Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Contaminación en suelos de la provincia de Buenos Aires con el herbicida organofosforado (glifosato) : impacto sobre la comunidad de hongos filamentosos

Fernández Di Pardo, Agustina

2014-03-31

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Fernández Di Pardo, Agustina. (2014-03-31). Contaminación en suelos de la provincia de Buenos Aires con el herbicida organofosforado (glifosato) : impacto sobre la comunidad de hongos filamentosos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Fernández Di Pardo, Agustina. "Contaminación en suelos de la provincia de Buenos Aires con el herbicida organofosforado (glifosato) : impacto sobre la comunidad de hongos filamentosos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-03-31.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Contaminación en suelos de la Pcia de Buenos Aires con el herbicida organofosforado (glifosato): Impacto sobre la comunidad de hongos filamentosos.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área **CIENCIAS BIOLOGICAS**

Agustina Fernández Di Pardo

Director de tesis: Dra. Alicia Godeas

Consejero de Estudios: Dra. Alicia Godeas

Lugar de trabajo: Lab. de Microbiología del Suelo - Depto. de Biodiversidad y Biología Experimental – Facultad de Cs. Exactas y Naturales – UBA.

Buenos Aires, 2014.

Agradecimiento

A Alicia Godeas, por haberme dado un lugar en su laboratorio.

A Vivi, por sus consejos y ayuda y por darme aliento para salir adelante.

Al Labo 12 y 12 y 1/2, por tantos momentos compartidos y por ayudarme cada vez que lo necesite.

A Laura Markovic, por su gran ayuda en las determinaciones de ergosterol.

A Santi y Vanina, por su ayuda y compañía en el muestreo.

A toda la cátedra de microbiología (FAUBA) por el apoyo.

A Caro, Marina, Gabi, Pato, Vicki, Ema y Vale, por tantos mates y momentos compartidos.

A mis amigos por estar presentes en todos los momentos de mi vida.

A mi familia y Nacho, por acompañarme siempre y por apoyarme en todo.

Gracias a todos!!!!!

Índice

RESUMEN **1**

ABSTRACT **2**

INTRODUCCIÓN

1.- El suelo y su ambiente **3**

2.-Hongos del suelo **5**

3.- Agroquímicos. Características del glifosato **6**

4.- Hongos y glifosato. **7**

HIPÓTESIS Y OBJETIVO **10**

CAPÍTULO 1: CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES FÚNGICAS DE SUELOS AGRÍCOLAS. COMPORTAMIENTO FRENTE A GLIFOSATO *IN VITRO*

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS **11**

METODOLOGÍA

1.-Aislamiento de microorganismos del suelo en dos sitios con distinta historia de aplicación de glifosato.

1.1) Recolección de muestras **12**

1.2) Aislamiento e identificación de hongos filamentosos **12**

1.2.1) Lavado de muestras de suelo **12**

1.2.2) Siembra de partículas y aislamiento **13**

1.3) Caracterización morfológica de las comunidades fúngicas presentes en suelos con y sin exposición al glifosato **14**

2.- Comparación de las poblaciones fúngicas obtenidas de dos suelos con distinta historia de aplicación de glifosato

2.1) Comparación entre las comunidades fúngicas de cada sitio obtenidas en la caracterización morfológica **15**

2.1.2) Análisis estadístico de las comunidades fúngicas en los distintos tratamientos **15**

2.2) Comparación entre las comunidades fúngicas de cada sitio mediante la técnica de pirosecuenciación **16**

2.2.1) Extracción y cuantificación de ADN genómico **16**

2.2.2) Diseño de oligonucleótidos específicos (primers) **16**

2.2.3) Amplificación del ADN genómico **17**

2.2.4) Pirosecuenciación **18**

2.2.5) Análisis de las secuencias y confección de MOTUs **18**

2.2.6) Comparación de las comunidades fúngicas entre los sitios **19**

ESQUEMA Nº1 **20**

3.- Selección *in Vitro* de cepas tolerantes a glifosato

3.1) Crecimiento en medio sólido. Cinética **21**

3.2) Crecimiento en medio líquido **21**

3.2.1) Cálculo de biomasa **21**

3.2.2) Cuantificación de glifosato en el sobrenadante **21**

RESULTADOS

1.-Aislamiento de microorganismos del suelo en dos sitios con distinta historia de aplicación de glifosato

1.1) Características de los suelos en los distintos sitios muestreados **23**

1.2) Aislamiento e identificación de hongos filamentosos **24**

1.2.1) Lavado de muestras de suelo **24**

1.2.2) Siembra de partículas y aislamiento de hongos filamentosos **25**

1.3) Caracterización morfológica de las comunidades fúngicas presentes en suelos con y sin exposición al glifosato. **25**

2.- Comparación de las poblaciones fúngicas obtenidas de dos suelos con distinta historia de aplicación de glifosato

2.1) Comparación entre las comunidades fúngicas de cada sitio obtenidas por aislamiento a partir de partículas de suelo **31**

2.1.2) Análisis estadístico de las comunidades fúngicas en los distintos tratamientos **32**

2.2) Comparación entre las comunidades fúngicas de cada sitio mediante la técnica de pirosecuenciación **34**

2.2.1) Análisis de los resultados obtenidos por la técnica de pirosecuenciación **34**

2.2.2) Comparación de las comunidades fúngicas entre los sitios **38**

3.- Selección *in Vitro* de cepas tolerantes a glifosato

3.1) Crecimiento en medio sólido. Cinética **40**

3.2) Crecimiento en medio líquido **42**

3.2.1) Cálculo de biomasa **42**

3.2.2) Cuantificación de glifosato en el sobrenadante **43**

DISCUSIÓN **45**

CONCLUSIONES **48**

CAPÍTULO 2: EFECTO DEL GLIFOSATO SOBRE LAS COMUNIDADES FÚNGICAS DEL SUELO FRENTE A UNA APLICACIÓN PUNTUAL

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS **49**

METODOLOGÍA

1. Estudiar los efectos del glifosato sobre las comunidades fúngicas del suelo

1.1) Diseño experimental **50**

1.2) Aislamiento e identificación de hongos filamentosos **50**

1.3) Caracterización morfológica de las comunidades fúngicas presentes en suelos con y sin exposición al glifosato. **50**

1.3.1) Comparación entre las comunidades fúngicas de cada sitio **51**

1.4) Análisis estadístico de las comunidades fúngicas en los distintos tratamientos **51**

1.5) Comparación de las comunidades fúngicas de los distintos tratamientos utilizando la técnica de pirosecuenciación **51**

1.5.1) Extracción y cuantificación de ADN genómico **51**

1.5.2) Diseño de oligonucleótidos específicos (primers) **52**

1.5.3) Amplificación del ADN genómico **52**

1.5.4) Pirosecuenciación 52

1.5.5) Análisis de las secuencias y confección de MOTUs 53

1.5.6) Comparación de las comunidades fúngicas entre los tratamientos 53

2.- Evaluación de contenido de ergosterol en suelo

2.1) Extracción de ergosterol 54

2.2) Cuantificación en HPLC 54

3.- Medición de parámetros morfológicos en planta de soja (*Glycine max*) 55

4.- Evaluación de la presencia de productos derivados del glifosato en el suelo. Estudios preliminares

4.1) Extracción de glifosato a partir de la muestra del suelo 55

4.2) Cuantificación en Cromatógrafo Iónico 55

ESQUEMA Nº2 56

RESULTADOS

1.- Estudio de los efectos del glifosato sobre las comunidades fúngicas del suelo

1.1) Caracterización morfológica de las comunidades fúngicas presentes en suelos con y sin exposición al glifosato 57

1.2) Comparación entre las comunidades fúngicas de cada sitio obtenidas por aislamiento a partir de partículas de suelo 60

1.3) Análisis estadístico de las comunidades fúngicas en los distintos tratamientos 61

1.4) Comparación de las comunidades fúngicas de los distintos tratamientos utilizando la técnica de pirosecuenciación 64

2.- Evaluación de contenido de ergosterol en suelo 65

3.- Medición de parámetros morfológicos en planta de soja (*Glycine max*) 67

4.- Estudios preliminares de la presencia de glifosato en las muestras de suelo 68

DISCUSIÓN 69

CONCLUSIONES 71

CONCLUSIÓN GENERAL 72

BIBLIOGRAFÍA 73

ANEXO 81

CONTAMINACIÓN EN SUELOS DE LA PCIA DE BUENOS AIRES CON EL HERBICIDA ORGANOFOSFORADO (GLIFOSATO): IMPACTO SOBRE LA COMUNIDAD DE HONGOS FILAMENTOSOS.

RESUMEN

El herbicida más utilizado en Argentina es el N-phosphonomethylglycine (nombre comercial: Glifosato). Éste puede ser rápida y completamente degradado por los microorganismos, por lo que el tiempo de vida en el suelo es bajo. Sin embargo, el comportamiento del glifosato puede variar en función de las características físicas y químicas del suelo sobre el que se aplique. Por lo tanto, el tiempo de permanencia en el suelo podría ser mayor. Es importante estudiar el comportamiento de este herbicida dada las potenciales alteraciones que puede provocar en las comunidades de microorganismos que viven en el suelo y en algunos de sus procesos. La contaminación de los suelos no sólo está afectando su biodiversidad microbiana sino también a su fertilidad, dado que los microorganismos son fundamentales para el proceso de reciclaje de nutrientes.

En este trabajo, se compararon comunidades de hongos filamentosos provenientes de suelos con y sin historia de aplicación de glifosato y se evaluó la capacidad de los hongos filamentosos en la recuperación de suelos contaminados por el herbicida glifosato. Para ello, se aislaron y caracterizaron hongos filamentosos del suelo en dos sitios con distinta historia de aplicación de glifosato utilizando dos técnicas distintas (método tradicional de lavado de muestras múltiples y siembra de partículas de suelo y el método de pirosecuenciación). Se seleccionaron cepas tolerantes a glifosato, se estudiaron los efectos del glifosato sobre los hongos luego de una aplicación puntual y se evaluó la presencia de glifosato en el suelo.

Se observó que las poblaciones fúngicas del suelo varían en su composición específica y en su biomasa en suelos expuestos a glifosato en comparación con suelos sin exposición. La mayor riqueza específica y los mayores valores de ergosterol, como medida indirecta de biomasa, se obtuvieron en suelos sin historia de prácticas agrícolas. Se lograron obtener cepas tolerantes al glifosato: *T. harzianum*; *F. oxysporum*; *P. lilacinus*; *C. didymum*. Finalmente, los valores de concentración de glifosato en suelos fueron bajos y prácticamente nulos luego de 3 meses de la aplicación en la mayoría de los casos.

ABSTRACT

SOILS OF BUENOS AIRES PROVINCE CONTAMINATED WITH ORGANOPHOSPHATE HERBICIDE (GLYPHOSATE): IMPACT ON SOIL FILAMENTOUS FUNGI COMMUNITY

The most widely used herbicide in Argentina in de N-phosphonomethylglycine (glyphosate). Because it can be rapidly and completely degraded by microorganisms, it disappears quickly from soil. However, the destiny of glyphosate in soil may vary depending on the physical and chemical soil characteristics. It is important to study the behavior of this herbicide given the potential changes that may produce in the communities of microorganisms and in the processes that involves them. The soil contamination with this herbicide no only affects the microbial biodiversity, but also its fertility, considering that microorganisms are a fundamental part of the nutrient recycling process in soil.

In this study, changes in filamentous fungi communities' from soils that were previously or not exposed to the herbicide and the capacity of some strains of remediating contaminated soils were evaluated. Soil fungi were isolated and communities were characterizes in two sites with different history of exposure to glyphosate, using two techniques: traditional isolation method (morphological) and pyrosequencing (molecular). Tolerant strains of fungi were selected; effects of recent glyphosate application on soils fungal communities was evaluated and remnant glyphosate in soil was quantified.

In conclusion, soil fungal community changes and fungal biomass reduction were observed after glyphosate application. Six tolerant strains were obtained: *T. harzianum*; *F. oxysporum*; *P. lilacinus*; *C. didymum*. The concentration of glyphosate in soil was practically zero after 3 month from application.

INTRODUCCIÓN

1.- El suelo y su ambiente

El suelo es la superficie de la tierra donde se desarrollan los microorganismos; en ella interactúan la biosfera (microorganismos vivos), la geosfera (rocas y minerales), la hidrósfera y la detritósfera (materia orgánica, restos vegetales). El hábitat de suelo está constituido por el conjunto de organismos vivos que lo habitan, incluyendo a las plantas, la microfauna y los microorganismos (bacterias, algas y hongos), en relación con los factores abióticos del ambiente: temperatura, húmedad, composición de la roca madre, pH, disponibilidad de oxígeno.

La fase sólida del suelo está constituida por las partículas minerales y orgánicas que se asocian en agregados. En la superficie de las partículas, en el interior de los agregados o asociados a las raíces, se desarrollan los microorganismos, que interaccionan constantemente con la atmósfera del suelo y su solución acuosa.

La capacidad de albergar una enorme cantidad de biomasa microbiana y una alta diversidad de especies, transforma al suelo en uno de los ambientes más desafiantes para los microbiólogos. Se estima que 1 gramo de suelo contiene varios kilómetros de hifas fúngicas, más de 109 células bacterianas y organismos pertenecientes a decenas de miles de especies diferentes. Por todo esto el suelo es considerado un reservorio natural de microorganismos, gran parte de ellos no cultivables en los medios convencionales, y por lo tanto totalmente desconocidos, albergando la mayor parte de la biodiversidad genética del planeta (Voroney, 2007, Decaëns, 2010).

Zinger *et al*, en el 2011 observaron que los patrones de distribución de la riqueza de los microorganismos evaluados a escala de paisaje, tienden a estar más relacionados con la distribución de la vegetación, el tipo de suelo, la topología y las perturbaciones (Turner et al. 2001).

Si se evalúa a escala local, el suelo presenta un rango de escala que va desde centímetros a metros debido a la heterogeneidad propia del hábitat y a la disponibilidad de recursos químicos. Por otra parte, las raíces provocan una gran heterogeneidad en el suelo debido a: los exudados que liberan al mismo, a la materia orgánica que aportan al ambiente edáfico y el efecto que ocasionan sobre su estructura. El efecto de la raíz en la escala local es considerado de importancia para comprender los patrones de distribución de las especies en el suelo.

La actividad y la diversidad de la microbiota, además de condicionar la fertilidad del suelo, determinan la estabilidad y funcionamiento de ecosistemas naturales y agroecosistemas. La diversidad microbiana es considerada esencial para garantizar los ciclos de los nutrientes y los fenómenos de descomposición de restos vegetales en cualquier ecosistema terrestre.

La agricultura tradicional ha buscado acrecentar la producción agrícola mediante el manejo del agua, los nutrientes y el control de malezas, insectos y organismos fitopatógenos. Las prácticas

agrícolas más recientes, apuntan a utilizar los insumos agrícolas en forma dirigida y controlada en el manejo integrado de plagas y enfermedades, la agricultura de precisión, entre otros. La calidad del suelo es definida por su capacidad para funcionar en un marco de ecosistema natural o modificado, sostener la productividad vegetal y animal, mantener o mejorar la calidad de agua y aire, y contribuir a la salud humana y habitabilidad (Karlen et al, 1997).

La calidad del suelo está fuertemente influenciada por los procesos microbianos que en él ocurren, y en consecuencia, relacionados con la diversidad; por lo tanto, es muy probable que el mantenimiento de la estructura de la comunidad microbiana tenga la capacidad de servir como indicador temprano y de gran sensibilidad de la degradación o empobrecimiento del suelo (Pedraza *et al*, 2010).

Una forma de medir la calidad del suelo es a través de la actividad enzimática, principalmente de origen microbiano, ya sean estas enzimas intra o extracelulares. Las enzimas del suelo dan una idea de la fertilidad, actividad microbiana, reciclado de nutrientes, nivel de contaminación debido a metales pesados o agroquímicos.

Los niveles enzimáticos varían entre los distintos suelos, ya que cada ambiente presenta distinto contenido de materia orgánica, composición e intensidad de actividad microbiológica. Dentro de las enzimas utilizadas para determinar calidad de suelo encontramos a la amilasa, arilsulfatasa, β-glucosidasa, celulasas, quitinasas, dehidrogenasas, fosfatasas, proteasas y ureasas. En particular, la dehidrogenasa, es comúnmente utilizada para medir disrupciones ocasionadas por la aplicación de pesticidas (Das & Varma, 2011).

2.- Hongos del suelo

El reino Fungi incluye a organismos eucariontes y heterótrofos que constituyen un grupo monofilético que incluye a los Phylum Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota y Basidiomycota. Dentro de los hongos es posible encontrar una gran variedad de estructuras, pudiendo ser unicelulares o filamentosos, formados por estructuras tubulares llamadas hifas. Se estima que existen alrededor de 1.725.000 especies en todo el mundo, de las cuales 70.000 especies, corresponden a especies fúngicas que se han podido identificar (Llorente-Bousquets & Ocegueda, 2008).

El desarrollo de las comunidades fúngicas depende de diversos factores ambientales: fuente de carbono; nitrógeno; temperatura; pH; aieración y humedad. Son los principales responsables de la mineralización de residuos orgánicos, contribuyendo así al reciclaje de nutrientes, fertilidad del suelo, formación de materia orgánica y a la formación y estabilización de los agregados del suelo a través de sus hifas y de la producción de polisacáridos (Bragg 1985; Paul & Clark, 1989; Tisdall 1991, Paul, 2007;). Son capaces de producir una gran variedad de enzimas extracelulares lo que les permite degradar compuestos complejos (lignina, celulosa). Además, sus metabolitos secundarios presentan actividad antibiótica y biocontroladora. Esta gran diversidad metabólica hace que sean el foco de estudio para encontrar compuestos químicos útiles tanto en el área de la medicina como en el área agronómica y ambiental.

Existen diferentes técnicas destinadas a estimar la biomasa fúngica del suelo, como: conteo de hifas (Parkinson, 1982a; Stahl et al, 1995); microscopía de fluorescencia (Bölter, 2002); clarificación y tinción de hojas (Bärlocheser & Kendrick, 1974; Bölter et al. 2002,) y ensayos de ATP (Larsen et al., 2004). También se han utilizado marcadores bioquímicos como la glucosamina y el ergosterol (Newell, 1992, Whipps & Lewis, 1980). La determinación de glucosamina puede sobreestimar la biomasa ya que está presente en otros microorganismos y también se encuentra en las hifas una vez que el micelio muere.

El ergosterol es el esterol más abundante que se encuentra en las membranas celulares de la mayoría de los hongos filamentosos, levaduras y de algunas microalgas y protozoos (Weete, 1989, Newell, 1992, He et al, 2000). Stahl & Parkin (1996) encontraron que existe una correlación positiva entre la concentración de ergosterol en suelo y la longitud total de hifas presentes en el suelo. Zhao *et al* (2005) obtuvieron resultados similares al encontrar una correlación positiva entre la biomasa fúngica estimada por contenido de ergosterol y biomasa obtenida por el método de respiración inducida por sustrato. El contenido de ergosterol puede variar de acuerdo a: el estado metabólico de la comunidad fúngica; a la composición específica de la comunidad fúngica del suelo; y a la tasa de recambio del ergosterol.

3.- Agroquímicos. Características del glifosato.

Los compuestos organofosforados pueden ser de origen sintético o natural. Se caracterizan por la presencia de una unión covalente entre un átomo de carbono y otro de fósforo (C-P), muy estable. Por esta razón, estos compuestos son resistentes a la hidrólisis química, descomposición térmica y fotólisis en comparación con compuestos análogos que contienen los enlaces N-P, S-P u O-P (Schuette, 1998; Roberts, 1998, Ternan *et al*, 1998).

Comercialmente, el organofosforado más importante es el Glifosato [N-(phosphonomethyl)-glycine, $HOOC-CH_2-NH-CH_2-PO_3H_2$). Su uso frecuente se debe a la necesidad de controlar las malezas que disminuyen el rendimiento de los cultivos. Este herbicida es de amplio espectro, post-emergente, de acción total, que actúa sobre la parte aérea de la planta y se transloca a través del xilema y floema, distribuyéndose con rapidez por toda la planta. Provoca interrupción del crecimiento, clorosis y necrosis. El mecanismo de acción del herbicida es a través de la vía de inhibición de la enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-P sintetasa (EPSPS), una enzima esencial en el proceso de síntesis de los aminoácidos aromáticos en las plantas. Esta inhibición conduce a una disminución de la síntesis de los aminoácidos aromáticos, triptófano, fenilalanina y tirosina, así como a tasas reducidas de la síntesis de proteínas, ácido indol acético (una hormona de crecimiento de las plantas) y clorofila. La muerte de la planta es lenta y se manifiesta inicialmente por una suspensión del crecimiento, seguida de clorosis y luego, de necrosis de los tejidos de la planta.

Las razones por las cuales se ha adoptado mundial y rápidamente el uso de cultivos resistentes al glifosato (GR) se debe a que disminuye el costo de producción (no es necesario aplicar otros herbicidas), permite un manejo de malezas más eficiente y es de fácil aplicación. Dado que es un herbicida de amplio espectro, no selectivo, una o dos aplicaciones post-emergentes, en el tiempo adecuado, es suficiente para lograr un control del crecimiento de malezas satisfactorio (Dukes & Powles, 2009).

Para la degradación de glifosato, la transformación microbiana es tal vez la principal vía, pasando por intermediarios como AMPA, sarcosina, formaldehído y finalmente dióxido de carbono (Mbanaso *et al*, 2013).

El glifosato presenta una vida media en el suelo que abarca un amplio rango, desde unos pocos días hasta dos o tres meses. También se ha encontrado una persistencia en suelo de cientos o miles de años y una persistencia de la actividad fitotóxica de más de 19 semanas después de su aplicación (Andrea *et al*, 2003).

Se considera que el tiempo de permanencia en el suelo de este herbicida es bajo ya que puede ser rápida y completamente degradado por los microorganismos. Sin embargo, la tasa de biodegradación varía en cada tipo de suelo, de acuerdo a las características que éste presente. Esto se debe a que este herbicida puede quedar adsorbido, a través de enlaces de

hidrógeno a la materia orgánica y por intercambio aniónico a las arcillas y a los óxidos de hierro y aluminio (Andrea *et al*, 2003). En suelos en los que coinciden condiciones de pH alto y presencia de concentraciones altas de fosfatos inorgánicos, puede tener una reducida movilidad. Por lo tanto, opera como una bomba de liberación lenta del producto. Una parte se mantiene libre y se degrada, pero otra puede volver a unirse al suelo, o dispersarse con el agua. La consecuencia es que, el tiempo de permanencia aumenta, así como también aumenta la posibilidad de dispersión en los cuerpos de agua, pudiendo ser incluso transportado a las napas (Barja & Dos Santos Afonso, 1998; Pessagno *et al*, 2005).

Existen estudios que demuestran que la aplicación sucesiva de glifosato al suelo disminuye la tasa de degradación del mismo, aumentando su vida media. Esto se atribuye a una degradación del glifosato libre seguida de un ataque al herbicida retenida en el suelo (Andrea *et al*, 2003).

La inhibición de la 5-enolpiruvil shikimato-3-P sintetasa es específica de las plantas, por lo que en principio no sería tóxico para otros organismos. Sin embargo, se han encontrado evidencias de efectos nocivos a la salud humana. Se lo ha asociado con irritaciones en la piel (Maibach *et al*, 1996). Con respecto al potencial genotóxico la exposición *in vitro* de linfocitos humanos a glifosato, resultó en un aumento de los intercambios de cromátidas hermanas (Bolognesi *et al*, 1997), aberraciones cromosómicas y alteraciones en los indicadores de estrés oxidativo. George *et al*. (2010) estudiaron el efecto del glifosato en ratones encontrando que este herbicida presenta actividad promotora de formación de tumores.

4.- Hongos y glifosato.

Los hongos poseen al menos dos mecanismos que le permiten llegar al herbicida: a través de sus hifas pueden penetrar en los agregados y llegar así al compuesto que se encuentra unido a las arcillas y, por otro lado, producir enzimas extracelulares, las cuales al ser liberadas al medio pueden difundir en el espacio del suelo y llegar hasta donde las hifas no pueden hacerlo (Mujija *et al*, 1999).

Las formulaciones de glifosato pueden disminuir o, en pocos casos estimular el crecimiento de ciertas especies de hongos (Sanogo *et al*, 2000; Laatikainen & Heinonen-Tanski, 2002, Tanney & Hutchison, 2010). Investigaciones realizadas sobre suelos fumigados con glifosato comprobaron que algunas cepas de *Fusarium* fueron capaces de degradar el glifosato, utilizándolo como única fuente de fósforo aún en altas concentraciones (Castro *et al*, 2007). En ningún caso se observó una alteración en el desarrollo de la biomasa fúngica, aún con distintas tensiones de oxígeno. Abdel-Mallek *et al* (1994), encontró un incremento en el número de colonias fúngicas como respuesta a dos dosis de aplicación de glifosato (1.84, 9.2 mg ingrediente activo/Kg de suelo seco) para algunas especies de *Acremonium*, *Aspergillus* y *Penicillium.* Asimismo, se han encontrado algunas cepas de *Fusarium*; *Trichoderma harzianum*; *Trichoderma viride*; *Scopulariopsis*; *Penicillium* sp; *Aspergillus niger* y *Alternaria* capaces de degradar glifosato utilizándolo como única fuente de fósforo (Krzysko-Lupicka *et al*, 1997). Por

otro parte, se observó un efecto negativo en los valores del área de la colonia y el número de conidios por unidad de área de colonia de *Fusarium* solani; *Penicillium ultimum* y *Trichoderma viride* y en el porcentaje de germinación de conidios de *F. solani* (Meriles *et al*, 2006). El glifosato también puede afectar la simbiosis entre las raíces y hongos formadores de micorrizas arbúsculares (HFMA). Estudios realizados muestran que el glifosato tiene efectos negativos en la colonización de raíces de zanahoria *in vitro* y sobre la germinación de esporas y crecimiento del tubo germinativo en ausencia de la planta hospedante, pero a concentraciones mayores que la dosis agronómica (Malty *et al*, 2006, Wan *et al*, 1998).

Además de las metodologías tradicionales para el estudio de las comunidades fúngicas del suelo (aislamiento a partir de partículas de suelo, diluciones), actualmente se utilizan enfoques metagenómicos. Esta técnica nos permite tener en cuenta a aquellos organismos que no pueden crecer en medios de cultivo sintéticos o que, por tener un crecimiento lento, no son detectados en los análisis. Un problema que surge al momento de utilizar la metagenómica para el estudio de los genomas microbianos es que, de la inmensa diversidad de microorganismos que se presupone existente, sólo una pequeña proporción ha sido identificada (Petrocino *et al*, 2009).

Entre las tecnologías de segunda generación asociadas a los proyectos actuales de metagenómica se encuentra la pirosecuenciación. Esta metodología de secuenciación de ADN fue desarrollada a mediado de la década del 90' y se caracteriza por ser una secuenciación por síntesis usando una polimerasa de ADN y por la generación de pulsos de luz cada vez que uno o más nucleótidos se unen a la cadena de ADN.

Hoy en día, el término pirosecuenciación se refiere a la reacción química básica y a una tecnología de secuenciación en plataformas de bajo rendimiento (Ej. Biotage PSQ 96 System). Sin embargo, el término "pirosecuenciación 454" hace referencia a plataformas de secuenciación de alto rendimiento (Ej. 454 Life Sciences - Roche) que basan su funcionamiento en la química de la pirosecuenciación y son utilizadas para estudios metagenómicos.

Así es que resulta posible realizar estudios de biodiversidad en distintos ambientes. Los cambios de la biodiversidad relacionados con la estructura del paisaje, se puede separar en componentes alfa, beta y gamma. La diversidad alfa es la riqueza de especies de una comunidad particular a la que consideramos homogénea; la diversidad beta es el grado de cambio ó reemplazo en la composición de especies entre diferentes comunidades en un paisaje y la diversidad gamma es la riqueza de especies del conjunto de comunidades que integran un paisaje, resultante de las diversidades alfa y beta (Whittaker, 1972).

La llanura pampeana posee una extensión aproximada de 60 millones de hectáreas, es ligeramente ondulada y está influenciada por un clima templado y húmedo. Se divide en dos grandes regiones: la Pampa Húmeda y la Pampa Seca, y en diferentes subregiones menores como la Pampa Ondulada y la Pampa Deprimida, entre otras. Es una de las regiones más fértiles del mundo y debido a su gran amplitud y a sus altos rendimientos también es,

mundialmente, una de las áreas de cultivo de grano más productiva. De hecho, el 90% de la superficie de la Pampa se encuentra sometida a agricultura intensiva. Actualmente, la Argentina es el tercer país en producción de soja y cuarto en producción de maíz, concentrándose toda esta producción principalmente en la región pampeana (Rascován *et al*, 2013).

El uso habitual de glifosato en los suelos bajo cultivo de soja, hace interesante el estudio de los cambios que puede llegar a producir el uso del mismo sobre la biodiversidad microbiana de los mismos. Resulta de gran importancia estudiar el comportamiento que presenta el glifosato debido a las potenciales alteraciones que puede provocar sobre las comunidades de microorganismos que viven en el suelo y a la alteración de algunos de sus procesos, por tratarse de un compuesto polar conocido por su fuerte adsorción a los óxidos de Fe, Al y arcillas reduciendo así su disponibilidad. La principal inquietud con respecto a este producto radica en que algunas comunidades de microorganismos que crecen en suelos con baja capacidad de adsorción, pueden encontrarse bajo un mayor riesgo cuando se aplica una alta cantidad de este herbicida. De esta manera, la contaminación de los suelos no solo afecta su biodiversidad microbiana si no también todos los procesos metabólicos asociados a él y a su fertilidad.

Así, planteamos la siguiente hipótesis:

El glifosato afecta a la comunidad microbiana del suelo; existiendo algunas cepas de hongos filamentosos capaces de degradarlo y que, por lo tanto, pueden ser utilizados potencialmente en la recuperación de suelos contaminados por este herbicida.

Para responder esta hipótesis se plantean como objetivo general ***comparar las comunidades fúngicas en suelos con y sin historia de exposición a glifosato y evaluar la capacidad de los hongos filamentosos en la recuperación de suelos contaminados por el herbicida glifosato,*** siendo los objetivos parciales los que se enumeran a continuación:

1) Aislar, identificar taxonómicamente y caracterizar hongos filamentosos del suelo en dos sitios con distinta historia de aplicación de glifosato.

2) Seleccionar *in vitro* cepas tolerantes a glifosato.

3) Estudiar los efectos del glifosato sobre las comunidades fúngicas luego de una aplicación puntual del glifosato.

4) Evaluar el efecto de la aplicación de glifosato en la biomasa fúngica del suelo.

5) Evaluar la presencia de glifosato en el suelo.

Capítulo 1

CAPÍTULO 1: CARACTERIZACION DE LAS COMUNIDADES FUNGICAS DE SUELOS AGRICOLAS. COMPORTAMIENTO FRENTE A GLIFOSATO *IN VITRO*.

HIPOTESIS

1) El glifosato afecta a la comunidad fúngica del suelo.

2) Existen cepas de hongos filamentosos capaces de degradarlo y que, por lo tanto, pueden ser utilizados potencialmente en la recuperación de suelos contaminados por este herbicida.

OBJETIVOS PARCIALES

1) Aislar e identificar taxonómicamente hongos filamentosos del suelo.

2) Comparar las poblaciones fúngicas obtenidas de dos suelos con distinta historia de aplicación de glifosato.

3) Seleccionar mediante un ensayo in vitro cepas tolerantes a glifosato.

METODOLOGIA

1.-Aislamiento de microorganismos del suelo en dos sitios con distinta historia de aplicación de glifosato.

1.1) Recolección de muestras

Se recolectaron muestras de un suelo cultivado con soja en la Estancia La Solita de la Localidad de Chivilcoy (34° 57' 29'' S, 60° 13' 11'' O) (Figura 1A, en marzo del 2010, 7 días después de la aplicación del herbicida organofosforado (nombre comercial: glifosato). Las muestras de suelo fueron tomadas de los primeros 15 cm de profundidad en 3 sitios diferentes: un lote (LS16) con 5 años de historia de aplicación; un lote (LS2) con 10 años de historia de aplicación y el casco de la estancia (como tratamiento control) sin aplicación de glifosato.

Se tomaron 10 submuestras de cada lote de soja (lote LS16 y LS2). Se tomaron 5 submuestras del surco y 5 del entresurco, siguiendo una transecta en diagonal al lote. En el lote correspondiente al casco, las submuestras fueron tomadas al azar. A partir de estas submuestras se formaron muestras compuestas las cuales se utilizaron para las distintas determinaciones.

Una muestra compuesta de cada uno de los sitios fue enviada al Instituto de Geocronología y Geología Isotópica (INGEIS-CONICET) para realizar un análisis de la composición química y textural del suelo.

1.2) Aislamiento e identificación de hongos filamentosos

1.2.1) Lavado de muestras de suelo

Las muestras de suelo obtenidas fueron lavadas según la técnica de lavado para muestras múltiples (Figura 1 B) (Bisset & Widden, 1972). Con el objetivo de determinar el número de lavados necesarios para obtener únicamente micelio activo, se realizó una curva de lavado con muestras de suelo obtenidas de los mismos sitios. Se recolectaron alícuotas del agua estéril utilizada para lavar el suelo en botellas estériles. Se sembraron 200µl de dicha agua en placas de Petri de 9cm de diámetro con medio de cultivo agar extracto de malta (AEM) y antibiótico al 1% (estreptomicina 0.5 gr + clorhidrato de tetraciclina 0.25gr), por triplicado. Las placas se incubaron a 25°C en oscuridad durante una semana. Pasado este tiempo, se contabilizó el número de colonias obtenidas por placa. Se graficó la cantidad de colonias vs el número de lavados.

1.2.2) Siembra de partículas y aislamiento

Las partículas de suelo retenidas en los tres tamaños de malla (842, 700 y 200 µm) fueron sembradas en placas de Petri sobre gotas de AEM y antibiótico, como se muestra en la figura 1C (Silvani *et al*, 2008). Las placas se incubaron a 25°C, en oscuridad. Los hongos aislados a partir de estas partículas se conservaron en tubos pico de flauta con AEM para su identificación taxonómica **(**Ellis, 1976; Booth, 1977; Domsch *et al*, 1980; von Arx., 1981).

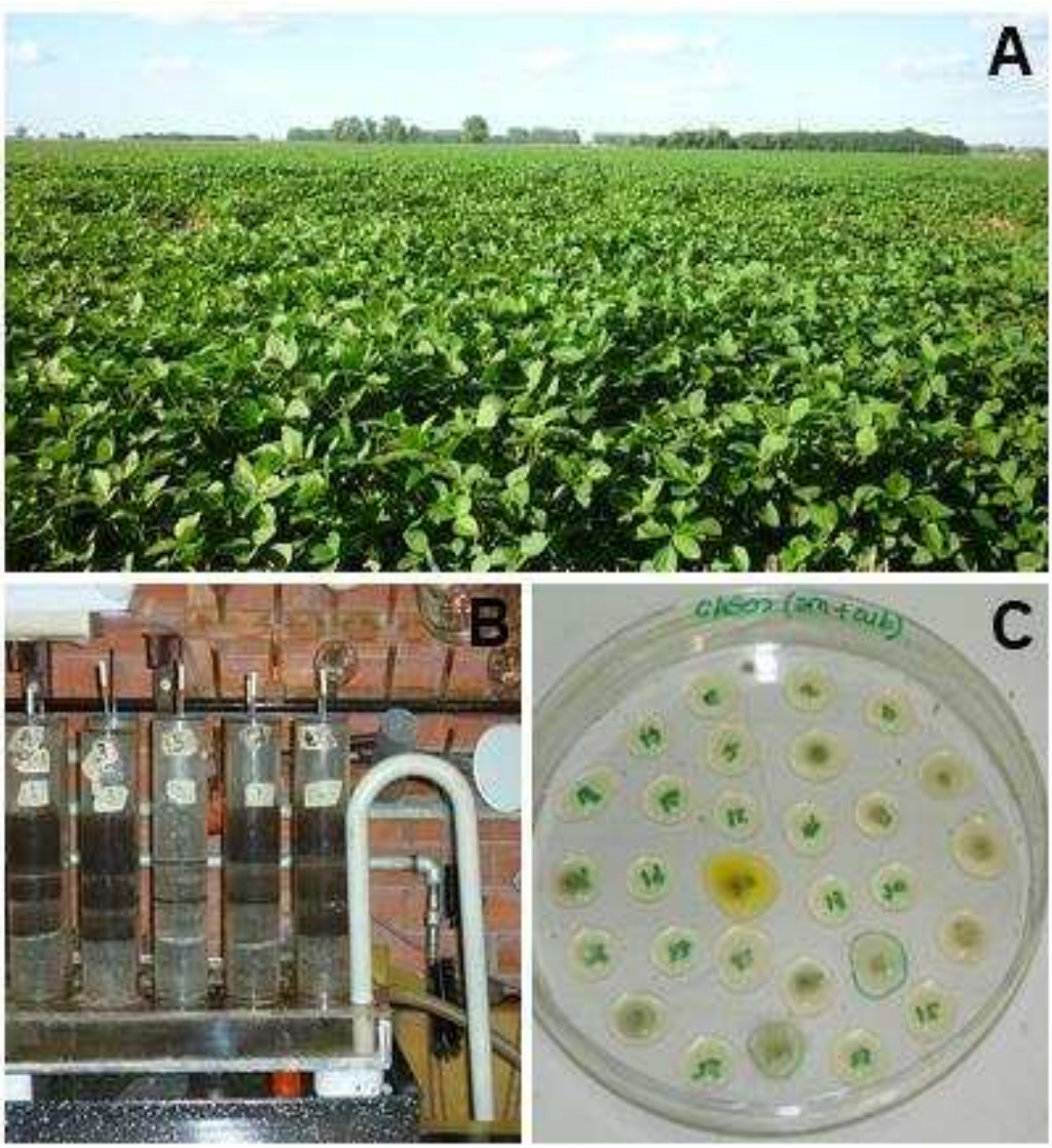


Figura 1: A) *lote (LS2) con 10 años de historia de aplicación de glifosato;* ***B)*** *Aparato de Lavado de muestras múltiples;* ***C)*** *siembra de partículas en gotas con AEM+ATB.*

1.3) Caracterización morfológica de las comunidades fúngicas presentes en suelos con y sin exposición al glifosato.

Una vez que todas las cepas aisladas fueron identificadas taxonómicamente y se calcularon los siguientes parámetros e índices:

F (frecuencia de aparición de cada especie) *= número de apariciones de la especie/número de partículas sembradas por placa.*

Riqueza = número de especies distintas de hongos presentes en cada muestra.

Índice de biodiversidad de Shannon-Wiener (H): asume que todas las especies están representadas en las muestras e indica qué tan uniformes están representadas las especies (en abundancia) teniendo en cuenta todas las especies muestreadas.

$$H = -\sum pi\ (\ln pi),$$

Donde: pi: abundancia relativa de las i especies comparado con el total de especies identificadas en la muestra.

Índice de biodiversidad de Simpson (D): muestra la probabilidad de que dos individuos sacados al azar de una muestra correspondan a la misma especie.

$$D = \sum (pi^2)$$

Índice de equidad de Pielou (J´): con base en los valores de diversidad del índice de Shannon-Wiener, expresa la equidad como la proporción de la diversidad observada en relación con la máxima diversidad esperada.

$$J' = H / \ln S$$

2.- Comparación de las poblaciones fúngicas obtenidas de dos suelos con distinta historia de aplicación de glifosato

2.1) Comparación entre las comunidades fúngicas de cada sitio obtenidas en la caracterización morfológica

Con el fin de comparar a las comunidades fúngicas de los suelos con y sin historia de aplicación de glifosato, se calculó el índice de Bray-Curtis, el cual cuantifica la disimilitud en la composición entre dos sitios diferentes, basadas en los recuentos en cada sitio. El cálculo de este índice se realizó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\textbf{Índice de Bray Curtis (BC)} = BC_{ij} = 2C_{ij} / (S_i + S_j)$$

Donde: C_{ij} *es la suma del valor menor para únicamente aquellas especies comunes entre ambos sitios*; S_i es la suma del valor menor para únicamente aquellas especies en común entre ambos sitios y S_{ij} es el número de especímenes contados en ambos sitios.

Por otro lado, se realizó un Análisis de Conglomerados utilizando la matriz de similitud de Bray-Curtis, que permitió agrupar a los sitios de acuerdo a la similitud de las comunidades.

2.1.2) Análisis estadístico de las comunidades fúngicas en los distintos tratamientos

Para el análisis estadístico de los datos se construyó una matriz de datos donde las distintas especies fueron consideradas como variables y los sitios de muestreo como factores.

Se realizó una transformación de los datos que se hace necesaria en el caso en que las variables estén medidas en distintas escalas o, aún estando medidas en la misma escala, tienen diferencias significativamente grandes, como es el caso de la abundancia de especies fúngicas. De otra forma unas pocas especies que son muy abundantes dominarían el análisis a expensas o detrimento de otras menos abundantes. En estos casos se recomienda la transformación logarítmica (Kendel & Booth, 1992), aplicándose en nuestro caso a transformación log(x+0,5) donde x=frecuencia de la especie considerada.

Las especies con una frecuencia igual o menor al 5% con una sola aparición a través de todos los muestreos no fueron consideradas en el análisis.

Con esta matriz de datos basada en la tabla de frecuencias, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) (INFOSTATv.2013). Por otro lado, se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (ACoorP) en base a la matriz de similitud de Bray-Curtis. Todos estos análisis se llevaron a cabo en el programa estadístico INFOSTAT v2013

Para analizar si las comunidades fúngicas difieren entre sí en base a las especies observadas en cada una y cuáles son las especies que contribuyen en mayor medida a esta separación, se realizó un Análisis de Componentes Principales. Por otro lado, para confirmar si los sitios se separan en base a la composición específica, se utilizó el análisis de ACoorP, basado en la matriz de similitud de Bray-Curtis. El ACoorP permite analizar la interdependencia entre variables categóricas y encontrar una representación gráfica de los n individuos tal que se refleje la distancia entre ellos (Balzarini *et al*, 2008).

2.2) Comparación entre las comunidades fúngicas de cada sitio mediante la técnica de pirosecuenciación

2.2.1) Extracción y cuantificación de ADN genómico

Las muestras de suelo provenientes de los sitios Casco y LS2 fueron tamizadas y homogeneizadas con un tamiz de 2mm y conservadas a -80°C hasta su procesamiento. La extracción de ADN a partir de 0,25g de suelo proveniente de las distintas muestras (LS2, T0 y Casco T0) se realizó siguiendo el protocolo correspondiente al kit PowerSoil™ Isolation kit (Mo Bio Laboratories INC., Carlsbad, CA, USA) (Ver Anexo). De cada tratamiento se extrajo ADN por triplicado, cada replica corresponde a suelo obtenido de distintos sitios dentro de los lotes estudiados. Para corroborar si la extracción de DNA genómico resultó exitosa, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (Ver Anexo). El DNA genómico se cuantificó en un QUBIT® 2.0 Fluorometer. Una vez obtenidos los ADN genómicos, se preservaron a -20ºC hasta el momento de la amplificación.

2.2.2) Diseño de oligonucleótidos específicos (primers)

Para la amplificación del ADN se utilizó un par de oligonucleótidos específicos (en inglés, primers) para hongos saprobios: ITS1F e ITS2 (Buee *et al,* 2009, Orgiazzi *et al*, 2013). Este par de

primers es específico para la región ITS1 y amplifica un fragmento de 400pb. Los oligonucleótidos fueron diseñados específicamente para ser utilizados en la Plataforma de Secuenciación 454 GS-FLX sistema Titanium (en inglés 454 Genome Sequencer FLX – Titanium System) de Roche applied Science®. Por esto, a los primers ITS1F e ITS2 se les agregó, en la posición 5´del oligonucleótido, una secuencia TAG (en negrita) y un identificador de secuencia múltiple (MID o "barcoding") para reconocer la muestra. En el caso de los reverse-primers, se agregó un código de barra (en inglés, Multiplex Identifier (MID)) de 10 pb, diferente para cada muestra, ubicado entre la clave de cuatro bases y la secuencia específica del primer. Estos códigos de barra permiten secuenciar múltiples muestras en una única corrida del pirosecuenciador. En total se confeccionaron 7 oligonucleótidos para las 6 muestras a secuenciar: 1 Forward y 6 Reverse. De esta manera se obtuvieron los siguientes primers:

Primer ITS1F (forward)

5´-**CACGACGTTGTAAAACGAC**CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3´

Primer ITS2 (reverse)

5´-**CAGGAAACAGCTATGACC(MID10pb)**GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3´

2.2.3) Amplificación del ADN genómico

El ADN genómico se amplificó mediante PCR (Polimerase Chain Reaction) utilizando primers específicamente diseñados para pirosecuenciación 454 con el sistema GS-FLX. La amplificación se llevó a cabo en un FastStart High Fidelity PCR system (Roche applied Science, Mannheim, Germany). Las condiciones de PCR fueron: un primer ciclo de desnaturalización a 94°C (4 min.); 35 ciclos de 98°C (10 seg.), 55°C (15 seg.); y 72°C (30 seg.) y un ciclo de elongación final a 72°C (4 min). Se utilizó un volumen de reacción de 50µl donde la concentración final de cada primer fue de 0,25µM, tomando un volumen de templado de 3µl. Los productos de la reacción fueron purificados y secuenciados en un Secuenciador Genómico FLX (Roche applied Science) siguiendo el protocolo especificado en el kit. La amplificación y purificación se realizó en el Instituto de Agrobiotecnología de Rosario (INDEAR).

2.2.4) Pirosecuenciación

La pirosecuenciación de los productos de PCR ya purificados también fue realizada en el INDEAR en la plataforma 454 GS-FLX Titanium, siguiendo las instrucciones del fabricante correspondientes a la secuenciación de amplicones.

2.2.5) Análisis de las secuencias y confección de MOTUs

Una vez finalizada la secuenciación se controló la calidad de las lecturas obtenidas y se realizó la limpieza de las mismas utilizando la secuencia de comandos ampliconnoise.py del software Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) versión 1.5.0. Esta línea de comandos permite también eliminar quimeras. Las secuencias fueron agrupadas en unidades moleculares taxonómicas operativas (en inglés: molecular operational taxonomic units MOTUs) utilizando QIIME (línea de comandos: pick_otus.py con el método Uclust). Los MOTUs fueron definidos a 97% de similitud de las secuencias. Este valor arbitrario fue elegido de acuerdo a la definición tradicional de "especie" microbiana (Konstantinidis & Tiedje, 2007). Con el fin de determinar si el esfuerzo de secuenciación había sido suficiente se realizó un análisis de curva de rarefacción, al igual que el realizado en el ensayo del capítulo 1. Dichas curvas fueron también construídas utilizando el software QIIME (http://qiime.sourceforge.net). El programa selecciona series de submuestras de diferentes tamaños aleatoriamente a partir del conjunto total de datos. Cada tamaño de submuestra fue replicado 10 veces por el programa.

Las secuencias representativas de cada MOTUs fueron comparadas con las secuencias publicadas en el banco de datos NCBI (National Centre for Biotechnology Information) usando el algoritmo Nt/nr BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov). Sólo se consideraron secuencias con valores de cobertura y similitud mayores a 97%. Únicamente se asignaron especies en el caso en que: i) los valores de E-values fueron menos o igual a 10^{-100} y que el porcentaje de similitud fuera mayor o igual al 97% y ii) no existiesen contradicciones en el listado de secuencias similares. Debido a que la región ITS no permite discernir entre especies de *Fusarium* y *Penicillium*, los MOTUs que correspondieron a estos géneros fueron identificados a nivel de género (Orgiazzi *et al,* 2013).

2.2.6) Comparación de las comunidades fúngicas entre los sitios

Las comunidades fúngicas en los suelos estudiados (Casco y LS2) fueron comparadas utilizando el Índice de Bray-Curtis, por ser uno de los índices más ampliamente utilizados y una opción menos sesgada que la distancia Euclideana (ya que este índice sobre-enfatiza los valores de las especies dominantes). Una vez obtenidos los valores de éste índice, se corrió un Análisis de Coordenadas Principales (PCoorA).

Aislamiento de microorganismos del suelo en dos sitios con distinta historia de aplicación de glifosato:

Recolección de muestras: *Casco (control); LS16 (5 años de exposición a glifosato); LS2 (10 años de exposición a glifosato)*

Aislamiento e identificación de hongos filamentosos

Técnica de lavado de muestras múltiples y siembra de partículas de suelo

Técnica de pirosecuenciación

Caracterización morfológica de las comunidades fúngicas presentes en suelos con y sin exposición al glifosato (F; riqueza; H; D; J´)

Comparar las poblaciones fúngicas obtenidas de dos suelos con distinta historia de aplicación de glifosato. Matriz de similitud Bray-Curtis. Análisis de Coordenadas Principales.

Esquema nº 1: análisis de datos para el Capítulo 1 (objetivo parcial nº1 y 2)

3.- Selección in Vitro cepas tolerantes a glifosato

3.1) Crecimiento en medio sólido. Cinética

Las distintas cepas obtenidas del sitio LS16 (*Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum*; *Paecilomyces lilacinus*, *Cylindrocarpon* sp, *Aspergillus niger*, *Humicola grisea* y *Drechslera dematioidea*) se sembraron en placas de Petri con agar-agua (15%) y glifosato en su formulación comercial en una concentración final de 200µg/g agar (Wardle & Parkinson, 1992). Se utilizó como inóculo cada una de las cepas sembradas en agar agua con tres días de crecimiento con el propósito de ocasionar un efecto de "hambreado" (starvation). Luego de sembrar las placas, se incubaron a 25ºC y se midieron periódicamente dos diámetros perpendiculares entre sí de las colonias durante 28 días, o hasta que el crecimiento de la colonia completara la caja de Petri.

3.2) Crecimiento en medio líquido

3.2.1) Cálculo de biomasa

Se evaluó la capacidad de degradación del glifosato de las cepas creciendo en medio líquido. Se utilizaron erlenmeyers de 100cc con los siguientes medios de cultivo y su correspondiente control: 1.- medio salino (SN) + sacarosa (20g/L); 2.- medio salino sin fuente inorgánica fosforada + sacarosa (20g/L) + glifosato puro (Sigma) (20mg/L), como única fuente fosforada (Romero *et al*, 2004). Para este ensayo fueron utilizadas tres cepas que presentaron distinta tolerancia al glifosato en medio sólido: *T. harzianum*, *F. oxysporum* y *D. dematioidea*. Los erlenmeyers fueron inoculados con dichas cepas. Luego de la inoculación, se incubaron en oscuridad, a 28°C y con agitación. Este ensayo se realizó por triplicado. En el caso de los controles (medio sin glifosato), el micelio se cosechó diariamente durante 8 días, mientras que en presencia de glifosato, las determinaciones de peso seco se hicieron cada 3 días, durante 21 días, a partir del tercer día desde la inoculación. Se determinó el peso seco del micelio, mediante filtrado y secado en estufa a 80°C por 48hs.

3.2.2) Cuantificación de glifosato en el sobrenadante

El sobrenadante recuperado del cultivo en medio líquido para el cálculo de biomasa, fue analizado mediante cromatografía iónica, con el fin de determinar la cantidad de glifosato remanente. Se realizó una curva de calibración con soluciones estándar preparadas con N-

fosfometilglicina en las siguientes concentraciones de glifosato: 1, 2,5 y 5ppm. Tanto los patrones como las muestras se analizaron con cromatografía iónico DIONEX-100 (DX-100), método básico, escala 10 µS. La fase móvil fue una mezcla CO_3Na_2/NaOH (9mM/4mM). Tanto para las muestras como los patrones se inyectaron 2ml.

.

RESULTADOS

1.-Aislamiento de microorganismos del suelo en dos sitios con distinta historia de aplicación de glifosato.

1.1) Características de los suelos en los distintos sitios muestreados

Las muestras de los distintos sitios fueron analizadas en el Instituto de Geocronología y Geología Isotópica (INGEIS-CONICET), arrojando los siguientes resultados (Tabla 1).

	LS2 (T0)	Casco (T0)	LS2 (Tf)	PMG (Tf)	Casco (Tf)
Clasificación textural	Franco limosa	Franco limosa	Franco limosa	Franco limosa	Franco limosa
pH	5.56	6.4	5.7	5.6	5.9
C.E. (dS/m)	0.38	2.05	1.79	0.17	0.11
C_T (g/Kg)	36.14	38.91	27.05	26.88	35.20
N_T (g/Kg)	2.86	3.42	2.22	2.08	3.13
P (mg/Kg)	90.4d	40.7d	92.5d	55.8d	70.9d
CIC ($cmol_c$/Kg)	29	28.5	23.6	22.1	24.1
Ca^{2+}($cmol_c$/Kg)	12.7	16.7	11.8	11.4	15.1
Mg^{2+}($cmol_c$/Kg)	2.1	3.2	2.6	2.6	2.8
Na^{+}($cmol_c$/Kg)	0.06	0.2	0.9	0.6	0.7
K^{+}($cmol_c$/Kg)	2.0	2.1	2.4	2.4	1.6

Tabla 1. *Composición química y textura de los suelos pertenecientes a los sitios muestreados: LS2 (T0) (lote soja con 10 años de historia de aplicación de glifosato); Casco (T0) (casco de la estancia, suelo control); LS2 (Tf) (tiempo final ensayo en macetas); PMG (Tf) (tiempo final ensayo macetas, con aplicación de glifosato); Casco (Tf) (tiempo final de suelo control).*

En todos los casos, la textura resultó franco limosa y el pH levemente ácido, siendo el sitio LS2 (T0) el lugar donde se registró el valor más bajo (pH = 5,56). El mayor valor de conductividad eléctrica (C.E.), Carbono y Nitrógeno total se encontró en el sitio Casco (T0). El fósforo tuvo mayor presencia en el suelo con mayor historia de aplicación de glifosato, LS2 (T0) y LS2 (Tf). El contenido de cationes fue similar en todos los suelos.

1.2) Aislamiento e identificación de hongos filamentosos

1.2.1) Lavado de muestras de suelo

Las muestras fueron lavadas de acuerdo a la técnica de lavado para muestras múltiples (Bisset et al 1972), obteniéndose la siguiente curva (Figura 2).

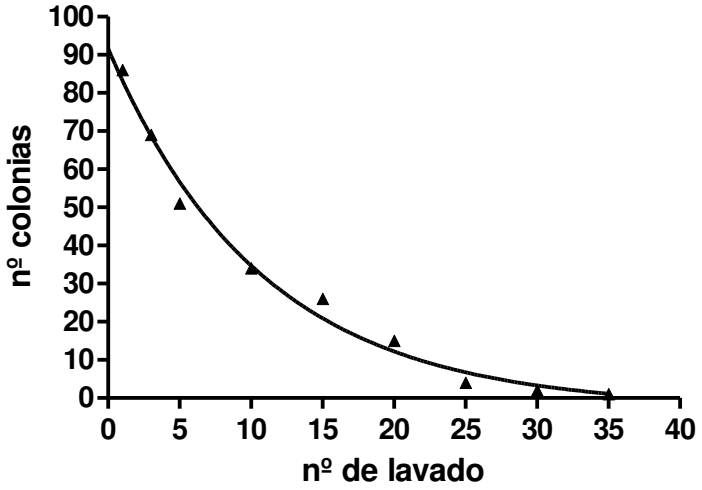


Figura 2. *Curva de lavado para las muestras de suelo provenientes de Chivilcoy, con ajuste logarítmico (R^2:0,9891).*

En el gráfico de la Figura 2 se observa la disminución del número de colonias obtenidas en placa de Petri a medida que aumenta el número de lavados. El eje X representa el número de lavados y el eje Y el promedio del número de colonias obtenidas en las placas de Petri a los siete días de crecimiento para cada número de lavado sembrado.

En la curva se observa que a partir del lavado número 25, el número de colonias en las placas de Petri se hace asintótico al eje X con valores cercanos a cero. De acuerdo a este resultado, se tomó como válida la realización de 25 lavados para la eliminación de las esporas quedando solamente el micelio activo adherido a las partículas del suelo.

1.2.2) Siembra de partículas y aislamiento de hongos filamentosos

En la Tabla 2, se muestran los resultados obtenidos de la siembra de partículas de suelo de distintos tamaños, correspondientes a los diferentes sitios: Casco (T0), LS2 (T0) y LS16. Para todas los suelos, se sembraron 120 partículas, de las cuales se obtuvieron 89, 121 y 105 aislamientos totales para cada muestra (Casco (T0), LS2 (T0) y LS16 respectivamente.

1.3) Caracterización morfológica de las comunidades fúngicas presentes en suelos con y sin exposición al glifosato.

En las tres muestras analizadas, se registra un número similar en especies fúngicas (riqueza), 14 especies para LS2(T0) y LS16 y 15 especies en el sitio Casco. En la Figura 3 se muestras algunas imágenes de especies observadas al microscopio.

Los géneros que aparecen con mayor frecuencia tanto en los suelos con historia de aplicación de glifosato como en el suelo control son *Fusarium* spp, *y Trichoderma* spp.

De las tres especies encontradas de *Fusarium*, *F. oxysporum* es la especie predominante y del género *Trichoderma*, las especies *T. aureoviride* y *T. harzianum quienes* están presentes en el suelo control mientras que las especies *T. koningii*, *T. pseudokoningii* y *T. longibrachiatum* solamente se encuentran en suelos en los que se ha fumigado con este herbicida.

RESULTADOS

géneros	CASCO T0						LS2 (T0)						LS16					
	C(T0)	C(T0)	C(T0)	C(T0)	C(T0)	C(T0)	LS2 (T0)	LS2 (T0)	LS2 (T0)	LS2 (T0)	LS2 (T0)	LS2 (T0)	LS16	LS16	LS16	LS16	LS16	LS16
Fusarium oxysporum	25,0	25,0	40,0	30,0	25,0	35,0	45,0	45,0	55,0	70,0	45,0	45,0	10,0	0,0	10,0	10,0	0,0	10,0
Fusarium solani	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Fusarium equiseti	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cylindrocarpon didymun	15,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0	0,0	5,0	5,0	5,0
Cylindrocapon olidum	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0
Trichoderma aureoviride	5,0	15,0	10,0	5,0	5,0	0,0	10,0	0,0	0,0	5,0	5,0	10,0	25,0	60,0	40,0	70,0	10,0	20,0
Trichoderma longibrachiatum	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	15,0	10,0	35,0	5,0	10,0	5,0	0,0	0,0	5,0	0,0	5,0	0,0
Trichoderma harzianum	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	5,0	0,0	15,0	0,0
Trichoderma pseudokoningii	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	5,0	0,0	10,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Trichoderma koningii	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	10,0	5,0	5,0	15,0	0,0	0,0	5,0	0,0	10,0
Trichoderma minutisporum	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Trichoderma koningiopsis	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Humicola fuscoatra	5,0	20,0	0,0	5,0	10,0	10,0	5,0	5,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Humicola grisea	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	15,0	5,0	0,0	0,0	0,0	20,0
Curvularia brachyspora	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cladosporium sp	0,0	5,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ulocladium sp	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Drechslera dematoidea	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0
Acremoniella sp	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Alternaria pluriseptata	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	5,0
Paecilomyces lilacinus	0,0	0,0	10,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0	5,0	0,0
Aspergillus candidus	5,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Aspergillus niger	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0
Penicillium	5,0	0,0	10,0	5,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	5,0	5,0
Talaromyces sp	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Absidia sección glauca	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Mucor hiemalis	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Rhizopus sp	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Zygomycete	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
micelio esteril 1	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	10,0	0,0
micelio esteril 2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	5,0	0,0	0,0	5,0	0,0
micelio esteril 3	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
micelio esteril 5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0
micelio esteril 6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0
micelio esteril 7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	15,0	0,0
micelio esteril 10	0,0	5,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
micelio esteril 11	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
micelio esteril 12	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
micelio esteril 13	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
micelio esteril 14	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
levadura	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	5,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
nº aislamientos	14,0	18,0	15,0	16,0	15,0	11,0	17,0	17,0	21,0	23,0	19,0	24,0	18,0	16,0	19,0	20,0	17,0	15,0
riqueza específica	15,0						14,0						14,0					
nº partículas sembradas	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0

Tabla 2. *Frecuencia de aparición (expresada en porcentaje), riqueza específica, número de aislamientos totales y número de partículas sembradas, de las distintas especies en los distintos sitios muestreados (Casco (T0), LS2 (T0) y LS16).*

RESULTADOS

Aislamientos	
Fusarium oxysporum	Schkechtdk. *1824* : Fr. [emend. Sny. & Hans. *1940* pro maxima parte]
Fusarium solani	(Mart.) Sacc. *1881* complex
Fusarium equiseti	(Corda) Sacc. *1886*
Fusarium sporotrichioides	Sherb. *1915* var. sporotrichioides
Fusarium sp1	
Fusarium sp2	
Fusarium sp3	
Fusarium sp4	
Cylindrocarpon didymun	(Hartig) Wollenw. *1926*
Cylindrocapon olidum	(Wollenw.) Wollenw. *1917* var. olideum
Cylindrocarpon destructans	(Zinssm.) G. Scholten *1968*
Cylindrocarpon cylindroides	Wollenw. Var. tenue Wollenw. 1928
Cylindrocarpon sp1	
Trichoderma aureoviride	Rifai aggr.
Trichoderma longibrachiatum	Rifai aggr.
Trichoderma harzianum	Rifai *1969*
Trichoderma pseudokoningii	Rifai aggr.
Trichoderma koningii	Oudem. *1902* aggregate
Trichoderma minutisporum	Bissett *1991*
Trichoderma koningiopsis	Samuels, C. Suárez & H.C. Evans *2006*
Acremonium strictum	W. Gams *1971*
Acremonium	
Clonostachys rosea	(Link:Fr.) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams *1999* f. rosea
Verticillium sp	
Humicola fuscoatra	Traaen *1914* [var. fuscoatra]
Humicola grisea	Traaen *1914* [var. grisea]
Curvularia brachyspora	Boedijn *1933*
Cladosporium nigrellum	Ellis & Everh. *1893*
Cladosporium sp	
Ulocladium sp	
Drechslera dematioidea	(Bubák & Wróblewski) Subram. & Jain *1966*
Acremoniella sp	
Alternaria pluriseptata	(P. Karst. & Har. ex Peck) Jørst
Broomela sp	
Chaetomium sp	
Paecilomyces lilacinus	(Thom) Samson *1974*
Aspergillus candidus	Link *1809* : Fr.
Aspergillus niger	Tiegh. *1867*
Penicillium	
Talaromyces sp	
Absidia sección glauca	
Mucor hiemalis	
Rhizopus sp	
Rhizopus rhizopodiformis	(Cohn) Zopf *1890*
Circinella linderi	Hesselt. & Fennell *1955*
Zygomycete	
cleistotecio1	
micelio esteril 1	
micelio esteril 2	
micelio esteril 3	
micelio esteril 4	
micelio esteril 5	
micelio esteril 6	
micelio esteril 7	
micelio esteril 8	
micelio esteril 9	
micelio esteril 10	
micelio esteril 11	
micelio esteril 12	
micelio esteril 13	
micelio esteril 14	
levadura	

Tabla 3. *Listado de especies presentes en los distintos sitios muestreados (Casco (T0), LS2 (T0), LS16, Casco (TF), LS2 (TF), PMG).*

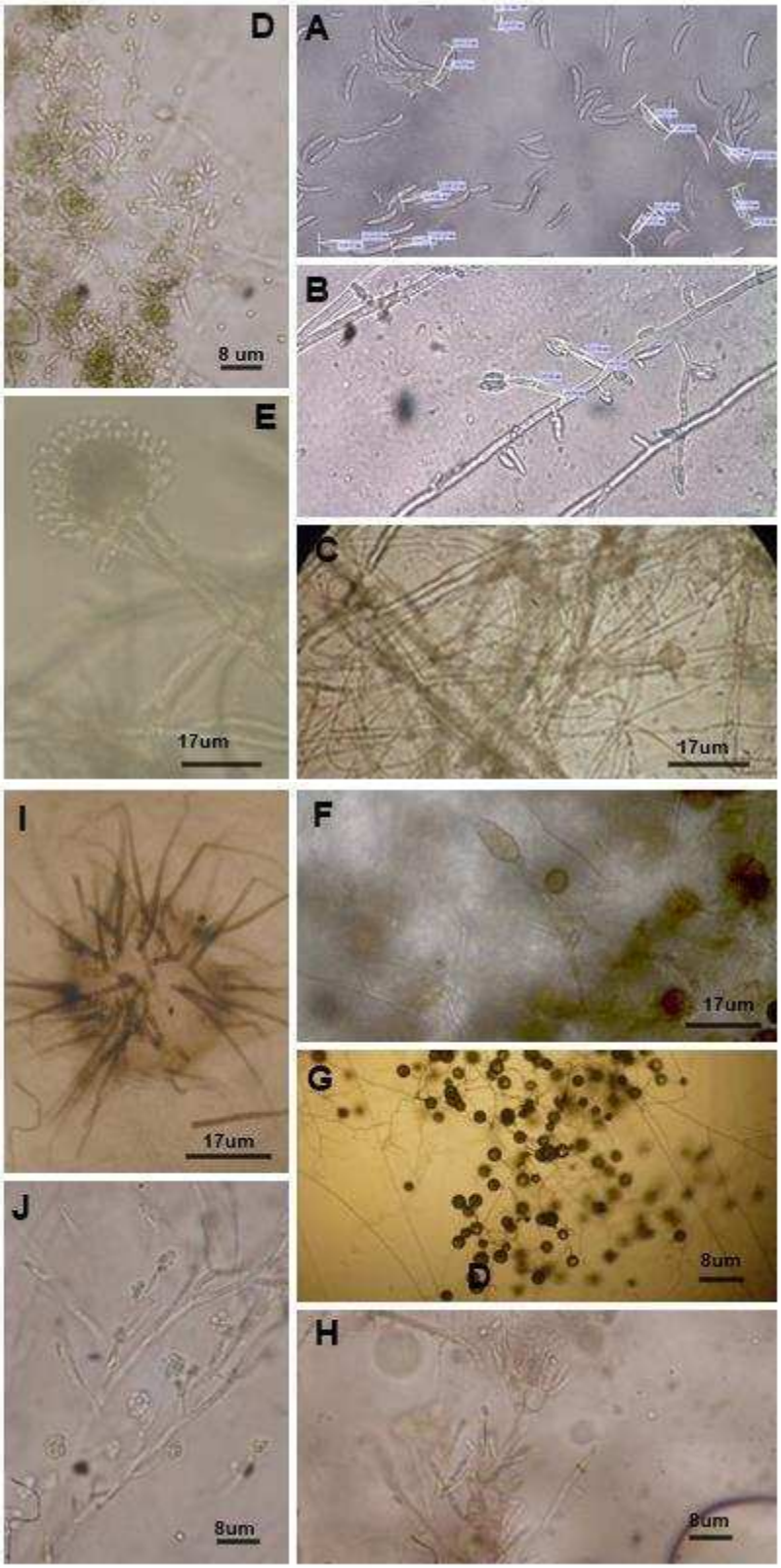


Figura 3. *Especies aisladas de las distintas muestras de suelo: Ay B) F. oxysporum (A:40X); C) M. hiemalis (A40); D)T. koningii (A:40); E)A. niger (A:40X); F) A. plurisepatata (A:40); G) H. grisea (A:20X); H) C. rosea(A:40X);I) Chaetomium sp (A:40X); J) A. strictum (A:40).*

RESULTADOS

Con respecto a la presencia de micelios estériles (Tabla 4) en los distintos lotes puede observarse que, el micelio estéril 10,11 y 12 solo se encuentra asociado al sitio control (casco), mientras que los micelios 2, 5, 6, 7, 13 y 14 sólo se presentan en lotes con aplicación del herbicida (LS16 y LS2). El único micelio estéril que está presente en los tres sitios estudiados es el micelio estéril 3.

	colonia			clamidosporas	sitios	
	color	color reverso	aspecto		sin glifosato (casco)	con glifosato (LS16 y LS2)
micelio estéril 1	grisacea	gris oscuro	algodonosa	presentes	P	P
micelio estéril 2	blanca	marrón	algodonosa	ausentes	A	P
micelio estéril 3	blanca	blanco amarillento	abundante micelio aéreo	ausentes	P	P
micelio estéril 5	blanca amarillenta	amarillo oscuro	algodonosa	ausentes	A	P
micelio estéril 6	amarilla	amarillo	cremosa	ausentes	A	P
micelio estéril 7	blanca	blanco	cremosa	ausentes	A	P
micelio estéril 10	blanco	amarillento	abundante micelio aéreo	presentes	P	A
micelio estéril 11	blanca, pigmentación amarilla	marrón claro	algodonosa	ausentes	P	A
micelio estéril 12	blanca/ anaranjada	rosa	abundante micelio aéreo	ausentes	P	A
micelio estéril 13	coral	coral	cremosa	ausentes	A	P
micelio estéril 14	blanca	blanco	cremosa	presentes	A	P

Tabla 4. *Características de los micelio estériles presentes en los distintos sitios muestreados (Casco (T0), LS2 (T0) y LS16).*

En el ambiente del casco (lote control) se han presentado diferentes asociaciones: *F. oxysporum* + micelio estéril 11, *Curvularia brachyspora* + *T. aureoviride*, *C. didymum* + *Penicillium* sp., *Fusarium oxypsporum* + *T. aureoviride*; teniendo el mayor número de apariciones esta última asociación.

En las muestras con presencia de glifosato, al igual que en el ambiente del casco el mayor número de asociaciones se presenta entre *T. aureoviride* *Fusarium oxysporum*. Aparecen como asociaciones exclusivas de estos sitios (LS2 y LS16), la presencia de *T. harzianum* y *Paecilomyces lilacinus*, *Dreschlera dematioidea*, *F. oxyporum* y *C. olidum*, *F. equiseti* con *T. pseudokoningii*.

En la tabla 5 se muestran los índices de diversidad obtenidos para las muestras estudiadas (Casco, LS2 y LS16). Los índices de biodiversidad de Shannon-Wiener y Simpson

presentaron valores más altos para los suelos provenientes de suelos sin historia de aplicación de glifosato y con 5 años de historia (Casco y LS16, respectivamente) respecto al suelo con 10 años de exposición al herbicida. El índice de equitatividad de Pielou (J´) mostró que las especies fúngicas del suelo se distribuyen de forma más equitativa en los suelos agrícolas.

Muestra	Riqueza (S)	Índice de biodiversidad alfa		Índice de equidad de Pielou (J´)
		Shannon-Wiener (H)	Simpson (D)	
Casco(T0)	15	2,3	0,19	0,85
LS2(T0)	14	1,92	0,29	0,73
LS16	14	2,25	0,21	0,85

Tabla 5. *Índices de biodiversidad alfa de cada muestra estudiada (Casco (T0), LS2 (T0) y LS16). Se muestran los índices de Riqueza específica (S); Sannon-Wiener (H); Simpson (D) y el índice de equitatividad de Pielou (J´).*

2.- Comparación de las poblaciones fúngicas obtenidas de dos suelos con distinta historia de aplicación de glifosato.

2.1) Comparación entre las comunidades fúngicas de cada sitio obtenidas por aislamiento a partir de partículas de suelo

Con el fin de comparar a las comunidades fúngicas de los suelos con y sin historia de aplicación de glifosato, se calculó el índice de Bray-Curtis, obteniéndose la siguiente matriz de similitud (Tabla 5):

	Casco(T0)	LS16	LS2(T0)
Casco(T0)	0		
LS16	0,53	0	
LS2(T0)	0,49	0,52	0

Tabla 6. *Índice de Bray-Curtis comparando los sitios Casco (T0), LS2 (T0) y LS16.*

En la Tabla 6 se observa que los sitios no difieren en gran medida entre sí ya que los valores del índice de Bray-Curtis son cercanos a 0,5. Sin embargo, el análisis de agrupamiento, mostró que los sitios con mayor similitud corresponden al Casco y a LS2, mientras que el LS16 queda separado (Figura 4).

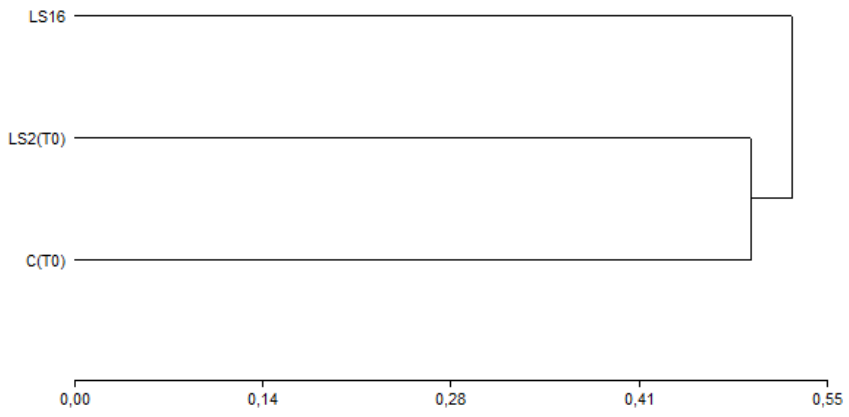


Figura 4. *Dendrograma de los sitios (Casco, LS2 y LS16) según el cálculo de la matriz de similitud de Bray - Curtis para las comunidades de fúngicas estudiadas.*

2.1.2) Análisis estadístico de las comunidades fúngicas en los distintos tratamientos

Del ACP surge que los primeros 3 componentes explican un 47% de la varianza total (Tabla 7).

En el cuadrante positivo del componente 1 se segregan 5 censos correspondientes a las partículas del sitio LS2 y todos los del casco, caracterizados por las especies de *F. oxysporum*, *T. pseudokoningii* y micelio estéril 3 (Figura 5). Sobre el sector negativo del componente 1 se ubican los censos correspondientes a partículas de suelo provenientes del sitio LS16, caracterizadas en este caso por *T. aureoviride*, *T. harzianum*, *D. dematioidea* y *P. lilacinus* (Figura 5).

Finalmente, el componente 2 permite diferenciar a los sitios provenientes del casco y LS2, este último caracterizado por las especies *T. longibrachiatum*, mientras que el casco por *H. fuscoatra* y micelio estéril 10 (Figura 5).

Variables de clasificación

TRATAMIENTO

Autovalores

Lambda	Valor	Proporción	Prop Acum
1	4,74	0,21	0,21
2	3,31	0,14	0,35
3	2,80	0,12	0,47
4	2,46	0,11	0,58
5	2,21	0,10	0,67
6	1,71	0,07	0,75
7	1,14	0,05	0,80
8	1,02	0,04	0,84
9	0,90	0,04	0,88
10	0,70	0,03	0,91
11	0,63	0,03	0,94
12	0,45	0,02	0,96
13	0,35	0,02	0,97
14	0,27	0,01	0,99
15	0,17	0,01	0,99
16	0,10	4,3E-03	1,00
17	0,05	2,2E-03	1,00
18	0,00	0,00	1,00
19	0,00	0,00	1,00
20	0,00	0,00	1,00
21	0,00	0,00	1,00
22	0,00	0,00	1,00
23	0,00	0,00	1,00

Tabla 7. *Análisis de Componentes Principales para los sitios estudiados (Casco, LS2 y LS16). Los primeros 3 ejes explican el 47% de variabilidad.*

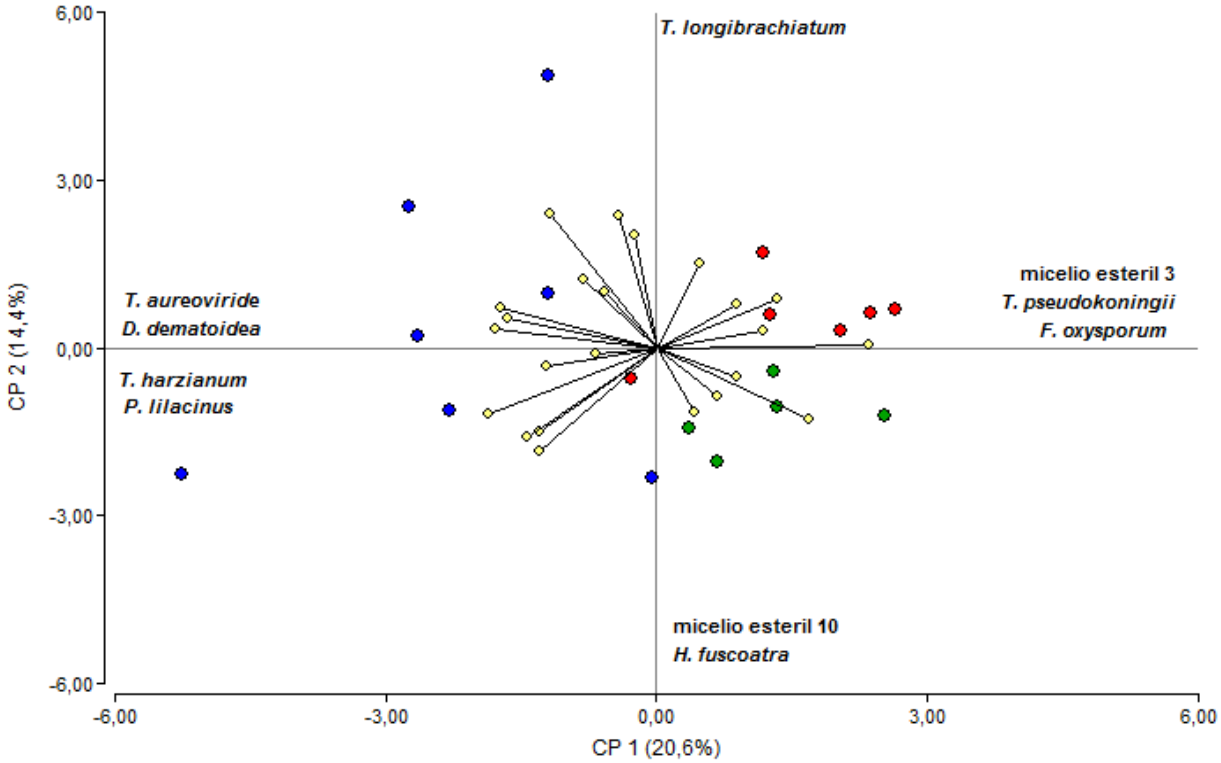


Figura 5. *Análisis de Componentes Principales de los sitios estudiados (Casco, LS2 y LS16). Los puntos verdes representan al casco, los rojos al sitio LS2 y los azules al LS16. En cada eje aparecen las especies que caracterizan a cada sitio.*

En cuanto al Análisis de Coordenadas Principales se observó que los censos para casa sitio se agrupan en cada cuadrante del gráfico. Sin embargo, dentro de cada grupo, existe una alta variabilidad ya que los puntos se encuentran dispersos entre sí (Figura 6), siendo el más variable el LS16.

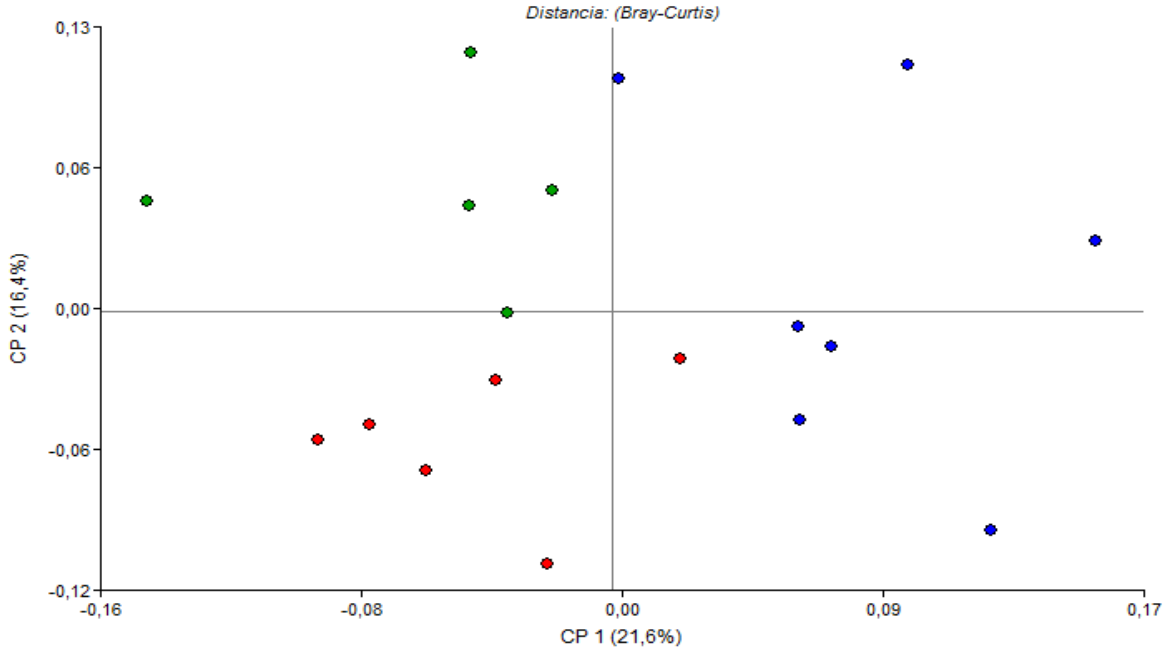


Figura 6. *Análisis de Coordenadas Principales de los sitios estudiados (Casco, LS2 y LS16). Los puntos verdes representan al casco, los rojos al sitio LS2 y los azules al LS16.*

2.2) Comparación entre las comunidades fúngicas de cada sitio mediante la técnica de pirosecuenciación

2.2.1) Análisis de los resultados obtenidos por la técnica de pirosecuenciación

A partir de las secuencias obtenidas por la técnica de pirosecuenciación y su agrupación en MOTUs, se construyeron las curvas de rarefacción para cada muestra (Figura 7). En todos los casos, las curvas no alcanzaron la asíntota. El

esfuerzo de secuenciación no fue suficiente para cubrir la totalidad de la diversidad presente en cada muestra.

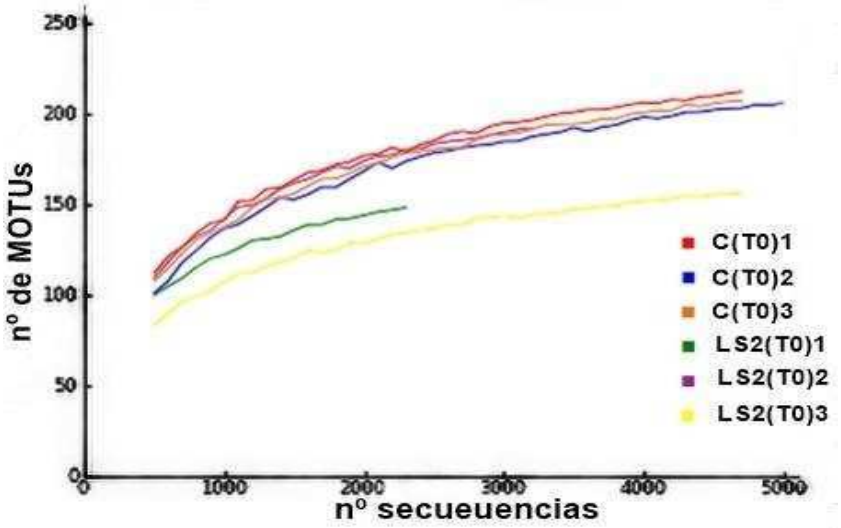


Figura 7. *Curvas de rarefacción de las secuencias de hongos filamentosos obtenidas a partir de ADN metagenómico del suelo para cada uno de los sitios muestreados.*

A partir de la pirosecuenciación del ADN metagenómico de suelo, se diferenciaron 575 MOTUs provenientes de un total de 24513 lecturas. De acuerdo a los resultados del BLAST, 420 de esos MOTUSs correspondieron a los Phylum Ascomycota, Basidiomycota y Zygomycota (Tabla 8). Los MOTUs que no correspondían a estos phylum fueron eliminados, quedando 19251 secuencias. Las lecturas correspondientes al Phylum Ascomycota representaron el 73,5% del total de las lecturas, seguido por las secuencias del Phylum Zygomycota y Badidiomycota (14,23% y 3,71%, respectivamente). El resto de las secuencias pertenecen a los Phylum Glomeromycota y Chytridiomycota (0,07% y 0,6%, respectivamente) y no fueron tenidas en cuenta en los análisis siguientes. Las secuencias que no pudieron ser identificadas taxonómicamente (sólo a nivel de Reino) representaron un 7,90% de las secuencias totales. En la Tabla 8 se muestran los géneros obtenidos al realizar el análisis de BLAST. Para la confección de la Tabla no se tuvieron en cuenta aquellos MOTUs que tuvieron una sola aparición en todas las muestras.

Asignación taxonómica	#OTU ID	nº lecturas	$C(T0)_{1(M1)}$	$C(T0)_{2(M2)}$	$C(T0)_{3(M3)}$	$LS2(T0)_{1(M4)}$	$LS2(T0)_{2(M5)}$	$LS2(T0)_{3(M6)}$
Acremonium sp	135	5	0.0	0.0	2.0	3.0	0.0	0.0
	177	13	7.0	0.0	0.0	6.0	0.0	0.0
	365	2	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0
	540	38	11.0	6.0	21.0	0.0	0.0	0.0
Alternaria longissima	64	6	4.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0
	209	163	36.0	53.0	71.0	3.0	0.0	0.0
Alternaria sp	81	74	26.0	5.0	17.0	19.0	3.0	4.0
	146	71	27.0	5.0	11.0	7.0	21.0	0.0
Arthrographis kalrae	229	217	0.0	0.0	0.0	0.0	216.0	1.0
Aspergillus sp	308	595	0.0	0.0	0.0	0.0	441.0	154.0
Bionectria ochroleuca	45	410	83.0	108.0	95.0	87.0	14.0	23.0
Bionectria sp	346	13	0.0	6.0	1.0	6.0	0.0	0.0
Cephaliophora tropica	41	15	0.0	0.0	0.0	15.0	0.0	0.0
	160	2	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	429	4	1.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cercophora sp	243	5	0.0	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	390	5	0.0	4.0	1.0	0.0	0.0	0.0
	101	50	21.0	16.0	13.0	0.0	0.0	0.0
Chaetomium globosum	519	1085	314.0	441.0	324.0	5.0	0.0	1.0
Chaetosphaeria sp	53	9	0.0	2.0	7.0	0.0	0.0	0.0
	244	62	19.0	23.0	20.0	0.0	0.0	0.0
	266	28	11.0	4.0	6.0	7.0	0.0	0.0
	343	258	94.0	64.0	90.0	10.0	0.0	0.0
Chalara sp	188	212	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	210.0
Chloridium sp	134	62	13.0	21.0	17.0	9.0	0.0	2.0
	539	39	5.0	19.0	10.0	5.0	0.0	0.0
Chrysosporium sp	489	53	9.0	3.0	0.0	0.0	19.0	22.0
Cladosporium cladosporioides	458	100	13.0	21.0	2.0	23.0	10.0	31.0
Clonostachys cf. *rossmaniae*	94	446	19.0	0.0	19.0	18.0	26.0	19.0
Cochliobolus sp	178	42	0.0	0.0	2.0	0.0	15.0	25.0
Corynespora cassiicola	421	75	26.0	32.0	8.0	9.0	0.0	0.0
Cosmospora sp	275	89	34.0	37.0	18.0	0.0	0.0	0.0
Cylindrocarpon olidum	559	40	0.0	0.0	1.0	6.0	16.0	17.0
Cylindrocarpon sp	261	12	10.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	331	104	7.0	21.0	4.0	1.0	46.0	25.0
	337	2	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0
Dinemasporium polygonum	117	17	0.0	0.0	0.0	0.0	17.0	0.0
Elaphocordyceps inegoensis	210	15	0.0	0.0	0.0	0.0	11.0	4.0
Emericellopsis sp	27	28	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	27.0
Epicoccum nigrum	195	91	38.0	25.0	21.0	0.0	2.0	5.0
Exophiala pisciphila	424	71	50.0	5.0	12.0	2.0	2.0	0.0
Exophiala sp	168	4	0.0	0.0	4.0	0.0	0.0	0.0
	198	5	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	248	2	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0
	381	20	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	0.0

Asignación taxonómica	#OTU ID	nº lecturas	$C(T0)_{1(M1)}$	$C(T0)_{2(M2)}$	$C(T0)_{3(M3)}$	$LS2(T0)_{1(M4)}$	$LS2(T0)_{2(M5)}$	$LS2(T0)_{3(M6)}$
Fusarium sp	59	168	17.0	51.0	28.0	27.0	5.0	40.0
	68	3	0.0	0.0	2.0	0.0	1.0	0.0
	80	90	37.0	17.0	19.0	7.0	10.0	0.0
	208	24	10.0	2.0	12.0	0.0	0.0	0.0
	228	3	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	279	2060	582.0	505.0	495.0	199.0	31.0	248.0
	323	549	148.0	110.0	103.0	58.0	69.0	61.0
	347	127	59.0	24.0	8.0	28.0	0.0	8.0
	373	821	164.0	175.0	141.0	69.0	44.0	228.0
	406	5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0
	410	55	5.0	1.0	47.0	1.0	1.0	0.0
	415	5	2.0	0.0	0.0	1.0	2.0	0.0
	516	52	12.0	2.0	19.0	10.0	0.0	9.0
	564	68	0.0	11.0	0.0	57.0	0.0	0.0
Ganoderma sp	119	6	0.0	4.0	0.0	0.0	2.0	0.0
Gibellulopsis nigrescens	280	1868	467.0	547.0	624.0	210.0	13.0	7.0
Hypocrea pachybasioides	237	20	2.0	6.0	12.0	0.0	0.0	0.0
Hypomyces sp	438	21	0.0	0.0	0.0	0.0	15.0	6.0
Lophiostoma sp	183	58	16.0	5.0	13.0	13.0	6.0	5.0
Mariannaea elegans var *punicea*	271	12	3.0	7.0	2.0	0.0	0.0	0.0
	314	203	64.0	90.0	49.0	0.0	0.0	0.0
Metarhizium lepidiotae	242	36	0.0	0.0	0.0	1.0	8.0	27.0
Metarhizium anisopliae	395	12	0.0	4.0	0.0	6.0	2.0	0.0
Mortierella alpina	38	28	0.0	0.0	0.0	1.0	18.0	9.0
	82	934	32.0	31.0	20.0	5.0	171.0	675.0
	454	147	53.0	30.0	33.0	15.0	8.0	8.0
Mortierella gamsii	189	276	34.0	52.0	32.0	46.0	61.0	51.0
Mortierella sp	7	3	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	140	979	87.0	50.0	103.0	129.0	198.0	412.0
	165	14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	14.0
	245	10	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	6.0
	407	308	85.0	105.0	115.0	1.0	2.0	0.0
	528	2	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	538	8	0.0	3.0	5.0	0.0	0.0	0.0
Mycoarthris corallina	143	219	0.0	0.0	0.0	0.0	67.0	152.0
Myrmecridium phragmitis	60	58	29.0	11.0	9.0	9.0	0.0	0.0
Myrothecium cinctum	207	28	13.0	13.0	1.0	1.0	0.0	0.0
Nectria mariannaeae	185	32	1.0	6.0	0.0	25.0	0.0	0.0
	566	35	0.0	0.0	0.0	0.0	15.0	20.0
Nectria sp	13	7	0.0	7.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	263	247	41.0	97.0	68.0	12.0	0.0	29.0
	445	53	16.0	17.0	18.0	2.0	0.0	0.0
	544	8	8.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Nigrospora oryzae	142	115	15.0	0.0	20.0	0.0	19.0	61.0
Paecilomyces carneus	547	23	4.0	12.0	0.0	1.0	2.0	4.0

Tabla 8. *Tabla de abundancia de los MOTUs obtenidos a partir de la pirosecuenciación con el par de primers ITS1F e ITS2 en cada sitio de muestreo (Casco (T0); LS2(T0)).*

Asignación taxonómica	#OTU ID	nº lecturas	$C(T0)_{1(M1)}$	$C(T0)_{2(M2)}$	$C(T0)_{3(M3)}$	$LS2(T0)_{1(M4)}$	$LS2(T0)_{2(M5)}$	$LS2(T0)_{3(M6)}$
Paecilomyces marquandii	350	68	3.0	5.0	0.0	37.0	6.0	17.0
Penicillium sp	74	5	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	0.0
	114	9	6.0	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0
	115	4	0.0	2.0	0.0	0.0	2.0	0.0
	144	79	26.0	37.0	9.0	1.0	0.0	6.0
	187	101	1.0	15.0	62.0	0.0	15.0	8.0
	267	148	64.0	49.0	32.0	3.0	0.0	0.0
	339	3	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	400	2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0
	403	1	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0
	448	1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0
	491	19	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	15.0
	502	4	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	0.0
	524	1	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	537	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0
Periconia macrospinosa	87	1	123.0	172.0	123.0	24.0	4.0	0.0
	414	4	0.0	0.0	4.0	0.0	0.0	0.0
	492	18	6.0	0.0	12.0	0.0	0.0	0.0
Pestalotiopsis cocculi	235	29	0.0	0.0	0.0	0.0	23.0	6.0
Phialemonium dimorphosporum	212	1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0
Phoma sp	473	2	1.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0
	476	52	5.0	0.0	10.0	4.0	33.0	0.0
Plectosphaerella cucumerina	262	202	28.0	27.0	66.0	61.0	17.0	3.0
Podospora sp	29	46	26.0	0.0	10.0	10.0	0.0	0.0
Podospora glutinans	255	79	0.0	52.0	26.0	0.0	1.0	0.0
Preussia terricola	259	83	0.0	0.0	0.0	0.0	83.0	0.0
	354	14	5.0	1.0	0.0	5.0	3.0	0.0
Preussia vulgaris	167	50	3.0	3.0	3.0	24.0	17.0	0.0
	419	7	0.0	0.0	0.0	3.0	3.0	1.0
Pseudallescheria fimeti	129	318	116.0	81.0	106.0	9.0	3.0	3.0
Pseudeurotium sp	180	15	2.0	6.0	2.0	5.0	0.0	0.0
Pseudeurotium bakeri	490	348	103.0	123.0	94.0	28.0	0.0	0.0
Ramophialophora sp	218	66	10.0	20.0	36.0	0.0	0.0	0.0
Scytalidium sp	230	37	13.0	0.0	24.0	0.0	0.0	0.0
Sesquicillium microsporum	565	29	0.0	16.0	0.0	4.0	8.0	1.0
Stachybotrys sp	319	5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0
	446	28	0.0	2.0	26.0	0.0	0.0	0.0
	513	1	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0
Trichocladium asperum	380	22	9.0	0.0	0.0	0.0	3.0	10.0
Trichoderma gamsii	103	56	15.0	20.0	10.0	8.0	3.0	0.0
Trichoderma spirale	357	19	4.0	4.0	5.0	1.0	0.0	5.0
Trichoderma sp	76	10	0.0	0.0	0.0	0.0	10.0	0.0
	169	7	5.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0
	412	2	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0
uncultured *Antarctomyces* sp	501	10	0.0	0.0	0.0	3.0	7.0	0.0

Asignación taxonómica	#OTU ID	nº lecturas	$C(T0)_{1(M1)}$	$C(T0)_{2(M2)}$	$C(T0)_{3(M3)}$	$LS2(T0)_{1(M4)}$	$LS2(T0)_{2(M5)}$	$LS2(T0)_{3(M6)}$
uncultured *Byssonectria* sp	33	8	6.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0
uncultured *Cenococcum* sp	133	46	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	46.0
uncultured *Cyphellophora* sp	63	11	9.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0
uncultured *Exophiala* sp	305	72	17.0	23.0	11.0	6.0	11.0	4.0
uncultured *Geopyxis* sp	58	13	2.0	1.0	3.0	7.0	0.0	0.0
uncultured *Gibberella* sp	51	6	3.0	1.0	0.0	2.0	0.0	0.0
uncultured *Guehomyces* sp	104	25	0.0	0.0	0.0	0.0	7.0	18.0
uncultured *Hygrocybe* sp	257	1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0
uncultured *Hyphodontia* sp	70	15	1.0	7.0	5.0	0.0	0.0	2.0
uncultured *Ilyonectria* sp	315	267	31.0	23.0	18.0	6.0	93.0	96.0
	480	5	4.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
uncultured *Kotlabaea* sp	273	17	0.0	14.0	0.0	3.0	0.0	0.0
uncultured *Mortierella* sp	19	1	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0
	137	19	4.0	3.0	3.0	9.0	0.0	0.0
	156	894	197.0	278.0	188.0	169.0	26.0	36.0
	465	33	4.0	8.0	1.0	17.0	2.0	1.0
uncultured *Neonectria* sp	311	30	0.0	0.0	0.0	0.0	30.0	0.0
	394	111	54.0	6.0	22.0	0.0	5.0	24.0
	493	1	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0
uncultured *Schizothecium* sp	197	76	0.0	0.0	0.0	0.0	6.0	70.0
	322	5	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	1.0
	461	1	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	497	5	0.0	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	569	5	0.0	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0
uncultured *Volutella* sp	20	89	5.0	48.0	17.0	15.0	1.0	3.0
Westerdykella purpurea	113	3	0.0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0
	507	6	0.0	0.0	6.0	0.0	0.0	0.0
	526	3	0.0	1.0	2.0	0.0	0.0	0.0
	543	122	29.0	40.0	51.0	2.0	0.0	0.0

Tabla 8 cont. *Tabla de abundancia de los MOTUs obtenidos a partir de la pirosecuenciación con el par de primers ITS1F e ITS2 en cada sitio de muestreo (Casco (T0); LS2(TF)).*

Los 420 MOTUSs que correspondían a los Phylum Ascomycota, Basidiomycota y Zygomycota fueron agrupados en 85 especies distintas. En algunos casos, más de un MOTU fue asignado al mismo género o especie. En esta tabla están representadas 18356 secuencias de las 19251 totales para los phylums de interés para este estudio. De los 164 MOTUs contemplados en la tabla, 16 corresponden a géneros no cultivables y representan un 9,62% de las secuencias tenidas en cuenta para los análisis. Los valores de riqueza obtenidos para cada sitio fueron 69 para el casco y 76 para el sitio LS2.

2.2.2) Comparación de las comunidades fúngicas entre los sitios

Las comunidades fúngicas en los suelos estudiados (Casco y LS2) fueron comparadas utilizando el Índice de Bray-Curtis (Tabla 9). Se observó que los sitios difieren en cuanto a su composición (valores de índice cercanos a 1). Por otro lado, las muestras provenientes del sitio LS2 difieren entre sí mientras que las correspondientes al casco presentan valores inferiores al 0,5.

	$C(T0)_2$	$LS2(T0)_2$	$LS2(T0)_3$	$C(T0)_3$	$C(T0)_1$	$LS2(T0)_1$
$C(T0)_2$	0,00					
$LS2(T0)_2$	0,86	0,00				
$LS2(T0)_3$	0,78	0,63	0,00			
$C(T0)_3$	0,25	0,85	0,78	0,00		
$C(T0)_1$	0,28	0,84	0,77	0,26	0,00	
$LS2(T0)_1$	0,62	0,79	0,76	0,59	0,59	0,00

Tabla 9. *Índice de Bray-Curtis comparando los sitios Casco (T0) y LS2 (T0) utilizando la técnica de pirosecuenciación.*

El Análisis de Coordenadas Principales (Figura 8) corrobora lo observado en la Tabla 9. Las muestras provenientes del casco se separan de las del lote con soja (LS2), quedando en distintos cuadrantes del gráfico.

RESULTADOS

Las muestras provenientes del casco se agrupan juntas en el cuadrante positivo del componente 2 mientras que las que provienen de un sistema agrícola, con exposición al glifosato, se encuentran dispersas en el gráfico, siendo màs heterogéneas entre sí.

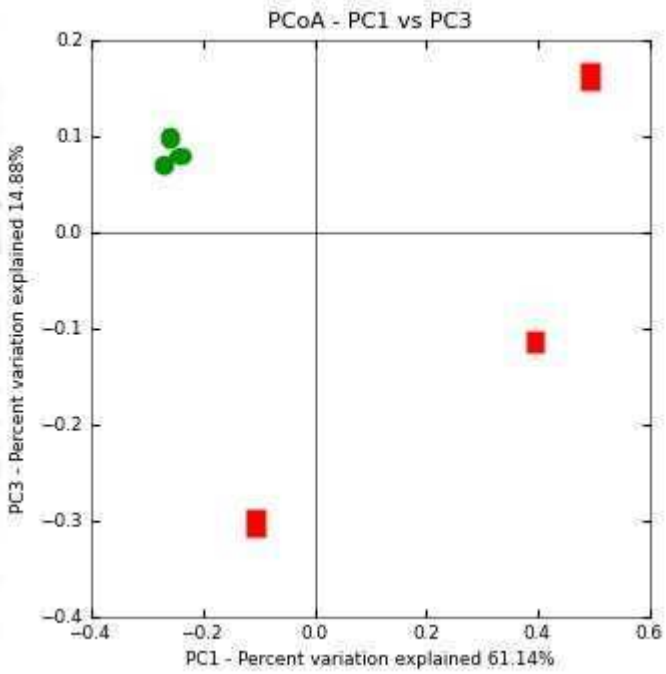


Figura 8. *Análisis de Coordenadas Principales de los sitios estudiados (Casco y LS2). Los puntos verdes representan al casco, los rojos al sitio LS2.*

3.- Selección in Vitro de cepas tolerantes a glifosato

3.1) Crecimiento en medio sólido. Cinética.

En la Figura 9, se observa la cinética de crecimiento en medio sólido en presencia y ausencia de glifosato para los aislamientos provenientes del sitio LS16.

Para las cepas evaluadas, se observa que la velocidad de crecimiento es mayor en ausencia del herbicida, siendo *Trichoderma harzianum*, la única cepa que completó su crecimiento en placa de Petri a los 5 días.

Las cepas que responden con una mayor tolerancia al glifosato son: *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum* y *Paecilomyces lilacinus*. *Cylindrocarpon didymum* también presenta tolerancia aunque en menor medida que los demás aislamientos.

Humicola grisea y *Aspergillus niger* comienzan su crecimiento en presencia de glifosato unos días después que sus respectivos controles. *Dreschlera dematioidea* comienza a tener un comportamiento similar a *Humicola grisea* y *Aspergillus niger* en el día 9 de crecimiento.

Las pruebas de Anova indican que existen diferencias significas ($p < 0,0001$) en la cinética de crecimiento entre las distintas especies estudiadas, para los días 4 y 10 de la curva.

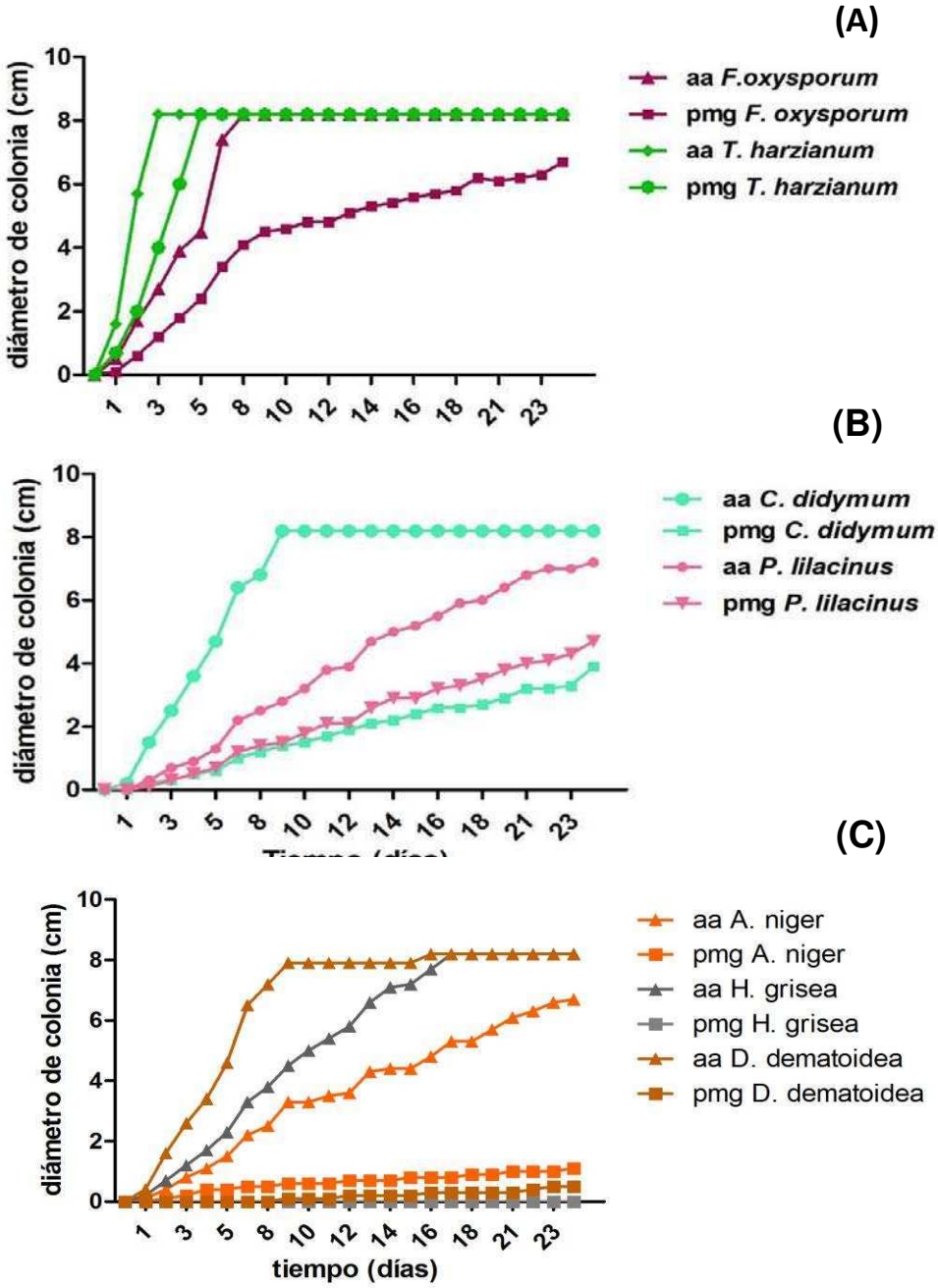


Figura 9. *Cinética de crecimiento de las cepas aisladas del lote LS16 en placas de Petri con medio AA y AA +glifosato (200µg/g agar) para F. oxysporum y T. harzianum* ***(A)****, C. didymun y P. lilacinus* ***(B)*** *y A. niger, H. grisea y D. dematioidea* ***(C)****. Existen diferencias significativas entre las especies para los días 4 y 10 de crecimiento (p<0,0001).*

3.2) Crecimiento en médio líquido.

3.2.1) Cálculo de biomasa

En todos los casos, el tratamiento con glifosato dio un crecimiento menor de la cepa en comparación con los controles (Figura 10). El valor máximo de peso seco se obtuvo para *D. dematioidea*, mientras que, en ausencia del herbicida, la mayor biomasa correspondió a *F. oxysporum*.

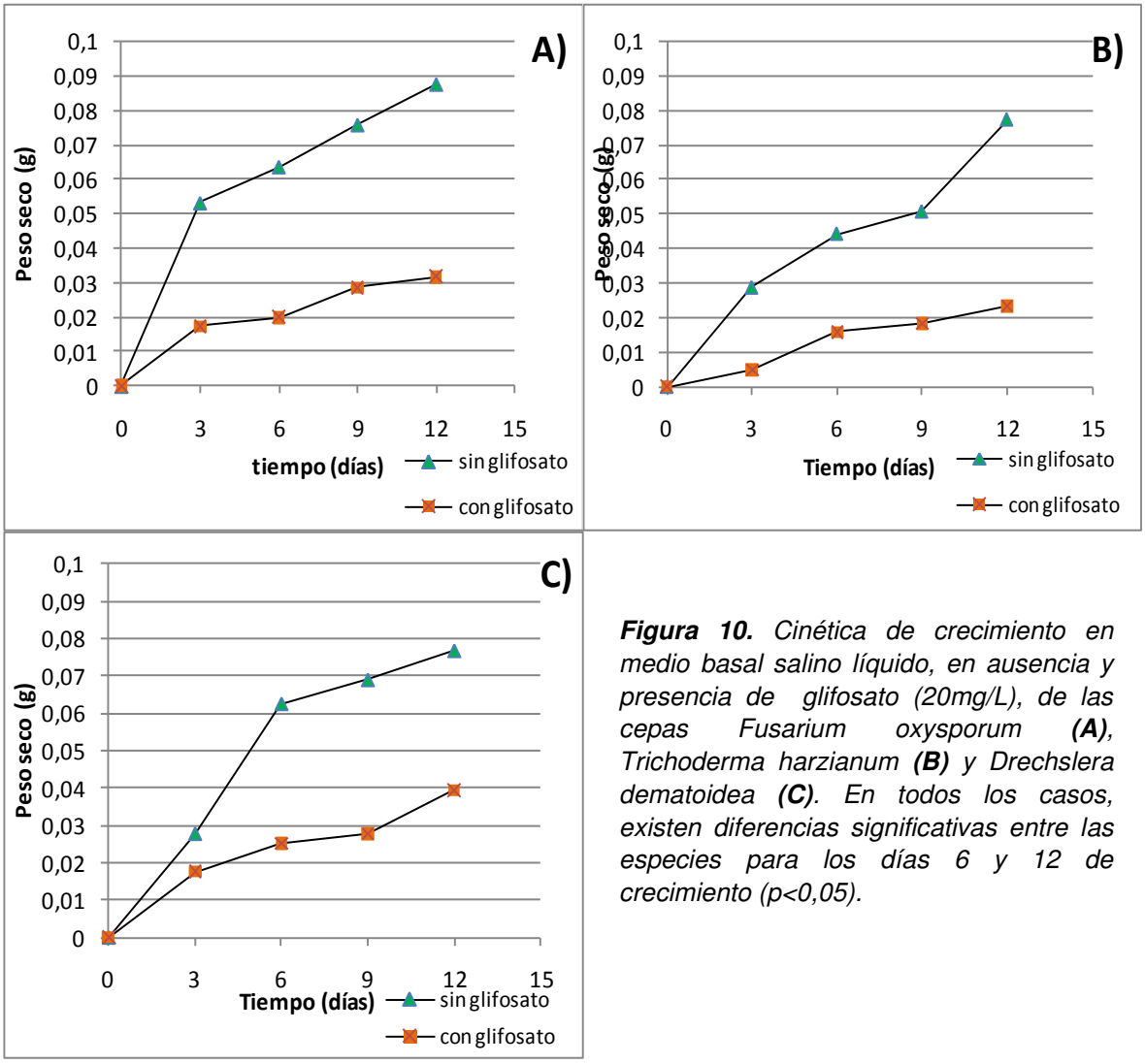


Figura 10. *Cinética de crecimiento en medio basal salino líquido, en ausencia y presencia de glifosato (20mg/L), de las cepas Fusarium oxysporum* ***(A)****, Trichoderma harzianum* ***(B)*** *y Drechslera dematoidea* ***(C)****. En todos los casos, existen diferencias significativas entre las especies para los días 6 y 12 de crecimiento (p<0,05).*

3.2.2) Cuantificación de glifosato en el sobrenadante.

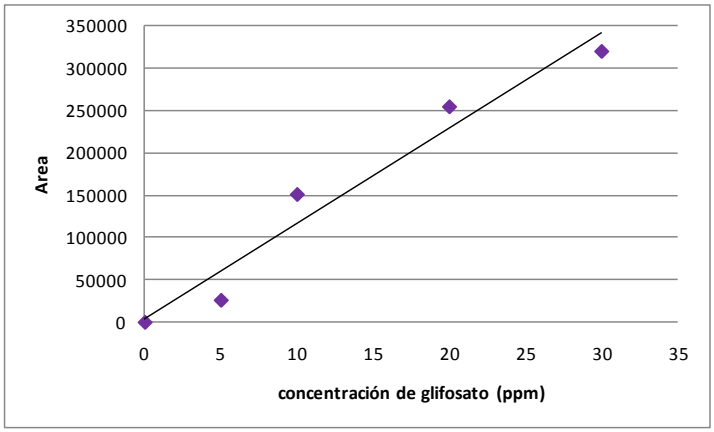
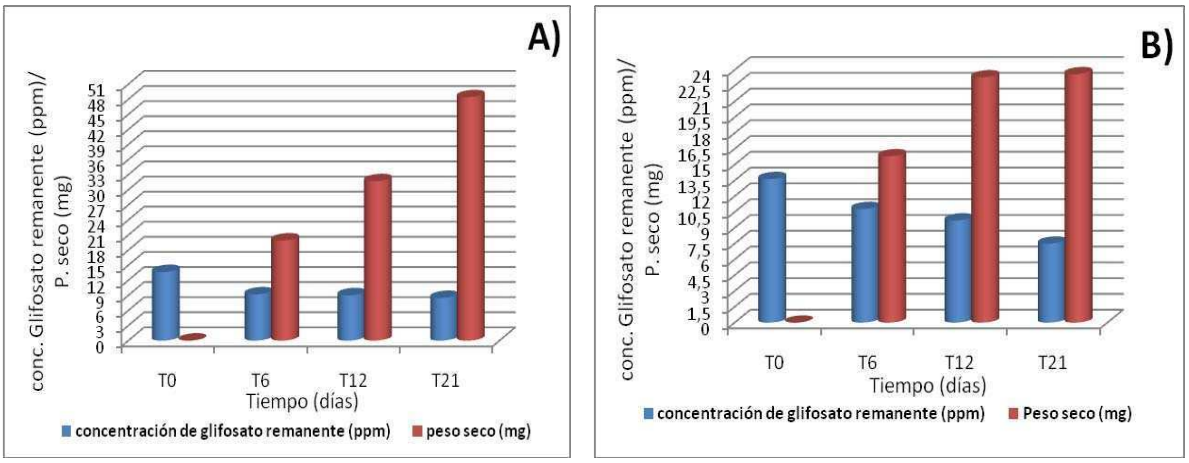


Figura 11. *Curva de calibración de glifosato. Ecuación de la curva: y=11447x; R2=0,9548.*



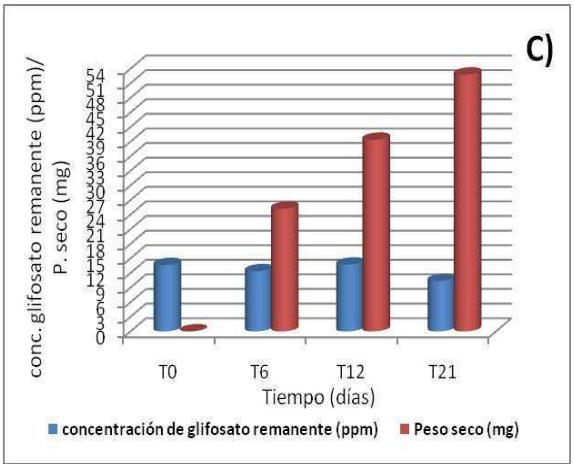


Figura 12. *Cinética de crecimiento en medio basal salino líquido, en presencia de glifosato (20mg/L) y concentración de glifosato remanente en los tiempos 0, 6, 12 y 21 para las cepas Fusarium oxysporum* ***(A)****; Trichoderma harzianum* ***(B)*** *y Drechslera dematioidea* ***(C)****.*

RESULTADOS

Para las tres cepas evaluadas, se observa que a medida que transcurren los días hay un incremento de la biomasa fúngica de los distintos aislamientos que se ve acompañado por una disminución en la concentración de glifosato en el medio de cultivo, sin embargo no existe una correlación lineal entre ambas variables (biomasa y concentración de glifosato remanente, $p>0,05$) que confirmen esta observación.

DISCUSION

En este primer capítulo se estudió la biodiversidad existente en 3 sitios con distinto tiempo de exposición al glifosato: Casco, como tratamiento control ya que en él nunca se aplicó el herbicida; LS16, un lote de soja con historia de 5 años de exposición al glifosato y LS2, con 10 años de historia.

Existe una gran cantidad de trabajos que estudian los efectos de la aplicación de agroquímicos, en particular del herbicida glifosato, sobre las poblaciones microbianas del suelo. La mayoría de los autores han encontrado que cuando se expone un suelo al glifosato, la actividad y biomasa microbiana aumentan, posiblemente debido a que los microorganismos estarían utilizando al herbicida como fuente de nutrientes (Chen *et al*, 2001; Haney *et al*, 2002; Zabaloy *et al*, 2008; Gómez *et al*, 2009). Sin embargo, también se ha encontrado que el glifosato puede reducir la actividad microbiana. En este sentido Weaver *et al*, (2007); Ratcliff *et al*, (2006) y Bortoli *et al*, (2012), reportaron un significativo incremento del número de propágulos fúngicos después de la adición de glifosato en bajas concentraciones.

En la caracterización morfológica de los sitios muestreados se observó que las riquezas específicas fueron prácticamente similares en todos los sitios muestreados, obteniéndose 15 especies distintas para el Casco(T0) y 14 para LS16 y LS2(T0).

Debido a que una baja proporción de microorganismos del suelo pueden ser cultivados, en este estudio se utilizó la técnica de pirosecuenciación con el fin de ver si la riqueza variaba en un sitio u otro teniendo en cuenta a éstos microorganismos que no pueden desarrollarse en medios de cultivo sintéticos o en el que su crecimiento se ve inhibido frente a otros hongos que crecen más rápido en placa de Petri. Efectivamente, los valores de riqueza obtenidos con ésta técnica fueron más elevados que los observados en la caracterización morfológica de los sitios. Para el casco, se observó una riqueza específica de 69 y para el sitio LS2 se obtuvieron 76 especies distintas. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que esta técnica utiliza, para la identificación taxonómica de las secuencias,bases de datos muy pobres y que de la inmensa diversidad de microorganismos que se presupone existen, solo una pequeña proporción ha sido identificada (Petrocino *et al*, 2009).

Si bien los índices de biodiversidad de Shannon-Wiener y de Simpson no difieren tanto entre sitios, el mayor valor se observa en el suelo con menor tiempo de exposición al glifosato (LS16), seguido del sitio control (casco). En estos sitios también existe una distribución equitativa de las especies (el índice de equitatividad de Pielou es de 0,85 para ambos).

DISCUSION

En todos los sitios, los géneros que aparecen con mayor frecuencia son *Fusarium* spp, siendo *F. oxysporum* la especie predominante y *Trichoderma* spp. Dentro de este último género, *T. aureoviride* y *T. harzianum* están presentes en el suelo control mientras que las especies *T. koningii*, *T. pseudokoningii* y *T. longibrachiatum* solamente se encuentran en suelos en los que se ha fumigado con el herbicida.

Del análisis de componentes principales se desprende que las especies que caracterizan a los sitios con historia de aplicación de glifosato son de *F. oxysporum*, *T. pseudokoningii* y *T. longibrachiatum* (para LS2) y *T. aureoviride*, *T. harzianum*, *D. dematoidea* y *P. lilacinus* (para LS16). Para el casco, la especie que mayor contribuye a separar a este sitio del resto es *H. fuscoatra.*

La presencia de *F. oxysporum* como especie predominante en suelos agronómicos expuestos al glifosato ya ha sido observada por otros autores, que han encontrado un aumento en las poblaciones de *F. oxysporum* en suelos a los cuales se les ha aplicado glifosato (Wachowska, 1999; Kremer *et al*, 2005; Meriles *et al*, 2006; Kryski-Lupicka & Sudol, 2010).

Los índices de Bray-Curtis y los Análisis de Conglomerados y Coordenadas Principales (tanto por aislamiento a partir de partículas de suelo como por pirosecuenciación) muestran que los sitios difieren en su composición, ya que logran separarse en grupos definidos. Los suelos del casco y el suelo con 10 años de historia de aplicación de glifosato presentan una mayor similitud respecto al suelo con 5 años de historia de aplicación. Esto podría deberse a que a los 10 años de disturbio el suelo ya se estabiliza y vuelve a tener una composición similar a la que presentaba originalmente.

Por otro lado, se observó que los sitios presentan una gran variabilidad dentro de cada uno, debido a la heterogeneidad propia del hábitat y a la disponibilidad de nutrientes. Las raíces, en particular, generan una gran heterogeneidad en el suelo debido a los exudados que liberan, a la materia orgánica que introducen al ambiente edáfico y al efecto sobre su estructura. El efecto de la raíz en la escala local es considerado de importancia para comprender los patrones de distribución de las especies en el suelo (Karlen *et al*, 1997).

Por último, cuando se estudió la cinética de crecimiento para las cepas aisladas, se observó que la velocidad de crecimiento es significativamente mayor en ausencia del glifosato en todos los casos. Si bien las especies que responden con una mayor tolerancia al herbicida son *T. harzianum*, *F. oxysporum*, *P. lilacinus y C. didymum*, la única cepa que completó su crecimiento en placa de Petri a los 5 días fue *T. harzianum*. Para *Humicola grisea*, y *A. niger* el crecimiento en

DISCUSION

presencia de glifosato comienza unos días después que sus respectivos controles, lo que indicaría que estos hongos estarían necesitando un tiempo de adaptación al medio que le permita a su vez sintetizar las enzimas necesarias para degradar el herbicida (Kryski-Lupicka *et al*, 1997). En el caso de *H. grisea* no se observó crecimiento en medio con glifosato, lo cual podría relacionarse con el hecho de no haber sido aisladas cepas de esta especie en suelos con historia de aplicación.

Las especies con mayor tolerancia al glifosato en ensayos *in vitro* coinciden con los resultados obtenidos en la primera parte de este capítulo. Las especies que predominan en los sitios agronómicos son las que poseen una mejor respuesta a la presencia del herbicida en el medio de cultivo.

Por otro lado, también se evaluó la cinética de crecimiento de las cepas *D. dematioidea*, *F. oxysporum* y *T. harzianun* en medio líquido en presencia y ausencia del herbicida organofosforado. Para las tres cepas evaluadas, se observó una disminución del porcentaje remanente de glifosato en el medio de cultivo mientras la biomasa fúngica se incrementa. Podríamos atribuir este resultado a la utilización del glifosato como fuente de fósforo. *T. harzianum* y *F. oxysporum* ya han sido reportado como biodegradadores de glifosato, utilizándolo como fuente de fósforo (Kryski-Lupicka, *et al*, 1997; Kryski-Lupicka, & Sudol, 2008).

CONCLUSIONES

HIPOTESIS

3) El glifosato afecta a la comunidad fúngica del suelo.

4) Existen cepas de hongos filamentosos capaces de degradarlo y que, por lo tanto, pueden ser utilizados potencialmente en la recuperación de suelos contaminados por este herbicida.

CONCLUSIONES

1) La primera hipótesis fue confirmada ya que las poblaciones fúngicas del suelo varían en su composición en suelos expuestos a glifosato en comparación con suelos sin exposición. Si bien las riquezas específicas son similares en los distintos sitios, las frecuencias de aparición varían de un sitio a otro, alterándose así las comunidades fúngicas. Las especies que caracterizan a los sitios expuestos al herbicida son *F. oxysporum*, *T. pseudokoningii* y *T. longibrachiatum* (para LS2) y *T. aureoviride*, *T. harzianum*, *D. dematoidea* y *P. lilacinus* (para LS16).

2) Se lograron obtener seis cepas tolerantes al glifosato: *T. harzianum*; *F. oxysporum*; *P. lilacinus*; *C. didymum*; *Acremoniella* sp y *A. niger*. T. *harzianum* y *F. oxysporum* fueron los aislamiento que presentaron la mayor velocidad de crecimiento en medio de cultivo in vitro, pudiendo ser utilizados como potenciales biodegradadores de este herbicida.

Capítulo 2

CAPÍTULO 2: EFECTO DEL GLIFOSATO SOBRE LAS COMUNIDADES FUNGICAS DEL SUELO FRENTE A UNA APLICACIÓN PUNTUAL.

HIPÓTESIS

1) El glifosato afecta a la comunidad fúngica del suelo a corto plazo.

2) La exposición a glifosato modifica a la biomasa fúngica del suelo

OBJETIVOS PARCIALES

1) Estudiar los efectos del glifosato en las poblaciones fúngicas debido a la aplicación de glifosato a corto plazo.

2) Evaluar el contenido de ergosterol (como medida de biomasa fúngica) en suelos con y sin historia de aplicación de glifosato.

3) Evaluar los efectos del glifosato en los parámetros morfológicos medidos en soja.

4) Evaluar la presencia de glifosato en el suelo.

METODOLOGÍA

1. Estudiar los efectos del glifosato sobre las comunidades fúngicas del suelo

1.1) Diseño experimental

Con los suelos recolectados en los lotes LS2 y Casco, se prepararon macetas a las que se les sembró soja (RS4009-NIDERA). Se le aplicó al suelo los siguientes tratamientos: suelo sin historia de aplicación de glifosato (Casco); suelo con historia de aplicación de glifosato (LS2); suelo con historia de aplicación de glifosato (LS2) a la que se le aplicó el herbicida a los 12 días de la siembra de la soja. La dosis de glifosato fue la equivalente en maceta a la especificada en el marbete del producto comercial (150ml en 10Lts). Se regó con 200ml de agua cada 3 días. Las macetas se mantuvieron en invernadero. Los tratamientos se realizaron por quintuplicado. El ensayo tuvo una duración de 3 meses.

En el estadio R8 de la soja, se descalzaron las macetas y se mantuvieron tanto las plantas como el suelo en la heladera (a 4ªC) hasta su procesamiento. Estas muestras fueron analizadas en los puntos 1.2; 1.3, 1.4 y 1.5.

1.2) Aislamiento e identificación de hongos filamentosos

Las tres muestras compuestas de suelo fueron lavadas de acuerdo al método de Bisset & Widden (1972). Se realizó los aislamientos fúngicos a partir de las partículas de suelo como se detalla en los puntos 1.2.1 y 1.2.2 del capítulo 1.

1.3) Caracterización morfológica de las comunidades fúngicas presentes en suelos con y sin exposición al glifosato.

Una vez que todas las cepas aisladas fueron identificadas taxonómicamente, se calcularon los siguientes parámetros e índices, de acuerdo a lo explicado en el punto 1.3 del capítulo 1: F (frecuencia de aparición de cada especie); Riqueza; Índice de biodiversidad de Shannon-Wiener (H); Índice de biodiversidad de Simpson (D) e Índice de equidad de Pielou (J´).

1.3.1) Comparación entre las comunidades fúngicas de cada sitio

Las comunidades fúngicas en cada tratamiento fueron comparadas utilizando el Índice de Bray-Curtis, como se explicó en el punto 2.2 del capítulo 1.

1.4) Análisis estadístico de las comunidades fúngicas en los distintos tratamientos

Para el análisis estadístico de los datos se construyó una matriz de datos donde distintas especies fueron consideradas como variables y los sitios de muestreo como factores. Al igual que en el capítulo 1, se realizó una transformación logarítmica (log(x+0,5)) de las frecuencias de aparición de los hongos. Las especies con una frecuencia igual o menor al 5% con una sola aparición a través de todos los muestreos no fueron consideradas en el análisis.

Con esta matriz de datos basada en la tabla de frecuencias, se realizó un Análisis de Componentes Principales (INFOSTATv.2013). Por otro lado, se realizó un Análisis de Coordenadas Principales en base a los valores obtenidos para el índice de Bray Curtis. Todos estos análisis se llevaron a cabo en el programa estadístico INFOSTAT v2013.

1.5) Comparación de las comunidades fúngicas de los distintos tratamientos utilizando la técnica de pirosecuenciación

1.5.1) Extracción y cuantificación de ADN genómico

Las muestras de suelo fueron tamizadas y homogeneizadas con un tamiz de 2mm y conservadas a -80°C hasta su procesamiento. La extracción de ADN a partir de 0,25g de suelo proveniente de las distintas muestras (LS2 T0; Casco T0; LS2 Tf; PMG Tf; Casco Tf) se realizó siguiendo el protocolo correspondiente al kit PowerSoil™ Isolation kit (Mo Bio Laboratories INC., Carlsbad, CA, USA) (Ver ANEXO).De cada tratamiento se extrajo ADN por triplicado. Para corroborar si la extracción de DNA genómico resultó exitosa, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. El DNA genómico se cuantificó en un QUBIT® 2.0 Fluorometer. Una vez obtenidos los ADN genómicos, se preservaron a -20ºC hasta el momento de la amplificación.

1.5.2) Diseño de oligonucleótidos específicos (primers)

Para la amplificación del ADN se utilizó un par de oligonucleótidos específicos (en inglés, primers) para hongos saprobios: ITS1F e ITS2 (Buee *et al*, 2009; Orgiazzi *et al*, 2013). En total se confeccionaron 7 oligonucleótidos para las 16 muestras a secuenciar: 1 Forward y 15 Reverse.

1.5.3) Amplificación del ADN genómico

El ADN genómico se amplificó mediante PCR (Polimerase Chain Reaction) utilizando primers específicamente diseñados para pirosecuenciación 454 con el sistema GS-FLX. La amplificación se llevó a cabo en un FastStart High Fidelity PCR system (Roche applied Science, Mannheim, Germany). Las condiciones de PCR fueron: un primer ciclo de desnaturalización a 94°C (4 min.); 35 ciclos de 98°C (10 seg.), 55°C (15 seg.); y 72°C (30 seg.) y un ciclo de elongación final a 72°C (4 min). Se utilizó un volumen de reacción de 50µl donde la concentración final de cada primer fue de 0,25µM, tomando un volumen de templado de 3µl. Los productos de la reacción fueron purificados y secuenciados en un Secuenciador Genómico FLX (Roche applied Science) siguiendo el protocolo especificado en el kit. La amplificación y purificación se realizó en el Instituto de Agrobiotecnología de Rosario (INDEAR).

1.5.4) Pirosecuenciación

La pirosecuenciación de los productos de PCR ya purificados también fue realizada en el INDEAR en la plataforma 454 GS-FLX Titanium, siguiendo las instrucciones del fabricante correspondientes a la secuenciación de amplicones.

1.5.5) Análisis de las secuencias y confección de MOTUs

Las secuencias obtenidas fueron analizadas siguiendo lo explicado en el punto 2.2.5 del capítulo 1. Las secuencias representativas de cada MOTUs fueron comparadas con las secuencias publicadas en el banco de datos NCBI (National Centre for Biotechnology Information) usando el algoritmo Nt/nr BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov). Sólo se consideraron secuencias con valores de cobertura y similitud mayores a 97%. Únicamente se asignaron especies en el caso en que: i) los valores de E-values fueron menos o igual a 10^{-100} y que el porcentaje de similitud fuera mayor o igual al 97% y ii) no existiesen contradicciones en el listado de secuencias similares. Debido a que la región ITS no permite discernir entre especies de Fusarium y Penicillium, los MOTUs que correspondieron a estos géneros fueron identificados a nivel de género (Orgiazzi *et al*, 2013).

1.5.6) Comparación de las comunidades fúngicas entre los tratamientos

Las comunidades fúngicas en los suelos estudiados (LS2 T0; Casco T0; LS2 Tf; PMG Tf; Casco Tf) fueron comparadas utilizando el Índice de Bray Curtis. Una vez obtenidos los valores de éste índice, se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (sigla en inglés PCoA).

2.- Evaluación de contenido de ergosterol en suelo.

2.1) Extracción de ergosterol

Se trabajó con 2 gr. de suelo por cada muestra (LS2 T0; Casco T0; LS2 Tf; PMG Tf; Casco Tf). Las muestras se saponificaron durante 1 hora a 70°C con 2gr. de KOH en 25 ml de metanol (grado HPLC), 100µl de corticosterona (como marcador de pérdida) y 100µl de butihidroxitolueno (BHT) como antioxidante. Luego, el sobrenadante se trasvasó a un tubo falcón de 50ml al que se le agregaron 30 ml de hexano (previamente secado con Na_2SO_4 anhidro) para extraer el ergosterol. Una vez obtenidas las dos fases, se transfirió la fracción orgánica a un balón de 250ml. Esto se repitió tres veces. El hexano se evaporó en un rotavapor. El precipitado se resuspendió en un volumen conocido de metanol (grado HPLC) (Chiocchio & Matkovic, 2011). Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento. Se realizaron 5 réplicas por muestra, con tres extracciones por cada réplica.

2.2) Cuantificación en HPLC

Para el análisis de las muestras, se utilizó un P100 isocratic HPLC pump (Spectra Physics), un detector de UV-100 (Spectra Physics) y un integrador Data Jet (Spectra Physics), flujo de 1.0 ml/min, columna Supelcosil LC18 (Supelco; 5 µm, 250 x 4,6mm). El ergosterol y la corticosterona se determinaron a una absorbancia de 290nm y 254nm respectivamente. Se utilizó como fase móvil una mezcla de metanol:agua (80:20v/v). Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de un Factor. Para ello, los datos fueron transformados (log10) para que se cumpliera con el supuesto de normalidad.

Para la curva de calibración del ergosterol y la corticosterona (Ver Anexo), se prepararon soluciones estándar de cada compuesto (0,0007mg/ml y 0,0006mg/ml, respectivamente). A partir de estas soluciones se hizo una dilución 1/10 y se inyectaron cantidades crecientes (de 5 a 20µl). Se graficó el área obtenida vs masa (µg).

3.- Medición de parámetros morfológicos en planta de soja (*Glycine max*)

Al momento de la cosecha de las plantas de soja provenientes de los tres tratamientos (punto 1.1) se evaluaron los siguientes parámetros: biomasa seca de vástago y de raíz; número de chauchas y número de nódulos por planta.

Para el análisis estadístico de los parámetros medidos, se utilizó un análisis multivariado de la varianza (MANOVA) y un análisis de la función discriminante, donde las variables fueron: número de chauchas, número de nódulos, peso seco del vástago y peso seco de raíz. Las comparaciones entre tratamientos se realizaron con una prueba de Hotelling (INFOSTATv2013).

4.- Evaluación de la presencia de productos derivados del glifosato en el suelo. Estudios preliminares.

4.1) Extracción de glifosato a partir de la muestra del suelo

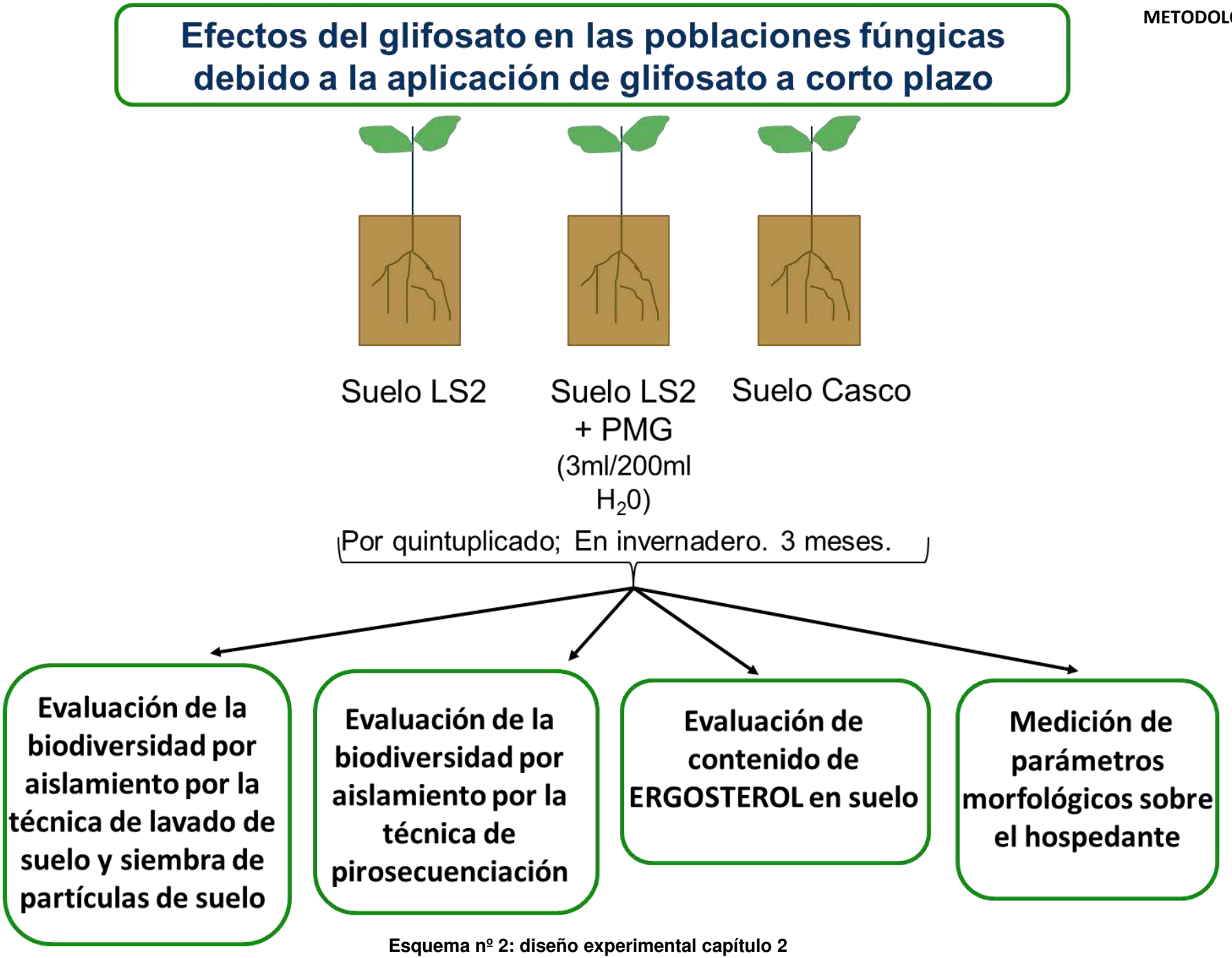
Las muestras de suelo (LS2 T0; Casco T0; LS2 Tf; PMG Tf; Casco Tf) fueron secadas a temperatura ambiente. Se pesaron 5gr. de suelo en tubos falcon de 50ml y se agregaron 10ml de KOH 0,1M. Los tubos con las muestras se agitaron en un shaker durante 2 horas. Luego, se centrifugó a 3500rpm durante 30 minutos. Se separó la solución alcalina. Este sobrenadante fue neutralizado con HCl 1M hasta pH 7. Luego de esto, las muestras fueron mantenidas en el freezer hasta su análisis (Chen *et al*, 2009).

4.2) Cuantificación en Cromatógrafo Iónico

Para el análisis de las muestras, se utilizó un cromatógrafo iónico DIONEX (DX-100), método básico, escala 10 µS. La fase móvil utilizada fue una mezcla CO_3Na_2/NaOH (9mM/4mM).

Se realizó una curva de calibración con soluciones estándar de glifosato con las siguientes concentraciones: 1, 2,5 y 5ppm. Tanto para las muestras como los patrones se inyectaron 2ml.

Para el análisis estadístico se llevó a cabo a un ANOVA, siendo la variable la concentración de glifosato en suelo y los tratamientos: LS2 (T0); Casco (T0); LS2 (Tf); Casco (Tf) y PMG (Tf). También se realizaron comparaciones entre tratamientos con un test de Tuckey.



Esquema nº 2: diseño experimental capítulo 2

RESULTADOS

1.- Estudio los efectos del glifosato sobre las comunidades fúngicas del suelo

1.1) Caracterización morfológica de las comunidades fúngicas presentes en suelos con y sin exposición al glifosato.

En esta etapa se compararon las comunidades fúngicas de suelos sometidos a diferentes tratamientos: suelo control (Casco); suelo proveniente de un sistema agrícola (LS2); suelo proveniente del sitio LS2 al que se le realizó una aplicación de glifosato (PMG). Las características físico-químicas de estos suelos se muestran en la Tabla 1. En base a la curva de lavado obtenida previamente (Figura 1), se llevaron a cabo 30 lavados.

En la Tabla 10, se muestran los resultados obtenidos de la siembra de partículas de suelo de distintos tamaños, correspondientes a los diferentes tratamientos: Casco (TF), LS2 (TF) y PMG. Para todas los suelos, se sembraron 120 partículas, de las cuales se obtuvieron 112, 122 y 113 aislamientos totales para cada muestra (Casco (TF), LS2 (TF) y PMG respectivamente.

En la Tabla 3 se muestra el listado de especies obtenidas. Se compararon las comunidades fúngicas del suelo sometido a tratamiento en maceta con los suelos del tiempo cero, utilizados como inóculo y analizados en el capítulo 1.

RESULTADOS

géneros	LS2 (Tf)						PMG (Tf)						CASCO (Tf)					
	LS2 (Tf)	LS2 (Tf)	LS2 (Tf)	LS2 (Tf)	LS2 (Tf)	LS2 (Tf)	PMG (Tf)	PMG (Tf)	PMG (Tf)	PMG (Tf)	PMG (Tf)	PMG (Tf)	C (Tf)	C (Tf)	C(Tf)	C (Tf)	C(Tf)	C (Tf)
Fusarium oxysporum	10,0	25,0	30,0	30,0	30,0	20,0	35,0	55,0	65,0	45,0	35,0	30,0	10,0	50,0	50,0	20,0	50,0	45,0
Fusarium sporotrichioides	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Fusarium sp1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Fusarium sp2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Fusarium sp3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Fusarium sp4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0
Cylindrocarpon didymun	5,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cylindrocarpon destructans	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cylindrocarpon cylindroides	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0
Cylindrocarpon sp1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Trichoderma aureoviride	10,0	35,0	25,0	15,0	15,0	30,0	10,0	5,0	0,0	10,0	20,0	10,0	45,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Trichoderma longibrachiatum	5,0	0,0	5,0	5,0	0,0	0,0	10,0	5,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0
Trichoderma harzianum	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Trichoderma pseudokoningii	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	10,0	5,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Trichoderma koningii	5,0	15,0	5,0	0,0	5,0	5,0	25,0	25,0	20,0	15,0	5,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Acremonium strictum	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0
Acremonium	5,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Clonostachys rosea	0,0	5,0	0,0	5,0	15,0	0,0	0,0	15,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0
Verticillium sp	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Humicola fuscoatra	0,0	5,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0	0,0	5,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Humicola grisea	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	5,0	5,0	10,0	5,0
Cladosporium nigrellum	15,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cladosporium sp	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0
Acremoniella sp	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0
Broomela sp	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0
Chaetomium sp	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Paecilomyces lilacinus	5,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0
Aspergillus candidus	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0
Aspergillus niger	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	15,0	10,0	5,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Penicillium	5,0	10,0	5,0	10,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	0,0	5,0	0,0	5,0	10,0	0,0	20,0	45,0	5,0
Talaromyces sp	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Absidia sección glauca	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0
Rhizopus rhizopodiformis	0,0	0,0	15,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Circinella linderi	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
cleistotecios1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	5,0	0,0	0,0
micelio esteril 1	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	15,0	0,0	0,0
micelio esteril 2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0	0,0	0,0
micelio esteril 3	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	5,0
micelio esteril 4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0
micelio esteril 5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0
micelio esteril 6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0
micelio esteril 7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	5,0
micelio esteril 8	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
micelio esteril 9	5,0	5,0	0,0	5,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
micelio esteril 10	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
nº aislamientos	20,0	20,0	18,0	17,0	19,0	18,0	19,0	25,0	20,0	19,0	20,0	19,0	19,0	19,0	18,0	19,0	22,0	16,0
riqueza específica	17,0						17,0						19,0					
nº partículas sembradas	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0

Tabla 10. *Frecuencia de aparición (expresada en porcentaje), riqueza específica, número de aislamientos totales y número de partículas sembradas, de las distintas especies en los distintos tratamientos (Casco (TF), LS2 (TF) y PMG).*

RESULTADOS

El mayor valor de riqueza específica corresponda al suelo control (Casco (TF)), donde se obtuvieron 19 especies distintas. Sin embargo, este valor no difiere significativamente de los obtenidos para los tratamientos LS2 (TF) y PMG (14 para ambos). La riqueza observada al final del ensayo, en comparación con el tiempo 0 (Tabla 2) es mayor para todos los tratamientos.

Nuevamente, los géneros que aparecen con mayor frecuencia son *Fusarium* spp, *y Trichoderma* spp. *F. oxysporum* es la especie predominante, en todos los tratamientos mientras que las especies de *Trichoderma* varían de acuerdo al tratamiento. *T. aureoviride* se encuentra mayormente en suelos con historia de aplicación de glifosato (LS2) mientras que *T. koningii* predomina en el suelo con una exposición reciente al herbicida.

Con respecto a la presencia de micelios estériles (Tabla 11) en los distintos tratamientos puede observarse que los micelios estériles 1, 2 y 3 aparecen en todos los tratamientos. A su vez, el micelio estéril 3 también estaba presente en ambos suelos del tiempo 0 (Tabla 4). Los micelios estériles 4, 5, 6 y 7 solo se encuentra asociado a los tratamientos control (casco) mientras que los micelios 8,9 y 10 sólo se presentan en suelos que han sido expuestos al herbicida (LS2 y PMG16 y LS2).

	colonia			clamidosporas	sitios	
	color	color reverso	aspecto		sin glifosato (casco)	con glifosato (LS2 y PMG)
micelio estéril 1	grisacea	gris oscuro	algodonosa	presentes	P	P
micelio estéril 2	blanca	marrón	algodonosa	ausentes	P	P
micelio estéril 3	blanca	blanco amarillento	abundante micelio aéreo	ausentes	P	P
micelio estéril 4	marrón	marrón dorado	algodonosa	ausentes	P	A
micelio estéril 5	blanca amarillenta	amarillo oscuro	algodonosa	ausentes	P	A
micelio estéril 6	amarilla	amarillo	cremosa	ausentes	P	A
micelio estéril 7	blanca	blanco	cremosa	ausentes	P	A
micelio estéril 8	mostaza	oscuro	abundante micelio aéreo	ausentes	A	P
micelio estéril 9	olivácea	oscuro	escaso micelio aéreo	ausentes	A	P
micelio estéril 10	blanco	amarillento	abundante micelio aéreo	presentes	A	P

Tabla 11. *Características de los micelio estériles presentes en los distintos tratamientos (Casco (TF), LS2 (TF) y PMG).*

En el tratamiento "casco" se han presentado diferentes asociaciones: *F. oxysporum* + *A. niger*, *F. oxysporum* + *T. pseudokoningii* y *F. oxysporum* + *Penicillium* sp. En los tratamiento delsuelo con exposición a glifosato, las asociaciones predominantes corresponden a *F. oxysporum* + *T. longibrachiatum*, *F. oxysporum* + *T. koningii*, esta última asociaciación es exclusiva del suelo con exposición reciente a glifosato (PMG). *F. oxysporum* también aparece asociado a *Rhizopus rhizopodiformis* y a *A.* niger.

RESULTADOS

En la tabla 12 se muestran los índices de diversidad obtenidos para los distintos tratamientos. Los índices de biodiversidad de Shannon-Wiener y Simpson presentaron valores similares entre los tratamientos, siendo el más bajo el observado para el suelo proveniente del lote cultivado con soja (LS2(T0)). El índice de equitatividad de Pielou (J´) mostró que las especies fúngicas del suelo se distribuyen de forma más equitativa en los mismos suelos que presentan mayores valores de biodiversidad. Los valores más bajos coinciden con los suelos en los que se ha aplicado recientemente, LS2(T0), suelo recolectado una semana después de la fumigación con el herbicida en el campo, y PMG).

Muestra	Riqueza (S)	Índice de biodiversidad alfa		Índice de equidad de Pielou (J´)
		Shannon-Wiener (H)	Simpson (D)	
Casco(T0)	15	2,3	0,19	0,85
LS2(T0)	14	1,92	0,29	0,73
Casco(TF)	19	2,33	0,19	0,79
LS2(TF)	17	2,45	0,14	0,86
PMG	17	2,01	0,23	0,71

Tabla 12. *Índices de biodiversidad alfa de cada muestra estudiada (Casco(T0), LS2(T0), Casco(TF), LS2(TF) y PMG6). Se muestran los índices de Riqueza específica (S); Sannon-Wiener (H); Simpson (D) y el índice de equitatividad de Pielou (J´).*

1.2) Comparación entre las comunidades fúngicas de cada sitio obtenidas por aislamiento a partir de partículas de suelo

Con el fin de comparar a las comunidades fúngicas de los suelos con y sin historia de aplicación de glifosato, se calculó el índice de Bray-Curtis, obteniéndose la siguiente matriz de similitud (Tabla 13):

	Casco(T0)	Casco(TF)	LS2(T0)	LS2(TF)	PMG
Casco(T0)	0				
Casco(TF)	0,34	0			
LS2(T0)	0,31	0,36	0		
LS2(TF)	0,30	0,34	0,33	0	
PMG	0,35	0,35	0,32	0,32	0

Tabla 13. *Índice de Bray-Curtis comparando los sitios Casco(T0),Casco(TF), LS2 (T0), LS2(TF) y PMG.*

En el análisis de conglomerados, utilizando a las especies como variables, se observó que los sitios con mayor similitud corresponden al Casco(T0) y LS2(TF). El tratamiento control, Casco(TF), se separa del resto de los tratamientos (Figura 13).

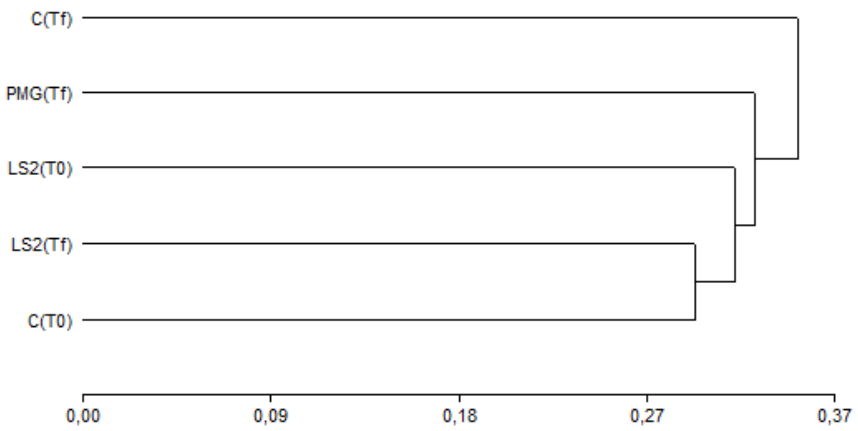


Figura 13. *Dendrograma de los sitios (Casco(T0), LS2(T0), Casco(TF), LS2(TF) y PMG) según el cálculo de la matriz de similitud de Bray - Curtis para las comunidades de fúngicas estudiadas.*

1.3) Análisis estadístico de las comunidades fúngicas en los distintos tratamientos

Del ACP surge que los primeros 3 componentes explican un 39% de la varianza total. Los tratamientos no presentan un patrón definido en el gráfico de Biplot. Los sitios no parecen agruparse en base a alguna especie en particular, con lo cual los resultados obtenidos por no ser contundentes, no se muestran.

En cuanto al Análisis de Coordenadas Principales (Figura 14) se observó que los tratamientos se agrupan de acuerdo a la exposición al glifosato, a lo largo de la coordenada principal 1. En el lado positivo, se agrupan los tratamientos que han estado expuestos alguna vez al herbicida (LS2(T0), LS2(TF) y PMG) mientras que en el lado negativo aparecen todos las muestras provenientes del casco.

Por otro lado, a lo largo del componente 2, se pueden distinguir dos grupos, de acuerdo al tiempo de la última aplicación de glifosato: hacia el extremo positivo tienden a ubicarse los suelos que han sido expuestos recientemente a glifosato (LS2(T0) y PMG). Los suelos del tratamiento LS2(TF) se encuentran hacia el extremo negativo. Los suelos provenientes del casco en tiempo inicial y final no se separan entre sí.

Se observa también que dentro de cada tratamiento existe gran variabilidad, dado que los puntos aparecen dispersos en el grupo.

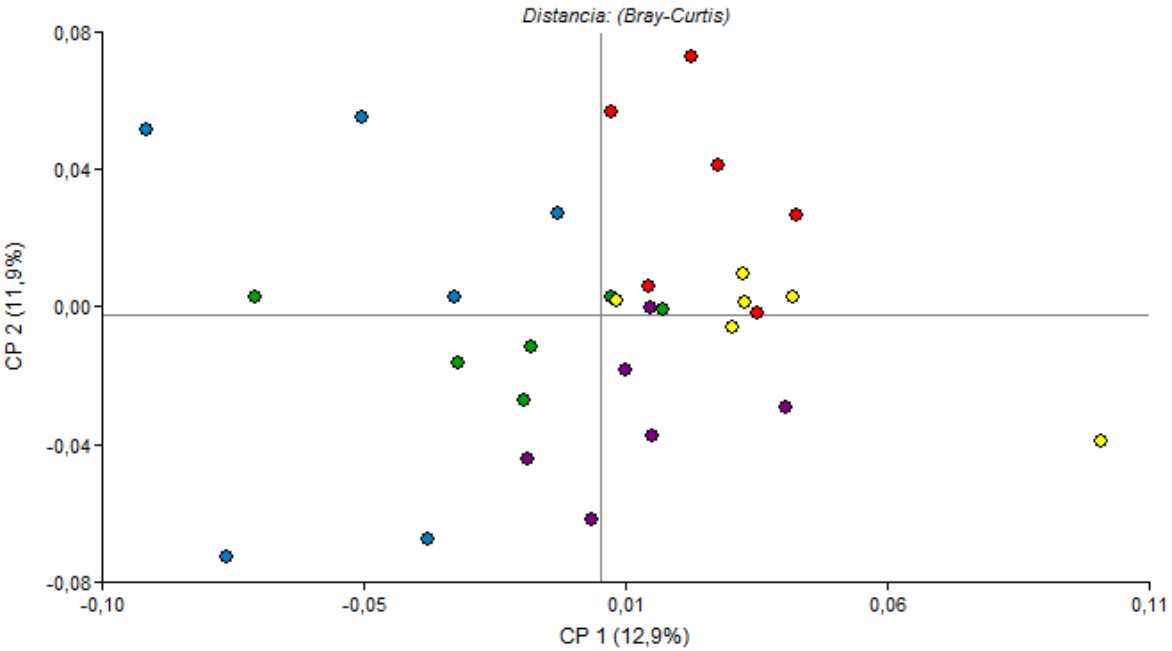


Figura 14. *Análisis de Coordenadas Principales de los distintos tratamientos (Casco(T0), en verde, LS2(T0), en rojo, Casco(TF), en celeste, LS2(TF), en violeta y PMG, en amarillo).*

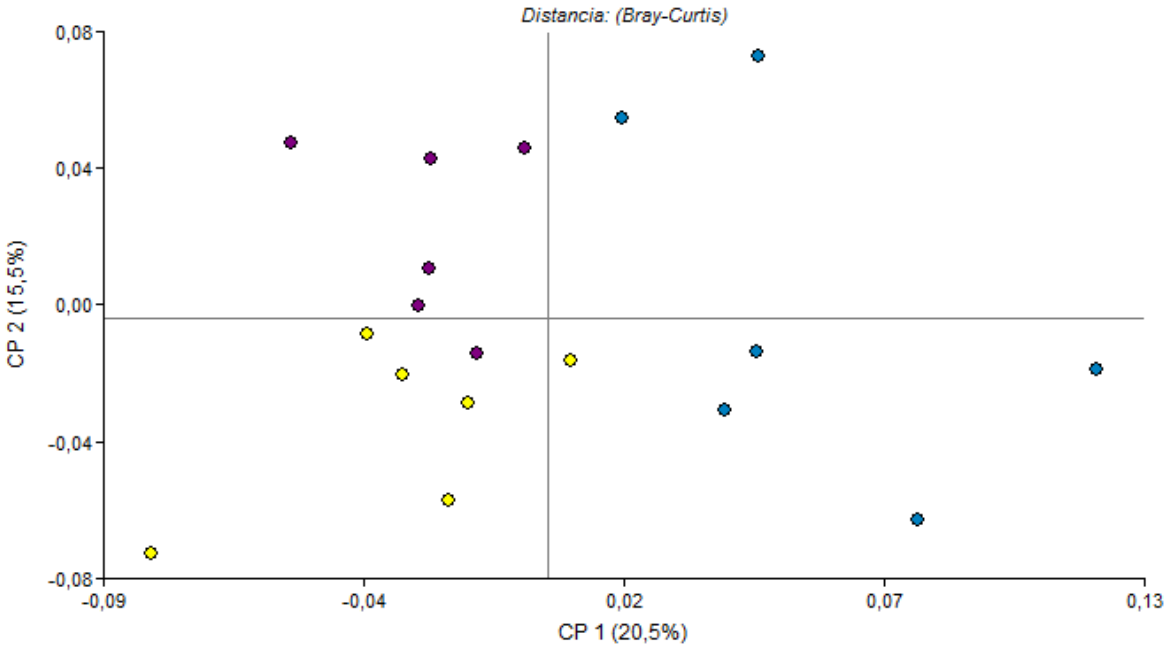


Figura 15. *Análisis de Coordenadas Principales de los distintos tratamientos (Casco(TF), en celeste, LS2(TF), en violeta y PMG, en amarillo).*

Para analizar si existen diferencias en las comunidades entre tratamientos una vez terminado el ensayo, se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (Figura 15). Al igual que en la Figura 14, se observa también que dentro de cada tratamiento existe gran variabilidad. Sin embargo, los tratamientos presentan diferencias en cuanto a sus comunidades, ya que los tratamientos PMG y LS2(TF) se separan del Casco(TF) y a su vez, el LS2(TF) se ubica hacia el extremo positivo de la coordenada principal 2, mientras que los censos pertenecientes al tratamiento PMG aparecen hacia el extremo negativo del mismo.

1.4) Comparación de las comunidades fúngicas de los distintos tratamientos utilizando la técnica de pirosecuenciación

Las comunidades fúngicas de los distintos tratamientos fueron comparadas utilizando el Índice de Bray Curtis (Tabla 14). Se observó que los sitios difieren en cuanto a su composición (valores de índice cercanos a 1).

	$L(T0)_3$	PMG_2	$L(T0)_2$	$C(T0)_2$	$C(TF)_3$	PMG_1	$L(TF)_3$	$C(TF)_1$	PMG_3	$L(TF)_1$	$C(TF)_2$	$C(T0)_3$	$C(T0)_1$	$L(TF)_2$	$L(T0)_1$
$L(T0)_3$	0.0														
PMG_2	0,73	0.0													
$L(T0)_2$	0,63	.79	0.0												
$C(T0)_2$	0,78	0.58	0,87	0.0											
$C(TF)_3$	0,72	0,83	0,55	0,85	0.0										
PMG_1	0,61	0,8	0,44	0,86	0,47	0.0									
$L(TF)_3$	0,51	0,81	0,65	0,9	0,71	0,62	0.0								
$C(TF)_1$	0,48	0,78	0,66	0,87	0,66	0,63	0,36	0.0							
PMG_3	0,72	0,35	0,8	0,55	0,79	0,8	0,85	0,8	0.0						
$L(TF)_1$	0,75	0,43	0,82	0,59	0,82	0,81	0,86	0,83	0,45	0.0					
$C(TF)_2$	0,73	0,43	0,81	0,5	,82	0,82	0,85	0,83	0,42	0,49	0.0				
$C(T0)_3$	0,78	0,57	0,85	0,26	0,83	0,85	0,88	0,85	0,54	0,56	0,49	0.0			
$C(T0)_1$	0,78	0,53	0,85	0,28	0,83	0,85	0,88	0,87	0,5	0,55	0,46	0,26	0.0		
$L(TF)_2$	0,74	0,41	0,81	0,53	0,81	0,8	0,87	0,84	0,37	0,47	0,41	0,52	0,51	0.0	
$L(T0)_1$	0,76	0,46	0,8	0,62	0,78	0,78	0,82	0,8	0,45	0,41	0,5	0,59	0,59	0,51	0.0

Tabla 14. *Índice de Bray-Curtis comparando los distintos tratamientos utilizando la técnica de pirosecuenciación.*

En el gráfico de Análisis de Coordenadas Principales (Figura 16) se observa que el único sitio en donde no hay variabilidad es en el Casco(T0), esto está indicado en el gráfico con el círculo verde. Las comunidades fúngicas que presentan mayor similitud son las de los tratamientos LS2(TF) y PMG, ya que se ubican cercanos en el gráfico.

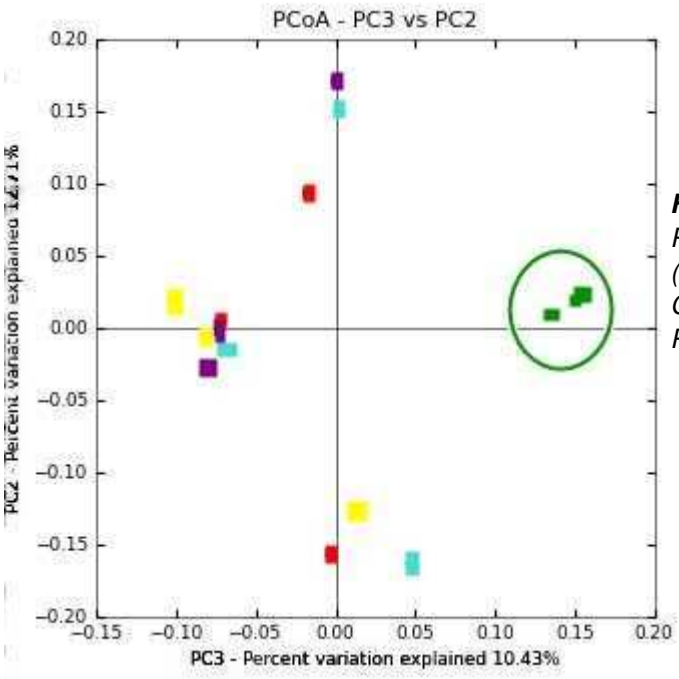


Figura 16. *Análisis de Coordenadas Principales de los distintos tratamientos (Casco(T0), en verde, LS2(T0), en rojo, Casco(TF), en celeste, LS2(TF), en violeta y PMG, en amarillo).*

2.- Evaluación de contenido de ergosterol en suelo.

A partir de una dilución 1/10 de una solución patrón de ergosterol (0,0007g en 1ml de metanol) se construyó la curva de calibración que se muestra en Figura 6. La curva fue linear desde los 5 hasta los 16µl.

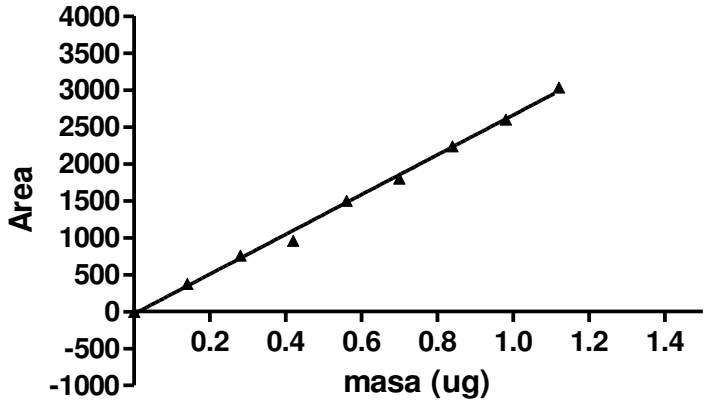


Figura 17. *Curva de calibración de ergosterol. Ecuación de la curva: y=1656x, R2 = 0,9992.*

RESULTADOS

Los suelos provenientes del casco de la estancia fueron los que mostraron los valores mas altos de ergosterol, mientras que los valores menores se observaron en los suelos con 10 años de historia de aplicación de glifosato (LS2), encontrandose diferencias significativas ($p<0,05$) entre el contenido de ergosterol de los suelos provenientes del casco y los provenientes de sistemas agrícolas. (Figura 18).

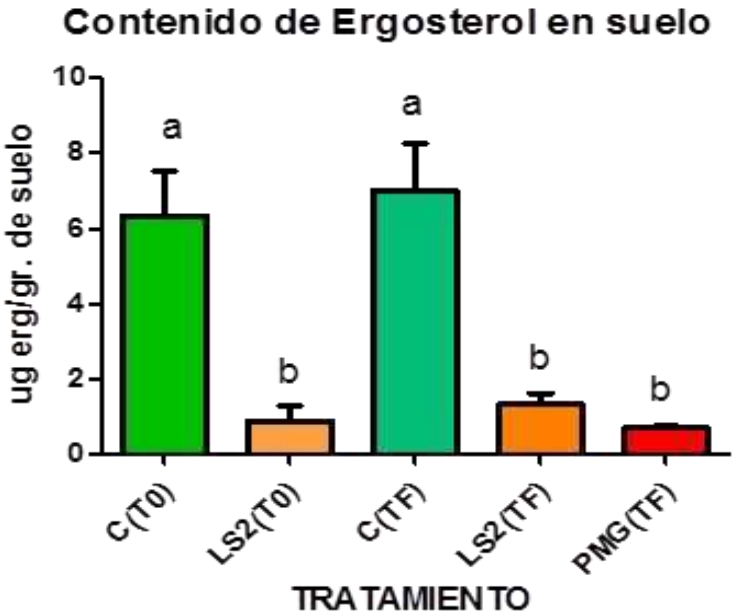
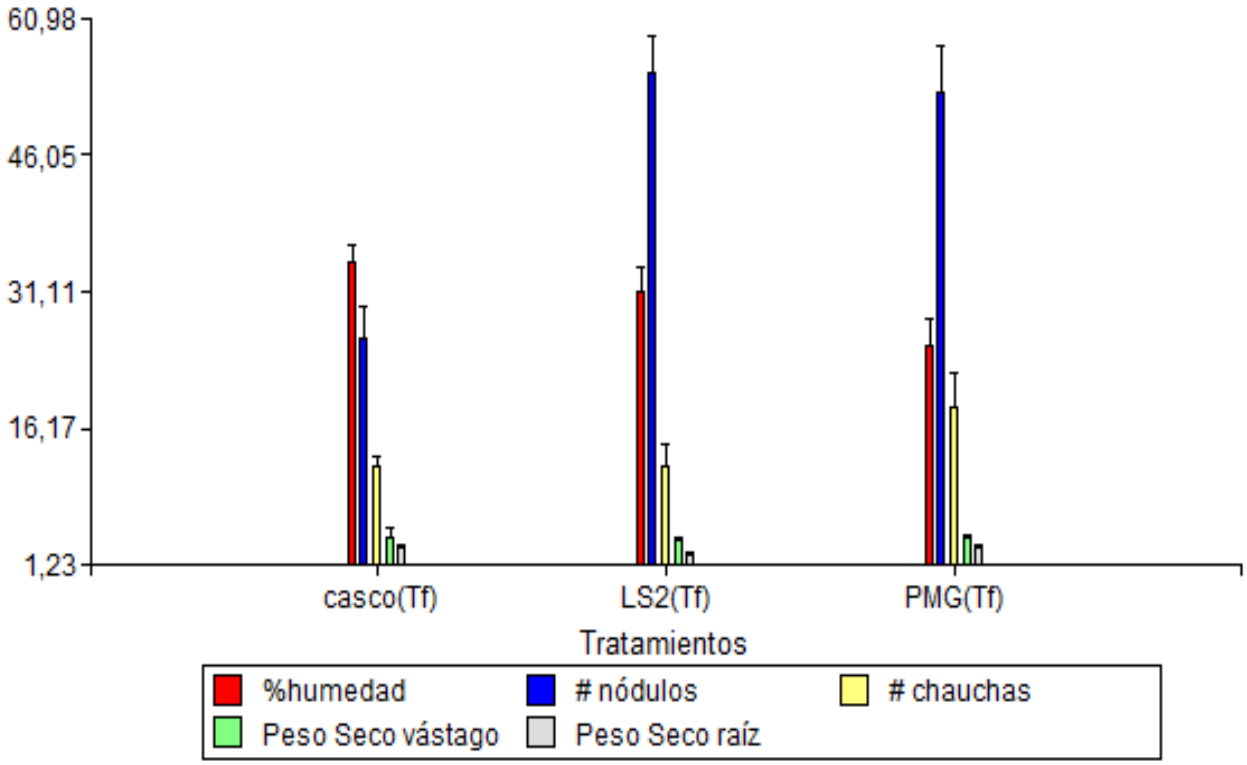


Figura 18. *Cantidad de ergosterol (ug de ergosterol/gramo de suelo) obtenido para cada tratamiento.*

3.- Medición de parámetros morfológicos en planta de soja (*Glycine max*)



Al realizar una prueba de MANOVA se observó que los tratamientos LS2(TF) y PMG(TF) difieren significativamente del tratamiento Casco (Tf) ($p<0,05$). El análisis de discriminante (Figura 8) dio como resultado 2 funciones que explicaron el 100% de la varianza total. La primera función estuvo asociada al número de nódulos y al peso seco del vástago mientras que la segunda, con el número de chauchas y el peso seco de la raíz. Las variables que presentan mayor contribución a la separación entre tratamientos son el número de nódulos y el peso seco del vástago. En los tratamientos con glifosato (LS2 y PMG) el número de nódulos es significativamente mayor al observado en el tratamiento control (casco).

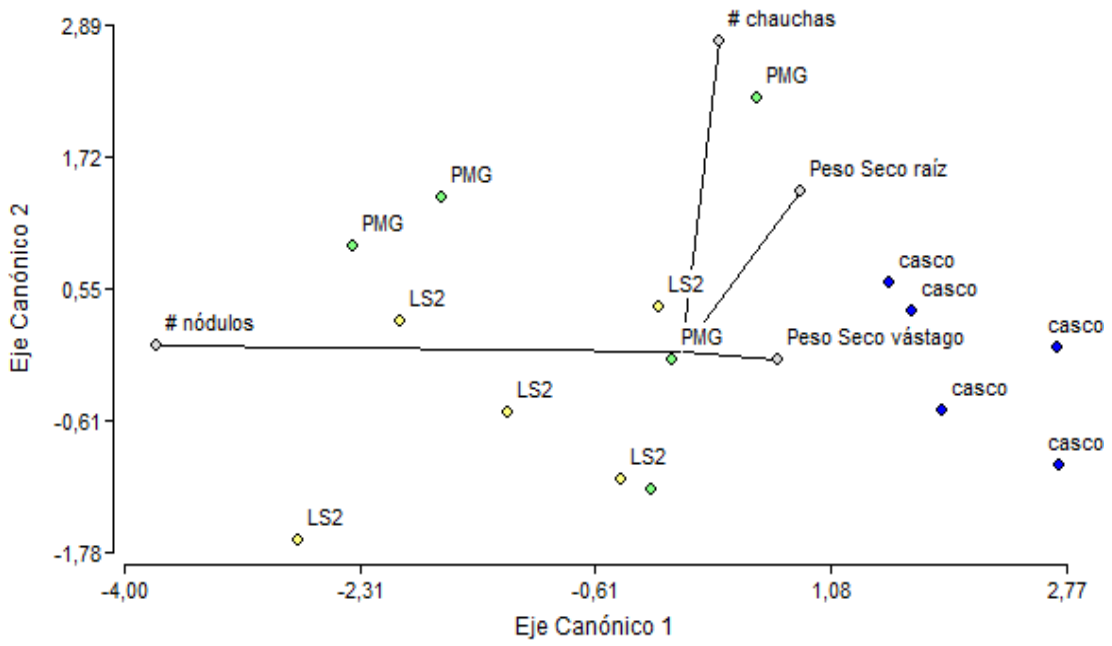


Figura 20. *Análisis de la función discriminante de los parámetros medidos sobre las plantas de soja con los tratamientos Casco, LS2 y PMG.*

4) Estudios preliminares de la presencia del glifosato en las muestras de suelo

Los valores de glifosato obtenidos para las distintas muestras de suelo provenientes del ensayo en maceta fueron prácticamente nulos. Sólo se detectó glifosato en los suelos del tratamiento PMG (Ver curva de calibración y Tabla en Anexo).

DISCUSIÓN

En este capítulo se estudió la alteración en la composición de las comunidades fúngicas del suelo ante una aplicación puntual de glifosato, comparando suelos con igual historia de exposición al herbicida y un suelo control.

La mayor riqueza específica fue observada en las muestras de suelo provenientes del casco (19). En los tratamientos PMG y LS2 se obtuvo igual número de especies (17). Los valores más altos de índices de biodiversidad (Shannon-Wiener y Simpson) correspondieron a los suelos provenientes del casco, y al suelo proveniente del lote LS2(TF). Asimismo, las comunidades con una distribución más equitativa de especies (valores del índice de Pielou cercanos a 1) coincidieron con los tratamientos con mayores índices de biodiversidad.

Al comparar a las comunidades en base a la matriz de similitud de Bray-Curtis, ya sea por la técnica de lavado de muestras múltiples o de pirosecuenciación, se observaron patrones de agrupación de los tratamientos de acuerdo a la procedencia del suelo utilizado en el armado de las macetas y al momento de aplicación de glifosato. Los suelos con aplicación recientes de glifosato (LS2(T0) y PMG) difieren del resto (casco y LS2(TF)). Esto indicaría una respuesta temprana a la presencia del herbicida por parte de las comunidades fúngicas. Esto es esperable, ya que el glifosato aporta nutrientes al suelo, al ser una fuente de carbono, nitrógeno y fósforo para los microorganismos capaces de degradarlo, por lo que la composición específíca se ve modificada. Tanney &Hutchison (2010), encontraron que la respuesta a la exposición a glifosato a distintas concentraciones difiere entre cepas cuando se mide el crecimiento de distintas especies de hongos filamentosos. Estos resultados sugerirían que las poblaciones del suelo expuestas al herbicida podrían verse modificadas, aumentando de este modo las poblaciones que no son susceptibles al glifosato. De este modo, las comunidades fúngicas del suelo se ven alteradas, cambian su composición

En el Análisis de Coordenadas Principales obtenido a partir de la técnica de pirosecuenciación, se observa que el único sitio que no presenta variabilidad entre los puntos provenientes del mismo suelo, es el casco en el tiempo 0. Este resultado se explica con la gran heterogeneidad del suelo, especialmente en zonas agrícolas donde el uso de fertilizantes aumenta la disponibilidad de nutrientes en zonas puntuales, favoreciendo el desarrollo de microorganismos.

Por otro lado, se evaluó el contenido de ergosterol en las distintas muestras. El ergosterol se utiliza como medida de biomasa fúngica, ya que se ha encontrado que existe una fuerte correlación entre el contenido de ergosterol en suelo y la biomasa expresada en peso seco (Passansen *et al* 1999). Los mayores valores de ergosterol se obtuvieron para el casco, existiendo diferencias significativas respecto al suelo agrícola. Estos resultados son coincidentes con los

encontrados por Stahl *et al*, (1999), quienes también registraron una mayor biomasa fúngica en suelos sin cultivar con respecto a suelos cultivados.

Las concentraciones altas de ergosterol en suelo indicarían una mayor presencia de hongos en el mismo. Sin embargo, el número de aislamientos obtenidos para cada tratamiento fue similar. Esto puede explicarse debido a que la cantidad de ergosterol varía de acuerdo a la especie, al estadío de desarrollo y a las condiciones ambientales en las que se encuentran los hongos. Dentro de los Hyphomycetes y Ascomycetes, se han reportado concentraciones de ergosterol que varían entre 2,3 y 11,9 mg de ergosterol/mg de peso de seco (Miller *et al*, 1997). Las especies predominantes en los suelos agrícolas podrían contener concentraciones de ergosterol más bajas que las del casco. Por otro lado, cuando caracterizamos a los suelos utilizando pirosecuenciación se encontró que un porcentaje de los MOTUs correspondieron a géneros de hongos no cultivables. La mayor proporción de estos hongos aparecieron en el casco, pudiendo ser esta la razón por la cual el contenido de ergosterol es mayor que en los otros tratamientos aunque el número de aislamientos sea similar.

Finalmente, en concordancia con lo obtenido por Araujo *et al* (2003), obtuvimos valores de concentración de glifosato muy bajos en el suelo PMG (Tf), por lo que podría considerarse que su tasa de degradación es alta. En los suelos provenientes del casco y del lote con diez años de historia de aplicación, no se logró detectar al compuesto. Sin embargo, este ensayo debería repetirse con un número mayor de réplicas y tomando muestras de la superficie del suelo, ya que el glifosato queda retenido en los primeros centímetros del mismo.

CONCLUSIONES

HIPÓTESIS

1) El glifosato afecta a la comunidad fúngica del suelo a corto plazo.

2) La exposición a glifosato modifica a la biomasa fúngica del suelo

CONCLUSIONES

1) El glifosato alteraría a la composición fúngica del suelo en poco tiempo, probablemente debido al aporte de nutrientes que genera.

2) El glifosato disminuiría la cantidad de biomasa fúngica en el suelo ya que los valores más altos de ergosterol en suelo fueron observados en las muestras de provenientes del casco de la estancia, donde nunca se realizaron prácticas agrícolas.

3) Los valores de concentración de glifosato en suelos fueron bajos y prácticamente nulos en la mayoría de los casos, reforzando la teoría de que es eliminado rápidamente del suelo, aunque estos resultados deberían ser corroborados repitiendo nuevamente el ensayo.

CONCLUSIONES GENERALES

La hipótesis general planteada al inicio de esta tesis es que el glifosato afecta a la comunidad microbiana del suelo; existiendo algunas cepas de hongos filamentosos capaces de degradarlo y que, por lo tanto, pueden ser utilizados potencialmente en la recuperación de suelos contaminados por este herbicida.

En base a los resultados que se obtuvieron, podemos concluir que el uso del herbicida glifosato provoca alteraciones en la composición fúngica del suelo, con efectos deletéreos en poblaciones susceptibles al mismo, mientras que favorecen el desarrollo de otras que podrían estar utilizándolo como fuente de nutrientes, aunque los valores de los índices de biodiversidad analizados no se ven afectados en gran medida.

Teniendo en cuenta que los microorganismos del suelo contribuyen en gran medida a su fertilidad ya que contribuyen en el reciclaje de nutriente, es importante seguir profundizando en el estudio del comportamiento de este herbicida y su efecto sobre los hongos del suelo.

BIBLIOGRAFÍA

ABDEL-MALLEK, A.Y.; ABDEL-KADER, M.I.A. & SHONKEIR, A.M.A. 1994. Effect of glyphosate on fungal population, respiration and the decay of some organic matters in Egyptian soil. *Microbiology Research*, 149(1): 69-73.

DE ANDRÉA, MM, BONANHO PERES, T, LUCHINI, LC, BAZARIN, S, PAPINI, S, BARIFOUSE MATALLO, M & TEDESCHI.SAVOY, VL. 2003. Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and soil bioactivity. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, *38*(11): 1329-1335.

ARAUJO, ASF; MONTEIRO, RTR & ABARKELI, RB. 2003. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*, 52:799-804.

BALZARINI MG, GONZALEZ L, TABLADA M, CASANOVES F, DI RIENZO JA & ROBLEDO CW. 2008. Infostat. Manual del Usuario, Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.

BARJA, B.C. & DOS SANTOS AFONSO, M. 1998. An ATR-FTIR Study of Glyphosate and Its Fe(III) Complex in Aqueous Solution. *Environmental Science Technology*, 32: 3331-3335

BISSET, J. & WIDDEN, P. 1972. An automatic multichamber soil-washing apparatus for removing fungal spores from soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 18:1399-1409.

BOLOGNESI C, BONATTI S, DEGAN V, GALLERANI E, PELUSO M & RABÓN M. 1997. Genotoxic activity of glyphosate and technical formulation Roundup. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 1957-62.

M. BÖLTER, M, BLOEM, J, MEINERS, K & MÖLLER R. 2002. Enumeration and biovolume determination of microbial cells - a methodological review and recommendations for applications in ecological research. *Biology and Fertility of Soils*, 36: 249-259.

BOOTH, C. 1977. *Fusarium*. Laboratory guide to the identification of the major species. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey.

BÓRTOLI, PV; VERDENELLI, RA; CONFORTO, C; VARGAS GIL, S & MERILES, JS. 2012. Efectos del herbicida glifosato sobre la estructura y el funcionamiento de comunidades microbianas de dos suelos de plantaciones de olivo. *Ecología Austral,* 22:33-42.

BUÉE, M. REICH, M, MURAT, C, MORIN, E, NILSSON, RH, UROZ, S & MARTIN, F. 2009. *454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. New Phytologist,* 184(2): 449-456.

CASTRO, J.R.; JOAO, V.; PERALBA, MARIA C. R. & AYUB, MARCO A. Z. 2007. Biodegradation of the herbicide glyphosate by filamentous fungi in platform shaker and batch bioreactor. *Journal of Environmental Science and Health*, 42(8): 883–886.

CHEN, Z.; HE, W.; BEER, M.; MEGHARAJ, M. & NAIDU, R. 2009. Speciation of glyphosate, phosphate and aminomethylphosphonic acid in soil extracts by ion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry with an octopole reaction system. *Talanta*, 78: 852-856.

CHIOCCHIO, VM & MATKOVIC, L. 2011. Determination of ergosterol in cellular fungi by HPLC. A modified technique. *The Journal of the Argentine Chemical Society*, 98: 10-15.

DAS, SK & VARMA, A. 2011. A. Role of Enzymes in Maintaining Soil Health. In: Soil Enzymology, *Soil Biology*, 22. Shukla, G. & Varma, A (eds).

DECAËNS, T. 2010. Macroecological patterns in soil communities. *Global Ecology and Biogeography*, *19*(3): 287-302.

DI RIENZO, J.A, CASANOVES F, BALZARINI MG, GONZALEZ L, TABLADA M & ROBLEDO CW. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL http://www.infostat.com.ar

DOMSCH, K.; GAMS, W. & ANDERSON, T. 1980. Compendium of soil fungi. Academic press London. pp. 859

DUKES, S.O. & POWLES, S.B. 2009. Glyphosate-Resistant Crops and Weeds: Now and in the Future. *Agrobiotechnology Forum*, 12(3&4): 346-357.

ELLIS, M. 1976. More dematiaceous Hyphomycetes. CMI, Kew.

FRANZ, J.E. 1985. Discovery, development and chemistry of glyphosate. In: Grossbard, E., Atkinson, D. (Eds.), The Herbicide Glyphosate. Butterworth Publishers, London.

GEORGE, J, PRASAD, S, MAHMOOD, Z, & SHUKLA, Y. 2010. Studies on glyphosate-induced carcinogenicity in mouse skin: A proteomic approach. *Journal of proteomics*, *73*(5): 951-964.

GÓMEZ, E.; FERRERAS, L.; LOVOTTI, L. & FERNÁNDEZ. E. 2009. Impact of glyphosate application on microbial biomass and metabolic activity in a Vertic Argiudol from Argentina. *European Journal Soil Biology*, 45:163-167.

HANEY, RL; SENSEMAN, SA & HONS, FM. 2002. Effect of Roundup Ultra on microbial activity and biomass from selected soils. *Journal of Environmental Quality*, 31:730-735.

HE, X.; HUAI, W.; TIE, C.; LIU, Y. & ZHANG, B. 2000. Breeding of high ergosterol-producing yeast strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25: 39-44.

IDENTIFICACION DEL HERBICIDA GLIFOSATO PROPIEDADES Y TOXICIDAD. Fuente. Documento Plan de Manejo Ambiental Erradicación de Cultivos Ilícitos. 2000

KARLEN, D.L.; MAUSBACH, M.J.; DORAN, J.W.; CLINE, R.G.; HARRIS, R.F. & SCHUMAN, G.E. 1997. Soil quality: a concept, definition and framework for evaluation. *Soil Science Society of America Journal*, 61: 4-10.

Kenkel, NC & Booth, T. 1992. Multivariate analysis in fungal ecology. In: *The fungal community: its organization and role in the ecosystem* (G. Carrol & D. Wicklow Eds): 209-227. M. Dekker Inc. Nueva York.

KONSTANTINIDIS K.T. & TIEDJE M. 2007. Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. *Current Opinion in Microbiology*, 10: 504-509.

KREMER, RJ; MEANS, NE & SUJUNG, K. 2005. Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere microorganisms. *International Journl of Environmental Analytical Chemistry*, 85: 1165-1174.

KRYSKI-LUPICKA, T & SUDOL, T. 2008. Interactions between glyphosate and autochthonous soil fungi surviving in aqueous solution of glyphosate. *Chemosphere*, 71(7): 1386-1391.

KRYSKO-LUPICKA, T; STROF, W; KUBS, K; SKORUPA, M. WIECZOREK, P; LEJCZAK, B & KAFARSKI, P. 1997. The ability of soil borne-fungi to degrade organophosphonate carbon-to-phosphorus bonds. Applied Microbiology Biotechnology. 48(4): 549-552.

LAATIKAINEN, T & HEINONEN-TANSKI, H. 2002. Mycorrhizal growth in pure cultures in the presence of pesticides. *Microbiology Research*, 157(2): 127-137.

LARSEN, T, AXELSEN, J & RAVN, HW. 2004. Simplified and rapid method for extraction of ergosterol from natural samples and detection with quantitative and semi-quantitative methods using thin-layer chromatography. *Journal of chromatography*, 1026(1): 301-304.

LLORENTE-BOUSQUETS, J & OCEGUEDA, S. 2008. Estudio del conocimiento de la biota, en Capital naturalde México. Vol I. Conocimiento actual de la Biodiversidad. Conabio, México: 283-322.

MALTY, J.D.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.D. 2006. Effects of glyphosate on soybean symbiotic microorganisms, in culture media and in greenhouse. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 41: 285-291.

MAÑAS, F., TORRES, M, GONZÁLEZ CID URROZ, B,GARCÍA OVANDO, H, WEYERS ANCHORDOQUI, I,UGNIA VERA, L, LARRIPA HAND, IB & GORLA ABRATE, N. 2006. Evaluation of genotoxicity of the herbicide glyphosate quantitatively measured by the comet assay and micronucleius formation in treated mice. *Theoria*, 15 (2): 53-60, 2006

MBANASO, F.U.; COUPE, S.J.; CHARLESWORTH, S.M. & NNADI, E.O. 2013. Laboratory-based experiments to investigate the impact of glyphosate-containing herbicide on pollution attenuation and biodegradation in a model pervious paving system. *Chemosphere*, 90: 737–746.

MC GONIGLE, T.P.; MILLER, M.H.; EVANS, D.G.; FAIRCHILD, G.S.& SWAN, J.A. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist, 115:495-501.

MERILES, JM; VARGAS GIL, SV; HARO, RJ; MARCH, GJ; & GUZMAN, CA. 2006. Glyphosate and previous crop residue effect on deleterious and beneficial soil-borne fungi from a peanut-corn-soybean rotations. *Journal of Phytopathology*, 154: 1-8.

MILLER, J. D., AND J. C. YOUNG. 1997. The use of ergosterol to measure exposure to fungal propagules in indoor air. *American Industrial Hygiene Association*, 58(1), 39-43.

MUJICA, M., FRACCHIA, S., OCAMPO, J.A. & GODEAS, A. 1999. Influence of the herbicides Chlorsulfuron and Glyphosate on mycorrhizal soybean intercropped with the weeds *Brassica campestris* or *Sorghum halepensis*. *Symbiosis*, 27: 73-81.

NEWELL SY. 1992. Estimating fungal biomass and productivity in decomposing litter. In: The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem (G.C.Carroll and D. T. Wicklow. Eds.), Dekker, New York, 1992, pp. 521-561.

ORGIAZZI A, BIANCIOTTO V, BONFANTE P, DAGHINO S, GHIGNONE S, LAZZARI, A, LUMINI, E, MELLO, A, NAPOLI, C, PEROTTO, S, VIZZINI, A, BAGELLA, S, MURAT, C & GIRLANDA, M. 2013. 454 Pyrosequencing Analysis of Fungal Assemblages from Geographically Distant, Disparate Soils Reveals Spatial Patterning and a Core Mycobiome. *Diversity*, 5: 73-98.

PARKINSON D. 1982a, Filamentous fungi. In: Methods of Soil Analysis, Part 2 (A. L. Page, R. H. Miller and D. R. Keeney, Eds): 945-968 American Society of Agronomy - Soil Science Society of America, Madison

PASANEN, AL, YLI-PIETILA, K, PASANEN, P, KALLIOKOSKI, P & TARHANEN, J. 1999. Ergosterol Content in Various Fungal Species and Biocontaminated Building Materials. *Applied and environmental microbiology*, 65(1):138-142.

PAUL, E.A. 2007. Soil Microbiology, Ecology and Chemistry. 3rd edition. Elsevier Inc.

PEDRAZA, RO, TEIXEIRA, KRS, FERNÁNDEZ SCAVINO, A, GARCÍA DE SALAMONE, IB, BACA, E, AZCÓN, R, BALDANI, VLD, BONILLA, R. 2010. Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos.

PESSAGNO, R.C.; DOS SANTOS AFONSO, M. & TORRES SANCHEZ, R.M. 2005. N-(Phosphonomethyl) Glycine Interactions With Soils. *Journal of Argentina Chemistry Society*, 93(4-6): 97-108.

PETROCINO JF, HIGHLANDER S, LUNA RA, GIBBS RA, VERSALOVIC J. 2009. Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification. *Clinical Chemistry*, 55(5): 856–866.

PHILLIPS J.M. & HAYMAN D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55: 158-60.

Rascován, N, Carbonetto, B, Revale, S. Reinert, M, Alvarez, R, Godeas, AM, Colombo, RP, Aguilar, M, Novas, MV, Zelada, A, Pardo, A, Schrauf, G, Mentaberry, A & Vazquez, MP. 2013. The PAMPA Datasets: A metagenomic survey to describe microbial communities in Argentinean pampean soils. *Microbiome*. doi:10.1186/2049-2618-1-21.

RATCLIFF, A.W.; BUSSE, M.D. & SHESTAK, C.J. 2006. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Applied Soil Ecology*, 34: 114-124.

ROBERTS, T.R. 1998. Metabolic Pathways of Agrochemicals: Part 1. Herbicides and Plant Growth Regulators. The Royal Society of Chemistry.

ROMERO, C.R.; REINOSO, E.H.; KIERNAN, A.M. & CÓRDOBA, S. 2004. Biodegradation of glyphosate by wild yeasts. *Revista Mexicana de Micología*, 19: 45-50.

RUEPPEL, M.L.; BRIGHTWELL, B.B.; SCHAEFER, J.; MARVEL, J.T. 1977. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25: 517–528.

SANOGO, S; YANG, XB & SCHERM, H. 2000. Effects of herbicide on *Fusarium solani* f. sp *glycines* and development of sudden death syndrome in glyphosate-tolerant soybean. *Phytopathology*, 90(1): 57-66.

SCHUETTE, J. 1998. Environmental Fate of Glyphosate. USA: Environmental Monitoring and Pest Management Department of Pesticide Regulation, Sacramento.

SILVANI , V.; FRACCHIA, S.; FERNÁNDEZ, L.; PÉRGOLA, M. & GODEAS, A. 2008. A simple method to obtain endophytic microorganisms from field-collected roots. *Soil Biology and Biochemistry*, 40 (5): 1259–1263.

STAHL, PD, PARKIN, TB & EASH, NS. 1995. Sources of error in direct microscopic methods for estimation of fungal biomass in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(8): 1091-1097.

STAHL, P.D.; PARKIN, T.B. & CHRISTENSEN, M. 1999. Fungal presence in paired cultivated and uncultivated soils in central Iowa, USA. *Biology and Fertility of Soils*, 29: 92–97.

TAMURA K.; PETERSON D.; PETERSON N.; STECHER G.; NEI M. & KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Method. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.

TANNEY, JB & HUTCHISON, LJ. 2010. The effects of glyphosate on the in vitro linear growth of selected microfungi from a boreal forest soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 56: 138-144.

TERNAN, N.G.; MC GRATH, J.W.; MC MULLAN, G. & QUINN, J.P. 1998. Review: Organophosphonates: occurrence, synthesis and biodegradation by microorganisms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 14: 635-647.

TURNER MG, GARDNER, RH & O'NEILL, RV. 2001. Landscape ecology in theory and practice: Pattern and Process. Springer

VON ARX., J. 1981. The genera of fungi sporulating in pure culture. Tercera edición. J. Cramer, Germany.

VORONEY, RP. 2007. The soil habitat. In: Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry. Third edition. Part 1 - Background. Ed. Paul EA, Academic Press. Oxford, UK 25-49

WACHOWSKA, U. 1999. The effect of Roundup on fungi of grasses rhizosphere. *Program of Plant Protection*, 39: 658-661.

WAN, M.T.; RAHE, J.E. & WATTS, R.G. 1998. A new technique for determining the sublethal toxicity of pesticides to the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17: 1421-1428.

WARDLE, D.A. & PARKINSON, D. 1992. The influence of the herbicide glyphosate on interspecific interactions between four soil fungal species. *Mycological Research*, 96(3): 180-186.

WEAVER, M.A.; KRUTZ, L.J.; ZABLOTOWICZ, R.M. & REDDY, K.N. 2007. Effects of glyphosate on soil microbial communities and its mineralization in a Mississipi soil. *Pest Management Science,* 63: 388-393.

WHIPPS, JM & LEWIS, D. 1980. Methodology of a chitin assay. *Transactions of the British mycological Society*, 79: 178–179.

Whittaker RH. 1972. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon*, 21(2/3): 213-251.

ZABALOY, MC; GARLAND, JL & GÓMEZ, MA. 2008. An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2-4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. *Appied. Soil Ecology,* 40:1-12.

ZABALOY, MC; GÓMEZ, E; GARLAND, JL & GÓMEZ, MA. 2012. Assessment of microbial community function and structure in soil microcosms exposed to glyphosate. Applied Soil Ecology 61: 333-339.

Zhao, XR, Lin, Q & Brookes, PC. 2005. Does soil ergosterol concentration provide a reliable estimate of soil fungal biomass? *Soil Biology and Biochemistry*, 37(2): 311-317.

ZINGER L, LEJON DPH, BAPTIST F, BOUASRIA A, AUBERT S, GEREMIA RA & CHOLER P. 2011. Contrasting Diversity Patterns of Crenarchaeal, Bacterial and Fungal Soil Communities in an Alpine Landscape. *Plos One*, 6(5): e19950.

ANEXO

1. MEDIOS DE CULTIVO

- AGAR-AGUA (AA): agar 20 gr; agua destilada para llevar a 1L.

- Fórmula de antibiótico: estreptomicina 0.5 gr + clorhidrato de tetraciclina 0.25gr + agua destilada estéril 100 ml. Se agrega 1 ml de esta solución por cada 100 ml de medio.

- AGAR EXTRACTO DE MALTA (MEA): extracto de malta 20 gr; peptona 2 gr; glucosa 20 gr; agar 15 gr; agua destilada para llevar a 1L.

-SNA: KH_2PO_4 2 gr; KNO3 1 gr; MgSO4 0,5 gr; KCl 0,5 gr; agar 17 gr; H2O destilada para llevar a 1L

2. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN (KIT POWERSOIL™ ISOLATION KIT (MO BIO LABORATORIES INC., CARLSBAD, CA, USA).

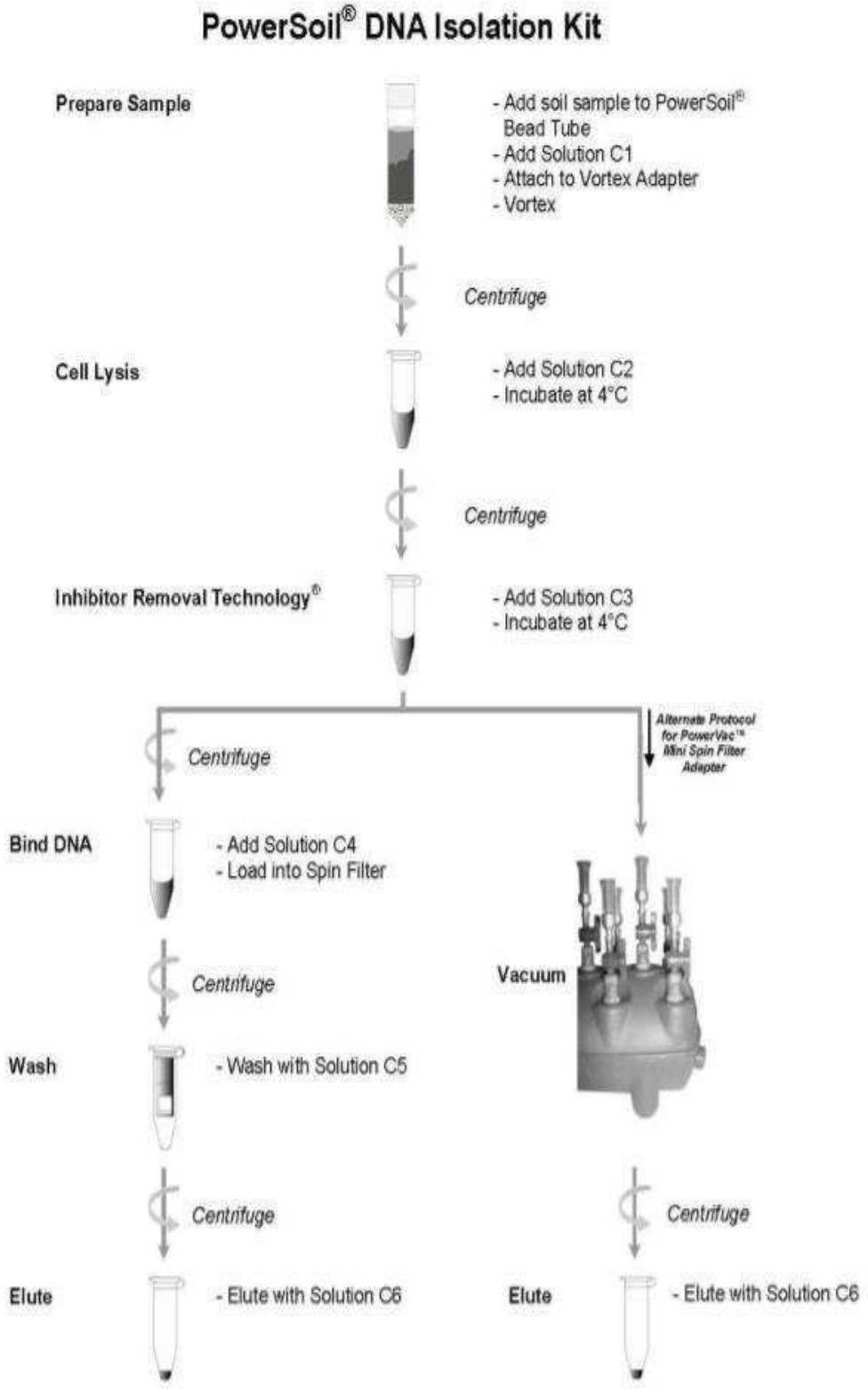


Figura 21. *Protocolo de extracción de ADN.*

3. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1,5%.

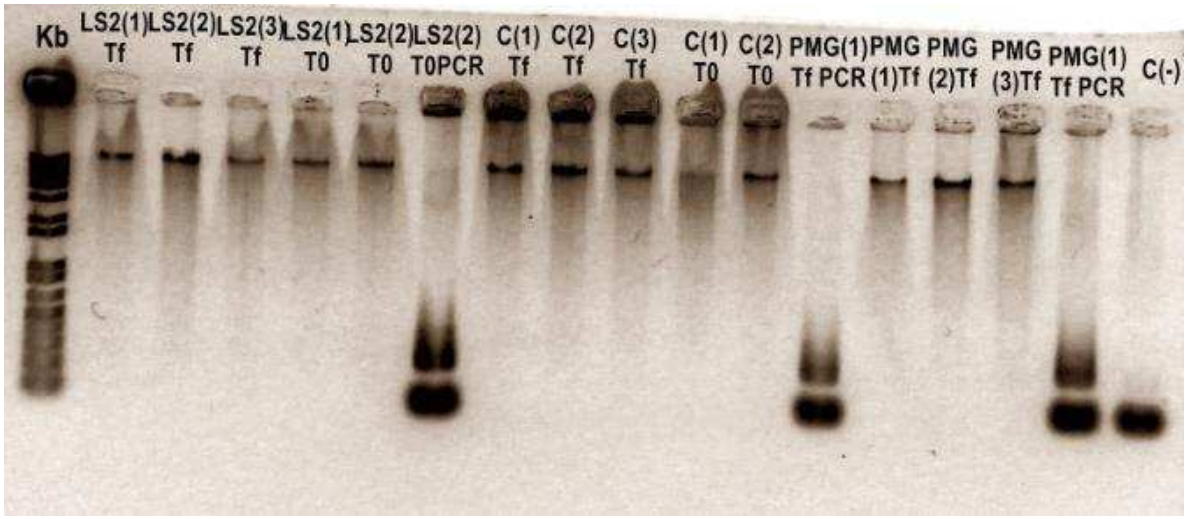


Figura 22. *Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Las bandas de aproximadamente 300 pb, corresponden al ADN genómico extraído a partir de las muestras de suelo y al producto de amplificación de PCR de las muestras LS2(2) y PMG(1). Se utilizó el marcador de PM 1 kb ladder.* Además, en la última calle (C-) corresponde al control negativo confirmándose que los reactivos utilizados durante la amplificación se encontraban en buen estado.

4. CURVA DE CALIBRACIÓN DE CORTICOSTERONA.

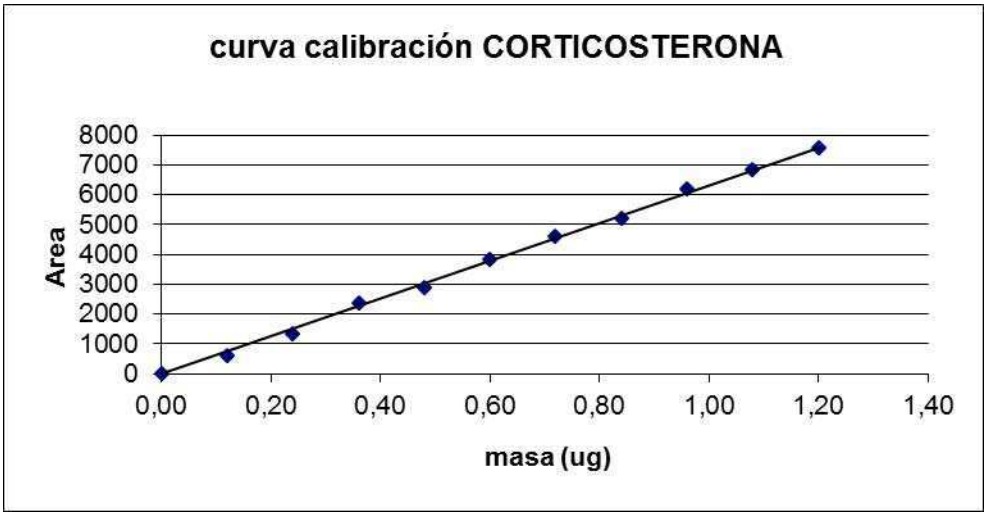


Figura 23. *Curva de calibración de corticosterona (marcador interno de pérdida para la determinación de ergosterol. Ecuación de la curva: v=6318.1x. R^2 = 0.9983.*

5. CURVA DE CALIBRACIÓN GLIFOSATO Y CUANTIFICACIÓN DE GLIFOSATO REMANENTE EN EL SUELO.

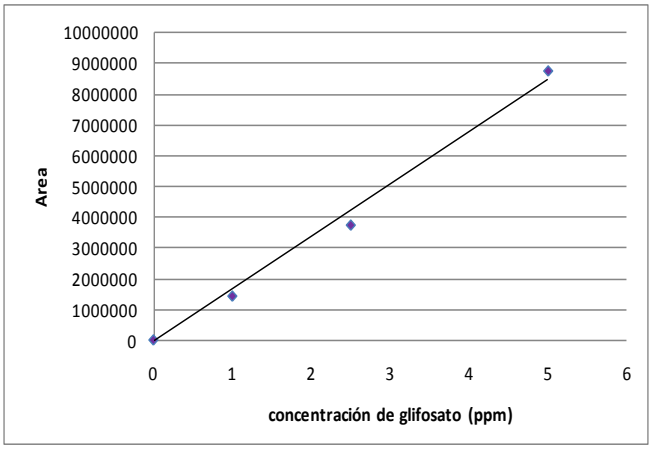


Figura 24. *Curva de calibración del glifosato. Ecuación de la curva y = 2E+06x; R^2 = 0,991.*

muestra	concentración de glifosato (ppm)
LS2 (Tf)	0,0528
PMG(1)(Tf)	1,4706
PMG(2)(Tf)	0,5783
Casco(3)(Tf)	0,0000
Casco(T0)	0,0000
LS2(1)(T0)	0,0000

Tabla 15. *Concentraciones de glifosato (ppm) en suelo.*