 1 gramo de fosfato de potasio di-básico (Mallinckrodt), 0.5 gramos de cloruro de potasio (Mallinckrodt), 0.5 gramos de sulfato de magnesio (H.V.O.), 0.01 gramos de sulfato ferroso (Lobal Chemie), 15 gramos de agar-agar (Bacto™). Se mezclaron los ingredientes en un Erlenmeyer en agitación constante, se ajustó el pH a 6.5 y se colocó 15 gramos de agar-agar (Bacto™) hasta punto de ebullición. Posteriormente se esterilizó el medio en autoclave por 30 minutos y se dispensó en cajas Petri esterilizadas (G.J. y Sherman, 1992).

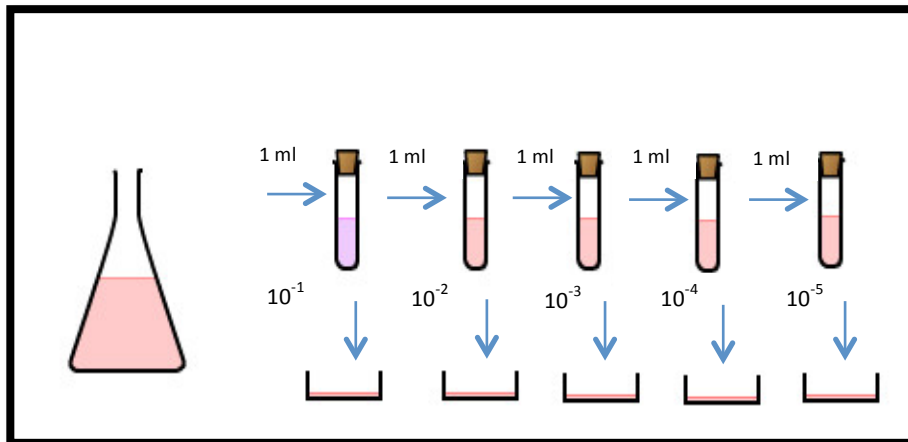
3.3 Siembra y cuantificación de los hongos

En cada muestra de suelo analizada se usó como método de siembra la técnica de dilución seriada (10^{-1} a 10^{-7} , figura 1), la misma que logra medidas cuantitativas multiplicando el promedio de las unidades formadoras de colonias (UFC) en las placas por el factor de dilución empleado. El resultado es una estimación del número de propágulos de hongos por gramo de suelo (Bills *et al.*, 2004).

Para el cuantificación y análisis se tomaron las disoluciones que podría ser cuantificable entre las disoluciones de 10^{-2} a 10^{-5} donde el número total fue de 30 a 50 colonias por caja Petri y estos hongos se diferenciaron por su apariencia y color. Se realizó un promedio con los valores de las cuatro muestras de suelo a cada profundidad antes y después de la aplicación del gas biocida, de esta forma se determinó el aumento o la disminución de las poblaciones de hongos identificadas además de la diversidad existente.

Por consiguiente, se pesaron 10 gramos de la muestra de suelo, se agitaron en 90 ml de agua destilada estéril por un minuto. Con la pipeta se recogió 1 ml de la mezcla y se dispensó en un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua destilada estéril formando la dilución 10^{-1} . De ese primer tubo se dispensó 1 ml en el siguiente tubo de ensayo formando la dilución 10^{-2} y así sucesivamente se fue dispensando 1 ml de la mezcla en el siguiente tubo de ensayo hasta que llegar a la dilución 10^{-7} (figura 1). En cada caja Petri se colocaron 100 μ l de cada una de las disoluciones, donde el inóculo se esparció en todo el medio y se selló con parafilm. Se esperó de 3 a 5 días para la cuantificación de las colonias.

Figura 1. Descripción gráfica de dilución seriada de muestras de suelo. La metodología implica llegar hasta la séptima dilución.



3.4 Análisis estadístico

Se usó la prueba t para muestras pareadas, para establecer si existían diferencias significativas en la población de hongos, de las muestras de suelo tomadas a dos profundidades (0-20 y 20-40 cm), antes y después de la aplicación del gas biocida. (Padrón, 2009).

El modelo estadístico consistió en:

$$t = \frac{A - \bar{B}}{S\bar{d}} = \frac{\bar{A} - \bar{B}}{\frac{Sd}{\sqrt{n}}}$$

Donde A fue la suma de las muestras sin aplicación de gas biocida y B fue la suma de las muestras con aplicación de gas biocida. \bar{A} y \bar{B} son las medias de cada una de las muestras, Sd representó la diferencia de las medias, $S\bar{d}$ representó el error estándar de la diferencia entre las medias y n es el número de muestras.

La varianza de la diferencia se analizó con las siguientes formulas tomadas de Padrón, 2009:

$S^2 d = \frac{\sum d^2 - (\sum d)^2 / n}{n - 1}$	$S\bar{d} = \sqrt{S^2 d}$
---	---------------------------

3.5 Aislamiento e identificación microscópica de hongos

Una vez incubados los hongos en cajas Petri por varios días, se procedió a aislar los hongos que crecieron en los medios de cultivo. Dentro de la cámara de flujo laminar, se cortó un pedazo de la colonia del hongo, se plantó en una nueva caja Petri y se realizó el proceso varias veces hasta que el hongo se aislara por completo. Posteriormente, se cambió a un medio líquido denominado Caldo Papa Dextrosa con sus siglas en inglés (PDB), con el propósito de obtener un crecimiento masivo necesario en el proceso de amplificación de ADN de los hongos (Echandi, 1967).

De los diferentes hongos aislados, se realizó una identificación fenotípica observando su apariencia y color, donde se utilizó un porta objetos que contenía una gota de azul de metileno. De cada uno de ellos y mediante una cinta adhesiva transparente se recolectó el micelio del hongo. Posteriormente se visualizó las estructuras de los diferentes hongos en un microscopio (RADICAL RXL-4T).

3.6 Extracción de ADN de hongos de suelo

De los hongos aislados e identificados microscópicamente, se tomaron dos muestras para una resiembra en el medio PDB. Una vez que crecieron los micelios, se procedió a la extracción de las muestras de ADN, que consistía en macerar cada muestra en un mortero con nitrógeno líquido. El producto de la maceración se colocó en microtubos donde se realizó el protocolo de extracción de ADN, dando como resultado un líquido transparente en cada microtubo. Se elaboró un gel de agarosa, se cargaron las muestras en el gel y se realizó la electroforesis. Al terminar este proceso se visualizó en lámpara de UV el gel para observar si existía ADN en las muestras.

El protocolo para el aislamiento de ADN fue descrito anteriormente por Falcón y Valera, (2007) detallado de la siguiente manera:

Se separó el hongo del medio por filtración con papel filtro estéril. Se colocó el hongo en un mortero. Se añadió un poco de nitrógeno líquido que actuó como cristizador de la pared celular de los hongos. Se maceró la muestra hasta formar una especie de polvo, las muestra maceradas se colocaron en un microtubo con 500 µl del buffer de extracción (tabla 1) previamente calentado a 60°C en baño María. Posteriormente se incubó a baño María las muestras a 65°C por 1 hora, se agregó 500 µl de fenol: cloroformo: isoamílico. Se

centrifugó a 10000 revoluciones por minuto (rpm) por 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo. Se agregó 500 µl de isopropanol o etanol al 98% y se mezcló cuidadosamente, esta solución se incubó al menos 2 horas a -20°C.

Transcurridas las 2 horas se centrifugó los microtubos a 10000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Después se lavó el pellet con 100 µl de etanol al 70% y se centrifugó nuevamente por 5 minutos a 10000 rpm. Se eliminó el sobrenadante. Se dejaron los microtubos boca abajo hasta que se eliminó el olor a etanol y se disolvió el pellet en 50 µl de agua destilada estéril. Se agregó 5 µl de la enzima RNAsa a 37°C por 1 hora y se almacenó las muestras a -20°C hasta ser utilizada.

Tabla 1. Elaboración de buffer de extracción de ADN.

BUFFER DE EXTRACCIÓN	Concentración	Para 250 ml
CTAB*	2%	5gr.
NaCl	1,4M	81,8 g o 70 ml de NaCl 5M
EDTA**	20 Mm	10 ml o 0,5M EDTA
Tris-HCL pH8	100 Mm	100 ml o 1M Tris-HCL
B-Mercaptoetanol	0,20%	0,5 ml

*CTAB: Cetil trimetil amonio bromuro

**EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

3.6.1 Visualización del ADN

Al terminar el proceso de extracción se visualizaron las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa. Para elaborar el gel se usaron 1,2 gr de agarosa y 60 ml de Tris Acetato EDTA (TAE), al 1%. Esta mezcla se colocó en un plato de agitación y caliente hasta que llegó a punto de ebullición. Al enfriar esta mezcla se añadió 2 µl de Sybr Safe y se vertió el contenido en un pocillo de carga donde después de solidificarse se colocó en la cubeta de electroforesis.

3.6.2 Proceso de electroforesis

Se colocaron 300 ml de TAE al 1% en la cubeta de electroforesis cubriendo el gel de agarosa. Se mezcló 2 µl de Blue Juice con 4 µl de la muestra de ADN y se cargaron en el gel. Este proceso se repitió con cada muestra. Al final se mezcló 2 µl de Blue Juice con 3 µl del marcador molecular y se cargó en el gel de agarosa. Se tapó la cubeta de electroforesis, se conectaron los electrodos a la fuente de alimentación (rojo para el polo

positivo) y se programó la fuente a 70 voltios durante 30 minutos. Al terminar este proceso se colocó el gel en un transiluminador de luz UV para visualizar las bandas.

Si existían bandas, se realizaba la cuantificación de las muestras con el Fluorómetro Qubit y kits de Tecnología Quant-iT. El resultado de este proceso es una lectura que refleja exactamente la cantidad de contenido de ADN de la muestra que debe estar entre 10 a 50 ng/μl. Las muestras que contenían la cantidad necesaria de ADN pasaron al proceso de PCR (Prieto et al., 2009).

3.7 Amplificación de ADN

En el proceso de amplificación de ADN se usaron primers ITS1 que contienen la secuencia TCCGTAGGTGAACCTGCGG e ITS4 con la secuencia TCCTCCGCTTATTGATATGC (Blanco et al, 1990). El procedimiento de PCR en el que se usó las muestras de ADN fue descrito por Falcón y Valera 2007 (anexo 7). Este proceso se realizó de forma automatizada, los tubos con el mix se introdujeron en un termociclador con el programa descrito en el anexo 8. Al finalizar el proceso en el termociclador, se visualizaron las muestras en gel de agarosa. El producto de la PCR se purificó con un kit de purificación de bandas *in vitro* (PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit). De aquí se procedió a medir la concentración de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa y NanoDrop (espectrofotómetro de bajo volumen de muestra, total 220-750nm) para determinar si la cantidad de concentración de ADN de la muestra era la requerida en el proceso de secuenciación (50 ng/ul y no menos de 10 ul de contenido).

3.8 Secuenciación de ADN

Las muestras obtenidas fueron enviadas a Corea para el proceso de secuenciamiento que fue realizado por la empresa Macrogen Corea mediante la técnica de dideoxinucleótidos o Sanger (Trelles, 2010). En breve, se usó la técnica de síntesis truncada mediante la polimerización usando nucleótidos no funcionales llamados dideoxinucleótidos (cambio en el grupo hidronio del carbón 3' a la hebra de ADN). Los fragmentos obtenidos fueron separados en una columna capilar y los ddNTPS fueron marcados con fluorocromos para la obtención de la señal de cada nucleótido. Una vez que las muestra son analizadas (obteniendo su secuencia), se utilizó el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que compara secuencias de nucleótidos que se encuentren cargadas en su base de datos con las secuencias de las muestras que fueron analizadas por Macrogen. Hoy en día

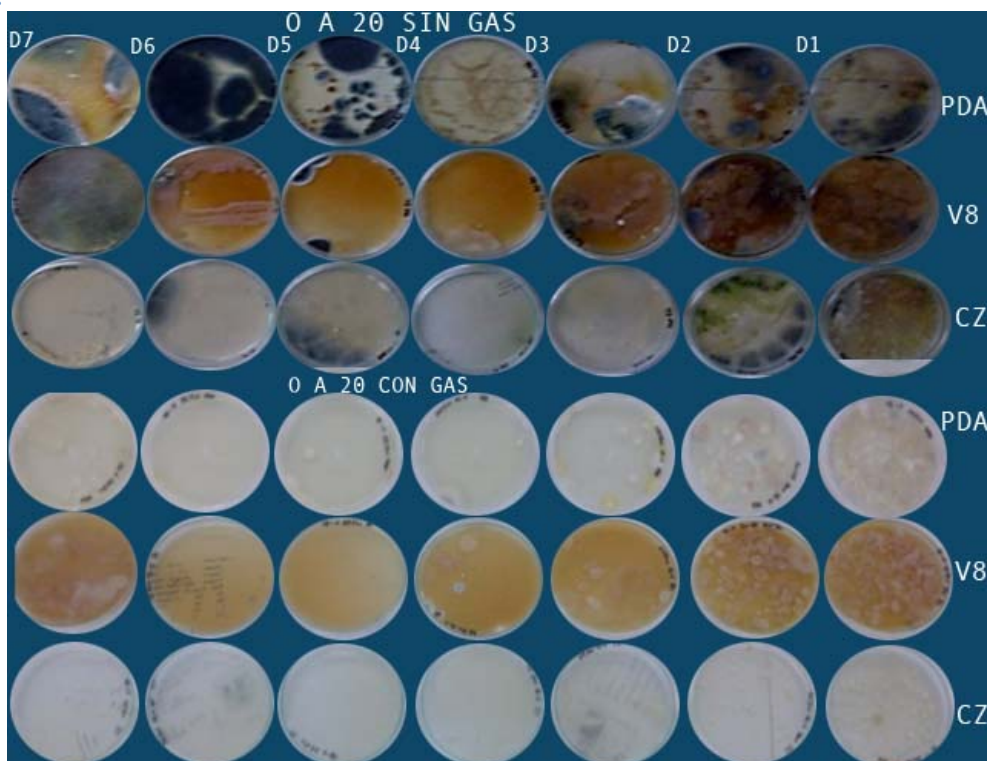
el BLAST es la herramienta más usada en la predicción de secuencias de proteínas (González, 2013 y Ochoa et al., 2012).

4. RESULTADOS

4.1 Siembra y caracterización fenotípica-microscópica

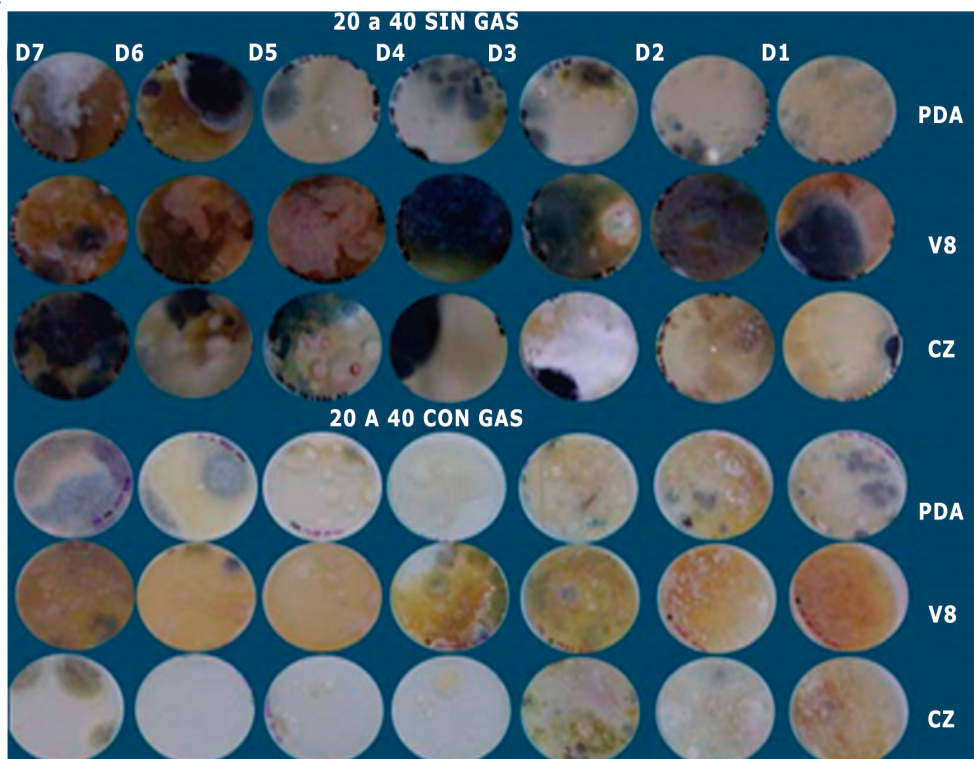
Para monitorear las poblaciones existentes en las muestras de suelo antes y después de la aplicación de gas biocida, a profundidades de 0-20 cm y de 20-40 cm, se realizó la siembra de suelo con la técnica de dilución seriada sobre los diferentes medios selectivos PDA, V8 y CZ. Después de 4 días de incubación se realizó el cuantificación de las diferentes poblaciones dando como resultado una mayor población de hongos en las muestras que no tenían la aplicación de gas biocida (Figura 2). En los medios PDA, existió mayor variabilidad de crecimiento fúngico además de mayor número de colonias. En el medio V8, la visualización de colonias fue difícil por el color que tomaba el medio, por esta razón fue necesario esperar entre 24 y 48 horas más para diferenciar los colores de las colonias fúngicas. En el medio CZ, el crecimiento de colonias no se registró en forma masiva y esto ayudó a una buena caracterización y un fácil cuantificación.

Figura 2. Siembra de suelo de una muestra de perfil 0-20 cm, antes y después de la aplicación de gas biocida.



En las muestras evaluadas de 0-20 cm (Figura 2), se aprecia que el crecimiento fúngico disminuye considerablemente con la aplicación de gas biocida, la mayoría de colonias son blancas y a partir de la dilución 10^{-4} , el crecimiento de colonias es mínimo o no existe crecimiento. En las muestras a profundidad de 20-40 cm (Figura 3), existió crecimiento y variedad de poblaciones fúngicas hasta la dilución 10^{-7} en las muestras con gas biocida.

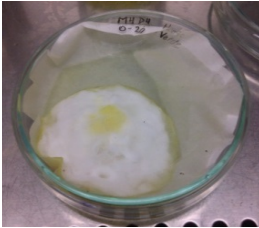
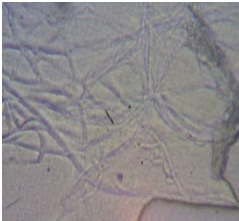

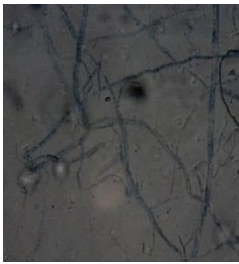
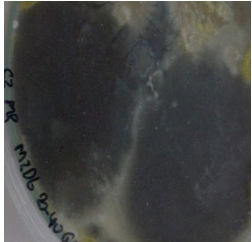
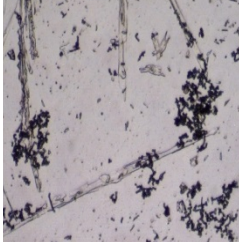

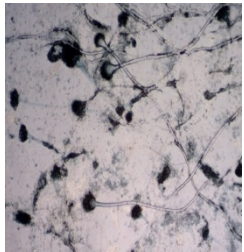
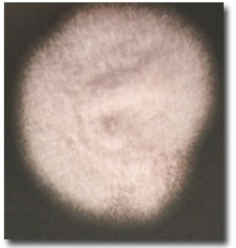
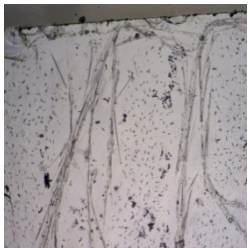
Figura 3. Siembra de suelo de una muestra de perfil 20-40 cm, antes y después de la aplicación de gas biocida.

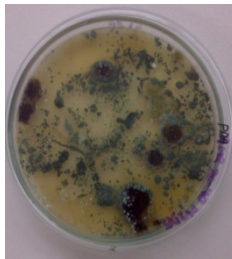
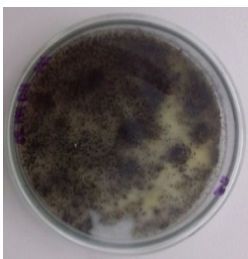
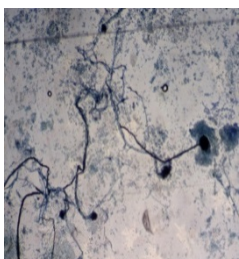
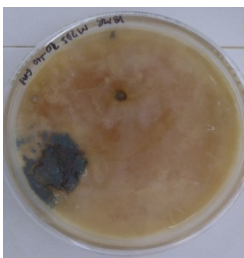
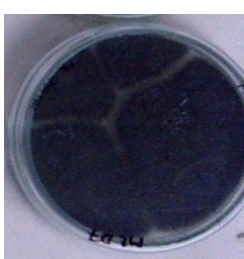
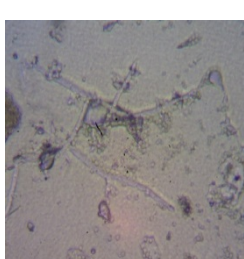


En los resultados de la evaluación de la segunda, tercera y cuarta muestra de suelo (Figura 3, anexos 1, 2, 3, 4, 5, 6), como en el caso anterior, se observó una disminución poblacional con la aplicación de gas biocida a profundidad de 0-20 cm y 20-40 cm. Por otro lado se pudo observar que en varias muestras de 20-40 cm con aplicación de gas, existían pequeñas colonias de hongos hasta en las últimas diluciones (10^{-5} a 10^{-7}).

Posteriormente, se realizó la caracterización fenotípica-microscópica de los hongos cultivados. En la Tabla 2 se expone mediante fotografías los organismos que fueron identificados en diferentes muestras y con diferentes tratamientos.

Tabla 2. Detalle de posibles hongos encontrados en las diferentes muestras de suelo analizadas mediante microscopía y aplicación de claves taxonómicas.

POSIBLES HONGOS IDENTIFICADOS EN MUESTRAS DE SUELO				
Nomenclatura del Hongo	Foto del micelio en medio de cultivo	Foto del micelio bajo el microscópico	Dato de la muestra	Posible identificación microscópica
A			M3D5 0-20 SIN BIOCIDA	<i>Phomopsis</i> sp.
B			MID5 20-40 SIN BIOCIDA	<i>Pythium</i> sp.
C			M2D6 20-40 CON BIOCIDA	<i>Penicillium</i> sp.
D			M2D4 20-40 SIN BIOCIDA	<i>Aspergillus</i> sp.
E			M2D6 20-40 SIN BIOCIDA	<i>Acremonium</i> sp.

F			M2D5 0-20 SIN BIOCIDA	<i>Trichoderma</i> sp.
G			M4D4 0-20 CON BIOCIDA	<i>Rhizopus</i> sp.
H			M2D5 0-20 CON BIOCIDA	<i>Botrytis</i> sp.
I			M3D7 20-40 SIN BIOCIDA	<i>Cladosporium</i> sp.

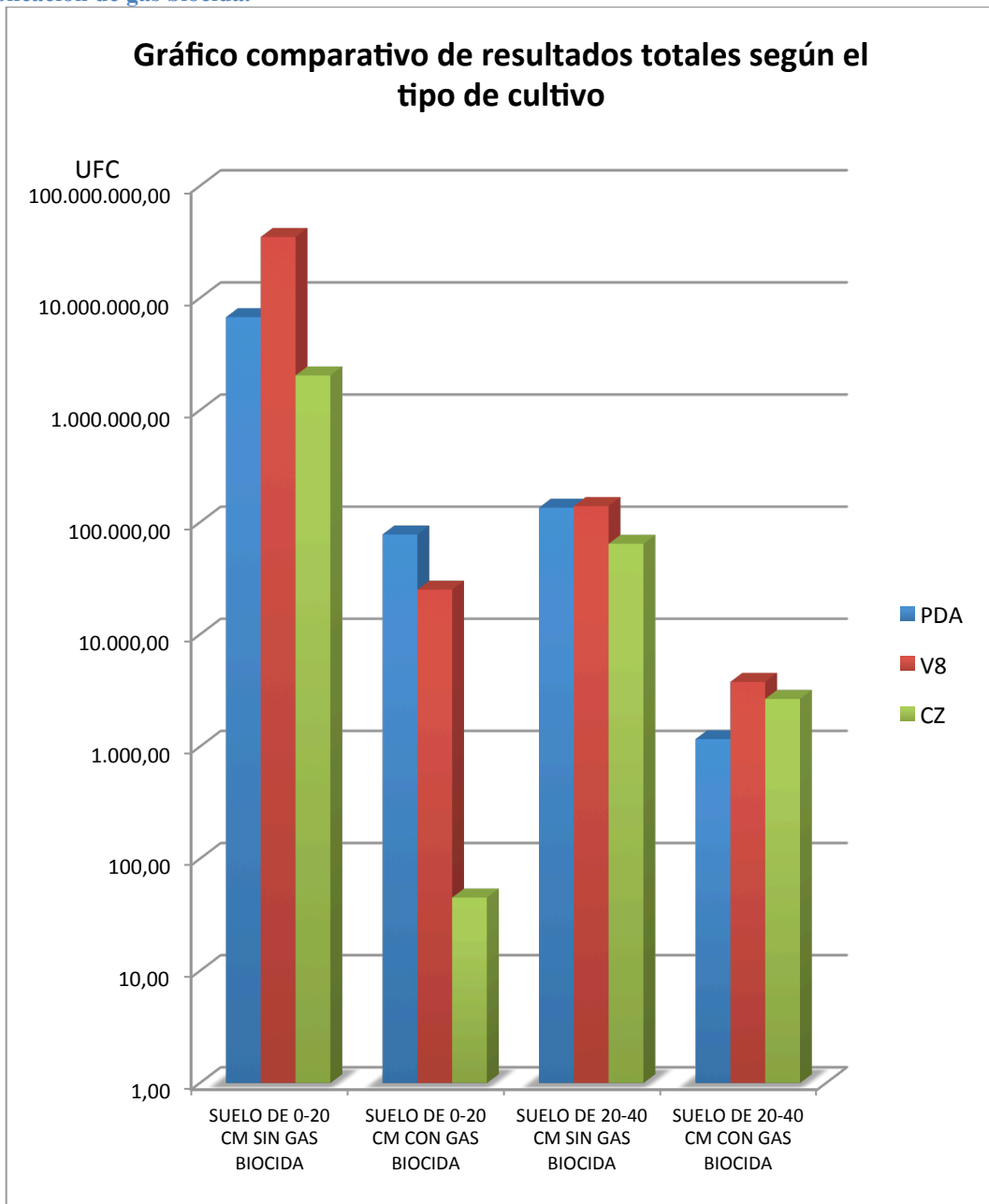
Las imágenes indican la presencia de organismos de suelo como *Phomopsis* sp., *Pythium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Acremonium* sp., *Trichoderma* sp., *Rhizopus* sp., *Botrytis* sp. y *Cladosporium* sp. Estos hongos son comúnmente encontrados en suelos según lo reportado por Areas y Piñeiros (2008), y, Urrutia et al, Ochoa (2008).

4.2 Cuantificación y análisis estadístico.

Se identificó que en suelos sin aplicación de gas biocida existía mayor cantidad poblacional, es así, que las cuentas de microorganismos encontrados en este tratamiento fueron sobre los 1×10^7 UFC por gramo de suelo. En suelos de 0-20 cm existió mayor población de hongos que en suelos de 20-40 cm (Figura 4). Por otro lado se pudo

determinar que en el medio de cultivo PDA (En figura 4, barra color azul), el crecimiento y la biodiversidad fúngica fue mayor que en los otros dos medios de cultivo.

Figura 4. Comparación de población de hongos en los diferentes medios de cultivo antes y después de la aplicación de gas biocida.



En el figura 5 se reporta un gran número de colonias y variedades de hongos identificados fenotípicamente y nombrados en orden alfabético, descritos anteriormente en la tabla 4.

En las muestras de 0-20 cm sin gas biocida se identificaron los hongos A, C, D, E, F, G, H (Figura 5), que a diferencia de las muestras de 20-40 cm sin gas, se identificaron los hongos B, C, D, E, F, G, H, I (Figura 7). Por otro lado, en las muestras de 0-20 con gas

(Figura 6), se ve claramente que las colonias disminuyen. Sin embargo, existe mayor crecimiento y biodiversidad de colonias en el medio PDA, mientras que en los medios V8 y CZ hay una disminución considerable de la biodiversidad y descenso poblacional de las colonias en los tratamientos después de la aplicación del gas biocida.

Figura 5. Representación de la población y biodiversidad de hongos encontrados en suelo agrícola a profundidad de 0-20 cm antes de la aplicación de gas biocida.

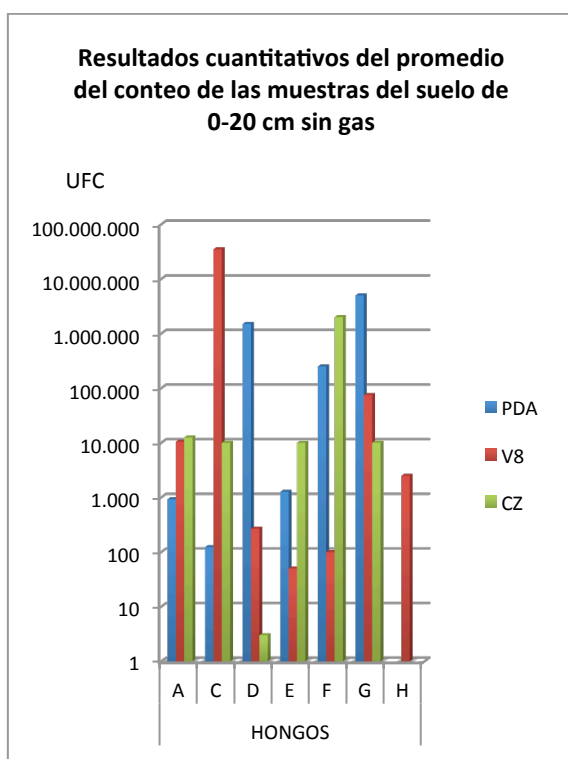
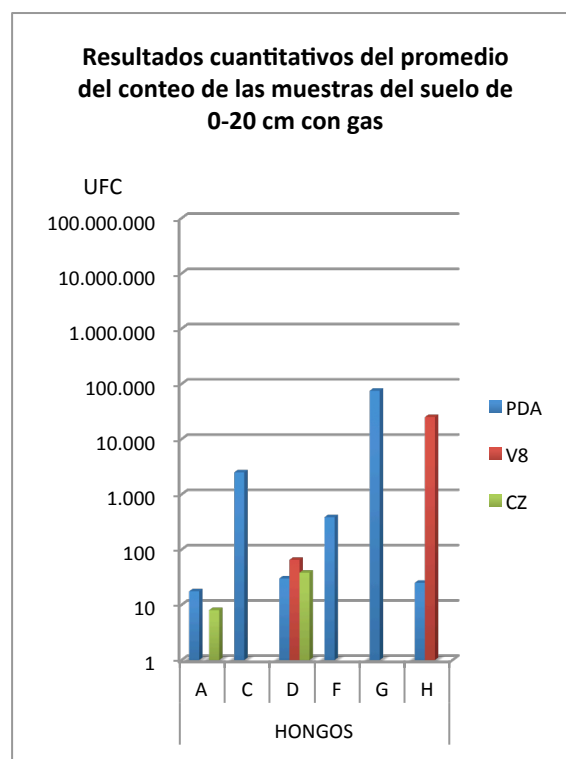


Figura 6. Representación de la población y biodiversidad de hongos encontrados en suelo agrícola después de la aplicación de gas biocida a profundidad de 0-20 cm.



En el análisis de las muestras de 20 a 40 cm sin tratamiento biocida, se encontró que las poblaciones de hongos en general fue menor que las poblaciones 0 a 20 cm. Por ejemplo, en suelos de 0-20 cm sin el tratamiento de gas la población en promedio del hongo D fue de 1.500.015 CFU (unidad formadora de colonia) por gramo de suelo mientras que a profundidad de 20-40 cm sin aplicación de gas biocida fue de 75 CFU por gramo de suelo (Ver figuras 5 y 7). Además se encontró cambios poblacionales a diferentes profundidades como el hongo A en perfil 0-20 cm (Figuras 5 y 6) y el hongo B en el perfil 20-40 cm (Figuras 7 y 8). Es así que se puede observar una diferencia en el efecto que tiene el gas a diferentes profundidades del perfil del suelo.

Figura 7. Representación de la población y biodiversidad de hongos encontrados en suelo agrícola a profundidad de 20-40 cm antes de la aplicación de gas biocida.

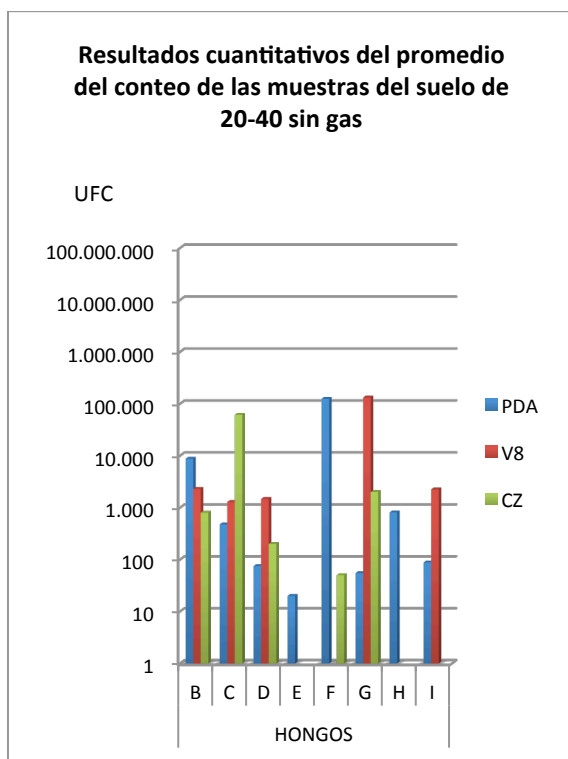
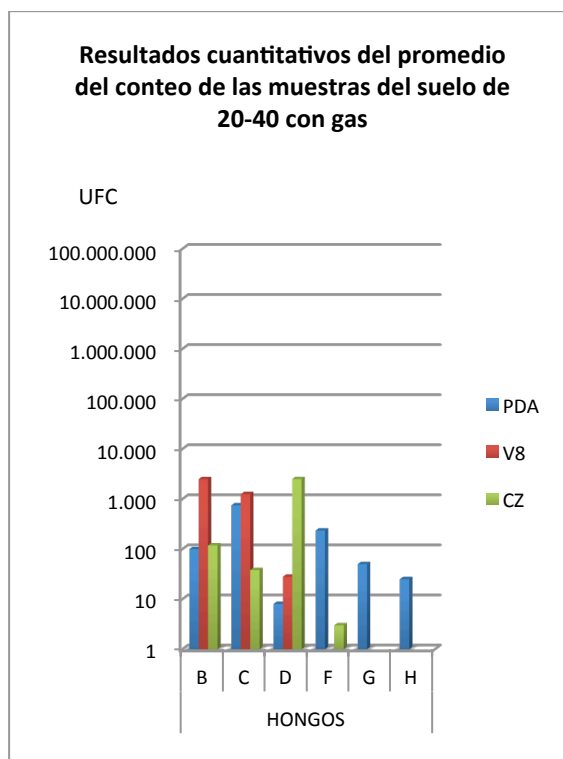


Figura 8. Representación de la población y biodiversidad de hongos encontrados en suelo agrícola después de la aplicación de gas biocida a profundidad 20-40 cm.



Una vez realizada la cuantificación de las diferentes colonias encontradas en las muestras de suelo, se realizó un análisis estadístico t para muestras pareadas para determinar, si existían diferencias significativas en las poblaciones encontradas antes y después de la aplicación de gas biocida. Los datos analizados fueron los valores de los promedios de las cuantificaciones de cada población de hongo distinguidos por letras desde la A hasta la I, y a sus diferentes profundidades (0-20 y 20-40 cm). A pesar de que los gráficos sugieren que hay una diferencia de la abundancia de los hongos identificados entre los cultivos de suelo con y sin biocida, la prueba t no arrojó que esta diferencia sea significativa. Se analizó la diferencia poblacional ajustando las dos profundidades de suelo a un solo análisis, obteniendo así diferencias significativas en todas las muestras de hongos. Con esto se puede concluir que existe diferencia estadística en la población de hongos con la aplicación de gas biocida. En la tabla 3 se muestra un resumen de los resultados estadísticos.

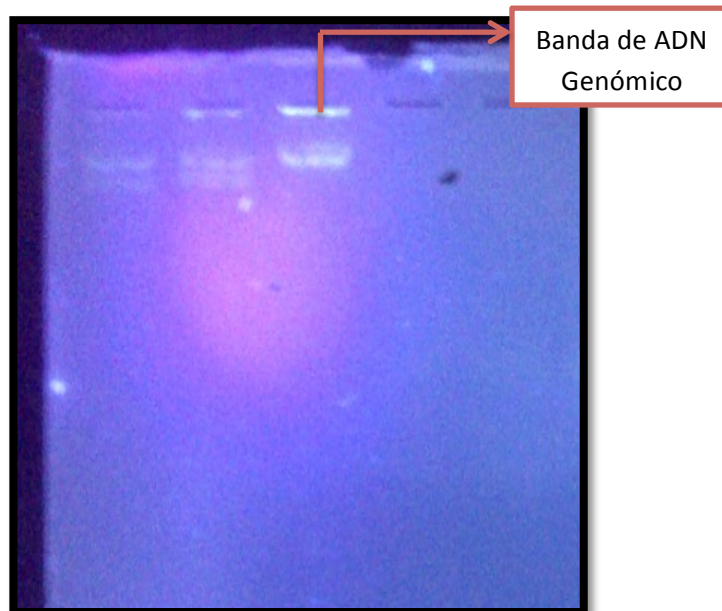
Tabla 3. Detalle de valores estadísticos analizados mediante la prueba t para muestras pareadas. Se usaron los datos de la cuantificación de colonias encontradas en muestras de suelo agrícola.

VALORES DE ANALISIS ESTADISTICO T DE MUESTRAS PAREADAS.			
Hongo	Profundidad de muestras antes y después de la aplicación del biocida	Valor t calculado $p \leq 0.05^*$	Valor t tabulado $0,05^*$
A	0-20	2,06	2,92
	20-40	0	
	0-20 y 20-40	3,27*	2,015
B	0-20	0	2,92
	20-40	1,5	
	0-20 y 20-40	2,38*	2,015
C	0-20	1,41	2,92
	20-40	1,41	
	0-20 y 20-40	2,24*	2,015
D	0-20	1,41	2,92
	20-40	1,63	
	0-20 y 20-40	2,24*	2,015
E	0-20	1,59	2,92
	20-40	1,45	
	0-20 y 20-40	2,51*	2,015
F	0-20	1,58	2,92
	20-40	1,41	
	0-20 y 20-40	2,63*	2,015
G	0-20	1,44	2,92
	20-40	1,43	
	0-20 y 20-40	2,34*	2,015
H	0-20	1,41	2,92
	20-40	1,41	
	0-20 y 20-40	2,16*	2,015
I	0-20	0	2,92
	20-40	1,47	
	0-20 y 20-40	2,32*	2,015

4.3 Extracción y amplificación de ADN

De las 18 muestras sembradas en el medio PDB, sólo 16 germinaron adecuadamente y de éstas se procedió a la extracción del ADN. Al hacer la primera electroforesis, se observó que de las 16 muestras, únicamente las muestras 2, 7, 8, 9 y 14 tenían una amplificación correcta del ADN en el gel de agarosa. En la figura 9 se puede observar cómo se diferencian las bandas con ADN.

Figura 9. Gel de agarosa donde se diferencia banda de ADN proveniente de hongos aislados de muestras de suelo.



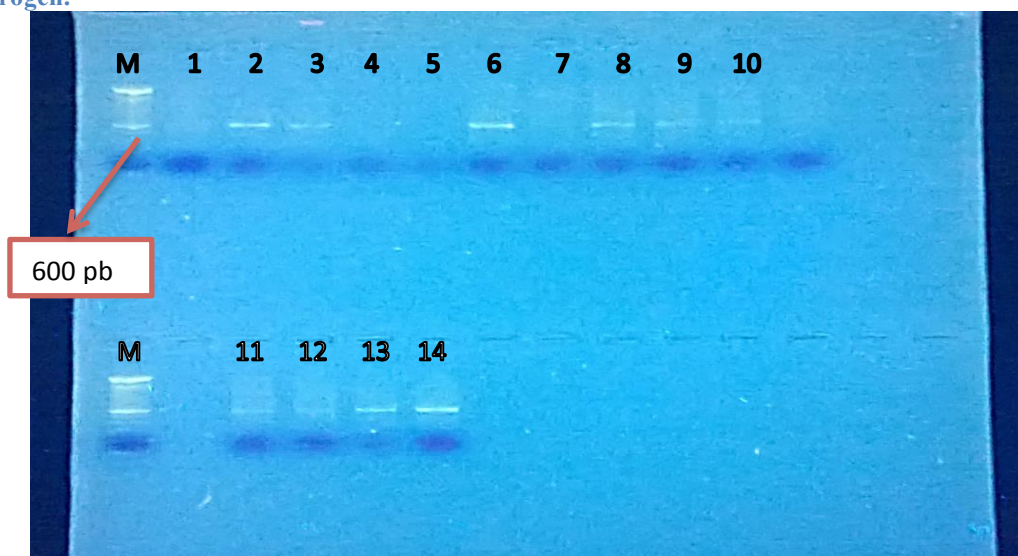
Las mismas 16 muestras se analizaron usando Qubit (Diaz, 2012) y se determinó que 14 muestras tenían ADN suficiente para el proceso de PCR.

Tabla 4. Valor de análisis de concentraciones con fluorómetro QUBIT.

Nº MUESTRA	CONCENTRACIÓN ng/μl
1	15,3
2	30,4
3	6,69
4	5,5
5	42,3
6	8,22
7	600
8	38,3
9	9,99
10	9,63
11	21,8
12	18,6
13	16,3
14	50

Una vez hecho el mix de PCR y programado el tiempo en el termociclador, se visualizaron las bandas nuevamente en gel de agarosa. Aquí se obtuvieron bandas completas en 12 de las 14 muestras. Sin embargo, las muestras se encontraban con barrido y se realizó el proceso nuevamente cambiando la temperatura de annealing con lo que se obtuvo bandas de buena calidad como lo demuestra la Figura 10).

Figura 10. Visualización de amplicon después de PCR en gel de agarosa. Marcador molecular 100 pb invitrogen.



Los resultados del gel se comprobaron nuevamente con el espectrofotómetro NanoDrop ya que para el proceso de secuenciación es necesaria una concentración de 50 ng de ADN en 10 μ l de muestra. Los resultados del NanoDrop no fueron los esperados, las concentraciones eran muy bajas, así que, se colocaron las muestras en baño María a 65°C por aproximadamente 30 minutos para evaporar el contenido de agua de la muestra y poder obtener concentraciones altas de contenido de ADN (tabla 5). Se descartaron 2 muestras en esta fase ya que no contaban con la concentración necesaria de ADN.

Tabla 5. Concentraciones de contenido de ADN en las muestras analizadas con el espectrofotómetro NanoDrop

Nº MUESTRA	CONCENTRACIÓN ANTES DE BAÑO MARÍA ng/ μ l.	CONCENTRACIÓN DESPUES DE BAÑO MARÍA ng/ μ l.
1	20	61,5
2	28,8	68,2
3	20,9	46,6
4	10,8	75,2
5	7,5	31,9
6	5,5	41,5
7	18,3	41,4
8	8,3	13,9
9	11,1	27,7
10	8,7	52,4
11	10,4	49,2
12	16,3	71,7

4.4 Secuenciación de ADN

Macrogen, Corea no aceptó la muestra 8 por contener muy bajo contenido de ADN. Las demás muestras si fueron secuenciadas. No todas las secuenciadas en Macrogen, probaron ser de buena calidad por cuanto la señal de los picos en algunas secuencias no pudieron utilizarse para la identificación (Ver Figura 12). Las secuencias viables (Ver figura 11), fueron analizadas con el programa BLAST. Mediante esta técnica, se determinó que 5 muestras dieron una identificación positiva para dos especies de hongos: *Aspergillus niger* y *Trichoderma asperellum* (Ver tabla 6). Estos hongos normalmente se encuentran en suelos agrícolas y florícolas y ya fueron descritos anteriormente en la tabla 2.

Figura 11. Visualización de picos de buena calidad identificados por la intensidad media de cada fila de nucleótidos definidos por el método de Sanger. Este gráfico representa una buena lectura.



```
AAACCGAGATAAACTCCCAACCCAATGTGAACGTTACCAA
ACTGTTGCCTCGGGGGGTACGCCCCGGGTGCGTCGCA
GCCCCGAACAGCGCCCGCGGAGGAACCAACCAAAAC
TCTTCTGTAGTCCCCTCGGGACGTATTTCTTACAGCTCT
GAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAAACCTTCAACAACGGA
TCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC
GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA
TCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGC
ATGCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCTCGAACCCCTCCGG
GGGATCGGGCTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGC
CGGCCCTAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCC
TGCGCAGTAGTTGCACAACCTCGACCCGGGAGCGGGCG
CGTCCACGTCCGTA AACACCCCAACTTTCTGAAATGTTGAC
CTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATC
AATAAGCGGAGAAAGGTTCAAGGGCGGTTTCGCGCC
```

Figura 12. Visualización de picos de buena calidad identificados por la intensidad media de cada fila de nucleótidos definidos por el método de Sanger. Este gráfico representa una mala lectura.



```
AACCCCGGGAATAAAAGAGTGGAGTGGGGTTTC
AGTAAGTCCCCGGGCCTTCATATGGGGAGTTT
AGTTGCATCCTCCGATGATTGAATGCGGTGGGAG
CGTATCTATTCGATGTTCCAGCACCGGCCAGAG
TAATAAATATCTTTATAAGATGCCCTTCAAACCTA
TAAAGTAAGGAACGCCCCCTTG
```

Tabla 6. Resultados de la secuencia de nucleótidos con el programa BLAST.

Nº de muestra	Posible hongo	Muestra	Región	Nombre del hongo	% Similitud en NCBI
1	<i>Aspergillus</i> sp.	0-20 M4D4 SIN GAS	its1	<i>Aspergillus niger</i>	87%
			its4	<i>Aspergillus niger</i>	92%
2	<i>Acremonium</i> sp.	20-40 M1D4 GAS	its1	No especifica	-
			its4	No especifica	-
3	<i>Rhizopus</i> sp.	0-20 M4D3 SIN GAS	its1	<i>Trichodema asperellum</i>	87%
			its4	<i>Trichodema asperellum</i>	95%
4	<i>Trichoderma</i> sp.	20-40 M1D2 SIN GAS	its1	<i>Trichodema asperellum</i>	100%
			its4	<i>Trichodema asperellum</i>	99%
5	<i>Pythium</i> sp.	0-20 M4D4 SIN GAS	its1	No especifica	-
			its4	No especifica	-
6	<i>Botrytis</i> sp.	20-40 M3D3 CON GAS	its1	No especifica	-
			its4	No especifica	-
7	<i>Cladosporium</i> sp.	20-40 M2D6 CON GAS	its1	No especifica	-
			its4	No especifica	-
8	<i>Penicillium</i> sp.	20-40 M1D3 CON GAS	its1	No especifica	-
			its4	No especifica	-
9	<i>Phomopsis</i> sp.	0-20 M1D4 SIN GAS	its1	No especifica	-
			its4	No especifica	-
10	<i>Pythium</i> sp.	0-20 M2D6 SIN GAS	its1	No se envió por baja concentración	-
			its4		-
11	<i>Phomopsis</i> sp.	20-40 M1D5 SIN GAS	its1	<i>Trichoderma asperellum</i>	99%
			its4	<i>Trichoderma asperellum</i>	95%
12	<i>Trichoderma</i> sp.	20-40 M2D7 CON GAS	its1	<i>Trichoderma asperellum</i>	99%
			its4	<i>Trichoderma asperellum</i>	97%

En la Tabla 6 se correlaciona la muestra analizada con los resultados de la Tabla 2. Se determinó que el hongo A identificado como *Aspergillus* sp., en la técnica molecular se reconoce como *Aspergillus niger* con un valor de confianza de 87 % para ITS 1 y el 92% para el ITS 4. Las muestras 4 y 12 también dieron una correspondencia correcta y mediante esta técnica se determinó que se trataba del hongo *Trichoderma asperellum*. El rango de confiabilidad va desde 97 a 100% por lo que no hay duda alguna que se trata de esta especie. En el análisis microscópico se determinó que la muestra 3 correspondía a *Rhizopus* sp., sin embargo por la técnica molecular se determinó que era *Trichoderma asperellum*. Igual ocurrió con la muestra 11 que se supone era *Phomopsis* sp. Las muestras 7 y 9 fueron identificadas como una bacteria y una planta; sin embargo, el rango de seguridad es bajo y sólo aplica para una región ITS. Cuatro muestras (2, 5, 6 y 8) no tuvieron picos lo suficientemente fuertes como para aplicar el análisis con BLAST.

5. DISCUSIÓN

El suelo tiene una gran diversidad de material orgánico e inorgánico. La parte orgánica está compuesta de varias fases de descomposición, exudados de las plantas, microorganismos entre ellos bacterias, hongos actinomicetos e invertebrados muy pequeños. Muchos de estos son benéficos que ayudan a la entrada y almacenamiento del agua, descomposición de materia orgánica y resistencia a la erosión. Específicamente los hongos en los suelos se encargan de descomponer residuos de plantas, aumentar los minerales en el suelo, ayudar a la formación de humus, son supresores de patógenos en las plantas y ayudan a la degradación de pesticidas y químicos tóxicos (Moreira *et al.*, 2012).

En la agricultura, los patógenos de plantas y sus antagonistas son muy importantes. Estos actúan en los suelos o en los tallos de las plantas infectándolos, provocando grandes pérdidas y mermando la producción de los cultivos. Existen evidencias de que las prácticas agrícolas causan más alteraciones cuantitativas que cualitativas en la comunidad de hongos microscópicos del suelo (Pfenning, 1997; Rodrigues, 2001). Los agricultores han tomado medidas como los fumigantes para el control de las enfermedades fúngicas. Unos de los fumigantes más conocidos son la Cloropicrina y 1-3 Dicloropropeno (nombre comercial Agrocelone). Este controla hongos de los géneros *Ceratabasidiurn*, *Colletotrichurn*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Idriella*, *Phytophthora*, *Pyrenochaeta*, *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Verticillium* que causan enfermedades de podredumbre en raíz y enfermedades en frutilla

(Wilhelm, 1988). Una vez eliminados los patógenos, los hongos benéficos pueden colonizar nuevamente los suelos.

Por otro lado, se ha demostrado experimentalmente que la introducción de hongos benéficos como *Trichoderma* sp. o *Coniothyrium minitans* pueden reducir la incidencia de enfermedades en el suelo (Whipps *et al.*, 1993), pues actúan como parasitantes de otros hongos. *Trichoderma* secreta enzimas (celulasas, glucanasas, lipasas, proteasas y quitinasas) que ayudan a disolver la pared celular de las hifas del huésped, absorbiendo los nutrientes del interior del hongo huésped. Al final el micelio del hongo parasitado queda vacío y con perforaciones, provocadas por la inserción de las estructuras especializadas de *Trichoderma*. El hongo *Coniothyrium minitans* se utiliza para controlar hongos del suelo específicamente del género *Sclerotinia* causantes de podredumbres varias como el mal del esclerocio de las raíces y tubérculos, mal blanco de la lechuga y otras hortalizas. Este hongo invade fácilmente las superficies de las hojas y se extiende con rapidez por la planta impidiendo que *Sclerotinia* invada a la planta (Rodríguez *et al.* 2004).

El material alimenticio en el que crecen los microorganismos en un laboratorio es el medio de cultivo. Se han preparado más de 10.000 medios de cultivo diferentes para el desarrollo de estos microorganismos. En este estudio se utilizaron 3 medios de cultivo, por ser usados comúnmente en estudios de suelo (Arias *et al.*, 2008). Con el medio PDA, se obtuvieron los mejores resultados en cuanto al crecimiento y biodiversidad de hongos. Según Cifuentes (1990), esto se debe a que el medio tiene dextrosa como fuente de carbono. Esto hace que sea un medio específico para hongos aunque no se considera como un medio selectivo. El medio Czapek que según Carrillo (2003) y Cifuentes (1990), es un medio específico para la identificación de *Aspergillus* y *Penicillium*, y el medio V8 que se usa para la identificación específica de *Phytophthora* y *Pythium*. En las muestras de suelo analizadas se pudo determinar que en el medio PDA, se observaron gran diversidad de colonias, como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Phomopsis*, *Penicillium*. En el medio V8 se pudo identificar claramente *Pythium* y en el medio CZ, *Aspergillus* y *Penicillium*. Estos resultados corroboran lo encontrado por Carrillo (2003) y Cifuentes (1990),

El objetivo de este estudio fue monitorear las poblaciones de hongos de suelo frente a las aplicaciones del gas fumigante (Agrocelone). Es claro que los productos del suelo que aplican los agricultores, son sustancias químicas que logran un efecto en dosis considerablemente altas, aunque no eliminan radicalmente los microorganismos como se

refleja en los resultados obtenidos en este estudio y lo corrobora (Rodríguez *et al.*, 2004; Wilhelm, 1988; Pfenning, 1997 y Rodrigues, 2001). Además, investigaciones realizadas por Lara *et al.* (2007) y Jiménez (1987), revelan que después de la aplicación de fumigantes del suelo, los hongos y bacterias descomponen microbiológicamente los componentes de los biocidas.

En el perfil superior del suelo sin tratamiento se pudieron observar mayores poblaciones de hongos. Según Carrillo, (2003), esto se debe a que los hongos en el suelo se encargan principalmente de la degradación de la materia orgánica e incrementarla. Carrillo, (2003), en su estudio indica que la distribución de los hongos en los perfiles del suelo (expresado en miles por gramo), es de 119 mil hongos a profundidad de 3 a 8 cm, de 20 a 25 cm se encuentran 50 mil y de 35 a 40 cm de profundidad se encuentran 14 mil hongos por gramo de suelo y que la variación de la población fúngica dependerá de la humedad promedio del suelo. Estos datos corroboran los resultados obtenidos en este análisis que en promedio fueron de 2,390.678 a profundidad de 0-20 cm sin aplicación de gas biocida, y 10.311 hongos por gramo de suelo con la aplicación del gas biocida. A profundidad de de 20-40 cm antes de la aplicación fueron de 18.855 y después de la aplicación, 585 hongos por gramo de suelo.

En las diferentes cajas Petri con y sin la aplicación de gas biocida, el hongo que más se diferenció microscópicamente fue el determinado como F (*Trichoderma*) lo que también fue identificado por medio de la secuenciación.

El hongo D identificado microscópicamente como *Aspergillus*, a profundidad de 0-20 cm, antes de la aplicación de gas biocida muestra una población de hongos del 61% y después de la aplicación de gas, del 23%. Esto quiere decir que la población disminuyó considerablemente aunque no bajo cerca de cero. Esto coincide con lo reportado por Lara *et al.* (2007) en su estudio con aplicación de biocida en suelos. *Aspérgillus*, un hongo saprofito degradador del suelo y que se alimenta de materia orgánica, es usado en la industria alimentaria para producir enzimas como celulasa, invertasa, amiloglucosidasa, amilasa, lactasa, proteasa ácida y pectinasa, además de ser conocido por producir la micotoxinas ocratoxina A, las fumonisinas B2 y B4 de un te chino llamado Pu-erh (Elsevier, 2009). De igual manera Carrillo (2003), afirma que al fermentar este hongo se obtiene ácido cítrico usado en bebidas y ácido glucónico usado en productos de limpieza.

Según Wilhelm *et al.* (1988), luego de fumigar el suelo con Cloropicrina, se encontraron hongos de los géneros: *Ceratobasidium*, *Colletotrichum*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Idriella*, *Phytophthora*, *Pyrenochaeta*, *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Verticillium*, de los cuales todos han demostrado haber causado pudrición de la raíz y/o la enfermedad de marchitez en los diferentes cultivos. En el análisis microscópico de este estudio se encontraron: *Phomopsis*, *Pythium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Botrytis* y *Rhizopus*, todos estos después de la aplicación de gas biocida.

En el análisis estadístico, se pudo determinar que existieron diferencias significativas al 5% de probabilidad con la aplicación del gas biocida al unir las 2 profundidades del suelo (0-20 y 20-40). La mayor diferencia fue en el hongo A identificado como *Phomopsis*. La menor diferencia se encontró en el hongo H, identificado microscópicamente como *Botrytis*.

Según Rodríguez (2009), la metodología de identificación de hongos desde hace décadas se ha realizado con medios específicos e identificación morfológica después de la tinción, observando sus estructuras reproductivas y a través de reacciones de anticuerpos a la presencia de un patógeno. Aunque estos métodos han funcionado pero no en un 100%, se han desarrollado técnicas moleculares de detección e identificación de microorganismos las cuales se basan en el análisis de los ácidos nucleicos extraídos de los microorganismos en forma directa. De esta manera se asegura especificidad, sensibilidad y efectividad en el reconocimiento.

En el análisis genético, el ADN que se utilizó para el proceso de PCR, se purificó siguiendo técnicas descritas previamente (se usó: PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit), con el que se eliminan sustancias húmicas y fenólicas que pueden interferir en un buen proceso de PCR (Díaz, 2012). Moreira *et al.* (2012), Falcón *et al.* (2007) y Herveg *et al.* (2006), comentan que los procesos de amplificación de ADN de hongos, se pueden mejorar usando técnicas de cebos junto con la PCR, usando primers de género específicos. Además afirma que la PCR convencional es inapropiada para enfoques cuantitativos porque cualquier pequeña variación durante la fase exponencial en la reacción de amplificación, puede alterar drásticamente las cantidades de los productos de la PCR.

A pesar de que las 12 muestras enviadas a MacroGen (Corea) tenían ADN de acuerdo a los resultados del análisis NanoDrop, sólo 11 fueron secuenciadas. MacroGen nos reporta que la muestra 10 que según nosotros tenía un concentración de 52.4 ng/μl, fue rechazada por bajo contenido de ADN. Esto puede explicarse porque en algunos casos se amplifican las moléculas accesorias en lugar del ADN (Moreira *et al.*, 2012).

En las 11 muestras restantes podemos ver que la muestra 1 que microscópicamente corresponde al género *Aspergillus*, mediante la secuenciación nos da como resultado la especie *Aspergillus niger* con una confiabilidad entre 87 y 92% para las dos regiones ITS. A pesar de no superar en ninguna región el 96%, que es lo que se acepta como total seguridad, al tener lectura en las dos regiones podríamos asumir que si se llegó a una identificación positiva de la especie. Las dos muestras de *Trichoderma* (4 y 11 en la Tabla 5) fueron exitosamente identificadas a nivel molecular con valores para las regiones ITS entre 97 y 100%. En este caso tenemos total seguridad que este hongo corresponde a la especie *Trichoderma asperellum*.

Las muestra que microscópicamente correspondía a *Rhizopus* y *Phomopsis* según la secuenciación se identificaron como *Trichoderma asperellum*. Para el primer caso las regiones ITS nos dan una confiabilidad de 87 y 95% y para el segundo caso entre 95 y 99%. Una posible explicación a estos resultados es que hubo una contaminación del ADN durante los proceso de siembra o extracción. Otra podría ser que los primers usados no son lo suficientemente sensitivos o se requieren más primers para mejorar la identificación. Este análisis escapa del objetivo de este estudio pero sería muy interesante que se explore esto en el futuro.

Moreira *et al.* (2012), determina que el género de hongo *Phytophthora* es difícil de detectar por métodos moleculares, y que en el proceso de amplificación de ADN de los hongos se suelen amplificar moléculas de ADN dominantes en ves del extracto del ADN total. Esto explicaría porque en las muestras de ADN que se secuenciaron en este estudio no todas hayan sido leídas exitosamente por el método de Sanger, aunque en los análisis Qubit y NanoDrop se hayan obtenido los valores necesarios para el proceso de secuenciación.

Se requiere repetir este tipo de estudios para mejorar las técnicas de extracción y amplificación. Probablemente también se requiere encontrar primers más específicos que aumenten las probabilidades de una correcta identificación. Como hemos visto, existen

hongos benéficos y patógenos que están juntos en el suelo. Las técnicas utilizadas no discriminan a los hongos por su función. Al tener un mejor conocimiento de la diversidad de especies y de los roles de cada tipo de hongo, podríamos eventualmente buscar métodos menos agresivos y más específicos para la eliminación de los patógenos del suelo.

Estudios dedicados específicamente a la biodiversidad de suelos son importantes para el entendimiento de las poblaciones nativas y benéficas en asociación con las plantas. Ecuador por ser un país con mucha biodiversidad y podrían encontrarse varios microorganismos que ayuden al beneficio de los cultivos y el hombre. Fortalecer investigaciones en el área de biodiversidad de suelos con impacto agrícola sigue siendo un reto para el futuro.



6. CONCLUSIONES

- La densidad y diversidad de hongos disminuyó luego de la aplicación del biocida 1,3 Dicloropropeno y Cloropicrina. La diferencia sólo fue estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) al agrupar los resultados de las dos profundidades de suelo (0-20 y 20-40 cm)
- Se aislaron e identificaron microscópicamente 9 hongos hasta el nivel de género: *Phonopsis* sp., *Pythium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Acromonium* sp., *Trichoderma* sp., *Rhizopus* sp., *Botrytis* sp., y *Cladosporium* sp.
- El medio de cultivo PDA demostró ser genérico ya que en éste crecieron el mayor número de especies de hongos. En el medio V8 y CZ por ser medios selectivos, se registró un menor número de individuos y menor diversidad de hongos por caja Petri.
- Se determinó que si en el proceso de PCR se cambia la temperatura de annealing de 52°C a 57°C, se obtienen bandas mucho más claras para el proceso de secuenciación.
- Del total de 12 muestras de ADN enviadas a Macrogen, Corea, cinco fueron identificadas como hongos para las dos regiones ITS.
- De las 5 muestras que si fueron identificadas, se llegó hasta el nivel de especie. Una fue *Aspergillus niger* y 4 fueron *Trichoderma asperellum*. Para esta identificación se usaron las dos regiones ITS y los rangos de confiabilidad van de 87 hasta 100%. (Se considera altamente confiable del 96% para arriba).

7. RECOMENDACIONES

Se recomienda para aumentar la probabilidad de obtener ADN puro de un solo tipo de hongo sería necesario aislar completamente los hongos con los que se piensa trabajar en el proceso de amplificación de ADN. Esto se podría lograr resemebrando el hongo en diferentes cajas Petri hasta lograr colonias de aspecto uniforme en cuanto a la forma, color y consistencia del hongo.

Se debe verificar que el crecimiento de micelio sea de al menos el 75% del medio PDB para mejorar la cantidad de ADN que se obtiene de una muestra de hongos,

Para obtener bandas de buena calidad (sin barrido) se recomienda mejor subir la temperatura de Anneling a 57 °C.

Se recomienda el uso de un antibiótico para evitar el crecimiento de bacterias en los medios de cultivo de hongos. Por efectos de costos, en este estudio se usó ácido láctico al 25% que probó no ser 100% adecuado. Otra opción sería aumentar la concentración de ácido láctico.

Se debería continuar con estudios parecidos para la búsqueda de la biodiversidad de suelos en áreas agrícolas con uso de intensivo de biocidas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

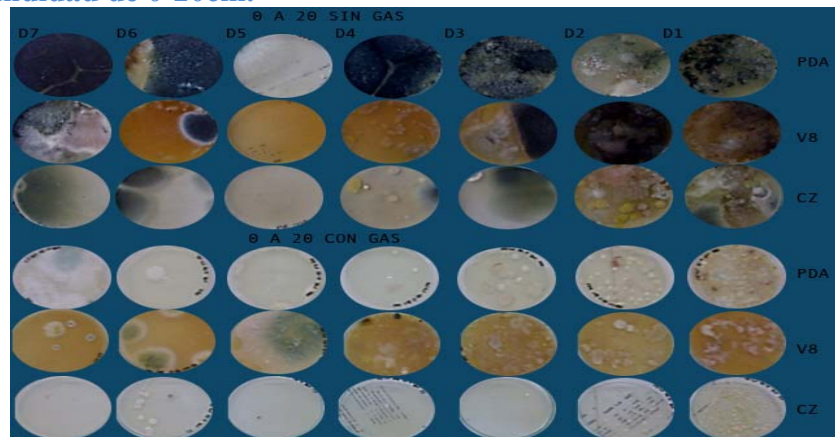
- Agrios G.N. 1996. “Fitopatología”. 3era Edición; Noriega Editores: México.
- Alurralde, I. Facultad de Ciencias Exactas; Universidad Nacional de Salta. “Estudio de Bromuro de Metilo en el cultivo de Tabaco, referencia en línea”, Enlace: <http://www.ingenieroambiental.com/new3informes/tabaco.htm>. Fecha de consulta, enero 2014.
- Arias, E.; Piñeiros, P. 2008. “Aislamiento e Identificación de Hongos Filamentosos de Muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde”: Bogota, Colombia.
- Besano, A.; Anca, V., Hensel, C. 2010. “Alternativa para el manejo de Fusarium en cebolla: Uso de Thichoderma”. Corfo Rio Colorado: Argentina.
- Bills, G.F.; Christensen, M., Powell, M.; Thorn, G. 2004. ‘Saprobic soil fungi’, *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*, Elsevier, Amsterdam, pp. 271–302.
- Birnboim, H.C.; Doly, J. 1979. “A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA”. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1523.
- Carrillo, L. 2003. “Microbiología Agrícola”, Capítulo 3. Actividad Microbiana. Universidad Nacional de Salta: Argentina.
- Cifuentes, D. 1990. “Prácticas de patología vegetal”. Universidad de Murcia, I.S.B.N.: 84-7684-981-8: Murcia.
- Chomczynski, P.; Sacchi, N. 1987. “Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction”. *Analytical Biochemistry* 162: 156-9.
- Colin, R. 2008. “Reemplazo del Bromuro de Metilo para su uso en producción de tomate de invernadero”. Fundación para la Innovación Agraria: Chile.
- Curtis, H.; Barnes, N.S.; Schnek, A.; Flores, G. 2000. “Biología”, Sexta edición en español: Buenos Aires- Argentina.
- Díaz, F. 2012. “Introducción a los Nano materiales”, Departamento de Ingeniería, Laboratorio de Tecnología de Materiales: Cuatitlan, Izcalli.
- Echandi, E. 1967. “Manual de Laboratorio para Fitopatología General”. Editorial IICA: Lima, Perú.
- Elsevier, V.B. 2009. “*Aspergillus acidus* from Puerh tea and black tea does not produce ochratoxin A and fumonisin B₂, sciencedirect, referencia en linea,” enlace: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160509002293>. Fecha de consulta: 10 mayo 2014.

- Falcón, I.; Valera, A. 2007. “Extracción de ácidos nucleicos”. En: Ecología Molecular (Eguiarte L. E., Souza V. y Aguirre X., compiladores) SEMARNAT-INE-UNAM-CONABIO, México, DF, pp. 499-515.
- FAO, 2012. “Aumenta la importancia de Agroquímicos en Ecuador”, Agronoticias America Latina y El Caribe, referencia en línea, Enlace: <http://www.fao.org/agronoticias/agronoticias/detalle/es/c/146183>. Fecha de consulta, mayo 2014.
- G.J.; Sherman, N. 1992. “Microbiology a Laboratory Manual 3ra edition”, Cappuccino Benjamin/Cummings Inc.
- Greenberg, A.; Clesceri, L.; Eaton, A. 1992. “Standard Methods for Examination of Water and Wastewater” 18th edition.
- González, G. 2013. “Bioinformaticos Algoritmo BLAST, referencia en línea”, Enlace: <http://www.bioinformaticos.com.ar/algoritmo-blast>. Fecha de consulta, abril 2014.
- Grupo Industrial Advantage Tecnologia, 2004. “Bromuro de Metilo, referencia en línea”, Enlace: http://www.nom-144.com.mx/bromuro_de_metilo.html. Fecha de consulta, diciembre 2013.
- Herveg, B.M.; Lethe, J. 2006. “Las ADN Polimerasas”: Cochabamba, Bolivia.
- Jaramillo, D.F. 2006. “La Biota del Suelo, referencia en línea”, Enlace: <http://www.unalmed.edu.co/~esgeocien/documentos/djaramillo/LA%20BIOTA%20DEL%20SUELO>, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Fecha de consulta 28 abril 2014.
- Jiménez, V. 1987. “Evolución de los biocidas en el suelo”. Bol. San. Veg. Plagas, 13: 99-116.
- Lara, J.M.; Troyliño, I.; García, E.; Fernández, C. 2007. “Desarrollo de una tecnología *in vitro* para la determinación rápida de actividad biocida-biostática sobre agentes fitopatógenos”. Departamento de investigación y desarrollo FUTURECO BIOSCENCE, SL: España.
- Moreira, F.; Huising, E.J.; D.E. 2012. “Manual de Biología de Suelos Tropicales, Muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo”. Instituto Nacional de Ecología, México, 337 pp., México.
- Ochoa, D. 2008. “Caracterización Molecular de 60 hongos que forman parte del Cepario Micológico del C.B.C.M. de la Universidad Técnica Particular de Loja”: Ecuador.
- Ochoa, F.Y.; Cerna, C.E.; Gallegos, M.G.; Landeros, F.J.; Delgado, O.C.; Hernández, C.S.; Rodríguez, G.R.; Olalde, P.V. 2012. “Identificación de especies de Fusarium en semillas de ajo Aguascalientes, México”, Departamento de parasitología, Revista Mexicana de Micología 36: 27-31.
- Padrón, C.E. 2009. “Diseños experimentales con aplicación a la agricultura y la ganadería”, Trillas: México.

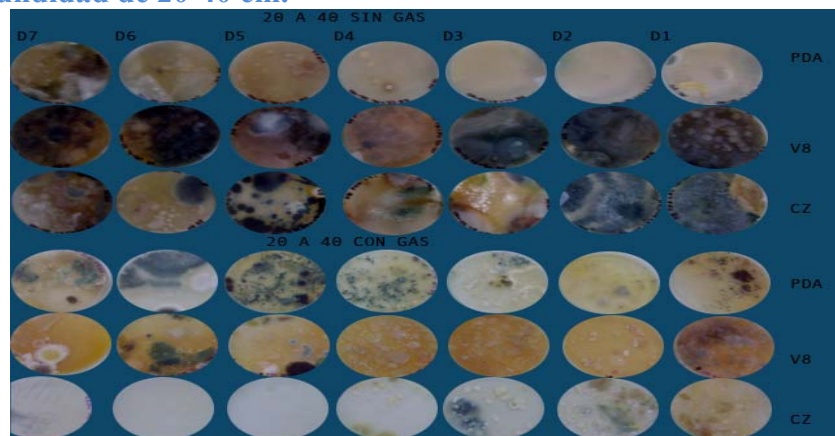
- Pfenning, L.H. 1997. "Soil and rhizosphere microfungi from Brazilian tropical forest ecosystems", *Biodiversity of Tropical Microfungi*, Hong Kong University Press, Hong Kong, pp. 341–365.
- Prieto, M.; López, J.; Pueyo, C. 2009. "Purificación de Ácidos Nucleicos"; Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus universitario de Rabanales, NF: España.
- Ramírez, R.; Trujillo, P.; Rivera, B. 2008. "Identificación y cuantificación de la actividad microbiana, y macrofauna de un Andisol bajo diferentes sistemas de manejo, en el Municipio de Marinilla, Antioquia": Colombia.
- Revista el Agro, 2013. "Sigatoka Negra: EL hongo destructor de las plantaciones de banano, referencia en línea", enlace: <http://www.revistaelagro.com/2013/02/14/sigatoka-negra-el-hongo-destructor-de-las-plantaciones-de-banano>. Fecha de consulta, 9 mayo 2014.
- Rodrigues, G., M.P. 2001. "Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de Mexico", *Acta Zoológica Mexicana*, special issue no 1, pp. 53–78.
- Rodríguez, H.R.; Aguilar, G.C.; Ayala, A.L.; Rocha, J.C.; Padilla, G.V.; Espinosa, H.T. 2009. "Detección de Microorganismos mediante métodos moleculares". Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila: México.
- Rodríguez, Z.S.; Dorante, I.; Velasco, V.J.; Ferrera, R. 2004. "Impacto de la fumigación con bromuro de metilo en tipos morfológicos de amebas desnudas en un suelo agrícola". *Terra Latinoamericana*, Vol. 22, num 2, versión 01875779. Universidad Autónoma Chapingo: Mexico.
- Sosa, C.; Perdomo, F.; Brathwaite, C.; Salazar, J. 1997. "Técnicas para el Diagnostico de las Enfermedades de las Planta". IICA: México.
- Treller, O. 2010. "Secuenciación de AND, Biomática Básica. Universidad de Málaga: España.
- Urrutia, A.I.; Pacheco A.; J. R. "Aislamiento e identificación de *Pythium sp*, un fitopatógeno de interés agrícola en el estado de Querétaro". Laboratorio de Plantas y Biotecnología Agrícola. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro: México.
- Whipps, J.M.; McQuilken, M.P.; Budge, S.P. 1993. 'Use of fungal antagonists for biocontrol of damping-off and *Sclerotinia* disease', *Pesticide Science*, vol. 37, pp. 309–317.
- Wilhelm, S.; Westerlund, F.V. 1988. "Cloropicrina – Fumigante de Suelos, referencia en línea", Enlace: http://www.trical.cl/biblio_content/Cloropicrina-Fumigante%20de%20Suelos.pdf. Fecha de consulta, 01 febrero 2014.

9. ANEXOS:

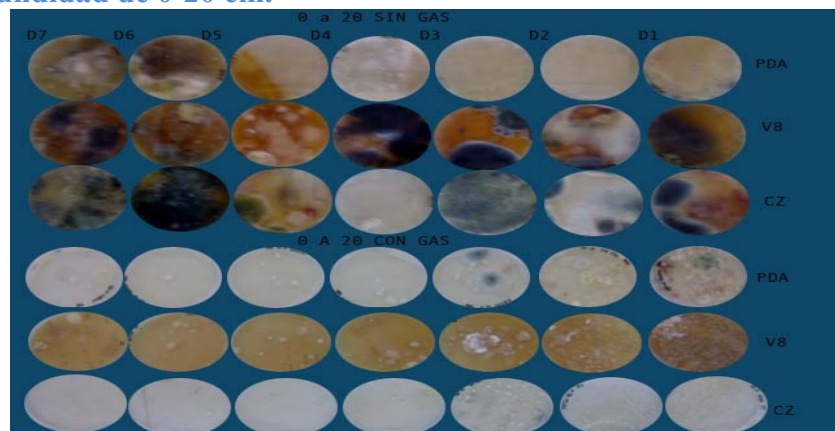
Anexo 1. Siembra de suelo muestra 2 sin y con la aplicación de gas biocida a profundidad de 0-20cm.



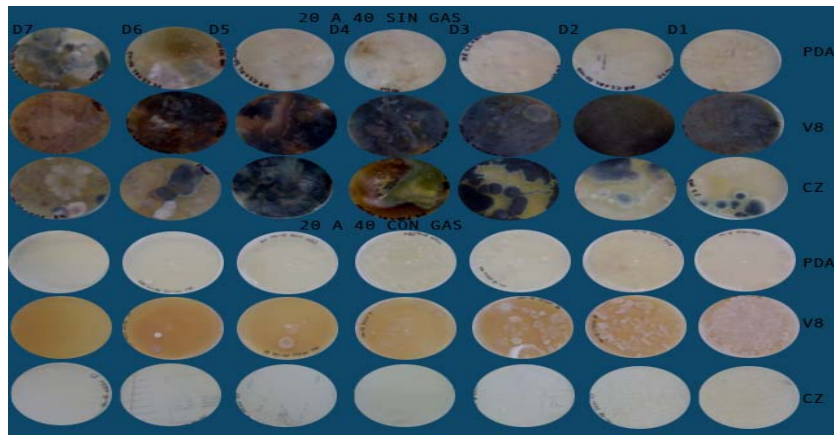
Anexo 2. Siembra de suelo muestra 2 sin y con la aplicación de gas biocida a profundidad de 20-40 cm.



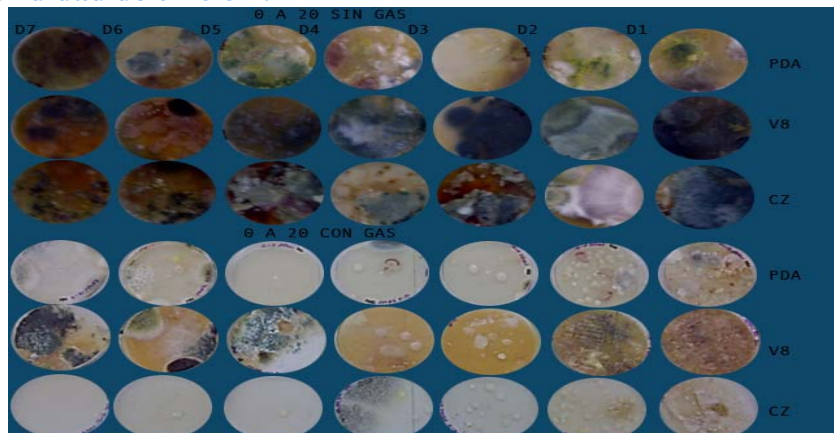
Anexo 3. Siembra de suelo muestra 3 sin y con la aplicación de gas biocida a profundidad de 0-20 cm.



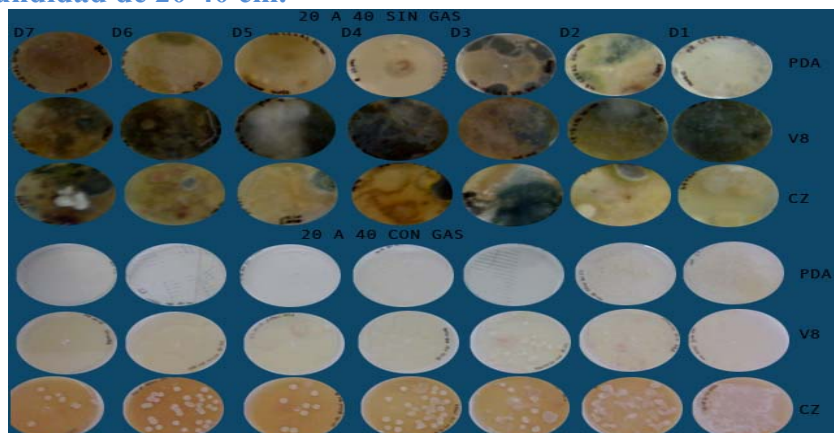
Anexo 4. Siembra de suelo muestra 3 sin y con la aplicación de gas biocida a profundidad de 20-40 cm.



Anexo 5. Siembra de suelo muestra 4 sin y con la aplicación de gas biocida a profundidad de 0-20 cm.



Anexo 6. Siembra de suelo muestra 4 sin y con la aplicación de gas biocida a profundidad de 20-40 cm.



Anexo 7. Componentes del mix para PCR.

Descripción	Cantidad
ADN del hongo en concentración de (50ng/μl)	2 μl
10x buffer	5μl
dNTPS (10mM)	2μl
MgCl₂	4μl
Primer ITS1	2μl
Primer ITS4	2μl
TAQ polimerasa	1μl
H₂O	32μl
TOTAL	50μl

Anexo 8. Detalle de ciclos, temperaturas y tiempos programados en el termociclador.

PCR PRIMERS ITS1 e ITS4	1 Temp.	3 Temp. 35 ciclos			2 Temp.
TEMPERATURA	95	94	57	72	72
TIEMPO	5	1	2	2	10