



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**IDENTIFICACIÓN DE HONGOS MICORRIZICOS
ARBUSCULARES ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DE
Prosopis laevigata (Humb. & Bonpl. Ex. Willd) Y
Parkinsonia praecox (Ruiz y Pavón), EN ZAPOTITLAN
SALINAS PUEBLA, MEDIANTE HERRAMIENTAS
MOLECULARES**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:
MORENO SANTILLÁN DIANA DANIELA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ELÍAS PIEDRA IBARRA

PROYECTO FINANCIADO POR UNAM DGAPA PAPIIT IN 209307



México

Mayo 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Moreno Santillán Diana Daniela



DEDICATORIA

Después de un arduo camino de 19 años de estudio, quiero dedicar el presente trabajo a mis padres quienes me regalaron el don de la vida; se la dedico a la vida misma que es la razón por la cual estoy en este camino.

Que este estudio sea el primero de muchos que me permitan conocer y admirar todas las maravillas que esta nos proporciona.

*“Los humanos somos parte de la naturaleza, y no estamos más arriba ni apartados de ella”
Proverbio Budista.*



AGRADECIMIENTOS

Comienzo dando gracias a la vida por todos los dones que me ha dado a lo largo de estos 23 años, por permitirme esta oportunidad de conocer una mínima parte de sus maravillas, doy gracias por tener la dicha de vivir.

A mis padres:

Armando Moreno Pineda y Aurora Santillán Gómez quienes con su infinito amor, cariño, apoyo, regaños justificados, y su admirable dedicación hacia mí me dieron todo el impulso necesario para llegar hasta lo que hoy soy.

Gracias por compartir conmigo este logro por el cual he luchado durante 19 años, desde el primer día que me llevaron al Kinder hasta el día de hoy que presento ante ustedes mi TESIS de licenciatura, sin duda alguna este logro es suyo.

Los quiero mucho y gracias por enseñarme a vivir.

A mi hermano:

Armando Alberto Moreno Santillán, muchísimas gracias por todo el cariño que me has dado a lo largo de mis 23 años de vida. Eres mi ejemplo a seguir y te admiro mucho por tu gran dedicación a la vida, por tu nobleza, honestidad y por tantas cosas más. Te quiero mucho amiguito.

A mi chavito:

Allan Santariaga Arce por estar conmigo desde el inicio de esta gran aventura. Muchas gracias porque siempre has creído en mí y en mis sueños, gracias por estar ahí siempre, en mis clases, prácticas, tareas, desvelos y gracias por tu apoyo y amor incondicional.

Aloha wau ia oi nui loa

A mi tutor de Tesis:

Dr. Elías Piedra Ibarra, por todo el conocimiento que me proporcionó tanto en las aulas como en el trabajo. Muchas gracias por todo el apoyo y confianza que me dio como profesor, como tutor y como amigo, así como por todas las enseñanzas y no sólo académicas, si no de vida que me ha dado. Profe muchas gracias por haberme hecho ver la biología de diferente manera por ahí se dice que la vida no se ve si no es a través del prisma de la evolución, pues yo digo que mi vida profesional no se ve si no es a través de usted. Gracias por compartir este logro conmigo.



A mis sinodales:

M. en C. Josefina Vázquez Medrano, Dr. César Mateo Flores Ortiz, M. en C. Rafael Quintanar Zúñiga, Dr. Alejandro Cruz Monsalvo Reyes; por haberme proporcionado sus conocimientos y apoyos durante todo el proceso, así como haberme brindado su amistad dentro y fuera del laboratorio.

Al laboratorio de Fisiología Vegetal:

Quiero agradecer también a todas las personas que laboran en el laboratorio de fisiología vegetal, en especial al biólogo Gerardo quien fue el primero en enseñarme a hacer un gel de electroforesis y a hacer un PCR.

A mis profesores durante la carrera:

Por todos aquellos momentos en las aulas, por sus conocimientos, paciencia, dedicación y por contagiarme de esa pasión por la vida. Espero no defraudarlos y poner muy en alto sus nombres y enseñanzas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México:

Ni la vida misma me alcanzaría para agradecer y demostrar cuán agradecida y orgullosa estoy por ser egresada de esta institución, el paso por sus aulas me ha formado como bióloga y ahora me tocará retribuirle a mi Universidad y a mi país lo que han dado por mí. Porque siempre seré de sangre azul y piel dorada toda la vida portaré con orgullo el escudo de la Universidad.
Por mi raza hablará el Espíritu.

A personitas especiales:

A mi profesor de biología en la preparatoria, el Biólogo Luis Antonio Martínez Franco, quien es en cierta forma el responsable de mi pasión por la biología. Le quiero dar las gracias por haberme brindado tanto conocimiento y por haberme enseñado lo maravilloso de la biología.

A quienes compartieron conmigo tantos momentos en aulas, pastitos y por supuesto en el campo...

A mi compadre porque desde el primer día de clases hasta el día de hoy estuvimos juntas hasta evolucionar y formar una simbiosis difícil de romper, compadre si me



pongo a agradecerle a usted por tantos momentos que vivimos juntas tendría que mandar a hacer dos tomos de esta tesis. Se le quiere a lo macho.

Anita, Marianita, Bre, Beca y Chayito chavitas muchísimas gracias por demostrarme lo que son las amigas, gracias por esas noches piratas, por esos chismes masivos y por tanto apoyo y cariño que me dieron. Anita una mención honorífica a ti, muchas gracias por haberme ayudado con mis plantitas y por todo tu apoyo en la parte experimental de esta tesis. Gracias a todas por absolutamente todo!.

Gracias a toda la bandita del 2 por haber hecho las prácticas y el paso por las aulas tan ameno, creo yo que no pudo haber existido mejor grupo que el 2, así como agradezco a todos los amigos bioloquitos que he ido adquiriendo durante estos 4 años, por cada una de las cosas maravillosas que han aportado a mi vida.

Gracias a mis amigas de danza (Karla, Diana y Ale) quienes hicieron más ameno el paso por la carrera, por compartir conmigo la pasión por la danza y hacerla aún más importante para mí.

Agradezco a mi abuelito Gabriel Moreno Rodríguez que aunque ya no está aquí, ha estado conmigo toda la carrera y todo lo que he hecho lo hago pensando en él, así como a mi amigo Arturo Sandoval Sotelo quien estuvo conmigo al principio de esta aventura y hoy quiero dedicarle este trabajo.



ÍNDICE

1. RESUMEN.....	12
2. INTRODUCCIÓN.....	13
2.1 Zonas áridas.....	13
2.2 Características generales del mezquite y palo verde.....	15
2.3 Adaptaciones vegetales para enfrentar deficiencia de agua.....	18
2.4 Micorrizas.....	19
2.5 Clasificación de los hongos micorrízicos.....	20
2.6 Características de los hongos micorrízicos arbusculares.....	21
2.7 Proceso de la colonización.....	23
2.8 Identificación de hongos micorrízicos arbusculares.....	24
2.9 Región SSU-RNA.....	25
3. ANTECEDENTES.....	27
4. OBJETIVO GENERAL.....	29
5. OBJETIVOS PARTICULARES.....	29
6. HIPÓTESIS.....	29
7. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	30
7.1 Área de estudio.....	30
7.2 Fase de campo.....	32
7.3 Fase de laboratorio.....	34
7.3.1 Incremento del consorcio de HMA.....	34
7.3.2 Extracción y cuantificación de esporas de HMA.....	36
7.3.3 Cuantificación de fosfato libre en suelo.....	36
7.3.4 Extracción y amplificación de DNA.....	36
8. RESULTADOS.....	38
8.1 Porcentaje de micorrización.....	38
8.2 Densidad y viabilidad de esporas.....	42
8.3 Fosfato libre en suelo.....	47
8.4 Extracción y amplificación del DNA de HMA.....	48



9. DISCUSIÓN.....	57
9.1 Porcentaje de micorrización.....	57
9.2 Densidad de esporas.....	58
9.3 Extracción y amplificación de DNA de HMA.....	60
10. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	63
11. REFERENCIAS.....	65
12. ANEXOS.....	70
13. APÉNDICES.....	82



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de tipos de vegetación en la República Mexicana.....	13
Figura 2. Ejemplar de <i>Prosopis laevigata</i> en el Valle de Zapotitlán Salinas Puebla.....	15
Figura 3. Ejemplar de <i>Parkinsonia praecox</i> en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla.....	17
Figura 4. Arbúsculo de Hongo Micorrízico Arbuscular.....	22
Figura 5. Vesícula de Hongo Micorrízico Arbuscular.....	22
Figura 6. Representación esquemática de la Colonización de HMA.....	23
Figura 7. Estructura general de los ribosomas en eucariontes.....	25
Figura 8. Diagrama de la locación relativa de los primers del gen SSU.....	25
Figura 9. Regiones florísticas de México, modificado de Rzedowski 2006.....	30
Figura 10. Mapa del área de estudio.....	31
Figura 11. Zona de muestreo con menor grado de perturbación (Zona A).....	32
Figura 12. Zona de muestreo con mayor grado de perturbación (Zona B).....	32
Figura 13. Composición del sustrato para la colonización de plantas trampa.....	34
Figura 14. Estructuras de la micorriza con la técnica de azul tripano.....	39
Figura 15. Porcentaje de micorización promedio en las plantas trampa.....	41
Figura 16. Espora viable y no viable.....	42
Figura 17. Esporas totales y viables en 100gr de suelo de la rizósfera de <i>P. laevigata</i> y <i>P. praecox</i>	43
Figura 18. Esporas viables en la rizósfera de <i>P. laevigata</i> en ambas zonas de estudio.....	43
Figura 19. Esporas viables en la rizósfera de <i>P. praecox</i> en ambas zonas de estudio.....	43
Figura 20. Promedio de esporas viables presentes en 100gr de suelo, en la zona A y B...	44
Figura 21. Número promedio de esporas viables en 100gr de suelo, en la zona A B, para <i>P. laevigata</i> y <i>P. praecox</i>	45
Figura 22. Número promedio de esporas viables obtenidas en las plantas trampa.....	45
Figura 23. Número de esporas viables en campo y en plantas trampa.....	46
Figura 24. Productos de PCR con oligonucleótidos VANS1-NS21 y DNA de raíces de plantas trampa.....	51



Figura 25. Producto de 550pb purificado de algunas de las plantas trampa.....	52
Figura 26. Árbol filogenético sin raíz obtenido con el modelo de máxima parsimonia...	54
Figura 27. Árbol filogenético sin raíz obtenido con modelo de distancia genética de Jukes-Cantor.....	55



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Prosopis laevigata</i>	15
Cuadro 2. Clasificación taxonómica de <i>Parkinsonia praecox</i>	17
Cuadro 3. Clasificación de Hongos micorrízicos.....	20
Cuadro 4. Clasificación de los Hongos Micorrícicos Arbusculares.....	21
Cuadro 5. Especificidad de VANS1 versus primers universales para la amplificación de una porción del gen SSU de eucariontes.....	26
Cuadro 6. Algunas características de los sitios donde se tomaron las muestras.....	33
Cuadro 7. Relación de plantas trampa utilizadas para incrementar consorcio micorrízico.....	35
Cuadro 8. Porcentaje de micorrización en plantas trampa.....	40
Cuadro 9. Porcentaje de micorrización promedio de micorrización en las plantas trampa.....	40
Cuadro 10. Fosfatos libres en 100gr de suelo, representados en ppm.....	47
Cuadro 11. Relación entre la colonización de la raíz en plantas trampa y presencia del amplicon esperado (550pb).....	49
Cuadro 12. Secuencias depositadas en el Genbank con identidad significativa con las secuencias de HMA obtenidas en este trabajo.....	52
Cuadro 13. Distancia entre géneros por el modelo de Jukes-Cantor.....	56



IDENTIFICACIÓN DE HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DE *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. Ex. Willd) Y *Parkinsonia praecox* (Ruiz y Pavón), EN ZAPOTITLAN SALINAS PUEBLA, MEDIANTE HERRAMIENTAS MOLECULARES

Moreno Santillán Diana Daniela.

Tutor: Dr. Elías Piedra Ibarra

RESUMEN

El 49.2% del territorio Mexicano está formado por zonas áridas, como Zapotitlán Salinas ubicado en la reserva de la biósfera del Valle de Tehuacán-Cuicatlán en Puebla y Oaxaca que alberga entre el 10 y 11.4% de la flora mexicana de la cual 815 especies vegetales son utilizadas por los pobladores. Entre ellas *Prosopis laevigata* conocido como mezquite y *Parkinsonia praecox* o palo verde, son apreciadas como material para construcción, combustible y como plantas medicinales.

El Mezquite y el Palo verde presentan adaptaciones que les han permitido sobrevivir y reproducirse en ambientes desfavorables o extremos, como la capacidad de asociarse con hongos micorrízicos arbusculares (HMA), los cuales incrementan, la captación de agua disponible y la captación de nutrientes minerales. El objetivo de este trabajo es determinar los HMA asociados con la rizósfera de *Prosopis laevigata* y *Parkinsonia praecox* que establecen la relación simbiótica con dichas plantas, mediante la amplificación por PCR, y posterior secuenciación, de un fragmento del genoma de los HMA que codifica la subunidad pequeña del RNAr utilizando los oligonucleótidos específicos (VANS1-NS21). Se obtuvo la densidad de esporas por medio del método de gradiente de sacarosa, obteniendo una densidad promedio de 213 esporas viables por 100 gramos de suelo. Se inocularon plantas trampa en el laboratorio (*Prosopis laevigata*, *Parkinsonia praecox*, *Sorghum bicolor* y *Lactuca sativa*) para inducir la simbiosis y extraer el DNA de la raíz para conocer que hongos se encontraban micorrizando las raíces. Al paso de 90 días se obtuvo un porcentaje de micorrización promedio del 70%. Una vez establecida la simbiosis, se extrajo el DNA de las raíces de las plantas, para realizar la amplificación utilizando los oligonucleótidos específicos. Los productos de la amplificación se separaron por electroforesis en un gel de Agarosa-TBE al 1%, se obtuvieron bandas de 550pb para las 4 plantas, adicionalmente se obtuvo otra banda de entre 650 a 1000pb. Se realizó la purificación del producto de PCR directamente del gel de agarosa para su posterior secuenciación y comparación con las bases de datos. Los resultados indican que el producto de 550pb corresponde a HMA, de manera particular al género *Glomus*.



INTRODUCCIÓN

ZONAS ÁRIDAS:

Las zonas áridas cubren el 54.3% de la superficie terrestre, en ellas, la evaporación potencial es mayor que las precipitaciones anuales (inferiores a 250mm; entre 250 y 450mm en las zonas semiáridas) provocando un alto grado de sequedad, por lo que las especies vegetales que las habitan poseen adaptaciones fisiológicas y morfológicas que les permiten crecer en condiciones poco favorables (Cervantes, 2002; Monroy *et al.*, 2007; Walter, 1977).

En la República Mexicana, 25 estados están conformados por zonas áridas. Los estados con mayor proporción de zonas áridas en su superficie territorial son Aguascalientes, Baja California, Baja California Sur, Coahuila, y Sonora; seguidos de Colima, Chihuahua, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Tamaulipas, Tlaxcala, Yucatán y Zacatecas (Cervantes, 2002). Las zonas áridas en el territorio Mexicano se dividen según su grado de sequía: 0.2% corresponde a zonas híper áridas, 17.6% a zonas subhúmedas secas, 23.7% a zonas semiáridas y 28.3% a zonas áridas. Los ecosistemas áridos y semiáridos en México poseen una elevada diversidad, de alrededor de 6,000 especies, de las cuales 60% son endémicas; la vegetación característica está constituida por matorrales xerófilos, pastizales y bosques espinosos (Figura 1) (Monroy *et al.*, 2007; Rzedowski, 2006).

El matorral xerófilo es abundante en la península de Baja California, se encuentra desde Chihuahua hasta Jalisco, Guanajuato, Hidalgo y el Estado de México, prolongándose hacia el sur a través de Puebla y Oaxaca (Cervantes, 2002).



Figura 1. Tipos de vegetación en la República Mexicana (Rzedowski, 2006).



La vegetación en las zonas áridas protege al terreno de la erosión, favorece la infiltración del agua en el suelo, protege las cuencas hidrológicas y contribuye a regular y modificar los microclimas. Predominan las formas de vida arbustiva, con plantas bajas, leñosas y muy ramificadas desde la base. Dentro de las familias predominantes se encuentran las leguminosas, que además de proporcionar sombra y protección a otras plantas, como en el caso de *Neobuxbaumia tetetzo*, forman islas de fertilidad debido a su capacidad de asociarse con microorganismos del suelo, ya que crean las condiciones propicias para el establecimiento y la actividad de estos microorganismos (Reyes *et al.*, 2000).

Las zonas áridas y semiáridas de nuestro país han presentado señales de perturbación relacionadas con actividades humanas como la ganadería, agricultura, extracción de leña, incendios, sobreexplotación de algunas especies y el sobrepastoreo (Monroy, 2007; CONABIO, 2008).



CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL MEZQUITE (*Prosopis laevigata*) Y PALO VERDE (*Parkinsonia praecox*).

Prosopis laevigata (Figura 2), es un arbusto espinoso perteneciente a la familia Mimosaceae (Cuadro 1). Su raíz principal llega a medir hasta 50m de profundidad y sus raíces laterales se extienden hasta los 15 m de radio. El tronco es leñoso, sus ramas tiernas son espinosas y con frecuencia carecen de hojas. Las hojas son compuestas, bipinadas de 12 a 15 pares de folíolos oblongos o lineares. Pierde las hojas en invierno y nacen nuevas hojas desde marzo hasta mayo que permanecen hasta diciembre. Sus flores son pequeñas de color amarillo, hermafroditas, con 5 sépalos, 5 pétalos y 10 estambres. Florece desde febrero-marzo hasta abril-mayo. La fructificación se extiende de mayo a agosto y se cosecha entre agosto y octubre, los frutos son vainas que contienen de 12 a 20 semillas cuya diseminación es zoófila y endozoica, es decir se dispersan por medio del tracto digestivo de los animales (Cervantes, 2002).



Figura 2. Ejemplar de *Prosopis laevigata* en el Valle de Zapotitlán Salinas Puebla.

Reino	<i>Plantae</i>
Phyllum	<i>Spermatophyta</i>
Clase	<i>Dicotiledoneae</i>
Superfamilia	<i>Leguminosae</i>
Familia	<i>Mimosaceae</i>
Género	<i>Prosopis</i>
Especie	<i>Prosopis laevigata</i>

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Prosopis laevigata*.

P. laevigata es abundante en el valle de Tehuacán-Cuicatlán Puebla pero también se localiza en el centro y sur de México, en los estados de Guerrero, Querétaro, Estado de México, Michoacán, Morelos, San Luis Potosí, Veracruz, Nuevo León, Aguascalientes, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Coahuila, Chiapas, Tamaulipas, Zacatecas y Oaxaca (Arias *et al.*, 2000).

Desde las épocas prehispánicas, el mezquite ha sido utilizado como un recurso natural por los habitantes de las zonas áridas; para los Chichimecas el mezquite era una planta básica para su alimentación, mientras que en la sierra de El Pinacate se han



encontrado metates que datan del año 1200 a. de C. utilizados para hacer harina de mezquite. En la actualidad, al ser el único representante arborescente en zonas de clima seco, es apreciado como material para obtener leña, carbón, goma, materiales para construcción, juguetes etc. lo que ha favorecido su desaparición en amplias extensiones (Cervantes, 2002; Rzedowski, 2006). Por otro lado, las hojas y frutos del Mezquite son utilizados para la alimentación del ganado caprino o para animales domésticos para lo que incluso se colectan y se almacenan para usarse en épocas de sequía. Como se mencionó, ésta planta se usa como combustible debido a la duración de la leña y a la cantidad de calor que producen.

En el valle de Tehuacán-Cuicatlán, la leña representa una fuente importante de energía doméstica, ya que 36% de la población la utiliza como único combustible, 44% utiliza leña y gas y sólo 20% utiliza gas únicamente. En el mezquite crece el cocopache, un insecto de importancia gastronómica para los habitantes del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Arias *et al.*, 2000; García & Tapia, 2007). Debido a lo anterior, esta especie tiene importancia económica, por lo que los pobladores la venden o intercambian en los mercados regionales (Paredes *et al.*, 2007).

La importancia ecológica del mezquite se debe, entre otras cosas, a que controla la erosión del suelo, proporciona alimento y refugio a la fauna silvestre, forma islas de recursos y actúa como indicador de profundidad del manto freático (Cervantes, 2002)

Parkinsonia praecox (Figura 3), también conocido como "Palo verde" o "Manteco", es un arbusto perteneciente a la familia Caesalpinaceae (Cuadro 2) que llega a medir hasta 6 metros de alto, posee un tallo de color verdoso. Sus hojas son bipinadas y las pierde durante el invierno, cada pinna llega a medir de 3-6mm de largo. La floración ocurre durante los meses de marzo y septiembre, aunque en la región de Zapotitán se ha reportado una sincronía en la floración durante los meses de febrero y marzo. Las flores se encuentran dispuestas en racimos por nudo, tienen pétalos pálidos o amarillos. Las semillas son oblongas y comprimidas, de color pardo. Las plántulas de *Parkinsonia praecox*, tienen poca necesidad de agua y soportan temperaturas de hasta -5°C.

Se distribuye desde México hasta el sur de Perú y Ecuador (Rogers, 1983 citado en: Rosas, 2006; García & Tapia, 2007).



Figura 3. Ejemplar de *Parkinsonia praecox* en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla.

Reino	<i>Plantae</i>
Phyllum	<i>Spermatophyta</i>
Clase	<i>Dicotiledoneae</i>
Superfamilia	<i>Leguminosae</i>
Familia	<i>Caesalpinaceae</i>
Género	<i>Parkinsonia</i>
Especie	<i>Parkinsonia praecox</i>

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Parkinsonia praecox*.

Al igual que el mezquite, esta especie está ampliamente distribuida en las regiones áridas y semiáridas de nuestro país. En el Valle de Tehuacán-Cuicatlán esta especie tiene importancia ecológica y económica, entre éstos sobresale el uso de troncos y ramas como leña principalmente en hornos de pan, ya que su combustión produce un olor dulce; las hojas, flores y frutos se utilizan como forraje; los exudados, como su "goma", se usan como pegamento y algunos remedios medicinales, sin embargo el uso más importante del manteco consiste en que es cultivado por los habitantes de la región debido a que durante los meses de junio y agosto crece en su tallo una larva de mariposa llamada "cuchamá", la cual es un platillo muy apreciado en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Su importancia ecológica es elevada, ya que desempeña una función en la modificación de ambientes extremos, formando islas de fertilidad, creando condiciones adecuadas para otros componentes del ecosistema, finalmente esta especie es clave para la reforestación y rehabilitación de suelos degradados. (Dávila *et al.*, 1993 citado en: Labrada, 2005; Arias, 2000; Rosas 2006).



ADAPTACIONES VEGETALES PARA ENFRENTAR DEFICIENCIA DE AGUA

En los ecosistemas semiáridos, las comunidades vegetales se ven sometidas a situaciones de elevado estrés hídrico, por lo que las especies vegetales que habitan en estos ecosistemas han desarrollado estrategias para sobrevivir a estas condiciones adversas. Este es el caso de el mezquite y el palo verde quienes han desarrollado características adaptativas para sobrevivir y reproducirse en ambientes con poca agua y baja fertilidad del suelo: parénquima o tejido que les permiten captar y usar el agua disponible en épocas de sequía, capacidad para establecer micorrizas y asociaciones con otros microorganismos formando islas de fertilidad o islas de recursos, etc. (Allen, 2007; Perroni, 2007).



MICORRIZAS:

Una micorriza (*mycos*=hongo, *rhiza*=raíz) es la relación simbiótica mutualista entre un hongo y las raíces de una planta. Esta asociación se ha observado en el 90% de las plantas superiores y sólo algunas familias son las excepciones como las Crucíferas, Ciperáceas y Quenopodiáceas (Guzmán & Farías, 2005; Honrubia, 2009; Martínez & Pugnaire, 2009). Debido a que los hongos micorrízicos son heterótrofos, obtienen sus nutrientes (carbono y azúcares simples) del hospedero, así la planta suministra entre el 4 y 20% del carbono procedente de la fotosíntesis. Por su parte la planta también obtiene beneficios del hongo, por ejemplo, incrementa su capacidad para captar el fósforo del suelo; experimentalmente se ha probado que la concentración de P en los micelios, es aproximadamente 1,000 veces la encontrada en la rizósfera, de esta manera, se ha estimado que las hifas externas proporcionan 80% del fósforo y 25% del nitrógeno requerido por la planta. Adicionalmente, se ha mostrado que la interacción entre el hongo y la planta facilita a la raíz la absorción de agua y actúa como control biológico contra agentes patógenos al competir por las raíces del huésped (Ázcon, 2000; De la Rosa & Monroy, 2006; Hernández, 2003; Honrubia, 2009).

La aparición de las micorizas (*Glomeromycota*) se remonta al Paleozoico junto con las primeras plantas terrestres, sugiriendo que la disponibilidad de nutrientes, agua, minerales y materia orgánica era inferior a la actual, por lo que la capacidad de las plantas primitivas para establecer asociaciones micorrízicas fue esencial para la colonización de aquellos paleoambientes. Los primeros registros fósiles de *Glomales*, datan del Ordovícico (hace alrededor 500 millones de años), sin embargo las primeras evidencias de simbiosis provienen del Devónico temprano ya que se encontraron arbuscúlos con su tronco basal y ramificaciones bien conservadas en el interior de células parenquimáticas de rizomas de *Aglaeophyton major* (Reyes, 2002; Honrubia, 2009).



CLASIFICACION DE LOS HONGOS MICORRÍZICOS:

La clasificación de los hongos micorrízicos fue realizada por primera vez por el botánico alemán Frank B. en 1887 quién los dividió en dos grandes grupos: ectotróficos y endotróficos. Sin embargo Harley y Smith propusieron una nueva clasificación (Cuadro 3) basada en las características morfológicas de la infección y en los taxones de los simbiontes (Chung, 2005; Smith & Read 2008). Otros autores clasifican las micorrizas dependiendo de las condiciones climáticas y edáficas, por ejemplo los hongos micorrízicos ericoides predominan en suelos húmicos de altas latitudes y altitudes, mientras que en el bosque de latitud media con acumulación de hojarasca predominan las ectomicorrizas y en suelos de bajas latitudes con altas tasas de mineralización, presencia de herbáceas y plantas leñosas predominan los hongos micorrízicos arbusculares (Martínez & Pugnaire, 2009).

Denominación clásica	Denominación actual	Características
Ectotróficas	Ectomicorrizas	<ul style="list-style-type: none"> • Asociación del 3 al 5% de las plantas. • Producen cuerpos fructíferos. • Basidiomycetes, Ascomycetes y algunos Zygomycetes. • Forman un verdadero manto de hifas que recubre las raíces • El manto penetra en los espacios entre las células corticales y desarrolla red de Hartig
Endotróficas	Vesículo-Arbusculares	<ul style="list-style-type: none"> • Desarrollo mayoritario del hongo dentro de la raíz. • Hifas externas no formadoras de manto. • Micelio no septado, salvo en hifas viejas. • Hifas inter e intracelulares. Las intercelulares no forman red de Hartig, las intracelulares forman arbusculos y vesículas.
	Ericoides	<ul style="list-style-type: none"> • Rudimiento de manto. • Hifas inter e intracelulares. • No se forman vesículas ni arbusculos.
	Arbutoides	<ul style="list-style-type: none"> • Forman manto. • Hifas intra e intercelulares, no forman red de Hartig.
Ectendotróficas	Monotropoides	<ul style="list-style-type: none"> • Forman manto y red de Hartig. • Haustorios intracelulares no ramificados. • Los micelios de los hongos pueden formar ectomicorrizas con plantas cercanas.
	Orquideoides	<ul style="list-style-type: none"> • La planta huésped tiene un periodo de su ciclo de vida heterótrofo durante el cual necesita ser infectada por un hongo micorrízico para sobrevivir. • No forman manto ni red de Hartig. • Sólo se presenta en la familia Orquidáceas.

Cuadro 3. Clasificación de Hongos Micorrízicos (Chung P., 2005)



CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (HMA):

La micorriza arbuscular es la más abundante, se asocia con la mayoría de las plantas terrestres especialmente con las que crecen en suelos áridos y semiáridos, así como en suelos pobres en fósforo (Guzmán & Farías, 2005).

Esta asociación se ha reportado en más de 200 familias de Briofitas, Pteridofitas, Angiospermas y Gimnospermas; dentro de las cuales destacan las gramíneas y las leguminosas (Guzmán & Farías, 2005), incluso se ha considerado que los HMA podrían representar el segundo componente más grande en biomasa en muchos ecosistemas terrestres. Como ya se mencionó, los HMA al ser heterótrofos son simbiontes obligados de las plantas y reciben entre 60 y 90% del carbono, pudiendo ser un suministro importante del carbono de la comunidad (Azcón, 2000; Montañó *et al.*, 2008).

Los HMA del orden Glomales (150 especies), pertenecen a la Clase Zygomycota, que comprende 3 familias y seis géneros de acuerdo con la clasificación hecha en 1990 por Morton y Benny (Cuadro 4) (Guzmán & Farías, 2005; Reyes, 2002)

División: Eumycota
Clase: Zygomycetes
Orden: Glomales (Morton y Benny)
Suborden: Glomineae (Morton y Benny)
Familia: Glomaceae (Pirozynski y Dalpe)
Género: <i>Glomus</i> (Tulasne y Tulasne)
Género: <i>Sclerocystis</i> (Berkely y Broome)
Familia: Acaulosporaceae (Morton y Benny)
Género: <i>Acaulospora</i> (Gerdemann y Trappe)
Género: <i>Entrophosphora</i> (Ames y Scheider)
Suborden: Gigasporineae (Morton y Benny)
Familia: Gigasporaceae (Morton y Benny)
Género: <i>Gigaspora</i> (Gerdemann y Trappe)
Género: <i>Scutellospora</i> (Walker y Sanders)

Cuadro 4. Clasificación de los Hongos Micorrízicos Arbusculares (Guzmán & Farías, 2005).



Los HMA llevan ese nombre ya que colonizan intracelularmente la corteza de la raíz por medio de estructuras llamadas arbusculos (Figura 4), los cuales se encargan del intercambio de nutrientes entre la célula vegetal y el hongo. Algunos géneros de micorriza arbuscular también forman dentro de las células de la raíz estructuras llamadas vesículas (Figura 5) compuestas principalmente por lípidos, estas son consideradas reservorios de nutrimentos para el hongo (Azcón, 2000; Aguilera *et al.*, 2008). El sistema micorrízico está formado por un conjunto de hifas que se ramifican dentro y fuera de la raíz. El micelio o hifas en el suelo forman una red que se interconecta a las raíces de otras plantas y permiten mayor flujo de agua y nutrimentos entre las raíces de estas. Así, los beneficios de los HMA no se restringen a incrementar el tamaño y producción de semillas a través de la incorporación de P, sino que contribuyen a dar estructura y estabilidad al suelo, reduciendo la erosión y mejorando la capacidad de retención del agua por el suelo (Montaño *et al.*, 2008).

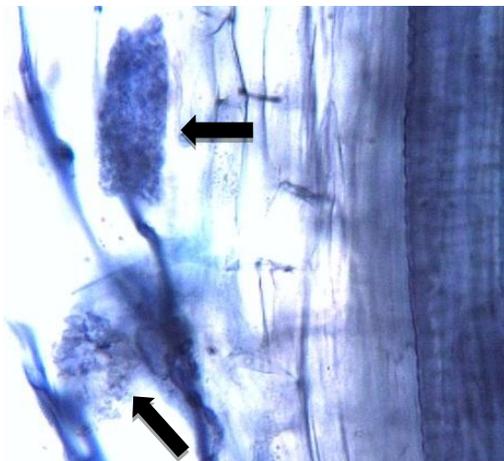


Figura 4. Arbúsculo de HMA, tinción por azul tripano, 1000X



Figura 5. Vesícula de HMA, tinción por azul tripano, 1000X



PROCESO DE LA COLONIZACIÓN:

Como ya se mencionó, los HMA son endomicorrizas que colonizan intracelularmente a las células corticales y epidérmicas de la raíz, sin llegar al sistema vascular ni a los meristemos (Bago *et al.*, 2000; Guzmán & Farías, 2005). Se propagan a través de estructuras de resistencia o esporas, las cuales en condiciones desfavorables entran en estado de latencia indefinido, si se presentan las condiciones adecuadas, germinan y la hifa emergente se dirige por atracción química a la superficie de la raíz más próxima y la penetra. La colonización también puede darse por trozos de micelio activo que se ramifica para desarrollar la infección (Aguilera *et al.*, 2008; Bago *et al.*, 2000; Sánchez *et al.*, 2000).

La hifa se diferencia formando el apresorio a partir del cual se desarrollan ramificaciones infectivas cortas, que penetran la raíz. Así el hongo se introduce forzando el camino entre las células epidérmicas. En el interior de la raíz las ramificaciones infectivas se diferencian formando los arbuscúlos y vesículas. Los arbuscúlos no atraviesan las membranas celulares de la planta, sino que la invaginan formando una interface donde se da el intercambio entre el hongo y la planta.

En algunos géneros de HMA, las hifas intraradicales forman vesículas intercelulares (Figura 6) (Aguilera *et al.*, 2008; Hernández, 2003).

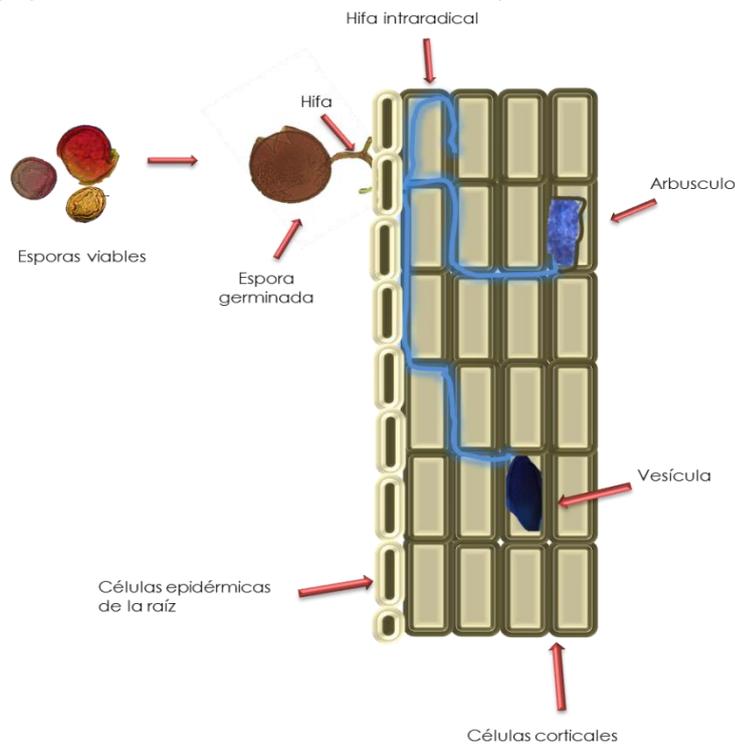


Figura 6. Representación esquemática de la Colonización de HMA



IDENTIFICACIÓN DE HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES:

La identificación de HMA se realiza mediante la caracterización morfológica de las esporas y el uso de claves taxonómicas. Sin embargo, por estos medios solo se puede conocer la diversidad en el suelo, más no las especies que están llevando a cabo la simbiosis, ya que la colonización no está necesariamente relacionada con la esporulación sino que depende de la especie del hongo, de la planta y de las condiciones ambientales (Clapp *et al.*, 1995; Katsuharu *et al.*, 2000; Martínez & Pugnaire, 2009; Redecker, 2000). Por ejemplo, Merryweather & Fitter en 1998 reportaron que a pesar de la ausencia de esporas de *Glomus* en suelo, amplificaron secuencias del DNA a partir de raíces de *Hyacinthoides non-scripta* pertenecientes a *Glomus*.

Al no haber esporas, la única forma de identificar los HMA es por medio de las estructuras intraradicales. Mediante estos medios la identificación puede llegar a nivel de familia por lo que actualmente se ha recurrido a técnicas moleculares para complementar los estudios de taxonomía tradicional, ya que las técnicas moleculares pueden revelar el taxa de los hongos que colonizan la raíz, usando oligonucleótidos o cebadores específicos en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Gracias a esta técnica se pueden obtener miles de millones de copias de un fragmento del genoma de HMA incluso partiendo de una espora, raíz colonizada o bien de una muestra de suelo (Clapp *et al.*, 1995; Merryweather & Fitter, 1998; Katsuharu *et al.*, 2000; Martínez & Pugnaire, 2009; Redecker, 2000).

En estudios con el genoma de HMA se han utilizado genes ribosomales y oligonucleótidos específicos para secuencias nucleares de SSU rDNA, aprovechando que evolucionan lentamente y son de utilidad para estudios filogenéticos (Reddy *et al.*, 2005)



REGIÓN SSU-rRNA:

Los ribosomas en eucariontes se componen de cuatro moléculas de rRNA organizadas en una subunidad mayor (Large Subunit rRNA LSU) y una subunidad menor (Small Subunit rRNA SSU-Rna). Contienen dos moléculas principales de rRNA: 28S ubicada en la subunidad mayor y 18S en la subunidad menor (Figura 7) (Lodish *et al.*, 2005).

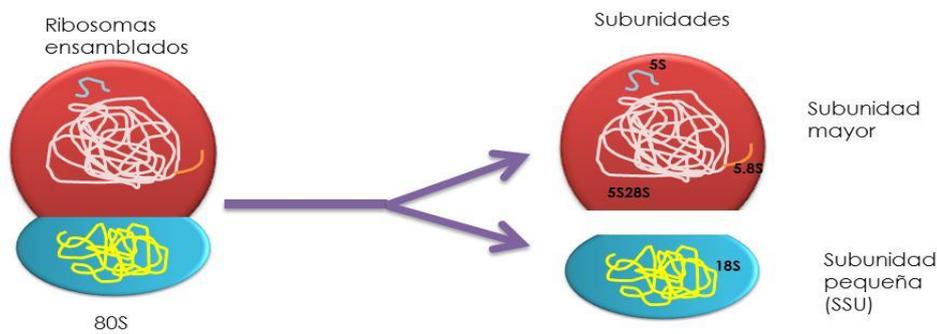


Figura 7. Estructura general de los ribosomas en eucariontes, modificado de Lodish *et al.*, 2005.

Para los HMA, se utiliza la región del genoma que codifica SSU rRNA con varias copias arregladas en tándem y variaciones en la secuencia que pueden proveer información filogenética (Clapp *et al.*, 1999). Para amplificar una porción del gen nuclear que codifica 18S rDNA de la SSU en HMA, Simon *et al.*, 1991 diseñaron un cebador específico (VANS1). Utilizando ese cebador con el cebador universal NS21 (Figura 8) se puede amplificar un fragmento de 18S de HMA aún en presencia de DNA vegetal o bien de otros microorganismos u hongos micorrízicos (Cuadro 5).

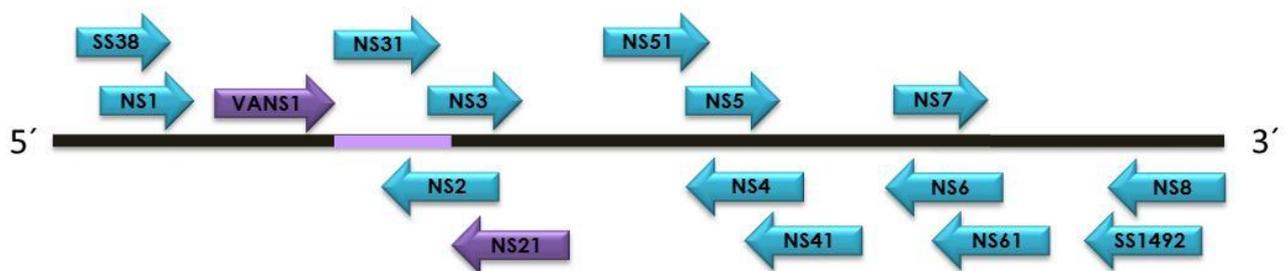


Figura 8. Diagrama de la localización relativa de los oligonucleótidos del gen nuclear que codifica para SSU. La región morada representa el fragmento amplificado por VANS1-NS21.

VANS1:GTCTAGTATAATCGTTATACAGG

NS21: AATATACGCTATTGGAGCTGG (Simon *et al.*, 1991).



Fuente de DNA		Resultados con pares de primer	
		Universal	VANS1-NS21
Angiospermas	<i>Allium porum</i>	+	-
	<i>Alnus glutinosa</i>	+	-
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	+	-
	<i>Quercus agrifolia</i>	+	-
Gimnospermas	<i>Abies concolor</i>	+	-
	<i>Pinus ponderosa</i>	+	-
Zygomycetes	<i>Endogone pisiformis</i>	+	-
	<i>Mycotypha africana</i>	+	-
	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	+	-
	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	+	-
	<i>Glomus mosseae</i>	+	+
	<i>Glomus intraradices</i>	+	+
	<i>Gigaspora gigantea</i>	+	+
	<i>Gigaspora margarita</i>	+	+
Ascomycetes	<i>Entrophospora colombiana</i>	+	+
	<i>Scutellospora pellucida</i>	+	+
	<i>Cenococcum geophilum</i>	+	-
	<i>Neurospora tetrasperma</i>	+	-
Basidiomycetes	<i>Tuber melanosporum</i>	+	-
	<i>Boletus satanas</i>	+	-
	<i>Dacrymyces palmatus</i>	+	-
	<i>Telephora americana</i>	+	-
	<i>Russula laurocerasi</i>	+	-

Cuadro 5. Especificidad de VANS1 versus oligonucleótidos universales para la amplificación de una porción del gen SSU de eucariontes.

Universal primer: NS1-NS2; SS38-NS21. Tomado de Simon *et al.*, 1991



ANTECEDENTES

Simon *et al.*, en 1991 diseñaron un cebador específico para amplificar una región del gen SSUrRNA de HMA, obtuvieron DNA de *Glomus intraradices* y *Gigaspora margarita* a partir de 60 y 20 esporas respectivamente, a su vez obtuvieron DNA de *Endogone pisiformis* a partir de un cultivo axénico y por último inocularon puerro con *Glomus vesiculiferum* para extraer el DNA a partir de la raíz. Amplificaron el DNA por PCR utilizando tres pares de oligonucleótidos, dos universales (NS1-NS2; SS38-NS21) y el cebador específico VANS1 con el cebador universal NS21. El juego VANS1-NS21 amplifica una banda de aproximadamente 550pb solamente cuando se usa DNA de Hongos Micorrízicos Arbusculares (*Glomus intraradices*, *Gigaspora margarita* y *Glomus vesiculiferum*), mientras que con los oligonucleótidos universales se amplificó DNA en todos los casos.

En 1995 Di Bonito *et al.*, inocularon *Glomus intraradices* en 5 especies: lechuga (*Lactuca sativa*), puerro (*Allium porrum*), zinnia (*Zinnia elegans*), escarola (*Cichorium endivia*) y pimiento (*Capsicum annuum*). A las pocas semanas evaluaron el porcentaje de micorrización y las raíces colonizadas fueron procesadas para extraer DNA y realizar PCR utilizando los oligonucleótidos VANS1-NS21. Obtuvieron una banda de 550pb en las plantas micorrizadas, sin embargo también encontraron productos no específicos de mayor tamaño, aún en las plantas control. El resultado fue consistente aun cuando el DNA correspondía a raíces con 21% de micorrización.

En 1999, Clapp *et al.*, utilizaron el cebador VANS1, con un cebador específico para la familia Gigasporacea (VAGIGA) a partir de DNA de esporas aisladas de suelo en campo y de raíz de Jacinto (*Hyacinthoides nonscripta*), obtuvieron secuencias características del género *Scutellospora* partiendo tanto de esporas como de raíces. Sin embargo, también obtuvieron secuencias más relacionadas con el género *Glomus* que con *Scutellospora*, a pesar de que las esporas fueron reconocidas taxonómicamente en este género, por lo que concluyeron que el polimorfismo en una sola espora no solo está restringido a la región ITS, sino que también es frecuente en el gen SSU.

Chelius, M. K. y Triplett, E. W. (1999), detectaron la presencia de HMA, mediante la extracción de DNA de éstos, en suelo y raíces de pasto. Utilizaron los oligonucleótidos específicos VANS1-NS21 para amplificar una región del gen SSU rDNA. Las secuencias obtenidas corresponden a HMA, ya que obtuvieron una identidad del 95% con *Glomus intraradices*



En el 2000, Katsuharu *et al.*, extrajeron DNA de raíces de pasto silvestre chino *Miscanthus sinensis*; lo amplificaron utilizando los oligonucleótidos específicos VANS1-NS21 en PCR directo, también lo usaron en PCR anidado, es decir realizaron una primera reacción con los oligonucleótidos universales SS38-NS21, seguidos por VANS1-NS21, obteniendo en ambos casos una banda de aproximadamente 500pb.

En 2001 Yamato identificó hongos micorrízicos en la raíz de *Sciaphila tosaensis* mediante PCR usando el cebador específico VANS1, en conjunción con los oligonucleótidos específicos VAGLO para *Glomus*, VAACAU para *Acaulospora* y VAGIGA para *Gigaspora* y *Scutelospora*. Obtuvo un producto de 190pb con los oligonucleótidos VANS1-VAGLO, mientras que en combinación con VAACAU y VAGIGA no hubo amplificación por lo que concluyó que solamente el género *Glomus* estaba colonizando la raíz.

En 2005, Camargo y Esperón, evaluaron la distribución y abundancia de esporas de HMA en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán contrastando la heterogeneidad espacial en islas de recursos formadas por especies de *Mimosa* vs áreas abiertas, así como la heterogeneidad estacional (temporada de lluvias vs temporada de sequía). Reportaron mayor número de espora durante la estación de lluvias y en el suelo de las islas de recursos formadas por *Mimosa* en relación con áreas abiertas.



OBJETIVO GENERAL

Determinar la diversidad de Hongos Micorrizicos Arbusculares asociados con la rizósfera de *P. laevigata* y *P. praecox*, mediante la amplificación y secuenciación del fragmento que codifica la subunidad pequeña del rDNA.

OBJETIVOS PARTICULARES

Calcular la densidad de los HMA presentes en las zonas de estudio.

Determinar el porcentaje de colonización de los HMA en *Prosopis laevigata* y *Parkinsonia praecox*.

Micorrizar plantas de *Prosopis laevigata* y *Parkinsonia praecox* en condiciones de invernadero.

Micorrizar plantas trampa en condiciones de invernadero.

Incrementar poblaciones de HMA del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla

Amplificar fragmentos del genoma de los HMA para determinar su grupo taxonómico.

HIPÓTESIS

El consorcio de hongos micorrizicos arbusculares obtenido de la rizósfera de mezquite y palo verde en Zapotitlán Salinas Puebla coloniza eficientemente especies trampa al paso de 90 días, permitiendo la extracción y amplificación de fragmentos de su genoma de manera que utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con los oligonucleótidos VANS1 y NS21 se amplifica un fragmento de 550 pares de bases, cuya secuencia permite determinar las especies que establecen la simbiosis.



DESARROLLO EXPERIMENTAL

ÁREA DE ESTUDIO:

El Valle de Tehuacán-Cuicatlán pertenece a la región xerofítica mexicana en el reino neotropical, una de las 17 provincias florísticas existentes en México (Figura 9) (Rzedowski, 2006).



Figura 9. Regiones florísticas de México, modificado de Rzedowski 2006.

Se encuentra en la porción Sureste del Estado de Puebla y comprende una porción del norte del estado de Oaxaca hasta Cuicatlán.

El clima varía de árido al subárido, la precipitación media anual es de 480mm con promedios mensuales que van de 2mm en enero a 119mm en septiembre. La temperatura media anual es de 18.6 grados. Incluye varios valles, entre los que destacan Coxcatlan, Cuicatlán, Tehuacán, Tepelmeme y Zapotitlán (Reyes *et al.*, 2000); en este último es donde se llevó acabo el estudio.

La comunidad de Zapotitlán Salinas, es la cabecera municipal de Zapotitlán en el estado de Puebla, se encuentra entre los 18°16'27.8''-18°16'28'' W y 97°32'52'' 97°32'53''N (Figura 10). Presenta un clima seco con lluvias en verano, temperatura media anual de 21°C y una precipitación de 400-450 mm.

Los suelos son someros, pedregosos y halomórficos, con diferentes estados de alcalinidad y salinidad. El tipo de vegetación es matorral espinoso, conformado por comunidades vegetales como el mezquital, el matorral espinoso, la tetechera, el cardonal, el izotal, el chaparral, la selva baja caducifolia y la tetechera candelillar.



Predominan las angiospermas con 161 familias, 863 géneros y 2521 especies, las familias más importantes son: Cactaceae, Asteraceae y Fabaceae, predominando los géneros *Opuntia*, *Neobuxbaumia*, *Acacia*, *Mimosa*, *Viguera* y *Verbesina*. Las principales actividades de la población son la agricultura de temporal, recolección de leña y de otros recursos, el trabajo como jornaleros y pastoreo de chivos. Presenta graves problemas de deforestación, migración y cambio de uso de suelo. (Dávila *et al.*, 2001; García & Tapia, 2007; Paredes, *et al.*, 2007).



Figura 10. Área de estudio, modificado de Montoya *et al.*, 2003



FASE DE CAMPO:

La colecta fue realizada en el mes de Septiembre del 2009 durante la temporada de lluvias en dos zonas con diferente grado de perturbación dentro del Jardín Botánico Helia Bravo.

La Zona A (Figura 11), presenta menos perturbación que la B (Figura 12), la cual demuestra erosión hídrica, eólica y menor cobertura vegetal.

En ambas zonas se colectaron muestras de suelo rizosférico (entendido como el volumen de suelo influenciado inmediatamente por las raíces) de plantas juveniles de *Prosopis laevigata* y *Parkinsonia praecox* (Cuadro 6) de 0-20cm de profundidad, se tomaron de 3 a 4 repeticiones por muestra. Las muestras se depositaron en bolsas de polietileno y fueron almacenadas en hielo hasta su traslado al laboratorio donde se almacenaron a 4°C.



Figura 11. Zona dentro del Jardín Botánico Helia Bravo con menor grado de perturbación (Zona A)



Figura 12. Zona dentro del Jardín Botánico Helia Bravo con mayor grado de perturbación (Zona B)



Zona	No. Muestra	Especie de donde se tomó la muestra	Características
ZONA A	1	<i>Parkinsonia praecox</i>	Acompañado de la plántula de <i>Prosopis laevigata</i> de la muestra 2
	2	<i>Prosopis laevigata</i>	Acompañada de la plántula de <i>Parkinsonia praecox</i> de la muestra 1
	3	<i>Parkinsonia praecox</i>	Rodeada por <i>Mammillaria sp.</i> , <i>Opuntia sp.</i> , <i>Mirtilocactus geometrizers</i> y <i>Castela tortuosa</i>
	4	<i>Prosopis laevigata</i>	Rodeada por <i>Mamillaria sp.</i> , <i>Parkinsonia praecox</i> , <i>Prosopis laevigata</i> y cardones.
	5	<i>Parkinsonia praecox</i>	Rodeada de <i>Opuntia sp.</i>
	6	<i>Prosopis laevigata</i>	Rodeada de <i>Mammillaria sp.</i> y herbáceas
Zona B	7	<i>Parkinsonia praecox</i>	Rodeada de <i>Mammillaria sp.</i> y <i>Opuntia sp.</i>
	8	<i>Prosopis laevigata</i>	Sin vegetación alrededor
	9	<i>Parkinsonia praecox</i>	Sin vegetación alrededor
	10	<i>Prosopis laevigata</i>	Sin vegetación alrededor
	11	<i>Parkinsonia praecox</i>	Sin vegetación alrededor

Cuadro 6. Algunas características de los sitios donde se tomaron las muestras



FASE DE LABORATORIO:

Incremento del consorcio de HMA mediante colonización de plantas trampa:

Con el fin de incrementar el consorcio de HMA, así como evaluar el potencial micorrízico, se inocularon plantas trampa de *Prosopis laevigata*, *Parkinsonia praecox*, *Sorghum bicolor* y *Lactuca sativa* con muestras de suelo en vasos de unicel de 1lt de capacidad (Figura 13). Los protocolos de escarificación y desinfección de las semillas se muestran en el Anexo I.

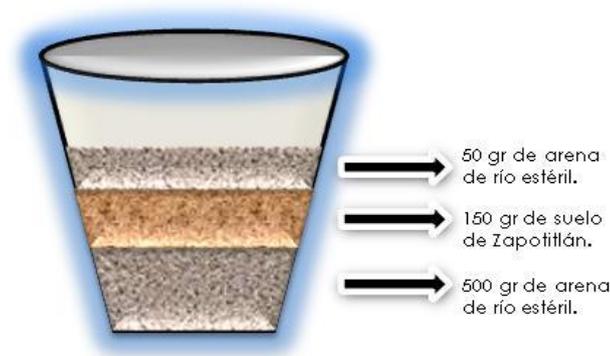


Figura 13. Composición del sustrato para la colonización de plantas trampa.

Las plantas trampa se sembraron en vasos utilizando como sustrato inerte arena de río esterilizada y 150 gramos del suelo tomado del campo, en cada muestra se sembraron semillas de *Sorghum bicolor* (sorgo), *Lactuca sativa* (lechuga), *Prosopis laevigata* y *Parkinsonia praecox* (estas últimas sólo cuando la muestra estaba asociada a esa especie) (Cuadro 7). El sustrato se mantuvo húmedo hasta la germinación de las semillas, una vez establecidas las plántulas se regaron con solución Long Ashton (Anexo II) cada 8 días y cada tercer día con agua potable.

Las macetas se mantuvieron en una cámara de crecimiento con condiciones controladas: 28°C, 8 horas de luz y 8 de oscuridad, por un período de 3 meses. Al cabo, se midió porcentaje de micorrización mediante la técnica de tinción con azul tripano propuesta por Phillips y Hayman (Anexo III), con el fin de observar si la micorrización se había establecido y proceder con la extracción de DNA.



Zona colecta	Muestra de suelo utilizadas como sustrato	No. Vaso	Planta trampa
Zona A	1 <i>Parkinsonia praecox</i>	1	<i>Parkinsonia praecox</i>
		2	<i>Sorghum bicolor</i>
		3	<i>Lactuca sativa</i>
	2 <i>Prosopis laevigata</i>	4	<i>Prosopis laevigata</i>
		5	<i>Sorghum bicolor</i>
		6	<i>Lactuca sativa</i>
	3 <i>Parkinsonia praecox</i>	7	<i>Parkinsonia praecox</i>
		8	<i>Sorghum bicolor</i>
		9	<i>Lactuca sativa</i>
	4 <i>Prosopis laevigata</i>	10	<i>Prosopis laevigata</i>
		11	<i>Sorghum bicolor</i>
		12	<i>Lactuca sativa</i>
	5 <i>Parkinsonia praecox</i>	13	<i>Parkinsonia praecox</i>
		14	<i>Sorghum bicolor</i>
		15	<i>Lactuca sativa</i>
	6 <i>Prosopis laevigata</i>	16	<i>Prosopis laevigata</i>
		17	<i>Sorghum bicolor</i>
		18	<i>Lactuca sativa</i>
Zona B	7 <i>Parkinsonia praecox</i>	19	<i>Parkinsonia praecox</i>
		20	<i>Sorghum bicolor</i>
		21	<i>Lactuca sativa</i>
	8 <i>Prosopis laevigata</i>	22	<i>Prosopis laevigata</i>
		23	<i>Sorghum bicolor</i>
		24	<i>Lactuca sativa</i>
	9 <i>Parkinsonia praecox</i>	25	<i>Parkinsonia praecox</i>
		26	<i>Sorghum bicolor</i>
		27	<i>Lactuca sativa</i>
	10 <i>Prosopis laevigata</i>	28	<i>Prosopis laevigata</i>
		29	<i>Sorghum bicolor</i>
		30	<i>Lactuca sativa</i>
	11 <i>Parkinsonia praecox</i>	31	<i>Parkinsonia praecox</i>
		32	<i>Sorghum bicolor</i>
		33	<i>Lactuca sativa</i>

Cuadro 7. Relación de plantas trampa utilizadas para incrementar el consorcio micorrízico.



Extracción y cuantificación de esporas de HMA

El número de esporas por 100 gramos de suelo fue determinado tanto en las muestras colectadas en el campo, como en el sustrato de las plantas trampa. Para esto se probaron dos técnicas, en primer lugar la extracción de esporas se realizó mediante el método de aislamiento por gradiente de sacarosa propuesto por Walker en 1997 (Anexo IV) seguido de tinción con fucsina ácida (Anexo V) para evaluar el número de esporas viables. Adicionalmente, la extracción y conteo de esporas se probó con una modificación a la técnica de gradiente de sacarosa (Anexo IV-A), de modo que solo se obtienen las esporas viables. El conteo se realizó con ayuda del microscopio estereoscópico.

Cuantificación de fósforo libre en suelo

Se determinó la cantidad de fósforo en el suelo, así como en el sustrato de las plantas trampa mediante la técnica de cuantificación de fósforo libre por el método modificado de Taussky y Shorr (Wharton & McCarty, 1972), esta técnica se muestra en el Anexo VI. La cuantificación de este compuesto en el sustrato fue importante dado que las especies trampa debieron mantenerse en una condición deficiente de fosfatos para favorecer el establecimiento de la simbiosis.

Extracción y amplificación de DNA

Comprobada la micorización de las plantas trampa se procedió a extraer el DNA a partir de 150 mg de raíz, para esto se utilizó el sistema de extracción ZR Plant/Seed DNA Kit™ siguiendo el protocolo sugerido por el proveedor (Anexo VII), fue necesario el uso del sistema de extracción, ya que las raíces de las plantas y el suelo contienen compuestos fenólicos, polisacáridos y proteínas que inhiben la reacción de PCR, (Katsuharu *et al.*, 2000). Las muestras fueron mantenidas a -10°C para su posterior amplificación mediante PCR.

La reacción de PCR se realizó en un volumen de 50µl (5µl de Buffer (10X Tris HCl pH 8.5 (NH₄)₂ SO₄, 0.2% Tween 20, MgCl₂ 3.0 mM,;) 1 µl de dNTP 10mM, 1 U DNAPolimerasa (Taq Platinum invitrogen), 1 µl 10 mM de cada iniciador (VANS1 y NS21). El programa de amplificación constó de 40 ciclos (Anexo VIII) en un termociclador Marca CTR Corbette.

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Anexo IX), el gel se tiñó con bromuro de etidio (15 µg/ml) y fue visualizado en un



transiluminador de UV, finalmente se fotografió en un transiluminador equipado con cámara digital.

El producto de PCR fue purificado directamente del gel (Anexo X) utilizando el kit Concert Rapid PCR™, y secuenciado en un equipo ABI Prism 3100 de 16 capilares en el laboratorio de Secuenciación de DNA de la UBIPRO en la FES-Iztacala.

Los electroferogramas fueron analizados con el programa Chromas lite 2.1 y las secuencias comparadas en el banco de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information) para un análisis inicial de similitud (BLAST).

Con el fin de realizar un análisis filogenético, se realizó un alineamiento múltiple (Apéndice III), con las secuencias obtenidas en este trabajo más las secuencias homólogas de HMA depositadas en los banco de información genética (*Glomus intraradices* **X58725**, *Glomus proliferum* **AF213462**, *Glomus fasciculatum* **Y17640.2**, *Glomus vesiculiferum* **L20824.1**, *Glomus sinuosum* **AJ133706.1**, *Glomus etunicatum* **Y17639.2**, *Glomus claroideum* **AJ276080.2**, *Acaulospora koskei* **AF231762**, *Acaulospora laevis* **AF074347**, *Scutellospora dipurpurens* **AF131027**, *Scutellospora gilmorei* **AJ276094.2**, *Scutellospora projecturata* **AJ242729.1**, *Scutellospora calospora* **FJ009671.1**, *Scutellospora castanea* **AF038590.1**, *Scutellospora gregaria* **AJ871274.**, *Scutellospora weresubiae* **AJ306444.1**, *Scutellospora pellucida* **Z14012.1**, *Scutellospora spinosissima* **AJ306437.1**, *Scutellospora cerradensis* **AB041344.1**, *Scutellospora reticulata* **AJ871272.1**, *Scutellospora heterogama* **NG017177.1**, *Scutellospora dipapillosa* **Z14013.1**, *Gigaspora albida* **Z14009.1**, *Gigaspora rosea* **X58726.1**, *Gigaspora margarita* **X58726**, *Gigaspora gigantea* **EF014362.1**, *Pacispora scintillans* **AJ619953.1**, *Endogone pisiformis* **X58724**, *Ambispora fennica* **AM268196.1**), mediante el programa de CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1997). Los alineamientos múltiples fueron editados con el programa de SEAVIEW 4.0 (Gouy *et al.*, 2010) con el fin de comparar solo el fragmento de interés. Se realizaron 10 alineamientos, los cuales fueron evaluados en el programa GENE.doc (Nicholas, K. & Nicholas, H., 1997) por el método de suma de pares (Reinert *et al.*, 2000) con el fin de obtener el mejor alineamiento para realizar el análisis filogenético.

Los gaps fueron utilizados como elementos informativos, para codificarlos como tales se utilizó el programa GapCoder (Young, N. & Healy, J., 2003). Finalmente se realizó el análisis filogenético por análisis de distancia y parsimonia en PAUP* 4.0 (Swofford, D., 2002).

Con el fin de conocer el modelo más apropiado para realizar el análisis de distancia, se utilizó el programa de Modeltest 3.6 (Posada, D., 2008). Los análisis filogenéticos con máxima parsimonia y distancia se realizaron con un Bootstrap de 1,000 réplicas. El árbol consenso, con soporte mínimo de 50%, fue editado mediante el programa Power Point de Office 2007.



RESULTADOS

PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN:

En todas las plantas trampa analizadas se estableció la simbiosis al cabo de 90 días de establecidas las unidades experimentales. El cuadro 8 muestra los resultados de esta evaluación; el porcentaje total varía en un rango del 18% al 87%. En todas las plantas trampa se presenta colonización mediante vesículas y arbusculos (Figura 14), siendo estos últimos los de mayor porcentaje.

El porcentaje de colonización promedio por especie trampa se presenta en el Cuadro 9 y la Figura 15. Las plantas de *Prosopis laevigata* mostraron el mayor porcentaje de colonización radical total con un 75%, en orden decreciente le siguen *Parkinsonia praecox* y *Lactuca sativa* con un 72% y por último *Sorghum bicolor* con un 62%. La colonización por arbusculos fue abundante, al igual que en el porcentaje total, el mayor porcentaje corresponde a *Prosopis laevigata* con un 48%, seguido por *Lactuca sativa*, *Parkinsonia praecox* y *Sorghum bicolor* con un 41%, 38% y 34% respectivamente. Por último la colonización promedio de vesículas fue de un 45% para *Prosopis laevigata*, 40% para *Parkinsonia praecox*, seguido de *Lactuca sativa* con 36% y por *Sorghum bicolor* con un 33%.

El análisis estadístico (ANOVA) sugiere las diferencias en el porcentaje de arbusculos, vesículas y micorrización total entre especies trampa no son significativas.

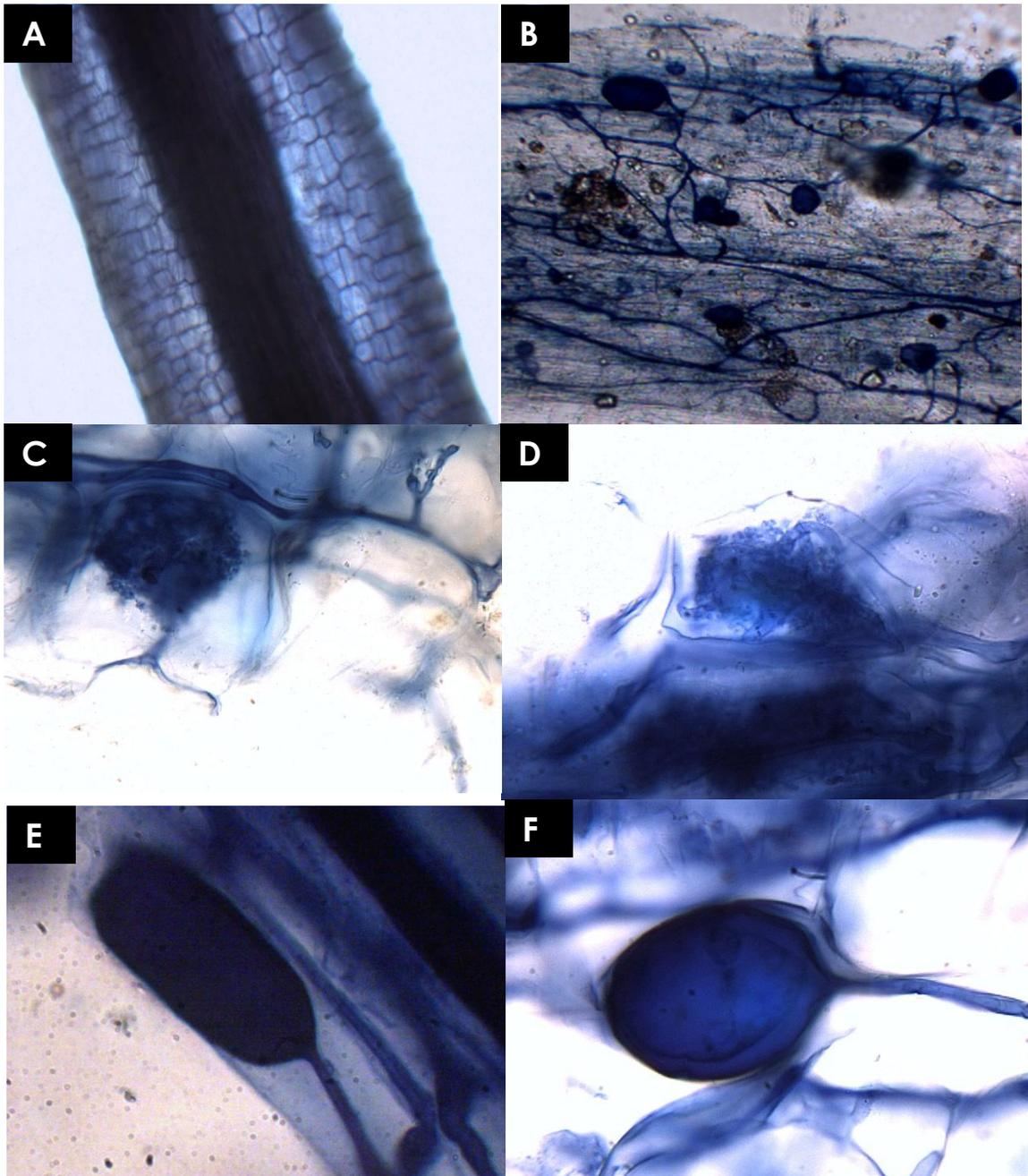


Figura 14. A) Raíz no micorrizada teñida con azul tripano. B) Raíz de lechuga micorrizada teñida con azul tripano. C) Arbúsculo en raíz de mezquite. D) Arbúsculo en raíz de Sorgo. E) Vesícula en raíz de palo verde. F) Vesícula en raíz de palo verde. 1000X



		Muestra		Arbúsculos	Vesículas	Total
ZONA A	Muestra 1	1	<i>Parkinsonia praecox</i>	42	52	72
		2	<i>Sorghum bicolor</i>	40	37	67
		3	<i>Lactuca sativa</i>	47	56	87
	Muestra 2	4	<i>Prosopis laevigata</i>	54	40	72
		5	<i>Sorghum bicolor</i>	28	35	60
		6	<i>Lactuca sativa</i>	40	58	77
	Muestra 3	7	<i>Parkinsonia praecox</i>	33	50	77
		8	<i>Sorghum bicolor</i>	47	47	73
		9	<i>Lactuca sativa</i>	38	48	77
	Muestra 4	10	<i>Prosopis laevigata</i>	48	55	78
		11	<i>Sorghum bicolor</i>	7	12	18
		12	<i>Lactuca sativa</i>	37	30	68
	Muestra 5	13	<i>Parkinsonia praecox</i>	28	36	59
		14	<i>Sorghum bicolor</i>	42	40	33
		15	<i>Lactuca sativa</i>	53	25	72
	Muestra 6	16	<i>Prosopis laevigata</i>	65	48	83
		17	<i>Sorghum bicolor</i>	33	37	70
		18	<i>Lactuca sativa</i>	37	25	68
ZONA B	Muestra 7	19	<i>Parkinsonia praecox</i>	57	33	87
		20	<i>Sorghum bicolor</i>	32	25	87
		21	<i>Lactuca sativa</i>	38	18	62
	Muestra 8	22	<i>Prosopis laevigata</i>	25	47	73
		23	<i>Sorghum bicolor</i>	37	25	68
		24	<i>Lactuca sativa</i>	37	32	80
	Muestra 9	25	<i>Parkinsonia praecox</i>	38	32	70
		26	<i>Sorghum bicolor</i>	27	32	58
		27	<i>Lactuca sativa</i>	36	31	62
	Muestra 10	28	<i>Prosopis laevigata</i>	47	33	67
		29	<i>Sorghum bicolor</i>	42	43	83
		30	<i>Lactuca sativa</i>	50	40	80
	Muestra 11	31	<i>Parkinsonia praecox</i>	39	34	70
		32	<i>Sorghum bicolor</i>	41	37	64
		33	<i>Lactuca sativa</i>	37	28	59

Cuadro 8. Porcentaje arbúsculos, vesículas y micorrización total en las plantas trampa, al cabo de 90 días de colonización.

	Arbúsculos	Vesículas	Micorrización total
<i>Prosopis laevigata</i>	48	45	75
<i>Parkinsonia praecox</i>	38	40	72
<i>Sorghum bicolor</i>	34	33	62
<i>Lactuca sativa</i>	41	36	72

Cuadro 9. Porcentaje de micorrización promedio de arbúsculos, vesículas y micorrización total en las plantas trampa, al paso de 90 días de colonización.

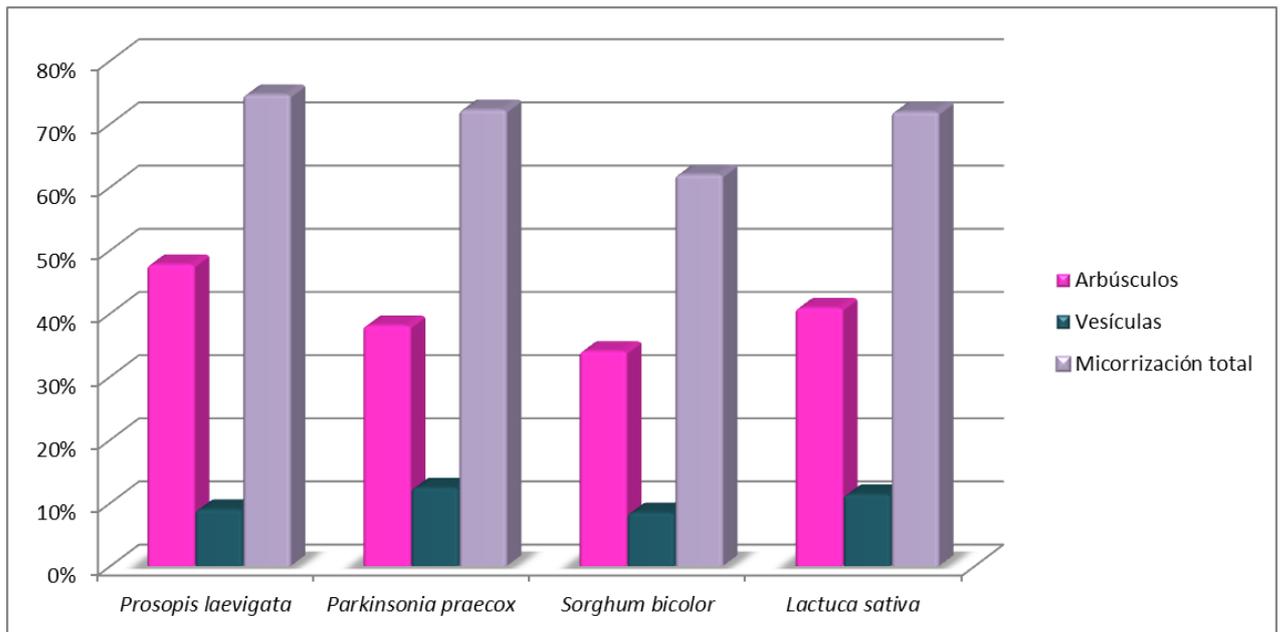


Figura 15. Porcentaje de micorrización promedio de arbúsculos, vesículas y micorrización total en las plantas trampa, al paso de 90 días de colonización.



DENSIDAD y VIABILIDAD DE ESPORAS EN CAMPO

Se obtuvo la densidad de esporas presentes en las muestras de suelo tomadas en el campo, utilizando la técnica de decantación para separar las esporas del suelo. Puede observarse que la abundancia de esporas es ligeramente superior en la rizósfera asociada a *P. praecox* y que esta especie presenta aproximadamente 25% más esporas en la zona perturbada.

Se sabe que algunas esporas pueden carecer de viabilidad (Figura 16), así que se estandarizó el protocolo para distinguir las de las viables. Los resultados se incluyen en la Figura 17, en las muestras asociadas con *Prosopis laevigata*, se obtuvo una viabilidad del 53% en la zona A y 51% en la B (Figura 18), mientras que en suelo asociado a *P. praecox* se obtuvo un porcentaje de viabilidad del 48% en la zona A y 64% en la zona B (Figura 19). Parece sugerir que *P. praecox* en condiciones perturbadas favorece el incremento de esporas en suelo aunque no existe una diferencia significativa entre ambas zonas.

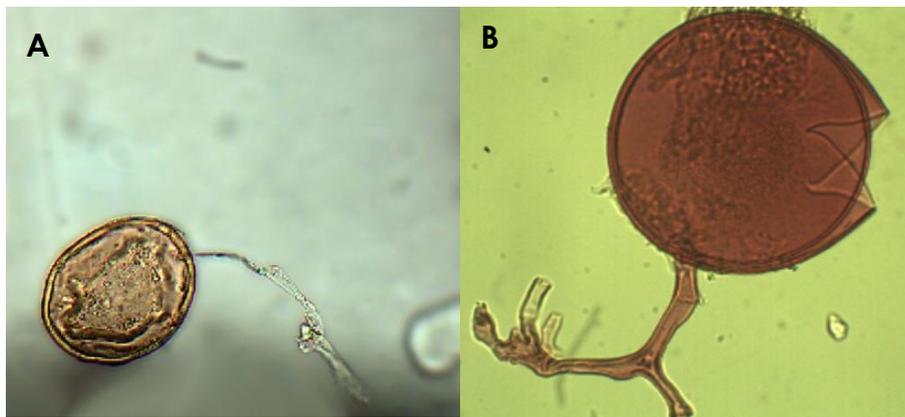


Figura 16. Espora no viable (A) y espora viable (B) de acuerdo con la técnica de tinción con Fucsina ácida. 400X

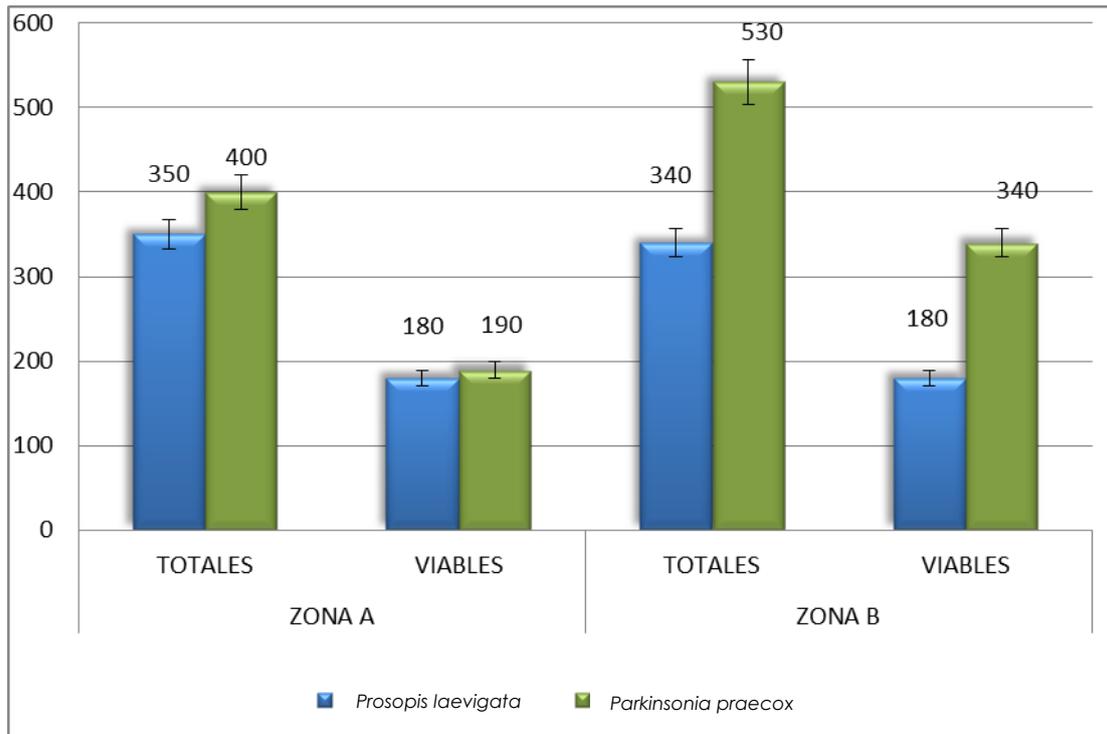


Figura 17. Esporas totales y viables en 100gr de suelo de la rizósfera de *Prosopis laevigata* y *Parkinsonia praecox*.

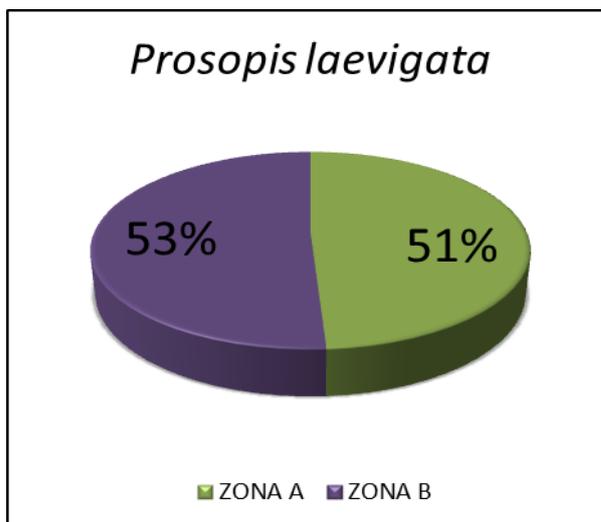


Figura 18. Esporas viables en la rizósfera de *Prosopis laevigata* en ambas zonas de estudio.

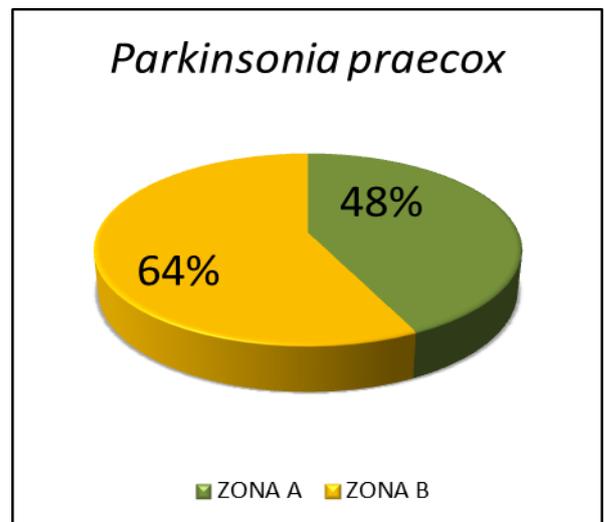


Figura 19. Esporas viables en la rizósfera de *Parkinsonia praecox* en ambas zonas de estudio.



Alternativamente, se estandarizó el protocolo mediante el cual se aíslan exclusivamente las esporas con viabilidad de este modo se comprobó que el número arrojado por ambas estrategias es similar. De manera que en los ensayos posteriores solamente se utilizó esta segunda alternativa.

Con la densidad promedio de esporas viables en las muestras de campo (Figura 20), se hizo un análisis estadístico (análisis de varianza con la prueba de T; valor de significancia de $\alpha=0.05$ y con un nivel de confianza del 0.95) comparando la zona A y B, (224 y 203 esporas promedio en 100gr respectivamente), los resultados sugieren que no existe diferencia significativa en este respecto.

En 100gr del suelo asociado a la rizósfera de *Prosopis laevigata* se encontraron 239 esporas viables en promedio para la zona A y 130 esporas en la zona B; el análisis estadístico (análisis de varianza con la prueba de T; valor de significancia de $\alpha=0.05$ y con un nivel de confianza del 0.95) no arrojó diferencia significativa. En la rizósfera de *Parkinsonia praecox*, se obtuvo un promedio de 210 esporas viables en la zona A y 253 esporas viables en la zona B (Figura 21), al igual que en el caso anterior el análisis estadístico no arrojó diferencia significativa entre los valores.

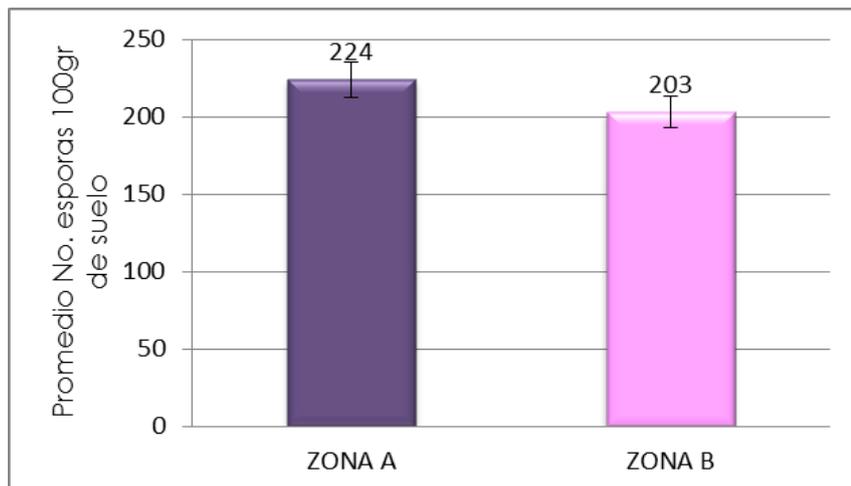


Figura 20. Promedio de esporas viables presentes en 100gr de suelo, en la zona A y zona B, en Zapotitlán Salinas, Puebla.

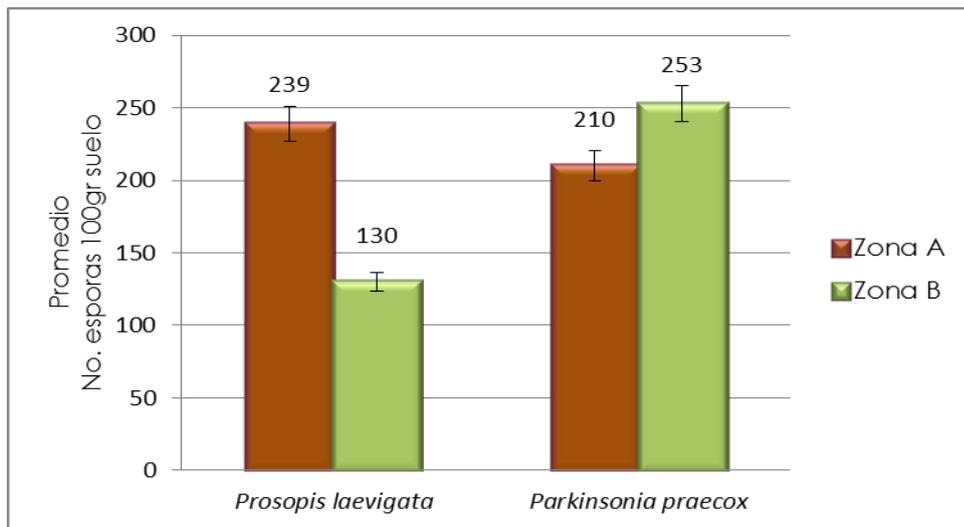


Figura 21. Número promedio de esporas viables en 100gr de suelo, en la zona A y zona B, para *Prosopis laevigata* y *Parkinsonia praecox* en Zapotitlán Salinas, Puebla.

Cada muestra colectada en campo fue utilizada para inocular plantas trampa e incrementar el consorcio. Los resultados muestran que el número promedio más alto de esporas viables corresponde a *Prosopis laevigata*, seguida de *Lactuca sativa*, *Parkinsonia praecox* y *Sorghum bicolor* (en orden decreciente) (Figura 22). Mediante el análisis estadístico (ANOVA) se observó que no hubo diferencia significativa entre el número de esporas en cada especie (Apéndice II).

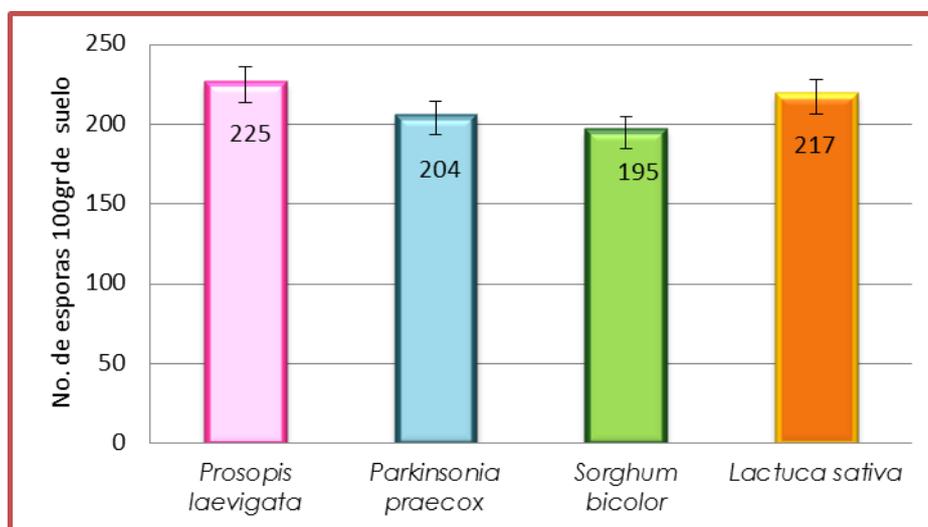


Figura 22. Número promedio de esporas viables obtenidas en las plantas trampa.



Como se indicó, las muestras de suelo fueron utilizadas para inocular especies trampa durante un periodo de 90 días, al cabo de ese tiempo se contaron las esporas viables. Cabe indicar que el número de esporas viables en las tres especies utilizadas fue similar por lo que en la Figura 23 se muestra el número promedio. El análisis estadístico (prueba de t en dos poblaciones pareadas) comparando del número de esporas en muestras de campo y las correspondiente a las especies trampa indica que no existe diferencias significativas. Sin embargo es importante resaltar que el análisis estadístico presentó una media negativa, sugiriendo que la utilización de plantas trampa incrementó el número de esporas viables aunque no significativamente.

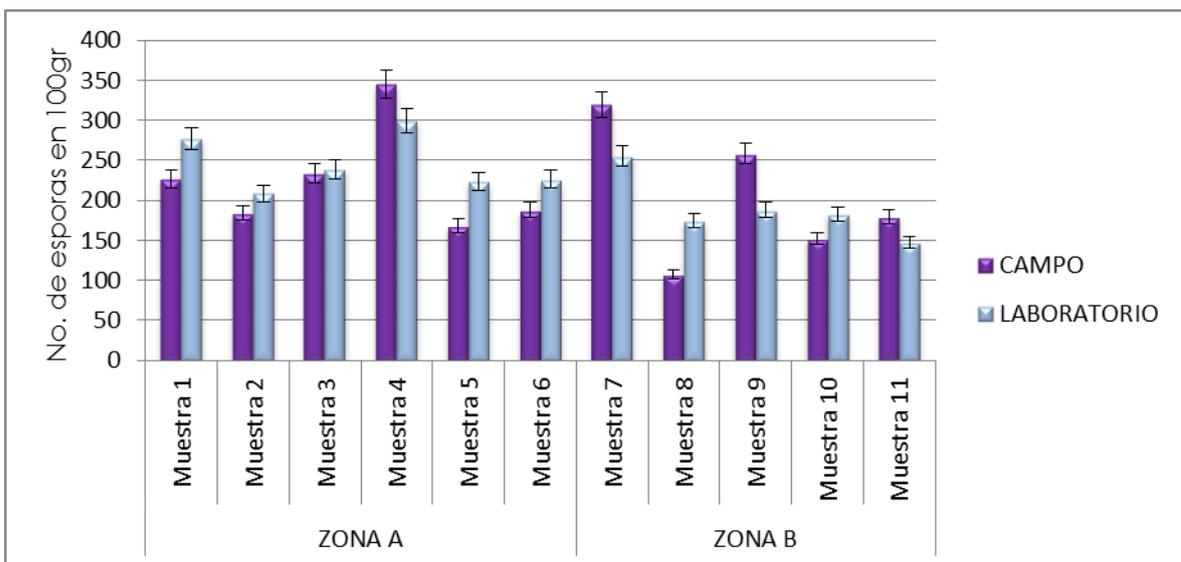


Figura 23. Número de esporas viables en campo y en plantas trampa.



FOSFATO LIBRE EN SUELO:

En el cuadro 10 se muestran las concentraciones de fosfato libre encontrado en el suelo de campo, la diferencia entre la concentración de fosfato en la zona A y la zona B no fue estadísticamente significativa (análisis de varianza con la prueba de T en dos poblaciones pareadas, valor de significancia =0.05 y nivel de confianza del 0.95) La concentración de fósforo es baja de acuerdo con Montaña en el 2000 quien reportó un suelo deficiente en fosfatos con concentraciones de 12.7 y 19.2 ppm. Adicionalmente, se muestra la concentración de ese compuesto en el sustrato tras el periodo durante el cual se mantuvieron las plantas trampa, como puede observarse el tratamiento favoreció que la concentración de ese compuesto disminuyera. La diferencia en este respecto fue significativa estadísticamente (análisis de varianza con la prueba de T en dos poblaciones pareadas, valor de significancia =0.05 y nivel de confianza del 0.95). Al disminuir la concentración de fosfato se pretendió favorecer el establecimiento de la simbiosis (Cuadro 10).

	P libre en 100gr de suelo, muestras de campo	P libre en 100gr de suelo, muestras de suelo de plantas trampa
Zona A	7.5 ppm	4.72ppm
	11.8 ppm	4.3 ppm
	12.9 ppm	5.1 ppm
	14.1 ppm	5.1 ppm
	6.2 ppm	3.7 ppm
	14 ppm	5.1 ppm
Zona B	13.1 ppm	3.7 ppm
	9.8 ppm	4.5 ppm
	11.3 ppm	3.6 ppm
	7.9 ppm	4.1 ppm
	12.4 ppm	3.8 ppm

Cuadro 10. Fosfatos libres en 100gr de suelo, representados en ppm



EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL DNA DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES:

Se extrajo el DNA de las 33 especies trampa micorrizadas en laboratorio, en el Cuadro 11 se muestra la relación entre el porcentaje de micorrización y la presencia de DNA (550 pb aproximadamente) producto del PCR realizado con los cebadores VANS1-NS21.

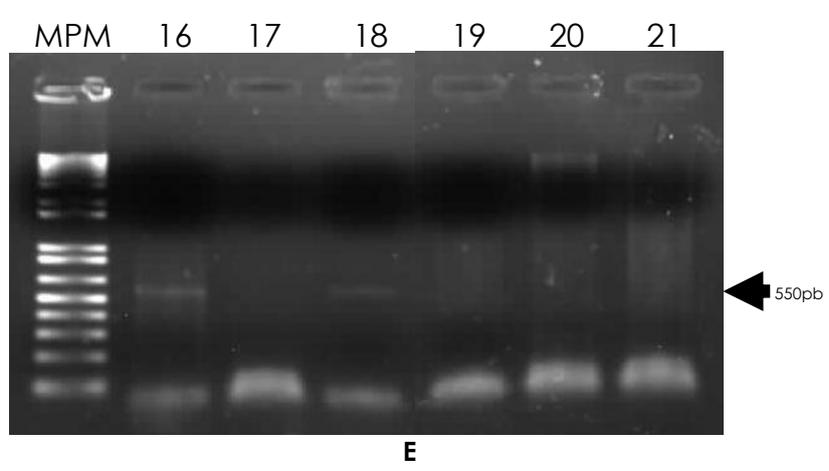
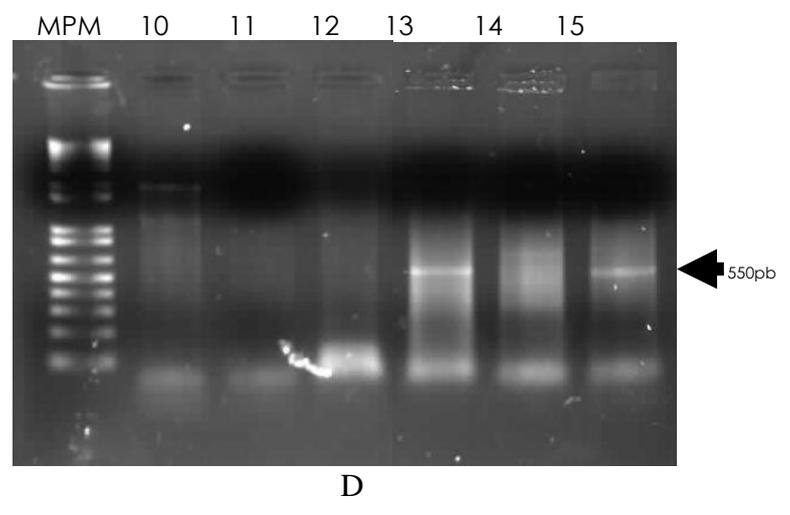
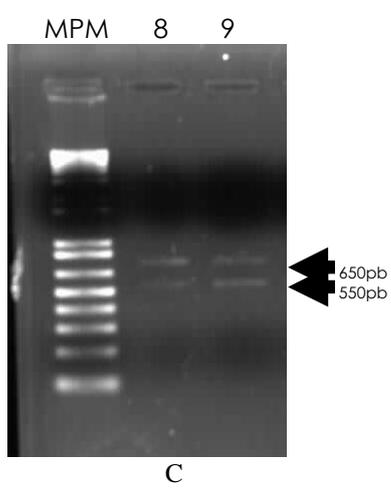
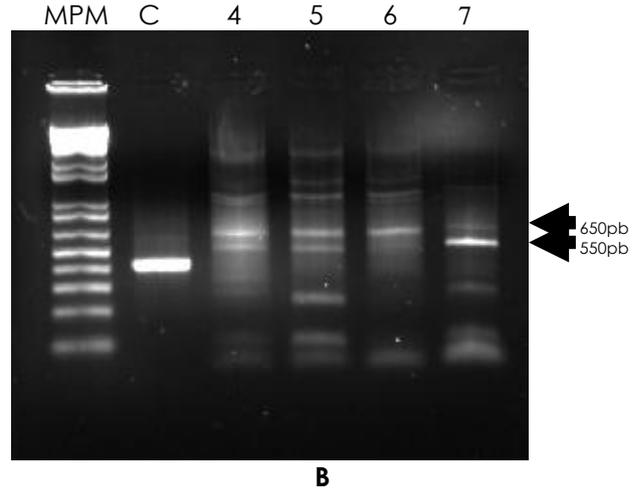
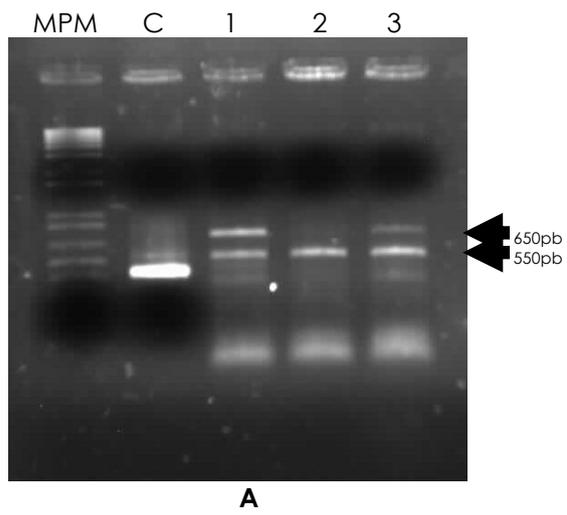
La separación por electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la amplificación evidenció la presencia, en algunos casos, de dos fragmentos uno de 550 y otro de más de 650 pb (Figura 24).

El fragmento delimitado por los oligonucleótidos según Simon *et al.*, 1991 tiene un tamaño de 550pb, por otro lado, el fragmento mayor sólo se obtuvo en algunos casos y en una concentración baja, por lo que solamente se purificó el fragmento de 550pb (Figura 25) y se procedió a su secuenciación.



Zona colecta	Muestra de suelo	Unidad	Especie trampa	Colonización %	Producto de PCR de 550pb
Zona A	Muestra 1 <i>Parkinsonia praecox</i>	1	<i>Parkinsonia praecox</i>	72	+
		2	<i>Sorghum bicolor</i>	67	+
		3	<i>Lactuca sativa</i>	87	+
	Muestra 2 <i>Prosopis laevigata</i>	4	<i>Prosopis laevigata</i>	72	+
		5	<i>Sorghum bicolor</i>	60	+
		6	<i>Lactuca sativa</i>	77	+
	Muestra 3 <i>Parkinsonia praecox</i>	7	<i>Parkinsonia praecox</i>	77	+
		8	<i>Sorghum bicolor</i>	73	+
		9	<i>Lactuca sativa</i>	77	+
	Muestra 4 <i>Prosopis laevigata</i>	10	<i>Prosopis laevigata</i>	78	+
		11	<i>Sorghum bicolor</i>	18	-
		12	<i>Lactuca sativa</i>	68	-
	Muestra 5 <i>Parkinsonia praecox</i>	13	<i>Parkinsonia praecox</i>	59	+
		14	<i>Sorghum bicolor</i>	33	+
		15	<i>Lactuca sativa</i>	72	+
	Muestra 6 <i>Prosopis laevigata</i>	16	<i>Prosopis laevigata</i>	83	+
		17	<i>Sorghum bicolor</i>	70	-
		18	<i>Lactuca sativa</i>	68	+
Zona B	Muestra 7 <i>Parkinsonia praecox</i>	19	<i>Parkinsonia praecox</i>	87	-
		20	<i>Sorghum bicolor</i>	87	-
		21	<i>Lactuca sativa</i>	62	-
	Muestra 8 <i>Prosopis laevigata</i>	22	<i>Prosopis laevigata</i>	73	+
		23	<i>Sorghum bicolor</i>	68	+
		24	<i>Lactuca sativa</i>	80	+
	Muestra 9 <i>Parkinsonia praecox</i>	25	<i>Parkinsonia praecox</i>	70	+
		26	<i>Sorghum bicolor</i>	58	+
		27	<i>Lactuca sativa</i>	62	+
	Muestra 10 <i>Prosopis laevigata</i>	28	<i>Prosopis laevigata</i>	67	+
		29	<i>Sorghum bicolor</i>	83	-
		30	<i>Lactuca sativa</i>	80	-
	Muestra 11 <i>Parkinsonia praecox</i>	31	<i>Parkinsonia praecox</i>	70	+
		32	<i>Sorghum bicolor</i>	64	-
		33	<i>Lactuca sativa</i>	59	-

Cuadro 11. Relación entre la colonización de la raíz en plantas trampa y presencia del amplicon esperado (550pb)



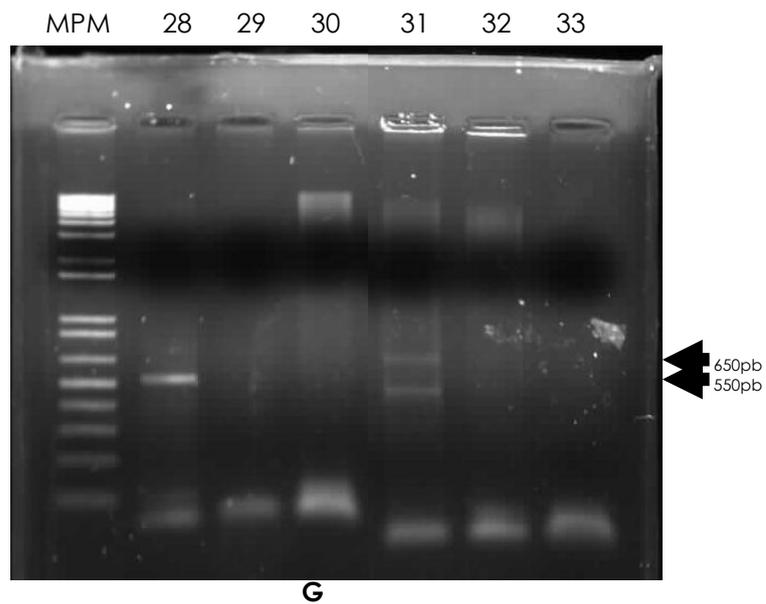
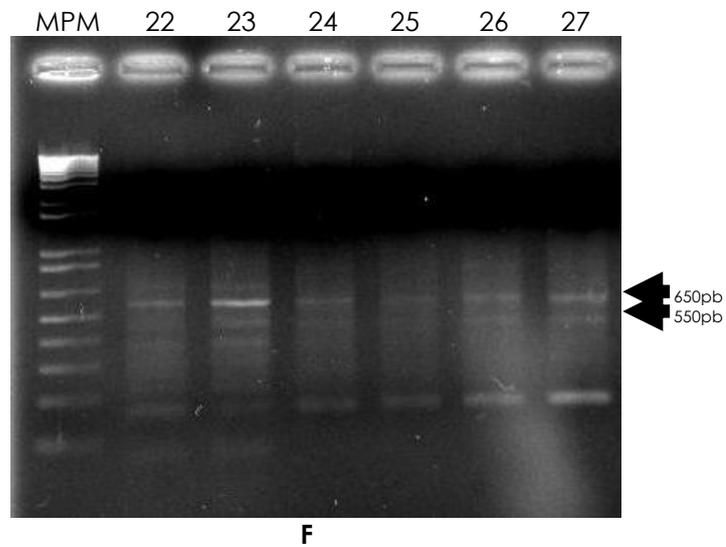


Figura24. Productos de PCR con oligonucleótidos VANS1-NS21 y DNA de raíces de plantas trampa. Para el caso del grupo control se utilizó el cebador 18S para planta. Los carriles C corresponden con el control de reacción (oligonucleótidos 18S), la numeración de los carriles coincide con el cuadro 11

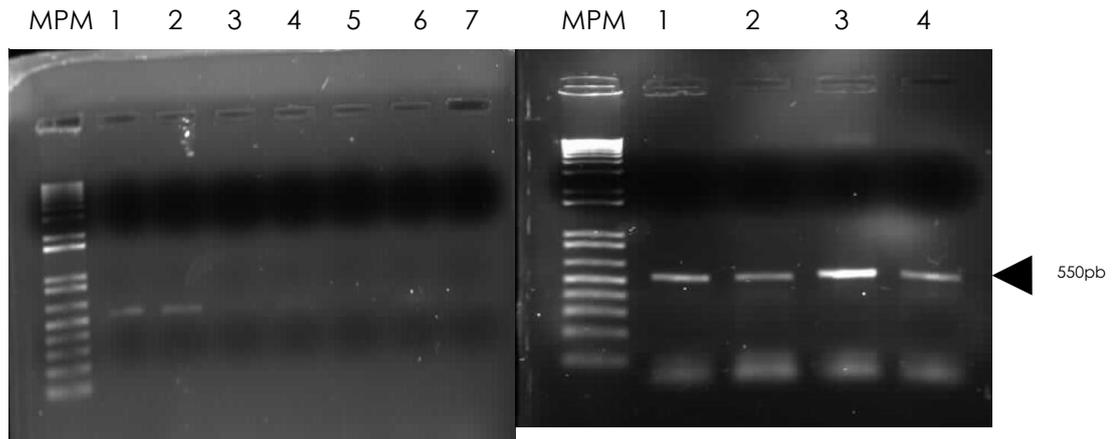


Figura25. Producto de 550pb purificado de algunas de las plantas trampa, en los carriles 1-2 y 8-11 se observa una buena recuperación de material de DNA, en los carriles 3-7 se observa poca recuperación.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las depositadas en las bases de datos (BLAST Basic Local Alignment Search Tool), con el fin de buscar secuencias homólogas y tener una aproximación a su identidad taxonómica. Las secuencias que mostraron identidad significativa se muestran en el Cuadro 12.

Muestra	No. de acceso NCBI	Organismo	Identidad	Porcentaje de identidad
1PpA	Y17640.2	<i>Glomus fasciculatum</i>	508/521	97
	AF213462	<i>Glomus proliferum</i>	514/521	98
	Y17648.3	<i>Glomus manihotis</i>	515/521	98
	L20824.1	<i>Glomus vesiculiferum</i>	517/521	99
	GU140042.1	<i>Glomus intraradices</i>	518/521	99
2SbA	Identidad incierta			
3LsA	GU140042.1	<i>Glomus intraradices</i>	518/523	99
	L20824.1	<i>Glomus vesiculiferum</i>	517/523	98
	AJ852597.1	<i>Glomus clarum</i>	516/523	98
	Y17648.3	<i>Glomus manihotis</i>	515/523	98
	Y17640.2	<i>Glomus fasciculatum</i>	510/523	97
7PpA	Identidad incierta			
16PIA	GU140042.1	<i>Glomus intraradices</i>	399/437	91
	AF213462.1	<i>Glomus proliferum</i>	395/437	90
	U36590.1	<i>Glomus manihotis</i>	394/437	90
	AJ852597.1	<i>Glomus clarum</i>	398/437	91
	AJ249715.1	<i>Glomus coremioides</i>	352/437	80
18LsA	GU140042.1	<i>Glomus intraradices</i>	509/529	96



	L20824.1	<i>Glomus vesiculiferum</i>	508/529	96
	Y17640.2	<i>Glomus fasciculatum</i>	503/529	95
	AJ852597.1	<i>Glomus clarum</i>	505/529	95
	Y17648.3	<i>Glomus manihotis</i>	506/529	95
22PIB	AJ852597.1	<i>Glomus clarum</i>	329/390	84
	AJ249715.1	<i>Glomus coremioides</i>	282/390	72
	Y17648.3	<i>Glomus manihotis</i>	326/390	83
	GU140042.1	<i>Glomus intraradices</i>	326/390	83
	L20824.1	<i>Glomus vesiculiferum</i>	326/390	83
23SbB	GU140042.1	<i>Glomus intraradices</i>	410/528	77
	L20824.1	<i>Glomus vesiculiferum</i>	412/528	78
	AJ852597.1	<i>Glomus clarum</i>	410/528	77
	U36590.1	<i>Glomus manihotis</i>	408/528	77
	Y17640.2	<i>Glomus fasciculatum</i>	482/528	91
24LsB	GU140042.1	<i>Glomus intraradices</i>	403/527	76
	Y17640.2	<i>Glomus fasciculatum</i>	397/527	75
	L20824.1	<i>Glomus vesiculiferum</i>	490/527	92
	U36590.1	<i>Glomus manihotis</i>	482/527	91
	AJ852597.1	<i>Glomus clarum</i>	489/527	92
27LsB	GU140042.1	<i>Glomus intraradices</i>	479/543	88
	L20824.1	<i>Glomus vesiculiferum</i>	478/543	88
	AJ852597.1	<i>Glomus clarum</i>	477/543	87
	Y17640.2	<i>Glomus fasciculatum</i>	469/543	86
	Y17648.3	<i>Glomus manihotis</i>	476/543	87
28PIB	GU140042.1	<i>Glomus intraradices</i>	491/528	92
	L20824.1	<i>Glomus vesiculiferum</i>	490/528	92
	Y17640.2	<i>Glomus fasciculatum</i>	482/528	91
	AJ852597.1	<i>Glomus clarum</i>	489/528	92
	AF213462.1	<i>Glomus proliferum</i>	483/528	91

Cuadro 12. Secuencias depositadas en el Genebank con identidad significativa con las secuencias de HMA obtenidas en este trabajo.

Producto de esta comparación se obtuvieron secuencias homólogas y sometidas a alineamiento múltiple, una vez alineadas se utilizaron para realizar un análisis filogenético utilizando el método de máxima parsimonia evolutiva (Figura 26) y el modelo Jukes & Cantor (Figura 27) de distancia genética.

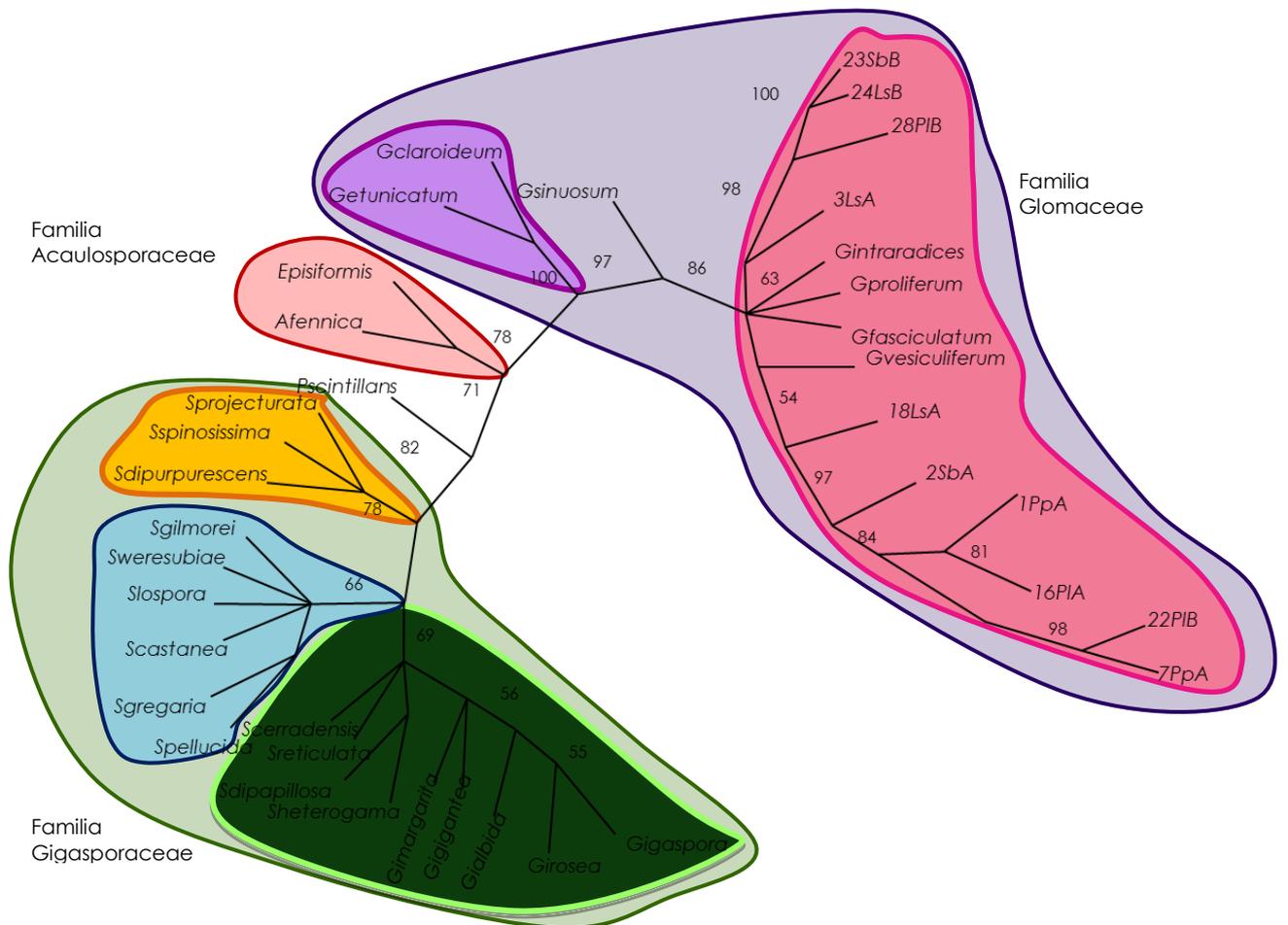


Figura 26. Árbol filogenético sin raíz obtenido con el modelo de máxima parsimonia, utilizando 236 sitios parsimoniosos informativos del amplicon VANS1-NS21. Bootstrap de 1,000 los clados con apoyo menor al 50 fueron colapsadas.

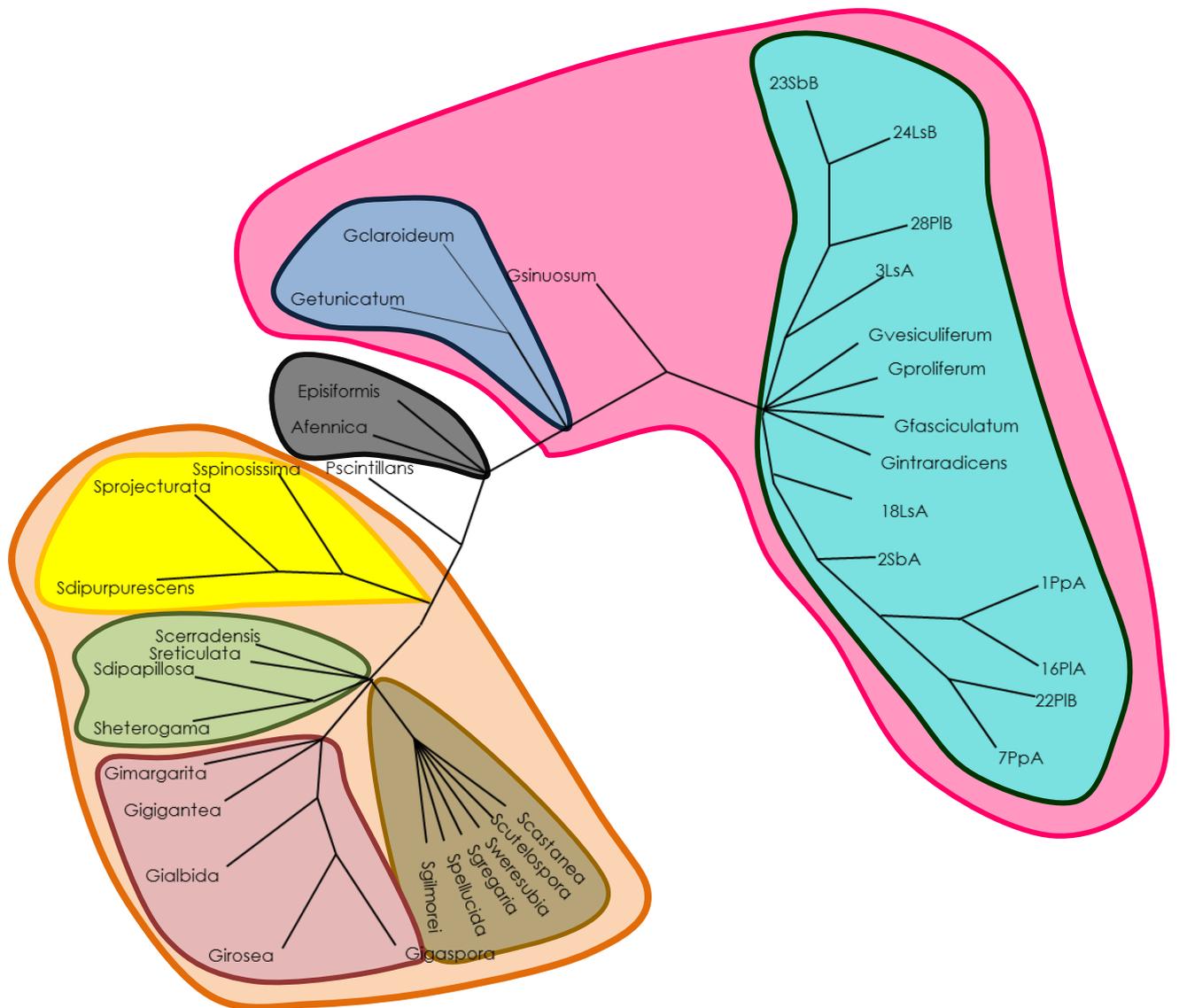


Figura 19. Árbol filogenético sin raíz obtenido con modelo de distancia genética Jukes-Cantor usando 541bp del fragmento VANS1-NS21. bootstrap de 1,000 repeticiones, las ramas con apoyo menor al 50 fueron colapsadas.



Los árboles filogenéticos presentan una estructura general similar. Se puede observar que en ambos árboles algunas especies del género *Scutellospora* agrupan con especies del género *Gigaspora*, mientras que otras especies de *Scutellospora* (*S. projecturata*, *S. Spinossissima*, *S. dipurpurescens*) se separan. Por otro lado, se puede observar que tanto en el árbol por parsimonia como en el árbol por distancia, el género *Glomus* se encuentra bien diferenciado con excepción de *Glomus sinuosum*, *Glomus claroideum* y *Glomus etunicatum* que se encuentran separados del grupo; la distancia entre géneros se muestra en el cuadro 13.

Las secuencias obtenidas de un fragmento de 18S rDNA en este trabajo agrupan con las secuencias del género *Glomus* recuperadas de la base de datos, dicho grupo comprende las especies *Glomus intraradices*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus proliferum* y *Glomus vesiculiferum*; también se observa que las secuencias obtenidas no se agrupan con una especie en particular.

En ambos árboles las secuencias 1PpA y 16 PIA, 23SbB, 24LsB, 7PpA y 22PIB forman grupos independientes.

	Glomus	Scutellospora	Acaulospora	Gigaspora	Endogone	Pascispora
Glomus		0.18	0.19	0.18	0.19	0.18
Scutellospora			0.02	0.01	0.02	0.01
Acaulospora				0.02	0.03	0.03
Gigaspora					0.02	0.08
Endogone						0.03
Pascispora						

Cuadro 13. Distancia entre géneros por el modelo de Jukes-Cantor



DISCUSIÓN

PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN:

Algunos autores han sugerido que en experimentos como el presente, el tiempo necesario para inducir la micorrización no debe ser menor a seis semanas, han probado que al término de este periodo la simbiosis se manifiesta en tinciones de raíz (Zezé *et al.*, en 1997), por lo tanto en este trabajo las plantas se mantuvieron 90 días a partir de la germinación de las semillas. Las esporas de HMA provenientes de Zapotitlán Salinas en ambas zonas de estudio, resultaron ser inóculos exitosos ya que mostraron un alto grado de colonización de raíces ($\bar{x}=70\%$) al paso de los 90 días. Este porcentaje de micorrización es alto en comparación con un estudio realizado por Monroy *et al.*, en 2007, quienes colonizaron plantas trampa de *Prosopis laevigata* y *Acacia farnesiana* con muestras provenientes del Valle de Actopan en Hidalgo obteniendo colonización promedio de 50% al paso de 330 días de inoculación; con este porcentaje de inoculación obtuvieron un mayor porcentaje de sobrevivencia de plantas micorrizadas cuando fueron transplantadas al campo, con relación a las no micorrizadas. Este resultado y los porcentajes de micorrización obtenidos en este trabajo sugieren que el consorcio micorrízico de Zapotitlán Salinas, puede provocar una respuesta similar en el caso de la reintroducción de especies vegetales nativas de la zona.

Para los objetivos del presente trabajo, la micorrización promedio (70%) tras 90 días de la germinación fue suficiente para obtener DNA de los HMA; Di Bonito *et al.*, reportaron que micorrización menores al 30% no asegura extracciones y amplificaciones exitosas.



DENSIDAD DE ESPORAS:

El promedio de esporas en la zona A es 375 y 435 para la B, este resultado coincide con el reportado por Camargo & Esperón en 2005 quienes encontraron en promedio 568 esporas en 100 gr de suelo (de 440 hasta 1330 esporas) en cuatro municipios del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. El número promedio de esporas viables es 235 en la zona A y 192 en la B. Así la densidad de esporas viables es baja comparada con el encontrado por Montañó en el 2000, quien reportó un rango de 2915 a 4411 esporas en 100gr de suelo de la rizósfera de *Prosopis laevigata* en un ambiente semiárido en el Valle de Actopan. Un factor que puede determinar la diferencia entre nuestros resultados y los obtenidos por Montañó 2000, es que la cobertura vegetal de su zona de muestreo era más diversa y abundante, y se encontraba en una zona con bajo índice de perturbación.

De acuerdo con diversos autores, la esporulación puede variar de acuerdo a la especie de HMA y de la planta hospedera, de acuerdo con los resultados obtenidos se puede sugerir que *P. praecox* en condiciones perturbadas favorece el incremento de esporas en suelo a pesar de que no se encontró una diferencia significativa entre el número de esporas en la rizósfera de *Prosopis laevigata* y *Parkinsonia praecox*, lo cual puede explicarse considerando que ambas plantas pertenecen a la superfamilia de las leguminosas, y su función ecofisiológica es similar.

El promedio de esporas encontradas en la rizósfera *Prosopis laevigata* fue mayor en la zona A, aunque como ya se mencionó no hay diferencia significativa. Resultados similares fueron encontrados por Reyes *et al.*, en el 2000, quienes reportaron que la cantidad de microorganismos (incluyendo a los HMA) disminuye en la zona erosionada; estos autores consideran que la disminución en la cantidad de microorganismos puede ser relacionada con la cantidad de materia orgánica, la baja fertilidad del suelo y cambios físicos y químicos.

El número de esporas en el suelo asociado a *Parkinsonia praecox*, es mayor en la Zona B, aunque no existió diferencia significativa, esto puede ser debido a que la distancia entre ambas zonas no es una distancia considerable y que por tanto las condiciones biológicas químicas y físicas no variación al grado para ejercer presiones de selección diferenciales que se manifiesten en la diversidad de los consorcios micorrízicos.

Durante el periodo evaluado el número de esporas no se incrementó significativamente en las plantas inoculadas y mantenidas en el laboratorio. Para explicarlo vale considerar que las esporas son la forma latente de los HMA de manera



que su ausencia se puede deber a las condiciones que favorecieron la colonización pero no la esporulación en las plantas trampa. Así, a pesar del bajo número de esporas el porcentaje de micorrización fue alto. Esta hipótesis está apoyada en conclusiones de diversos autores quienes indican que el número de esporas en el suelo no se relaciona con la presencia de los hongos en las raíces (Clapp *et al.*, 1995; Katsuharu *et al.*, 2000; Martínez & Pugnaire, 2009; Redecker, 2000; Merryweather & Fitter, 1998). De esta manera, a pesar que no hubo aumento significativo en el número de esporas o incluso disminución (muestra 4 de *Prosopis*, y 7, 9 y 11 de *Parkinsonia praecox*) no podemos concluir que el inóculo no sea eficiente, vale la pena contrastar este resultado con el reportado por Monroy *et al.*, quien utilizó un inóculo obtenido de plantas de mezquite y huizache con una densidad de 1500 esporas en 100gr de suelo y al paso de 11 meses obtuvo un 50% de micorrización.



EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL DNA DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES:

Como se mencionó en los resultados, las amplificaciones con los oligonucleótidos VANS1 Y NS21 produjeron fragmentos de distintos tamaños, frecuentemente en los geles sobresalía por su intensidad un fragmento de 550 pb. Un fragmento de ese tamaño ha sido reportado por diversos autores (Simon *et al.*, 1991; Simon *et al.*, 1992; Di Bonito *et al.*, 1995; Redecker, 2000; Katsuharo *et al.*, 2000) cuando trabajaron con DNA de plantas micorrizadas en esos trabajos demostraron que esa secuencia pertenece a HMA, por lo que la presencia de esa banda en nuestras amplificaciones fue considerada como evidencia de DNA de HMA. En este trabajo, como se mencionó, se amplificaron fragmentos de tamaño mayor (entre 650 y 1000 pb), los cuales corresponden con productos no específicos, este resultado concuerda con los obtenidos en los trabajos de Di Bonito *et al.*, y Simon *et al.*, quienes reportaron que al amplificar por PCR con los oligonucleótidos VANS1-NS21 usando DNA de raíz obtuvieron productos no específicos de mayor peso. En el trabajo de Simon *et al.*, obtuvieron una sola banda de 550pb al amplificar DNA extraído de esporas, por otro lado, al utilizar DNA de raíz de puerro micorrizado con inóculos mono-específicos, el producto obtenido consistió de al menos dos bandas: de 600pb y 550pb, a pesar de que no secuenciaron el fragmento mayor, mencionan que extrajeron DNA a otros microorganismos del suelo y obtuvieron bandas tenues de varios tamaños. El inóculo utilizado en este trabajo fue colectado en el campo, y muy seguramente contiene diversos microorganismos que componen la rizósfera y establecen asociaciones con las raíces así que las bandas tenues en el producto de PCR pueden provenir de esos microorganismos.

Adicionalmente, la secuencia del oligonucleótido específico fue sometido a comparación con las secuencias de la base de datos (Blast), el resultado indica que la secuencia de ese oligo tiene secuencias probablemente homólogas en (identidad de 100%) genomas de diversos organismos (bacterias, hongos, plantas y humanos inclusive). Por estas razones se omitió la secuenciación de los fragmentos no específicos.

Debido a la existencia de múltiples bandas en los productos de PCR se optó por purificar la banda de 550 pb a partir del gel de agarosa, para eso se utilizó un sistema de purificación basado en membranas de sílica gel. A pesar que los proveedores prometen una eficiencia de recuperación mayor al 95%, en nuestros casos la recuperación disminuyó entre 10 y 20 veces. Es probable que esta disminución en la



concentración del producto provocara que no se obtuviese una secuenciación eficiente en todos los casos.

Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en las bases de datos del NCBI, los resultados (Cuadro 11) indican que la identidad de estas secuencias es mayor con las correspondientes a HMA del género *Glomus* exceptuando a las muestras 2SbA y 7PpA para las cuales no se encontró identidad significativa. Dado que la identidad de estas secuencias es semejante con varias especies del género, este resultado se consideró no determinante, por lo que se consideró necesario realizar un análisis informático utilizando modelos evolutivos con los cuales se considera no solamente el número de residuos idénticos sino también su naturaleza.

En los dendogramas obtenidos con modelos de distancia y máxima parsimonia, se puede observar una agrupación por familias (Acaulosporaceae, Pascisporaceae, Gigasporaceae y Glomaceae). Ambos árboles agrupan al género *Scutellospora* con *Gigaspora* debido a que ambos géneros corresponden a la familia Gigasporaceae y la divergencia genética entre estos géneros sea baja.

Se observa que las secuencias obtenidas en este trabajo no agrupan con secuencias de una sola especie de *Glomus* si no que se incluyen en un grupo integrado por *Glomus intraradices*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus proliferum* y *Glomus vesiculiferum*, de manera que este análisis nos permite confirmar que las secuencias corresponden con el género *Glomus*, aunque no establece su identidad específica.

En los árboles filogenéticos elaborados con esta región del gen SSUrDNA, es notorio que tres especies del género *Glomus* (*G. sinuosum*, *G. claroideum* y *G. etunicatum*) se separan del grupo principal. Kramadibrata *et al.*, trabajaron con un fragmento del gen SSU rDNA y realizaron un análisis filogenético mediante parsimonia y neighbour-joining reportando que *Glomus etunicatum* se separa de *Glomus vesiculiferum* y *G. intradacices*. Estos resultados nos sugieren que el fragmento 18S de los HMA posee la suficiente información para establecer su naturaleza específica, no obstante, es necesario incrementar la información en la bases de datos acompañada de las evidencias utilizadas en su determinación taxonómica.

En este trabajo se demostró que el fragmento de aproximadamente 550pb amplificado con los oligonucleótidos VANS1 y NS21 corresponde con HMA, indican también que el género *Glomus* está en el suelo de Zapotitlán Salinas, y es quien establece la micorriza con las plantas trampa en el laboratorio.

Beena *et al.*, en el 2000, reportaron los géneros *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Sclerocystis* y *Glomus* en zonas áridas, siendo este último el encontrado con mayor frecuencia; en



contraste Camargo y Esperón en 2005, determinaron la riqueza de especies de HMA en el suelo del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, encontrando que *Acaulospora* y *Glomus* son los géneros dominantes. Monroy *et al*, mencionan la posibilidad de que este género domine debido a que promueve el crecimiento y el establecimiento de las plantas hospederas, mientras que los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* se encargan de promover el desarrollo de la red hifal en ecosistemas maduros. Tomando en cuenta este supuesto, se podría explicar la presencia de *Glomus* en las raíces de las plantas trampa, ya que estas se inocularon desde la germinación y la simbiosis se estableció durante las primeras etapas del desarrollo de la planta, por lo que se favoreció la simbiosis con dicho género, es probable que al dejar pasar más tiempo de crecimiento de las plantas, se pueda encontrar el establecimiento de la simbiosis con otros HMA de acuerdo con las necesidades del hospedero. Martínez & Pugnaire, mencionan que se ha demostrado que las familias de HMA han evolucionado al grado de que sus funciones ecológicas son complementarias entre sí, ya que por ejemplo las Gigasporas son efectivas para incrementar la absorción del fósforo por la planta, de la misma manera se ha demostrado que la productividad de una comunidad vegetal es mayor si interaccionan con más de una familia de HMA.

Como ya se mencionó nuestros resultados no permitieron determinar la naturaleza específica de los hongos que está establecieron la micorriza, así como saber si hay otro género de HMA estableciendo esta simbiosis en menor grado, por lo que se propone realizar en futuros trabajos una amplificación de un fragmento de DNA con el cebador específico para HMA VANS1, en conjunción con oligonucleótidos específicos para familias como VAGLO (*Glomus*), VAACAU (*Acaulospora*) y VAGIGA (*Gigaspora* y *Scutellospora*), de manera que se pueda ampliar la información obtenida.



CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir:

- ☆ El tiempo necesario para inducir la micorrización es de 90 días en condiciones controladas.
- ☆ Una micorrización promedio del 70%, es suficiente para obtener DNA proveniente de HMA.
- ☆ El porcentaje de viabilidad de HMA en Zapotitlán Salinas es relativamente alto en ambas zonas de estudio.
- ☆ El número de esporas viables encontradas durante la temporada de lluvias es bajo en comparación con los reportados por otros autores.
- ☆ En zonas con mayor grado de perturbación se observa una disminución en cuanto a la densidad de esporas.
- ☆ La comunidad de HMA provenientes de Zapotitlán Salinas es una comunidad con un gran potencial infectivo dado que un número bajo de esporas puede establecer la simbiosis de manera exitosa.
- ☆ Los oligonucleótidos VANS-1NS21 amplifican una región de 550pb específica para HMA.
- ☆ Las secuencias obtenidas en este trabajo, pertenecen al género *Glomus*, de acuerdo con los modelos evolutivos utilizados.
- ☆ El género *Glomus* se encuentra en la rizósfera de Zapotitlán Salinas y es quien establece la simbiosis micorrízica con las plantas trampa.

Este trabajo abona la propuesta del uso de herramientas moleculares en apoyo para la identificación taxonómica, ya que mediante estas se pudo establecer el género que coloniza a las plantas trampa.

Sin embargo se abren muchos campos para la investigación, se propone que se determine si hay otros géneros de HMA colonizando la raíz o si solamente es el género *Glomus* el que se encuentra estableciendo la simbiosis. En caso de que el género *Glomus* sea el único que coloniza, tal vez se podría evaluar el impacto en el crecimiento y desarrollo de la planta en condiciones estresantes, lo cual es de suma importancia, ya que como diversos autores han propuesto, permitiría proyectos de conservación y restauración mediante la propagación de plantas originarias de Zapotitlán Salinas y promover su propagación en invernaderos de modo de promover el establecimiento de la simbiosis micorrízica con esporas de HMA provenientes de la zona ya que como en este estudio se demostró son cultivos con alto potencial infectivo además de que se ha reportado que hay mayor efecto si se utilizan como



inóculos esporas originarias de la zona de estudio que si se utilizan HMA aún de la misma especie pero de ecosistemas diferentes.

Por otro lado valdría la pena investigar las respuestas fisiológicas de la planta a cada género de HMA, para poder realizar una evaluacin del éxito en la supervivencia en caso de la restauración vegetal.



REFERENCIAS

Aguilera, G.L.; Olalde, P.V.; Ariaga, M.R. & Contreras, R.A. (2008). "Micorrizas arbusculares". *Ciencia Ergo Sum, Universidad Autónoma del Estado de México*. 14(3)-300-306.

Allen, M.F. (2007). "Mycorrhizal fungi: Highways for water and nutrients in arid soils". *Vadose Zone Journal* 6:291-297.

Arias, A.; Valverde, M. & Reyes, J. (2000). "Las plantas de la región de Zapotitlán Salinas, Puebla". *Instituto Nacional de Ecología*. pp63.

Azcón, R. (2000). "Papel de la simbiosis micorrízica y su interacción con otros microorganismos rizosféricos en el crecimiento vegetal y sustentabilidad agrícola". CSIC. Granada, España.

Bago, B.; Azcón, C.; Shachar, Y. & Pfeffer, P. (2000). "El micelio externo de la micorriza arbuscular como puente simbiótico entre la raíz y su entorno". *Ecología, Fisiología y Biotecnología de la Micorriza Arbuscular*. pp. 78-92.

Beena, K.R.; Raviraja, A.B. & Sridhar, K.R. (2000). "Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi on the coastal sand dunes of west coast of India". *Current Science* 79: 1459-1466.

Camargo, R. S. & Esperón, R. M. (2005). "Effect of the spatial and seasonal soil heterogeneity over arbuscular mycorrhizal fungal spore abundance in the semi-arid Valley of Tehuacán-Cuicatlán, México". *Rev. Biol. Trop.* 53(3-4):339-52

Cervantes, R. (2002). "Plantas de importancia económica en las zonas áridas y semiáridas de México". México, D.F. Instituto de Geografía UNAM. 155 pp.

Chelius, M. K. & Triplett, E. W. (1999). Rapid detection of arbuscular mycorrhizae in roots and soil of an intensively managed turfgrass system by PCR amplification of small subunit rDNA. *Mycorrhiza* 9:61-64.

Chung, P. (2005). "Hongos micorrízicos comestibles. Opción productiva aplicada a las plantaciones forestales". *INFOR* . 55p.

Clapp, J.P.; Fitter, A.H. & Young, J.P. (1999). "Ribosomal small subunit sequence variation within spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora* sp." *Molecular Ecology* 8:915-921.

Clapp, J.P.; Young, J.P.; Merryweather, J.W. & Fitter, A.H. (1995). "Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community". *New Phytologist* 130:259-265.



CONABIO.(2008). "<http://www.conabio.gob.mx/institucion/cooperacion_internacional/doctos/dbt_mexico.html>.

Dávila, P.; Arizmendi, M.; Valiente, A.; Villaseñor, L.; Casas, A. & Lira, R. (2001). "Biological Diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, México". *Biodiversity and Conservation*. 11:421-422.

De la Rosa, J. & Monroy, A. (2006). "Mosaicos de vegetación para la restauración ecológica en una zona semiárida". *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 9(2):96-100.

Di Bonito, R.; Elliott, M.L. & Des Jardin, E.A. (1995). "Detection of an Arbuscular Mycorrhizal Fungus in roots of different plant species with the PCR". *Applied and Environmental Microbiology* 61(7):2809-2810.

García, M. M. & Tapia, M. M. (2007). "Aspectos demográficos de *Prosopis laevigata* y *Parkinsonia praecox*, especies utilizadas como leña en Colonia San Martín, Zapotitlán Salinas, Puebla". Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. pp.83

Gouy, M.; Guindon, S. & Gascuel, O. (2010). "Seaview versión 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building". *Molecular Biology and Evolution* 27(2):221-224.

Guzmán, G.S. & Farías, L.J. (2005). "Biología y regulación molecular de la micorriza arbuscular". *Avances en investigación agropecuaria* 9(2): 17-31.

Hernández, L.; Castillo, S. & Guadarrama, P. (2003). "Hongos Micorizógenos arbusculares del Pedregal de San Ángel". Facultad de Ciencias UNAM. pp13-28.

Honrubia, M. (2009). "Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años". *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. Vol. 66S1. pp 133-144.

Katsuharu, S.; Aya N. & Kazuo S. (2000). "DNA Extraction from Arbuscular Mycorrhizal roots of *Miscanthus sinensis* Anderss. Collected in the Native Grassland". *Grassland Science* 46 (2):182-184.

Kramadibrata, K.; Walker, C.; Schwarzott, D. & Schübler A. (2000). "A new species of *Scutellospora* with a colied germination Shield". *Annals of Botany* 86: 21-27.

Labrada, A. G. (2005). "Propagación *in vitro* de *Parkinsonia praecox* (Ruiz & Pavón) Hawkins (Caesalpiniaceae) del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla". Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 55pp.

Lodish, H.; Berk A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C.; Krieger, M.; Scott, M.; Zipursky, S. & Darnell, J. 2006. "Biología Celular y Molecular" 5ªed. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana. 973 p.



Martínez, L.B. & Pugnaire, F.I. (2009). "Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos". *Ecosistemas* 18(2): 44-54.

Merryweather, J. & Fitter, A. (1998). "The arbuscular mycorrhizal fungi of *Hyacinthoides non-scripta*". *New Phytol.* 138:177-129.

Monroy, A.A.; Estevez, T.J.; García, S.R. & Ríos, G.R. (2007). "Establecimiento de plantas mediante el uso de micorrizas y de islas de recursos en un matorral xerófilo deteriorado". *Bol. Soc. Méx.* 80:49-57.

Montaño, A.N. (2000). "Potencialidad de los Hongos Micorrizógenos Arbusculares de las islas de fertilidad de Mezquite (*Prosopis laevigata*) de dos agostaderos semiáridos del valle de Actopan, México Central. Un enfoque ecológico para recuperar la vegetación". Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. 159pp.

Montaño, A.N.; Camargo, R.S.; García, S.R. & Monroy, A.A. (2008). "Micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos". Mundi-Prensa SA de CV, Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT, UAM-Iztapalapa, FES-Zaragoza-UNAM. Mexico, Distrito Federal.

Montoya, A. R.; Padilla, R. J. & Standford C. S. (2003). "Valoración de la calidad y fragilidad visual del paisaje en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla (México). *Boletín de la A.G.E* 35:123-126.

Nicholas, K. B. & Nicholas, H.B. Jr. (1997). "GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments": Distributed by the author.

Paredes, F. M.; Lira, S. R. & Dávila, A. P. (2007) "Estudio etnobotánico de Zapotitlán Salinas, Puebla". *Acta Botánica Mexicana*. 79:13-61.

Perroni, V.Y (2007). "Islas de Fertilidad en un ecosistema semiárido: Nutrientes en el suelo y su relación con la diversidad vegetal". Tesis de doctorado, Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Veracruz. 100pp.

Posada D. (2008). "jModelTest: Phylogenetic Model Averaging". *Molecular Biology and Evolution*. 25: 1253-1256.

Reddy, S.R.; Pindi, P.K. & Reddy, S.M. (2005). "Molecular methods for research on arbuscular mycorrhizal fungi in India: Problems and prospects". *Current Science* 89(10):1699-1709.

Redecker, D. (2000). "Specific PCR oligonucleótidos to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots". *Mycorrhiza*. 10:73-80



Reyes, I. (2002). "Asociaciones biológicas en el suelo: La micorriza arbuscular (MA)". Departamento de Biología. División de CBS. UAM-I. 44:5-10.

Reyes, Q. C.; Ferrera, C. R.; Alarcón, A. & Rodríguez Z. S. (2000). "Microbiología de la relación de nodricismo entre leguminosas arbóreas y *Neobuxbaumia tetetzo* en suelos no erosionados y erosionados en Zapotitlán Salinas, Puebla". Ecología, Fisiología y Biotecnología de la Micorriza Arbuscular. Mundi Prensa, México pp 56-58.

Reinert, K.; Stoye, J. & Will T. (2000). "An iterative method for faster sum-of-pairs multiple sequence alignment". Bioinformatics 16(9):808-214.

Rosas, L. R. (2006). "Aspectos etnobotánicos y demográficos de *Parkinsonia praecox* (Ruiz & Pavón) Hawkins, especie útil de Zapotitlán Salinas, Puebla". Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. 73pp.

Rzedowski, J. (2006). "Vegetación de México". 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México

Sánchez, M.; Ramírez, P. & Torrescano, N. (2000). "Micorriza arbuscular y *Rhizobium* presentes en leguminosas establecidas en suelo andosol". Ecología, Fisiología y Biotecnología de la Micorriza Arbuscular. pp46-55.

Simon, L.; Lalonde, M. & Bruns, T. (1991). "Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from Vesicular-Arbuscular Endomycorrhizal Fungi colonizing roots". Applied and Environmental Microbiology 58(1):291-295.

Simon, L.; Lévesque, R.C. & Lalonde M. (1992). "Rapid Quantitation by PCR of Endomycorrhizal Fungi Colonizing Roots". PCR Methods and Applications 2:76-80.

Smith, S.E. & Read, D.J. (2008) En: Imhof, S. (2009). "Arbuscular, ecto-related, orchid mycorrhizas- three independent structural lineages towards mycoheterotrophy: implications for classification?". Mycorrhiza 19:357-363.

Swofford, D. L. (2002). "PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Syzmon, Z.; Katarzyna, T.; Merope, M. & Reto, S. (2008). "Response of endangered plant species to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria". Mycorrhiza 19:113-123.

Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997). "The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." Nucleic Acids Research, 25:4876-4882.

Walter, H. (1977). "Zonas de vegetación y clima". Omega. Barcelona. 256pp.



Wharton, D. & McCarty R. (1972). "Experiments and methods in Biochemistry. Mc Millan pub. New York.

Yamato, M. (2001). "Identification of a mycorrhizal fungus in the roots of achlorophyllous *Sciaphila tosaensis* Makino (Triuridaceae)". *Mycorrhiza* 11:83-88.

Young, N. D. & Healy, J. (2003). "GapCoder automates the use of indel characters in phylogenetic analysis" *Biomedcentral Bioinformatics* 4:6.

Zeze, A.; Sulistyowati, E.; Ophel, K. K.; Barker, S. & Smith, S. (1997). "Interresporal genetic variation of *Gigaspora margarita*, a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus, revealed by M13 minisatellite-primed PCR". *Applied and Environmental Microbiology*. 63(2):676-678.



ANEXOS

ANEXO I

ESCARIFICACIÓN Y DESINFECCIÓN DE SEMILLAS

Materiales y Soluciones:

- * Vaso de precipitados
- * Ega-pack
- * H₂SO₄ concentrado
- * Hipoclorito 1:1
- * Hipoclorito 1:3
- * Agua destilada

1. Colocar las semillas de *Prosopis laevigata* y *Parkinsonia praecox* durante 15 y 30 minutos respectivamente.
2. Neutralizar con bicarbonato, para posteriormente lavar en agua destilada.
3. Para el caso de las semillas de *Lactuca sp.* y *Sorghum sp.* lavar en Hipoclorito 1:3 durante 10 minutos para *Lactuca sp.* y en hipoclorito 1:1 durante 15 minutos para el caso de *Sorghum sp.*
4. Lavar perfectamente en agua destilada.
5. Todas las semillas se colocan en imbibición en agua durante toda la noche y perfectamente cerradas.
6. Una vez en imbibición están listas para ser germinadas.



ANEXO II

SOLUCIÓN MINERAL DE LONG ASHTON (6ppm de fósforo).

KNO ₃	0.808gr
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.944gr
NaH ₂ PO ₄ · 4H ₂ O	0.184gr
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.368gr
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.0022gr
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.00025gr
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.00029gr
H ₃ BO ₃	0.00310gr
NaCl	0.0059gr
(NH ₄) ₂ MoO ₇ · 2H ₂ O	0.000088gr
FeCl ₂	0.25gr
Ácido cítrico	0.049
Agua destilada	1000 ml



ANEXO III

DETERMINACIÓN DE PORCENTAJE DE COLONIZACIÓN MICORRÍZICA VESÍCULO ARBUSCULAR EN RAÍCES (Phillips y Hayman 1970).

Material y Soluciones:

- | | |
|---------------------------|---------------------------------------|
| * Cápsulas esterilizables | * HCL 10% |
| * Portaobjetos | * Lactoglicerol (Apéndice I) |
| * Cubreobjetos | * Azul tripano 0.05% en lactoglicerol |
| * Microscopio óptico | * Esmalte |
| * KOH 10% | * Agua destilada |
| * H2O2 10% | |

Procedimiento:

1. Para la tinción de las raíces, colocar raíces libres en cápsulas esterilizables en un vaso de precipitados y agregar KOH al 10% hasta cubrir las.
2. Calentar durante 10 minutos a 10 libras de presión (Clareo).
3. Retirar el KOH y enjuagar las raíces con agua destilada.
4. Agregar H2O2 al 10% hasta cubrir las durante 3 minutos y enjuagar las raíces con agua destilada (Blanqueo).
5. Cubrir las raíces con HCl al 10% durante 3 minutos, posteriormente se retira el ácido (Acidificación).
6. Sin enjuagar, se cubren las cápsulas con azul tripano 0.05% en lactoglicerol y se calienta a 10 minutos a 10 libras de presión (Tinción).
7. Eliminar el colorante y decolorar las raíces con lactoglicerol limpio (Decoloración).
8. Colocar 20 segmentos de raíz de aproximadamente 1 cm, de forma paralela en el portaobjetos.
9. Adicionar gotas de lactoglicerol y sellar las laminillas con esmalte.
10. Observar al microscopio a 100x.
11. Si un segmento tiene hifas, vesículas y / o arbusculos, independientemente de la intensidad de micorrización, se le da el valor de uno para la evaluación total y por estructuras.
12. Determinar la colonización endomicorrízica mediante las siguientes fórmulas:



$$\text{PORCENTAJE DE COLONIZACIÓN TOTAL} = \frac{\text{Número de segmentos colonizados}}{\text{Número de segmentos totales}} \times 100$$

$$\text{PORCENTAJE DE COLONIZACIÓN POR VESÍCULAS} = \frac{\text{Número de segmentos con vesículas}}{\text{Número de segmentos totales}} \times 100$$

$$\text{PORCENTAJE DE COLONIZACIÓN POR ARBÚSCULOS} = \frac{\text{Número de segmentos con arbúsculos}}{\text{Número de segmentos totales}} \times 100$$



ANEXO IV

EXTRACCIÓN DE ESPORAS POR GRADIENTE DE SACAROSA

- | | |
|------------------------------------|-------------------------------|
| * Vaso de precipitados de 1000 ml. | * Centrifuga |
| * Tamiz de 600 μ de apertura. | * Microscopio estereoscópico. |
| * Tamiz de 45 μ de apertura. | * Sacarosa al 60% |
| * Tubos para centrifuga | * Sacarosa al 20% |

1. Colectar 100 gr de suelo en un vaso de precipitados de 1000 ml y agregar agua de la red potable.
2. Agitar manualmente durante 5 minutos y dejar decantar hasta que el material más denso este en el fondo.
3. Pasar el sobrenadante por dos tamices, el primero de una apertura de 600 μ y el segundo de 45 μ .
4. Se repite dos veces el paso 2 y 3.
5. Recuperar el material obtenido en el segundo tamiz y pasarlo a un tubo de centrifuga de 40ml de capacidad.
6. Agregar 10ml de sacarosa al 60% y posteriormente 10ml de sacarosa al 20%, esto se hace lento para no romper el gradiente.
7. Centrifugar durante 3 minutos a 3,500 rpm y extraer las esporas que quedan flotando.
8. Observar al microscopio estereoscópico y contar en caja Petri.



ANEXO IV-A

EXTRACCIÓN DE ESPORAS POR GRADIENTE DE SACAROSA CON MODIFICACIONES POR CHIMAL SÁNCHEZ.

Material y Soluciones

- | | |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| * Vaso de precipitados de 1000 ml. | * Centrifuga. |
| * Tamiz de 600 μ de apertura. | * Cajas de petri. |
| * Tamiz de 45 μ de apertura. | * Microscopio estereoscópico. |
| * Licuadora?? | * Sacarosa al 50%. |
| * Tubos para centrifuga. | * Hexametáfosfato de sodio al 5%. |

Procedimiento

1. Se toman 100gr de suelo, se colocan en un vaso de precipitados de 1000 ml con agua de la red potable y Hexametáfosfato de sodio al 5%.
2. Mezclar durante 5 minutos en licuadora y dejar reposar durante 30 segundos.
3. Filtrar el sobrenadante a través de los tamices de 600 μ y 45 μ .
4. Repetir los pasos del 1 al 3, tres veces más.
5. Recuperar la muestra de suelo en el tamiz de 45 μ en tubos de plástico con agua de la red potable y centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos y eliminar el sobrenadante ya que aquí se eliminan las esporas no viables y la materia orgánica
6. Agregar sacarosa al 50% a la pastilla contenida en el tubo y centrifugar a 1000rpm durante 3 minutos y pasar el sobrenadante por el tamiz de 45 μ y enjuagar con agua de la red potable para eliminar la sacarosa y recuperar las esporas de HMA viables.
7. Vaciar el contenido del tamiz de 45 μ en una caja de petri cuadrículada para su conteo y observación en el microscopio.



ANEXO V

PROTOCOLO DE VIABILIDAD DE ESPORAS POR TINCIÓN CON FUCSINA ÁCIDA (KOUGH *ET AL.*, 1987; MODIFICADA POR SCHAFFER Y PETERSON, 1993 Y BRUNDRETT *ET AL.*, 1994), EN COMBINACIÓN CON LA TÉCNICA DE VIABILIDAD DE ESPORAS DE HMA (AN Y HENDRIX, 1988)

Material y soluciones:

- * Tubos de ensaye.
- * Cajas de Petri
- * Solución azul de tetrazolio (Apéndice I)
- * Solución salina-formol (Apéndice I)
- * Ácido fucsínico/láctico (Apéndice I)

Procedimiento:

1. Lavar las esporas con agua destilada.
2. Incubar en tubos de ensaye a temperatura ambiente durante toda la noche a oscuridad en solución de azul de tetrazolio.
3. Enjuagar 3 veces con agua destilada.
4. Fijar las raíces en una solución salina-formol por una hora en oscuridad y lavar las esporas con agua destilada.
5. Acidificar las esporas en HCl al 1% por 5 minutos.
6. Tinción de contraste por una hora en tubos de ensaye a 75°C en estufa con ácido fucsínico/ácido láctico.
7. Observar las esporas en microscopio estereoscópico, las esporas teñidas son las esporas viables.



ANEXO VI

TÉCNICA ANALÍTICA PARA CUANTIFICACIÓN DE FOSFATO LIBRE POR EL MÉTODO MODIFICADO DE TAUSSKY Y SHORR

Materiales y reactivos:

- * Tubos de ensaye.
- * Gradilla de tubos de ensaye.
- * Tubos endorf.
- * Pipetas de 10 ml.
- * Pipetas de 5 ml.
- * Pipetas de 1 ml.
- * Vaso de precipitados 100 ml.
- * Probeta de 50 ml.
- * Cronómetro.
- * Balanza analítica.
- * Espectrofotómetro de luz visible.
- * Cubeta de vidrio 3 ml.
- * TCA 0.5 N (Apéndice I)
- * Reactivo de color (Apéndice I)
- * KH_2PO_4 1mM.

Procedimiento:

1. Pesar 0.1gr de muestra de suelo y colocarlas en tubos endorf etiquetados y agregar 1ml de TCA al 0.5 N a cada tubo.
2. Agitar en vortex durante 3 minutos.
3. Centrifugar a 10,000 rpm durante 3 minutos; recuperar el sobrenadante y colocarlo en tubos de ensaye para su posterior lectura en el espectrofotómetro, aforar a 1ml con agua destilada si fuera necesario.
4. Elaborar una curva patrón con KH_2PO_4 como sigue:
 - Blanco: 2ml de TCA.
 - 0.1 ml KH_2PO_4 +1.9 ml TCA
 - 0.2 ml KH_2PO_4 +1.8 ml TCA
 - 0.3 ml KH_2PO_4 +1.7 ml TCA
 - 0.4 ml KH_2PO_4 +1.6 ml TCA
 - 0.5 ml KH_2PO_4 +1.5 ml TCA
5. Adicionar 1 ml de reactivo de color a todos los tubos desfasados por 30 segundos para incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Al paso de 10 minutos, leer la absorbancia a 600 nm.
7. Graficar concentración contra U Abs para construir la curva patrón e interpolar las concentraciones de la muestra problema. Considerar el volumen empleado para la determinación y la cantidad de muestra para expresar la concentración final.



ANEXO VII

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN ZR PLANT/SEED DNA KIT™

1. Antes de empezar, se debe preparar la columna IV-HRC, se retira la base, y centrifugar a 8,000Xg, durante 3 minutos, esto con el fin de eliminar polisacáridos y polifenoles.
2. Añadir 150mg de raíz y moler en mortero en 750µl de Buffer de lisis y agitar en vortex durante 1 minuto.
3. Centrifugar a 10,000Xg durante un minuto y transferir el sobrenadante al tubo IV Spin Filtre y centrifugar a 7,000 rpm durante un minuto.
4. Añadir 1,200µl de Plant/Seed DNA Binding Buffer al filtrado en el tubo colector y mezclar.
5. Transferir 800µl de la mezcla a la columna IIC en un tubo de colección y centrifugar a 10,000Xg durante 1 minuto.
6. Eliminar el eluido y repetir el paso anterior.
7. Añadir 200µl DNA-Pre Wash Buffer al la columna IIC en un nuevo tubo de colección y centrifugar a 10,000Xg durante 1 minuto.
8. Añadir 500µl Plant/Seed DNA wash buffer a la columna IIC y centrifugar a 10,000Xg durante 1 minuto.
9. Transferir la columna IIC a un tubo de colección nuevo y añadir 100µl de DNA elution Buffer directamente sobre la columna y centrifugar a 10,000xg durante 30 segundos.
10. Transferir el eluido de DNA al tubo previamente preparado IV-HRC y centrifugar exactamente a 8,000xg durante un minuto.



ANEXO VIII

PROGRAMAS DEL TERMOCICLADOR

	18S	VANS1-NS21	ITS1-ITS4
Desnaturalización inicial	95°C - 5 min.	95°C - 5 min.	95°C - 5 min.
Desnaturalización	95°C – 50 seg.	95°C – 50 seg.	95°C – 50 seg.
Alineamiento	50°C – 50 seg.	47°C – 50 seg.	53°C—50 seg.
Amplificación	72°C –1.30 min	72°C –1.30 min	72°C –1.30 min
Extensión final	72°C – 5 min	72°C – 5 min	72°C – 5 min



ANEXO IX

GEL DE AGAROSA 1%

Material y reactivos

- | | |
|--------------------------|---------------------|
| * Matraz Erlenmeyer 50ml | * Agua destilada |
| * Probeta 50ml | * TBE 10X |
| * Horno de microondas | * Agarosa |
| * Balanza analítica | * Bromuro de etidio |

Procedimiento:

1. Para preparar 20 ml de gel de agarosa, pesar 0.2gr de Agarosa y colocarla en un matraz Erlenmeyer.
2. Agregar 18ml de agua destilada y 2ml de TBE 10X, para disolver la agarosa, calentar durante 20 segundos en el horno de microondas.
3. Ya que se disolvió se deja enfriar sin que se solubilice y se agregan 3 μ l de bromuro de etidio.
4. Mezclar y vaciar sobre una lámina de acrílico con un peine para que se formen los pozos.



ANEXO X

PURIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DEL GEL DE ELECTROFORESIS

Materiales y soluciones:

- * Tubos eppendorf
- * Bisturí
- * Papel aluminio
- * Lentes de acrílico
- * Vortex
- * Buffer QG
- * Wash Buffer
- * Columnas de fibra de vidrio

Procedimiento:

1. Colocar el gel en el transiluminador sobre papel aluminio para evitar la degradación del DNA.
2. Cortar el fragmento del gen donde aparece la banda y colocarlo en un tubo eppendorf estéril.
3. Adicionar 3 volúmenes de Buffer QG y agitar en vortex hasta disolver el gel.
4. Pasar el contenido a una membrana de fibra de vidrio y centrifugar a 6,000 rpm durante 1 minuto (repetir este paso 2 veces).
5. Posteriormente adicionar 350 μ l de Wash buffer con etanol al 70% y centrifugar a 6,000rpm durante 1 minuto (repetir este paso 2 veces).
6. Secar la membrana dando un spin de 1 minuto a máxima potencia.
7. Ya seca la membrana, adicionar 40 μ l de agua desionizada bidestilada estéril y pasar la columna a un tubo nuevo y dejar reposar durante 3 minutos.
8. Bajar el DNA centrifugando a 13,000 rpm durante 4 minutos.
9. Correr electroforesis.



APÉNDICES

Apéndice I

Ácido fucsínico/láctico:

- 85% Ácido láctico.
- 6.3% Glicerina.
- 6.3% Agua destilada.
- 0.01% Ácido fuscínico.

Lactoglicerol:

- Ácido láctico 500ml
- Glicerol 500ml
- Agua destilada 500ml

Solución azul de tetrazolio:

- 30% Agua destilada.
- 25% Buffer Tris 0.2M pH 7.4
- 25% Azul de tetrazolio.
- 10% $MgCl_2$.
- 10% Ácido succínico.

Solución salina-formol

- Formaldehido 10%.
- 90% Agua destilada.
- 0.9% NaCl.

REACTIVO DE COLOR:

- Disolver 2gr de $FeSO_4$ en 36ml de agua destilada.
- Agregar 4ml de molibdato de amonio al 16% en H_2SO_4 10N

TCA 0.5N:

- 8.17 gr de ácido tricloroacético.
- Disolver en agua destilada y aforar a 100 ml.



Apéndice II

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.06853364	3	0.02284455	2.09637449	0.12243294	2.93402989
Dentro de los grupos	0.31601788	29	0.01089717			
Total	0.38455152	32				

Cuadro 13. ANOVA del porcentaje de arbusculos en plantas trampa a los 90 días de colonización.

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1350.54409	3	450.181365	2.92407969	0.05052436	2.93402989
Dentro de los grupos	4464.74138	29	153.956599			
Total	5815.28547	32				

Cuadro 14. ANOVA del porcentaje de vesículas en plantas trampa a los 90 días de colonización.

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	881.906061	3	293.968687	1.55238506	0.22217898	2.93402989
Dentro de los grupos	5491.60909	29	189.365831			
Total	6373.51515	32				

Cuadro 15. ANOVA del porcentaje de micorrización total en plantas trampa a los 90 días de colonización.

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	6547.63636	3	2182.54545	0.57102458	0.63859383	2.93402989
Dentro de los grupos	110842.545	29	3822.15674			
Total	117390.182	32				

Cuadro 16. ANOVA del número de esporas viables en plantas trampa.



Apéndice III

Alineamiento múltiple.

```

                *           20           *           40           *           60           *           80           *           100
22P1B      :  ??? ?????? ???? ?AATGCAAGGTTA TCGTT TTTTATTGATAGTAC TAACCTT TGAACCCCCCCTGCT ---ATTCTTAGCTAATCATGCTAAACCTCCA
7PpA       :  TCCCAAAAGGGGGGAGATTAAACCACCTCCATTACGTAATTATCCAGCTCCCTTGCCCCCCTTTG ---CCCCGCTCCCGAGAGTATTTTCCCGCT
1PpA       :  TGCCCAAAGGGGTTC TTAATTCAGTTATAATTTATTGATT --IACCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACIG-CTAAACCTCC
16P1A      :  TATGCAAAGGGTTCATTAATCAGTTATAATTTATTGATT --ATCC TACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAACCTCC
3LsA       :  ACTTGCGAATGGCTCATTAAATCAG--TATATAATTTATTGATAGTAGCTT-ACTACTTGGATCACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAACCTC
Gsinuosum  :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTT-ACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAATCTCC
18LsA      :  CCCAAAAGGGGTTCATTTAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTTACTACTTGGATCAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAACCTC
Getunicatu :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTTACTACTTGG-GATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAATCTCT
Gvesiculif :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTTACTACTTGG-GATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAACCTC
Gclaroideu :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTTACTACTTGG-GATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAATCTCC
Sdipurpure :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAATCTCC
Pscintilla :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAATCTCC
Sprojectur :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAATCTCC
Gintraradi :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTT-ACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAACCTC
28P1B      :  AATGCAAAATTCGTTA TTTATTCAGTTCGCAATTTATTGATAGTAGCTCTACTACTTGGATCACCGTG-GTTTTCI TAGCTAATACATGCTAAACCTC
Gfascicula :  TATGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTT-ACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAACCTC
Sspinosiss :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAATACAAITACTACTTGGATAA CTGGTGAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAATCTCC
Sreticulat :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAATCTCC
Gialbida   :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAATCTCC
Scastanea  :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAATCTCT
Sqilmorei  :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAATCTCT
Gigaspora  :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAATCTCC
Girosea    :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAATCTCC
Afennica   :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTT-ACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAATCTCC
Gproliferu :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTT-ACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAACCTC
Ggigantea  :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAATCTCC
Sheterogam :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAATCTCC
Sdipapillo :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAATCTCC
Gimarqarit :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAATCTCC
Episiformi :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAATACCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAATCTCC
Spellucida :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAATCTCT
Ssarearia  :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAATCTCT
Sweresubia :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAATCTCT
Slospora   :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAATCTCT
Scerradens :  AACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTGATAGTAGCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCIAGAGCTAATACATGCTAAATCTCC
23SbB     :  AATGCTAAAGGGGATTGAATCAGTTGCA-TTTATTGATAGTAGCTCTCTACCTGCTTCCACCGTGGTGTTCITTAGCTAATCTTGTCCACCTC
24LsB     :  AATGCAAAATGGGGTATTTAATCAGTTGCG-TTTATTGATAGTAGCTCTCTCTACTGCTTCCACCGTGGTGTTCITCCACCGGATCCATG-TTAGCCCTC
2SbA      :  CPTAAACGTAATCTCGTAAGCAAGGTTAACTGCGCAGAGATGCCAGATTCTCTAATAGTCTTCCATGTAAAGTCAACAGGACGTGCTCTCCAGCCGC
aa tgc aatggctcattaaatcagttata tttatttgATagtac t ctacttggataacCGTGGTAATTCIagagCTaatacatgctaaa

```



```

*      120      *      140      *      160      *      180      *      200
22FlB   : CTTCTGAAGGGGG--TGTITTTTAAATAAAACAAATTCGGGGCAC-----ATTCCCTTG--GTGATTCAT--ATACTTTTCATTCAG--AG
7PpA    : CCAATTCAGGAAACAAGCCAGCTCCAAAATTAATTTATCCPCGGTCC-----ATAATGAA--TATTTGCCG--AGCCCGATACGTTTAT--TA
1PpA    : G-ACTTCTGGAAGGGGGGTGTATTATTAGATAAAAAACCPATATCGGGCAACCG-----ATTCCCTTG--GTGATTCATAATACTTTT--CAATCG--TA
16FlA   : G-ACTTCTGGAAGGGGGGTGTATTATTAGATAAAAAACCPATATCGGGCAACC-----ATTCCCTTG--GTGATTCATAATACTTTT--CAATCG--TA
3LsA    : CGACTTCTGGAAGGGGGGTGTATTATTAGATAAAAAACCPATATCGGG--CAACCG--ATTCCCTTG--GTGATTCATAATAACTTTTCGAATCG--TA
Gsinuosum : CGACTTCTGGAAGGGAGAGTATTATTAGATAAAAAACCPATATCGGGGCAACCTG---ATTCCATTG--GTGATTCATAATAACTTTTCGAATCG--TA
18LsA   : CGACTTCTGGAAGGGGGGTGTATTATTAGATAAAAAACCPATATCGGG---CAAC--CGATTCCCTTG--GTGATTCATAATAACTTTTCGAATCG--TA
Getunicatu : CGACTTCTGGAAGGG--ATGTATTATTAGATAAAAAACCPACAGTTGGGCAACCA--ACTAAACCTTG--GTGATTCATGATAACTTTTCGAATCG--TA
Gvesiculif : CGACTTCTGGAAGGGGGGTGTATTATTAGATAAAAAACCPATATCGGG---CAAC--CGATTCCCTTG--GTGATTCATAATAACTTTTCGAATCG--TA
Gclaroideu : CGACTTCTGGAAGGG--ATGTATTATTAGATAAAAAACCPACAGTTGGGCAACCA--ACTAAACCTTG--GTGATTCATGATAACTTTTCGAATCG--TA
Sdipurpure : CGACTTCTGGAAGGG--ATGTATTATTAGATAAAAAACCPATAA--CCT---TCGG--GTTTCCACTTG--GTGATTCATGATAACTTTTCGAATCG--TA
Pscintilla : CAACTTCTGGAAGGG--ATGTATTATTAGATAAAAAACCPATAGCCCT---TCGG--GGTTCCCTTG--GTGATTCATGATAACTTTTCGAATCG--TA
Sproiectur : CGACTTCTGGAAGGG--ATGTATTATTAGATAAAAAACCPATAA--CCT---TCGG--GTTTCCACTTG--GTGATTCATAATAACTTTTCGAATCG--TA
Gintraradi : CGACTTCTGGAAGGGGGGTGTATTATTAGATAAAAAACCPATATCGGG---CAAC--CGATTCCCTTG--GTGATTCATAATAACTTTTCGAATCG--TA
28FlB   : CGACTTCTGGAAGGGGGGTGTATTATTAGCAAAAAACCPATATCGGG---CAAC--CGATTCCCTTG--GTGATTCATAATAACTTTTCTTATCG--TA
Gfascicula : CGACTTCTGGAAGGGGGCGTATTATTAGATAAAAAACCPATATCGGG---CAAC--CGATTCCCTTG--GTGATTCATAATAACTTTTCGAATCG--TA
Sspinosiss : CGACTTCTGGAAGGG--ATGTATTATTAGGTAAAAAACCPATAACCT---TCGG--GTTTCCAGTTG--GTGATTCATGATAACTTTTCGAATCG--TA
Sreticulat : CGACTTCTGGAAGGG--ATGTATTATTAGATAAAAAACCPATAACCTTTCG-----GGTTCCACTTG--GTGATTCATGATAACTTTTCGAATCG--TA
Gialbida  : CGACTTCTGGAAGGG--ATGTATTATTAGATAAAAAACCPATAACCTTTCG-----GGTTCCACTTG--GTGATTCATGATAACTTTTCGAATCG--TA
Scastanea : CGACTTCTGGAAGGG--ACGTATTATTAGATAAAAAACCPATAACCTTTCG-----GGTTCCACTTG--GTGATTCATGATAACTTTTCGAATCG--TA
Sgilmorei : CGACTTCTGGAAGGG--ACGTATTATTAGATAAAAAACCPATAACCTTTCG-----GGTTCCACTTG--GTGATTCATGATAACTTTTCGAATCG--TA
Giaspora  : CGACTTCTGGAAGGG--ATGTATTATTAGATAAAAAACCPATAACCT---TCGGG-----TTCCCTTG--GTGATTCATGATAACTTTTCGAATCG--TA
Girosea   : CGACTTCTGGAAGGG--ATGTATTATTAGATAAAAAACCPATAACCT---TCGGG-----TTCCCTTG--GTGATTCATGATAACTTTTCGAATCG--TA
Afennica  : CGACTTCTGGAAGGG--ATGTATTATTAGATACAAAAACCPATCTCG---TCTTCGGGCGAGTCCCTTG--GTGATTCATGGTAACTTTTCGAATCG--CA
Gproliferu : CGACTTCTGGAAGGGAGGTGTATTATTAGATAAAAAACCPATATCGGGCAACCG-----ATTCCATTG--GTGATTCATAATAACTTTTCGAATCG--TA
Gidiqantea : CGACTTCTGGAAGGG--ATGTATTATTAGATAAAAAACCPATAACCT---TCGGG-----TTCCCTTG--GTGATTCATGATAACTTTTCGAATCG--TA
Sheterogam : CGACTTCTGGAAGGG--ATGTATTATTAGATAAAAAACCPATAACCT---TCGGG-----TTCCACTTG--GTGATTCATGATAACTTTTCGAATCG--TA
Sdipapillo : CGACTTCTGGAAGGG--ATGTATTATTAGATAAAAAACCPATAACCT---TCGGG-----TTCCACTTG--GTGATTCATGATAACTTTTCGAATCG--TA
Gimarqarit : CGACTTCTGGAAGGG--ATGTATTATTAGATAAAAAACCPATAACCT---TTCGGG-----TTCCCTTG--GTGATTCATGATAACTTTTCGAATCG--TA
Episiformi : CGACTTCTGGAAGGG--ATGTATTATTAGATAAAAAACCPA--C-----TTG--GTGATTCATAATAACTTTTCGAATCG--TA
Spellucida : CGACTTCTGGAAGGG--ACGTTTTATTAGATAAAAAACCPATAACCT---TTCGGG-----TTCCACTTG--GTGATTCATGATAACTTTTCGAATCG--TA
Sqreqaria : CGACTTCTGGAAGGG--ACGTATTATTAGATAAAAAACCPATAACCT---TTCGGG-----TTCCACTTG--GTGATTCATGATAACTTTTCGAATCG--TA
Sweresubia : CGACTTCTGGAAGGG--ACGTATTATTAGATAAAAAACCPATAACCTTTCG-----GGTTCCATATG--GTGATTCATGATAACTTTTCGAATCG--TA
Slospora  : CGACTTCTGGAAGGG--ACGTATTATTAGATAAAAAACCPATAACCTTTCG-----GGTTCCCTTG--GTGATTCATGATAACTTTTCGAATCG--TA
Scerradens : CGACTTCTGGAAGGG--ATGTATTATTAGATAAAAAACCPATAACCTTTCG-----GGTTCCACTTG--GTGATTCATGATAACTTTTCGAATCG--TA
23SbB    : CGACTTCCGGGAGGGGGGTGTATTATTAGGTTAAACCCCGTATCGGGCAACCTG---TCCCTTG--CCGATTCATAAGAACTTTCTGTGCG--TA
24LsB    : CGACTTCCGGGAGGGGGGTGTGTCGCCAGGCCAAAAACCCGTATCGGGCAACCTG---TTCCTTG--GTGATTCATCTGAACTTTCTGTGTCG--TA
2SbA     : AGGATTGGCCAGCAAAAATCTTGTGCGCCGGCGAGGACGCGGTGCTCTG-----TACCCTGTCAGGATCCAGCAGCTTTCCGGAGGAGGTT
cgacTtctggaagg  gtatTtattagataaaaa C a a c          ttc cttg  gtgaItCat ataacttttTcgaatcg  ta

```



```

                *           220           *           240           *           260           *           280           *           300
22P1B      :C---TTTTGTCACGG-ATG-AACPAATCAAATTTCTGCGCTATGCTCGGGATG--CTACCCTAAGGTGTAAATAATACGGG-----AACGGG
7PpA       :T---CCAAACCACGT-CGATATAAATCTGATAATAAATCCTCTGCTATC--CTGGTGATAGGT-----ACACGGG-----AACGGG
1PpA       :TGACTTTTG--TCAOA-TGAAATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATG---GAGATTAAGCCTACCATGGTGGTA---CGGG--AACGGG
16P1A      :TGACTTTATGTCGACG-ATGAATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--GGG---AGATAAGGGGCTACTCTGGGGTAA---CGGG--AACGGG
3LsA       :TGACTTTATGTCGACG-ATGAATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Gsinuosum  :CAACTTTACGTGACG-ATGAATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
18LsA      :TGACTTTATGTCGACG-ATGAATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGCAACGGG
Getunicatu :TGGCTTCGTGCCGACG-ATGAATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Gvesiculif :TGGCTTTACGTGACG-ATGAATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Gclaroideu :TGGCTTCGTGCCGACG-ATGAATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Sdipurpure :TGGCTTTCGCTGACG-ATGAATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Pscintilla :TGGCTTTCGACTGCGG-ATGAATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Sprojectur :TGGCTTTCGCTGACG-ATGAATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Gintraradi :TGACTTTACGTGACG-ATGAATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
28P1B      :TGACTTTATGTCGACG-ATGAATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Gfascicula :TGACTTTACGTGACG-ATGAATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Sspinosiss :TGGCTTTCGCTGACG-ATGAATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Sreticulat :TGGCTTTCGCTGACG-ATGATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Gialbida   :TGGCTTTCGCTGACG-ATGATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Scastanea  :TGGCTTTCGCTGACG-ATGAATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Sgilmorei  :TGGCTTTCGCTGACG-ATGAATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Gigaspora  :TGGCTTTCGCTGACG-ATGATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Girosea    :TGGCTTTCGCTGACG-ATGATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Afennica   :CGGCCTTTCGCGCGG-ATGGTTCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Gproliferu :TGACTTTACGTGACG-ATGAATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Gqiqantea  :TGGCTTTCGCTGACG-ATGATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Sheteroqam :TGGCTTTCGCGCGACG-ATGATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Sdipapillo :TGGCTTTCGCGCGACG-ATGATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Gimargarit :TGGCTTTCGCTGACG-ATGATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Episiformi :TGGCTTAGTECCGACG-ATGATTCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Spellucida :TGGCTTTCGCTGACG-ATGAATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Sgregaria  :TGGCTTTCGCTGACG-ATGAATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Sweresubia :TGGCTTTCGCTGACG-ATGAATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Slospora   :TGGCTTTCGCTGACG-ATGAATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
Scerradens :TGGCTTTCGCTGACG-ATGATCATTCAAATTTCTGCGCTATCAACTTTCC--ATGGTAGGATAGAGG-CCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
23SbB      :TGACTTTTTGTCGGG-ATGAATCATTCTCCCTTCTGCGCTATCAACTTTCC--CTGGACGGATTAAGG-CCTACCTTGGTGGCG---CGGGTAACGGG
24LsB      :TGACTTTTTGTCACG-ATGAATCATTCTCCCTTCTGCGCTATCAACTTTCC--CTGGTGGATATGAGCCTACCATGGTGGTA---ACGGGTAACGGG
2SbA       :TGTAAATGGCGAGAAATTGGGAGCTCGGGACGCAATCGCTGGGGACATTCGCAGTACACCACTGATAATCGGTAGCTTAAATAATCGCAGATCCGT
tg c tt g gacg atg atcattcaaattttctgCctatcaactttcg atggttaggatagagg cctaccatgGt ta acgggtAacGg
    
```



```

*           320           *           340           *           360           *           380           *           400
22P1B      : G-----TTAGG CAGAGGG AAACTACCACATC---GAG---GCAGCGGG-----ATTACCTCCACGGGA
7PpA       : G-----TTAGG CAGAGGG AAC-ACCACATC---GAG---GCG-CGGG-----ATTACC-CCACGGGA
1PpA       : GTTAGG-----CAGAGGG-----AAACTACCACATC---GAG---GCAGCGGG-----ATTACCTCCACGGGA
16P1A      : GGTAAAGG---CGA CACCCGAGGGAG---CGGAAAACGTCAATCACCACATC---GAG---GCAGCGGG-----ATTACCTCCACGGGA
3LsA       : GTGTTAGGGCACGACACCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAC
Gsinuosum  : GTGTTAGGGCACGACACCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAC
18LsA      : GTGTTAGGGCACGACACCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAC
Getunicatu : GAA TTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAC
Gvesiculif : GTGTTAGGGCACGACACCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAC
Golaroideu : GAA TTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAC
Sdipurpure : GAA TTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAC
Pscintilla : GAA TTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGATACGGGGAC
Sprojetar  : GAA TTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAC
Gintraradi : GTGTTAGGGCACGACACCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAC
28P1B     : GTGTTAGGGCACGACCCGCGACACGGAGCCTGACAAACGGCTACCACATC---CACGGATGGCAGCAGGTCGCGCAAATTACCGTGCCCGACACGGGGAC
Gfascicula : GTGTTAGGGCACGACACCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAC
Sspinosiss : GAA TTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAC
Sreticulat : GAA TTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAC
Gialbida   : GAA TTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGATACGGGGAC
Scastanea  : GAA TTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAC
Sqilmorei  : GAA TTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAC
Gigaspora  : GAA TTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGATACGGGGAC
Girosea    : GAA TTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGATACGGGGAC
Afennica   : GAA TTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAC
Gproliferu : GTGTTAGGGCACGACACCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAC
Gigigantea : GAA TTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGATACGGGGAC
Sheterogam : GAA TTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAC
Sdipapillo : GAA TTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAC
Gimardarit : GAA TTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGATACGGGGAC
Episiformi : GAA TTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGATACGGGGAC
Spellucida : GAA TTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAC
Sgregaria  : GAA TTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAC
Sweresubia : GAA TTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAC
Slospora   : GAA TTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAC
Scerradens : GAA TTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC---CAAGGATGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAC
23SbB     : GTGTTAGGGCACACCGGCTCCCGGTGAAAGCAAACTGTACCACATC---GCAGGATGGCGCCGGGGGCCTGTTACCTGTCCCAACTCAGGGAC
24LsB     : GTGTTACGGCACACCGGCTCCCGGTGAAAGCAAACTGTACCACATC---GCAGGATGGCAGCCGGGGGCACAGTTACCTGTCTCGACTCAGGGAC
2SbA      : GTGGCAGCACACCGCTCCCGGTGAAAGCAAACTGTACCACATC---GCAGGATGGCAGCCGGGGGCAGGTTGCAAGG--CAGTCTGATCACAATCAACAC
|G ttaggg cga cgggagagggagcctgagaaaaggctaccacacac caagga gGcagCaGGcgcgcaattacccaatcccgcacacggggA

```




```

                0          *          520          *          540          *
22P1B : -----GCAAGTTGGTGAACGCGGTATCCAGCTCCAATA-CGTATATAAA? : 390
7PpA  : -----GCAGTTTGGTGAACGCGGTATCCAGCTCCAATA-CGTATATAAA? : 395
1PpA  : -----GCAAGTTGGTGAACGCGGTATCCAGCTCCAATA-CGTATATAAA? : 418
16P1A : -----GCAAGTTGGTGAACGCGGTATCCAGCTCCAATA-CGTATATAAA? : 436
3LsA  : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 523
Gsinuosum : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 526
18LsA : GTCTGGTGCCGCAGCGC-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 526
Getunicatu : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 527
Gvesiculif : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 525
Gclaroideu : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 526
Sdipurpure : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 523
Pscintilla : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 525
Sprjectur : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 523
Gintraradi : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 525
28P1B : GTCTGGTGCCACAAACCGCGGTATATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 528
Gfascicula : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 525
Sspinosiss : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 523
Sreticulat : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 522
Gialbida : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 522
Scastanea : GTCTGGTGTCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 522
Sgilmorei : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 522
Gigaspora : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 522
Girosea : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 522
Afennica : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 526
Gproliferu : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 524
Gigigantea : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 522
Sheterogam : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 522
Sdipapillo : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 522
Gimargarit : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 522
Episiformi : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 508
Spellucida : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 522
Sgregaria : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 522
Sweresubia : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 522
Slospora : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 522
Scerradens : GTCTGGTGCCAGCAGCCG-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 522
23SbB : GTTTGGTGCCCAATGCGCGGTATATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 527
24LsB : GTCTGGTGCCCAAGCCGCGGTATATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 527
2SbA  : CAGAAACACCAATCTTCCG---GTTTTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAA : 511
      gtctggtgccagcagccg cggttaattCCAGCTCCAATAGCGTATAttAAA
```