



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
ECOLOGÍA Y MANEJO INTEGRAL DE ECOSISTEMAS

**"ANÁLISIS MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD DE BACTERIAS
FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE DE LA ZONA DE
RAÍCES DE *Prosopis laevigata* Y *Parkinsonia praecox* EN EL VALLE DE
ZAPOTITLÁN DE LAS SALINAS, PUEBLA"**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. ANGÉLICA SERRANO VÁZQUEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza
FES Iztacala, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. María del Pilar Ortega Larrocea
Instituto de Geología, UNAM
Dr. Arturo Carlos II Becerra Bracho
Facultad de Ciencias, UNAM

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2013.



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de agosto de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **SERRANO VÁZQUEZ ANGÉLICA**, con número de cuenta **98112630** con la tesis titulada **"ANÁLISIS MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE DE LA ZONA DE RAÍCES DE PROSOPIS LAEVIGATA Y PARKINSONIA PRAECOX EN EL VALLE DE ZAPOTITLÁN DE LAS SALINAS, PUEBLA"**, realizada bajo la dirección del **DR. SALVADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA**:

Presidente: DR. SERGIO VACA PACHECO
Vocal: DR. VICTOR MANUEL RIVERA AGUILAR
Secretario: DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO
Suplente: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA
Suplente: DR. JOHN LARSEN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 27 de septiembre de 2013.

M. del Coro Arizandi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Primeramente al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por la formación recibida durante los estudios de Doctorado.

A los programas CONACyT-becas nacionales-CVU 169204 por los apoyos recibidos.

Por el apoyo recibido a los programas de becas de posgrado DGAPA-PAPIIT-IN217112 y COMECyT-2013.

Este proyecto estuvo financiado por los proyectos de investigación DGAPA-PAPIIT-IN217112 "Estructuración de comunidades microbianas en suelo de leguminosas, cactáceas y costras biológicas de Zapotitlán Salinas, Puebla"; PAPCA 2011-2012 "Dinámica espacio-temporal de las propiedades fisicoquímicas del suelo bajo el dosel de *Prosopis laevigata* y *Parkinsonia praecox* en Zapotitlán Salinas, Puebla" y PAPCA 2012-2013 "Dinámica espacial de la comunidad de amebas desnudas de vida libre del suelo bajo *Prosopis laevigata* y *Parkinsonia praecox* en una terraza degradada de Zapotitlán Salinas, Puebla." (Responsable Dr. Víctor Manuel Rivera Aguilar).

A los miembros del Comité Tutor: Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza (tutor principal), Dra. María del Pilar Ortega Larrocea y Dr. Arturo C. Becerra Bracho por la dirección en el trabajo de tesis.



AGRADECIMIENTOS

A TÍTULO PERSONAL

A los miembros del jurado: Dr. Sergio Vaca Pacheco, Dr. Víctor Manuel Rivera Aguilar, Dr. Diego Julio Arenas Aranda y Dr. John Larsen por sus valiosas aportaciones en la redacción de la tesis.

Dra. Gloria Luz Paniagua y al Dr. Erick Monroy del Laboratorio de Análisis Clínicos, por su asesoría y préstamo de equipo para realizar la cuantificación y la determinación de la pureza del DNA del suelo.

Al Dr. Daniel Muñoz y al M en C. Francisco, al Técnico Alfonso del laboratorio de Edafología, FES-Iztacala, UNAM las facilidades en el uso de equipo y material de laboratorio.

A la Dra. Pilar Ortega, Dra. Christine Siebe y Dra. Lucy Mora, por su asesoría en las técnicas para el estudio del suelo.

Al Dr. Candelario Vázquez Cruz por su colaboración en el desarrollo del análisis molecular y por darnos la posibilidad de colaborar con su grupo de trabajo.

Al M en C. Ángel Durán Díaz y al Dr. Héctor Godínez Álvarez por toda su enseñanza, por el apoyo y asesoría en la parte de análisis estadístico y diseño experimental.

A mi mamá Lina Vázquez, quien ha invertido todo su esfuerzo y cariño por brindarme educación, la cual siempre empezó desde la casa. Eres la persona a la que más admiro porque a pesar de todo lo que te ha tocado vivir siempre te has levantado y contigo nos has levantado a todas. Porque siempre has tenido tu confianza puesta en todas tus hijas y has sabido ser padre y madre a la vez para sacarnos adelante y vernos crecer. Espero que cada una de nosotras sepa agradecer todos y cada uno de los sacrificios que has tenido que hacer tan solo por el amor a tus hijas ¡¡¡Gracias por todo!!! Eres la mejor madre que pude tener sin merecerlo.

A mis hermanas María de “Jesús”, Virginia y Mercedes, por todo el apoyo que me han brindado, por hacer que vivir en familia sea la mejor experiencia de mi vida. Porque hemos



pasado por muchas cosas y todo lo hemos enfrentado juntas y porque son ejemplo de virtudes para mí. Ahora sí que como dice el dicho “Mujeres unidas jamás serán vencidas” ja, ja, ja. A mi hermano y Adán, a quienes le debo mucho, que a pesar de no tener ninguna obligación con nosotras, siempre nos ofrecieron su ayuda y también, por qué no, a Miguel mi cuñado.

A los nuevos miembros de la familia Dany y Miguelito, que llegaron a quitarme el puesto de la más pequeña de la casa, ja, ja, pero de quienes he disfrutado su compañía, que me permiten sentirme muy joven aún (porque lo soy) y puedo jugar y divertirme y estar tranquila, porque sé que cuidan de mi mamá, de mis hermanas y también, por qué no, de Osiris y de Yoda.

A Horacio Pérez Juárez, “Mi Compañero”, por estar conmigo en todo este camino, por enseñarme a ser feliz, a valorar todo lo que tengo y a disfrutar de la vida. Gracias por todo este tiempo juntos y por no desesperarte con mi forma de ser (y sí que es difícil). Gracias porque me has enseñado muchas cosas, que ni con todos los doctorados y posdoctorados que se puedan hacer, lo habría aprendido. Porque aún queda tanto por compartir. Gracias por ser esa persona ejemplar, llena de virtudes y principios que han hecho que yo sea una mejor persona en tantos aspectos de mi vida ¡¡¡eres muy importante para mí!!!

A Jesús Bazán Cuenca mejor cocido como “Chucho” ¡¡¡compadre ya terminé por fin!!! Gracias por haberme dado todo tu apoyo y amistad, lo valoro mucho. Porque soy afortunada de que seamos amigos, donde sólo la confianza, la fidelidad y el respeto han estado presentes. Porque por personas como tú es por quien uno se esfuerza por hacer las cosas lo mejor posible y así no defraudarte. No se cómo agradecer tu compañía tan valiosa, la amistad, por la cual has dejado muchas cosas y personas y por escucharme siempre aunque sea por le face, ja, ja, ja.

Tengo que agradecer de manera conjunta a Chucho y Horacio, como “propiedad emergente”, ja, ja, ya que fue tan agradable mi paso por el doctorado por responsabilidad suya. Vivimos tantas cosas y disfrutamos mucho juntos, jugando, trabajando, platicando, discutiendo y por ser tan apasionados con la ecología microbiana, que no podía pasarlo por alto.

Al Dr. Víctor Manuel Rivera Aguilar, porque me brindó su tiempo, toda su confianza, orientación, apoyo y amistad que son muy valiosos para mí, creo que nunca voy a poder



terminar de agradecerle por todo. Porque gracias a usted he podido enfrentar muchos retos y he aprendido que la mejor virtud que puede existir en la investigación y en la vida cotidiana es la honestidad y el esfuerzo.

Al Dr. Sergio Vaca Pacheco, responsable del Laboratorio de Genética de la UMF, FES-Iztacala, porque además del apoyo en el uso del equipo e instalaciones de su laboratorio me brindó su amistad. Es una persona admirable para mí, porque con su ejemplo me ha demostrado cómo es que se debe vivir, siempre disfrutando las cosas y haciendo lo correcto, dándole la importancia no solo al trabajo sino también a la familia y amigos y así poder ser una persona completa. Además, le agradezco todos esos buenos consejos y charlas tan agradables.

Al Dr. Erasmo Negrete Abascal, que a pesar de que me cambié de laboratorio siguió siendo un apoyo muy grande para mí. Porque afortunadamente tuve la oportunidad de trabajar con usted y fue un tutor ejemplar, de quien aprendí que la responsabilidad y el trabajo bien hecho es la clave del éxito y que tengo ahora la responsabilidad de transmitir. Porque se esforzó en enseñarme esos principios necesarios para poder desarrollarme donde quiera que esté lo cual ahora valoro y le agradezco infinitamente y siempre tuvo el tiempo para poder seguir formándome a pesar de que yo ya no era su alumna. Porque además me brindó su amistad aunque lo niegue, ja, ja.

Al Dr. Arturo Becerra, por todo el apoyo, muchas gracias, fue fundamental para mí en todo el doctorado, por su apoyo durante la candidatura y en esta parte final de la escritura de la tesis.

Al Dr. Salvador Rodríguez, por abrirme la puerta de su laboratorio y brindarme un espacio para poder trabajar y desarrollarme, por dejarme con toda confianza ayudarme a formar a algunos de sus estudiantes, así como permitirme el manejo de algunas cuestiones administrativas, que fueron esenciales en mi formación como doctora. Por respetar mi trabajo y decisiones en todo momento y por siempre tomarme en cuenta como parte importante de su laboratorio. Le agradezco también que haya sido usted quien dio inicio al gran equipo de trabajo que ahora tenemos con el Dr. Víctor, Chucho y Horacio en un principio y al que se han ido agregando elementos muy valiosos.

A Alina y Cecy, que a pesar de que no se conocen entre sí, ha sido mis grandes amigas durante ya mucho tiempo, a quienes aprecio mucho y con quienes he disfrutado mucho ir a



platicar, a bailar, a cantar, a comer. Porque cuando ya no podía con el estrés, el trabajo, los problemas, todo el tiempo estuvieron ahí. Sé que puedo contar con ustedes siempre “su amistad es muy valiosa para mí”.

A Vianey, Martha, Luisa, Abbid, Isabel, Mario y como no, el buen Miguelón, Carlos, Karina, Alberto Chantes y Jessica, que buen equipo no solo de trabajo, sino también de diversión. Que buenas tardes comiendo pastel de piñón y platicando o comiendo comida vegetariana que milagrosamente estaba rica verdad Carlos y Karina. Gracias Luisota por esa interrupción que solo trajo cosas buenas, ja, ja, aunque viviste con la culpa durante mucho tiempo y porque sin tu ayuda nunca se hubiera publicado el artículo, ja, ja, ja. Esas pláticas con Miguel tan amenas, las discusiones de los artículos, donde la imaginación mía se quedaba corta, esos buenos bailes con Abbid en las bombillas, esas noches de Karaoke en la bola 8, cante y cante, aunque Isabel y Jessica decían que no les gustaban las canciones, o en los tacos donde Mario y Chucho se los querían terminar todos. Gracias por que compartir esos momentos fue fundamental para que el tiempo se hiciera corto.

No podían faltar mis amigas Ara, Eli, Magali y Gaby, creo que cuando entramos a la carrera no nos imaginábamos todo lo que podíamos llegar a hacer, gracias por estar ahí siempre y por todos esos buenos momentos.

A la M en C. Mayra Mónica Hernández Moreno por su apoyo en la estandarización de las técnicas edafológicas y en la interpretación de los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica de los microambientes estudiados. Además, te agradezco Mayra por la amistad, las buenas pláticas y consejos, por el apoyo y por querer formar un equipo de trabajo con nosotros.

A los miembros del Laboratorio de Microbiología (aunque algunos ya no están), por los buenos partidos de futbol, a veces de basket, porque Laurita confiaba en mis aptitudes casi nulas como defensa, ja, ja. Por el apoyo de todos en el campo, por la comida compartida, como el pozole que hacía el profesor Ramón (La Voz), que además me sacaba libros de la biblioteca, porque con Tere empezó mi interés por las bacterias fijadoras de nitrógeno, por las buenas discusiones en los artículos, en fin, gracias a todos.

A todos los estudiantes del laboratorio de Genética ya que por varias generaciones me han permitido seguir formando parte de ese agradable espacio.



A los miembros del Laboratorio de Recursos Naturales y al de Ecología, sobre todo a Humberto, al Dr. Oswaldo, Rafa, Violeta, Anita, Cesar, Verito y Maribel.

A la Dra. Laila Pamela Partida Martínez, responsable del Laboratorio de Interacciones Microbianas, CINVESTAV-Irapuato, a quien debo mi admiración, por la asesoría en el montaje de la técnica para la separación del gen *nifH* por electroforesis en gradiente desnaturalizante (DGGE), por la afectuosa atención, apoyo e integración que tuvo durante la estancia de entrenamiento que realicé en su laboratorio y por el gran ejemplo de esfuerzo y éxito en su quehacer como investigadora que me impulsa a seguir adelante.

Al Dr. Diego Julio Arenas Aranda, responsable del Laboratorio de Genética Humana, Hospital General Siglo XXI, IMSS, por todas las facilidades que me brindó en cuanto al uso de equipo y material de su laboratorio para poder desarrollar las técnicas moleculares y por abrirme la puerta de la colaboración con su grupo de investigación.

A todos los miembros del Laboratorio de Genética Humana, gracias Ruth y Dr. Miguel, por recibirnos en su laboratorio y ser tan cálidos durante nuestro paso por ese lugar.

A todos los miembros del laboratorio de Interacciones Microbianas, en especial a Citlalli, Damaris, Cristabel y Olges, porque hicieron muy agradable y enriquecedor el tiempo que pasé en su laboratorio.

A la Dra. Cecilia Ximenez, al Dr. René Cerritos y a todos los miembros del Laboratorio de Inmunología, Dpto. de Medicina Experimental, UNAM, por abrirme las puertas de su laboratorio e interesarse en mis inquietudes sobre los microorganismos del suelo y por dejarles mostrarles este universo.

Al P. de Biol. José Luis Pérez Ramos por el diseño de la imagen de portada que se presenta en esta tesis. Además te agradezco la confianza por querer formar parte de nuestro equipo.

Agradezco también al Sr. René Pacheco y a los responsables de los bienes comunales del municipio de Zapotitlán Salinas por las facilidades brindadas para el trabajo de campo en el área de estudio.

Y aun cuando parezca algo muy raro en este tipo de trabajos, le doy gracias a Dios, ya que a pesar de que no siempre tengo todo lo que quiero si tengo todo lo que necesito.

Finalmente, tengo tanto que agradecer a tantas personas que creo nunca terminaría de hacerlo, así que a este último renglón sólo puedo ponerle “Gracias a todos”.



DEDICATORIA

A MI FAMILIA

Y

AMIGOS



ÍNDICE

Tema	Página
Resumen general	1
Abstract	3
Capítulo I: Descripción general del proyecto	5
- Introducción	
- Pregunta de investigación	
- Hipótesis	
- Justificación	
- Objetivos	
Capítulo II: Descripción del área de estudio	34
- Reserva de la biósfera de “Tehuacán-Cuicatlán”	
- Zapotitlán Salinas	
- Terrazas aluviales	
- Referencias	
Capítulo III: Caracterización fisicoquímica de los microambientes del suelo	43
- Resumen	
- Physical and chemical variation of soil under two desert shrubs in Tehuacan, Mexico.	
Capítulo IV: Comparación de métodos para la extracción de DNA	62
- Resumen	
- Comparación de métodos para la extracción de DNA de bacterias del género <i>Streptomyces</i> .	
Capítulo V: Bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre cultivables	83
- Resumen	
- Comunidades microbianas del suelo bajo el dosel de <i>Prosopis laevigata</i> en Zapotitlán Salinas, Puebla.	
Capítulo VI: Riqueza de genes <i>nifH</i> del suelo	115
- Resumen	
- Variación de la comunidad de diazótrofos en el desierto de Tehuacán, México.	
Capítulo VII: Discusión general y conclusiones	108
- Discusión general	
- Conclusiones	
- Referencias	



RESUMEN

Las zonas áridas se caracterizan por presentar bajo contenido de nitrógeno (N) en estado biodisponible en el suelo, lo que limita la productividad primaria de estos sistemas y esto los hace altamente sensibles a la degradación. La principal fuente de entrada de N en estas zonas es la fijación biológica del nitrógeno (FBN). Por ello, es de gran importancia conocer la diversidad de diazotófos de vida libre (DVL) y el efecto que tienen las variaciones en los factores físicos y químicos del suelo de diferentes microambientes sobre estos microorganismos. Por lo que el objetivo de este estudio fue determinar la dinámica de la comunidad de DVL de la zona de raíces de *Prosopis laevigata*, *Parkinsonia praecox* y en interespacio y su relación con las variaciones de las propiedades físicas y químicas del suelo en una terraza aluvial degradada del valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Se determinó la estructura, la temperatura, la textura, la humedad, la capacidad de retención de agua (CRA), conductividad eléctrica (CE), pH, materia orgánica (MO) y contenido de ortofosfatos (OP) del suelo sin cobertura vegetal y las variaciones de estos factores bajo *P. laevigata* y *P. praecox* de 0 a 50 cm de profundidad, durante un ciclo estacional. Se encontró que las propiedades del suelo bajo los arbustos varían más en los 0-10 cm de profundidad a lo largo del ciclo estacional. Se observaron correlaciones significativas entre las propiedades del suelo ($R = 9,86$, $P < 0,05$) y se formaron tres grupos con el 90% similitud que corresponden 1) 0-50 cm suelo sin cobertura vegetal, 2) 10-40 cm de suelo bajo *P. praecox* y 3) 10-40 cm de suelo bajo *P. laevigata*, en tanto que los primeros 10 cm del suelo bajo ambos arbustos son los que presentan mayor diferencia. Para poder estudiar a los microorganismos por técnicas moleculares, primero se hizo una comparación con diferentes métodos para la extracción de DNA del suelo. El kit MoBio fue el que arrojó mejores resultados, ya que nos permitió obtener DNA suficiente y de buena calidad para poder realizar análisis como amplificación por PCR, secuenciación, análisis filogenético y DGGE. Se aislaron y se cultivaron los posibles DVL del suelo de la zona de raíces de *P. laevigata* y del interespacio en medio Rennie y fueron identificados por medio del análisis



del gen rDNA 16S. Se encontraron los géneros *Sinorhizobium*, *Rizhobium*, *Streptomyces*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Cupriavidus* y *Microbacterium*, de los cuales *Burkholderia*, *Sinorhizobium*, *Rizobium* y *Streptomyces* tenían también la capacidad de solubilizar fósforo. También se amplificaron las diferentes secuencias del gen *nifH* a partir del extracto de DNA total del suelo y se separaron por electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) en dos temporadas contrastantes (humedad-sequía) a lo largo del gradiente de profundidad (0-50 cm) en los tres microambientes. En base al análisis molecular encontramos que la estructura de la comunidad de DVL varía entre microambientes, entre profundidades y entre estaciones. Además, observamos que la mayor riqueza de DVL se encuentra en el suelo de la zona de raíces de *P. laevigata* durante la temporada de lluvia. Mientras que la riqueza de estos organismos es mayor en el interespacio que en el suelo bajo *P. praecox*. Encontramos que algunas secuencias se presentan en los tres microambientes y en todas las profundidades, pero existen otras que únicamente se encuentran en uno de los tres microambientes. El análisis de similitud reveló que las comunidades de diazótrofos presentes en *P. praecox* y el interespacio durante las lluvias son idénticas. Con base en los resultados podemos concluir que *P. laevigata* y *P. praecox* sí modifican las propiedades físicas y químicas del suelo bajo su dosel sobre todo en los primeros 10 cm de profundidad en comparación con el interespacio. Además, los microambientes edáficos que se crean bajo las especies vegetales y el interespacio determinan las comunidades de DVL de la terraza aluvial degradada de Zapotitlán Salinas, Puebla. Finalmente *P. laevigata* mejora las condiciones físicas y químicas del suelo lo que permite el establecimiento de una mayor riqueza de DVL en su zona de raíces.



ABSTRACT

Arid zones are systems highly sensitive to degradation because to the limitation in primary productivity. This condition can be caused by the low content of available nitrogen (N) in the soil. The principal manner in which nitrogen enters these systems is through biological fixation of nitrogen (BFN), carried out by diazotrophs. For this reason it is very important to explore the diversity of free-living diazotrophs (FLD) and the effect exerted on these microorganisms by variations in physical and chemical factors of the soil of different microenvironments. The present study was carried out in a degraded alluvial terrace of Zapotitlán Salinas, Puebla, Mexico. The aim of the study was to define the community of FLD around of the root zones of *Prosopis laevigata* and *Parkinsonia praecox*, as well as the zone without vegetation (interspace), and their relation with the variations in the physical and chemical properties of the soil. During a seasonal cycle, a comparison was made between soil without vegetation and that with roots from 0 to 50 cm deep, determining the structure, temperature, texture, moisture, water holding capacity (WHC), electrical conductivity (EC), pH, organic matter (OM) and content of orthophosphates (OP). It was found that during the seasonal cycle, there is a greater variety in the properties of the soil under bushes and at the depth of 0-10 cm. Significant correlations were observed between the properties of the soil ($R = 9.86$, $P < 0.05$), and three groups were formed with 90% similarity, in soil at a depth of: 1) 0-50 cm interspace, 2) 10-40 cm under *P. praecox*, and 3) 10-40 cm under *P. laevigata*. The greatest difference was found in the first 10 cm of soil under both of the aforementioned bushes. To study the microorganisms with molecular techniques, we first tested different methods for DNA extraction from the soil and compared the results. The MoBio kit gave the best results, allowing us to obtain sufficient good quality DNA to enable the performance of analysis, including PCR amplification, sequencing, phylogenetic analysis and denaturalized gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis. We isolated and cultivated various FLD originating from the soil under *P. laevigata* and the interspace in the Rennie medium, and these microorganisms were identified by means of gene rDNA 16S analysis. The FLD genera found were *Sinorhizobium*, *Rizhobium*, *Streptomyces*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Bacillus*,



Cupriavidus and *Microbacterium*, of which *Burkholderia*, *Sinorhizobium*, *Rizobium* and *Streptomyces* also had the capacity to solubilize phosphorous. The different sequences of the gene *nifH* were amplified from the total DNA extract found in soil from the three microenvironments during the rainy and dry seasons, taking samples from 0-50 cm deep. These amplification products were then separated by DGGE. Based on DGGE analysis, we found that the structure of the FLD community varied between microenvironments, seasons and depths of soil. The greatest abundance of FLD was observed in soil from the root zone of *P. laevigata* during the rainy season. These microorganisms were more abundant in the interspace than in the soil under *P. praecox*. Some sequences were found in all three microenvironments and at all depths, while others only existed in one of the three microenvironments. Analysis of similarity revealed that the communities of FLD present on *P. praecox* and in the interspace during the rainy season were identical. Based on the results, we can conclude that *P. laevigata* and *P. praecox* do indeed modify the physical and chemical properties of the soil under their canopy, above all in the first 10 cm of depth, compared with the interspace. The microenvironments created below the different species of vegetation and in the interspace determine the FLD communities of the degraded alluvial terrace of the Zapotitlán Salinas, Puebla. *P. laevigata* improves the physical and chemical conditions of the soil, which allows for the establishment of a greater wealth of FLD in the soil around its roots.



CAPÍTULO I:

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL

PROYECTO



INTRODUCCIÓN

ZONAS ÁRIDAS

Las zonas áridas albergan una gran riqueza biológica, con un alto porcentaje de plantas y animales endémicos, poseen un elevado potencial productivo y se hallan densamente pobladas por comunidades humanas, que constantemente hacen uso de los recursos que este tipo de ecosistemas les ofrece (INE-SEMARNAP, 1997). Estas regiones son de gran importancia, ya que albergan cerca de 2000 millones de personas en todo el mundo (FAO, 2003).

Las zonas áridas, de acuerdo con el Atlas Mundial de la Desertificación, son zonas con una proporción entre la precipitación media anual y el potencial de evapotranspiración menor a 0.65 (Vásquez-Méndez et al., 2010). La precipitación está caracterizada por lluvias de corta duración con alta intensidad. Después de una temporada seca, la precipitación desencadena procesos erosivos en el suelo con baja o nula cobertura vegetal (Verbist et al., 2010).

Estas zonas ocupan aproximadamente el 40 % (54 millones de km²) del suelo total en el mundo y llegan a cubrir el 24 % del Continente Americano. En México, las zonas áridas y semiáridas cubren aproximadamente el 40 % del área total del país, en su mayoría ubicados en la región centro-norte (Verbsit et al., 2010; Fig. 1).

Independientemente de su ubicación geográfica, las zonas áridas se caracterizan tanto por su vegetación como por sus condiciones abióticas extremas (Vásquez-Méndez et al., 2010).

Los factores abióticos son los que controlan, principalmente, el funcionamiento de las zonas áridas (Perroni-Ventura, et al., 2006). Estas zonas se caracterizan por presentar condiciones extremas de temperatura y cantidades bajas e impredecibles de humedad y nutrientes biodisponibles (Shamir y Steinberger, 2007). En estos sistemas, el agua y nitrógeno son los factores abióticos más comunes que limitan la productividad primaria, por lo que la fijación de nitrógeno es considerada como el principal aporte de las formas reducidas de este elemento en las zonas áridas (Xie y Steinberger, 2002). A su vez, la disponibilidad de agua y de otros nutrientes pueden limitar las tasas de fijación de nitrógeno y también regular la conservación del nitrógeno en el suelo (Xie y Steinberger, 2002).



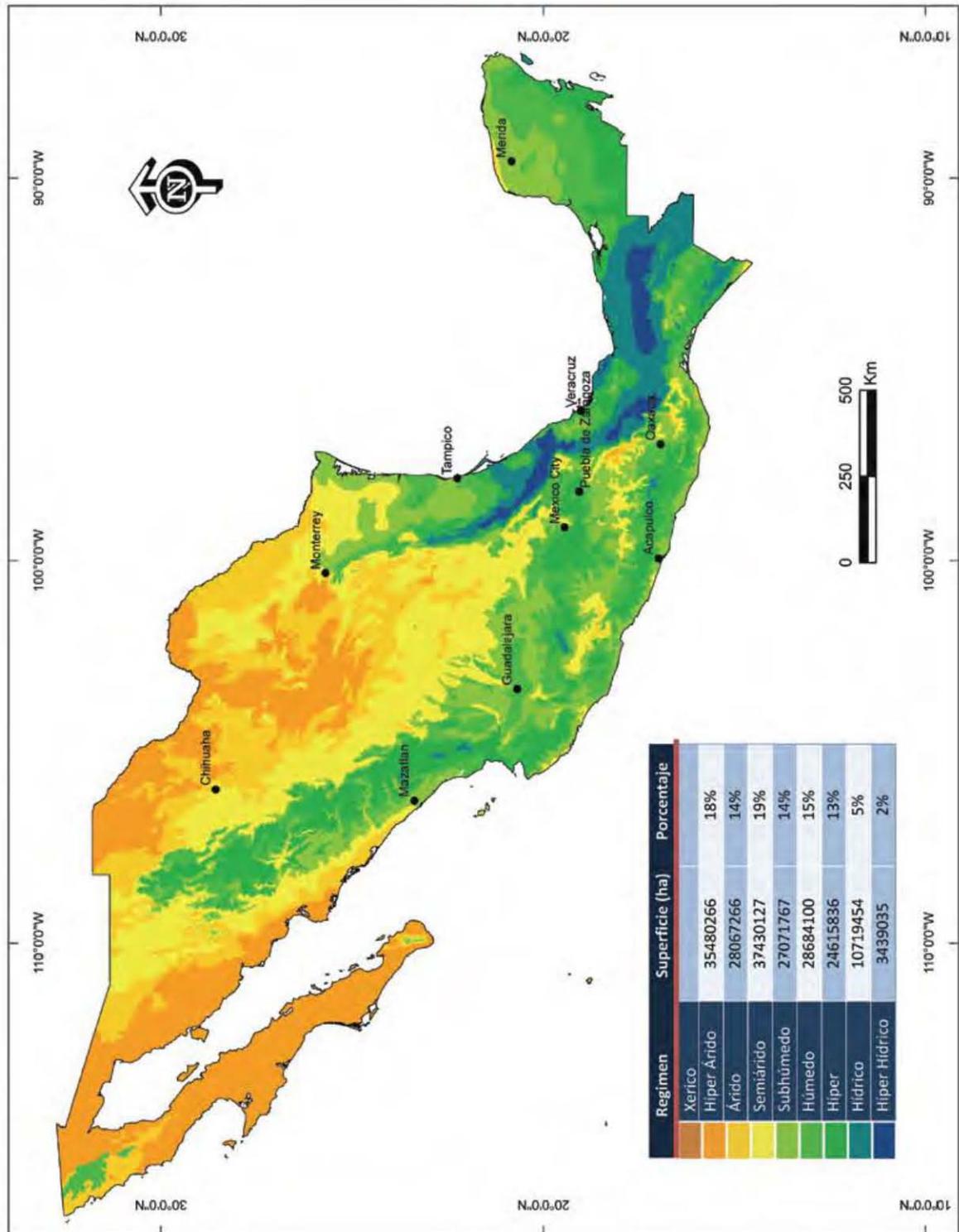


Fig. 1: **Mapa de aridez de la República Mexicana** (Verbist et al., 2010). Esta clasificación considera las zonas xéricas, hiperáridas, áridas, semiáridas y subhúmedas como zonas áridas.

Vegetación de las zonas áridas

La vegetación está dominada por plantas con mecanismos de resistencia y/o adaptación al estrés hídrico, como los cactus, mezquites y arbustos espinosos, entre otros (Whitford, 2002).

Los patrones de distribución espacial de la vegetación en estas zonas son heterogéneos, es decir, presentan alternancia de áreas desnudas y áreas vegetadas, observándose como parches o franjas de arbustos y pastos, llamadas islas de fertilidad (Rango et al., 2006; Whitford, 2002). Estas islas de fertilidad, son un tipo especial de parche de vegetación de mayor densidad, que comprenden uno o varios individuos de una o varias especies de árboles o arbustos, generalmente leguminosas, y las plantas establecidas bajo su copa y que aún con baja disponibilidad de agua, tienen una elevada productividad biológica (Puignare et al., 1996; González et al., 2007; Perroni-Ventura et al., 2006).

Las zonas áridas de México se han considerado especialmente importantes por su alto grado de endemismo en la vegetación (Rzedowski, 1978). La diversidad fisonómica y florística de las comunidades arbustivas en zonas áridas y semiáridas de México, puede ser considerada como moderada, ya que está constituida por más de 6000 especies vegetales descritas (Rzedowski, 1978). Sin embargo, este caudal biótico ofrece un considerable potencial de recursos naturales catalogados como forestales, con posibilidades de ser aprovechados de manera racional y sostenible, para contribuir al mejoramiento de los niveles de vida del sector rural. Estos recursos ofrecen múltiples alternativas de apropiación como recursos maderables, alimenticios, forrajeros, industriales, energéticos, ornamentales, artesanales y medicinales (Cervantes, 2005).

***Prosopis laevigata* (Humb. et Bonpl. ex Willd) M. C. Johnston**

Descripción. *Prosopis laevigata* (mezquite), es un árbol o arbusto espinoso de hasta 10 m de altura. En algunos sitios es un arbusto de varios tallos y típicamente de unos 2 m de altura. Su sistema radical puede alcanzar más de 50 m de profundidad y hasta 15 m en sus laterales. Los tallos son de corteza oscura y sus ramas tienen abundantes espinas axiales o terminales. Las hojas son compuestas, bipinadas, con 12 a 15 pares de folíolos oblongos o lineares, de 5 a 10 mm de largo. Las flores son de color amarillo verdoso, agrupadas en racimos, miden de 4 a 10 mm; son bisexuales, actinomorfas, con 5 sépalos y 10 estambres.



El fruto es una vaina de color rojo paja o rojizo violáceo, con forma alargada, recta o arqueada y espiralada en algunos casos, indehiscente, de 10 a 30 cm de longitud; puede ser plano o cilíndrico en la madurez y contiene de 12 a 20 semillas (Felker, 1996).

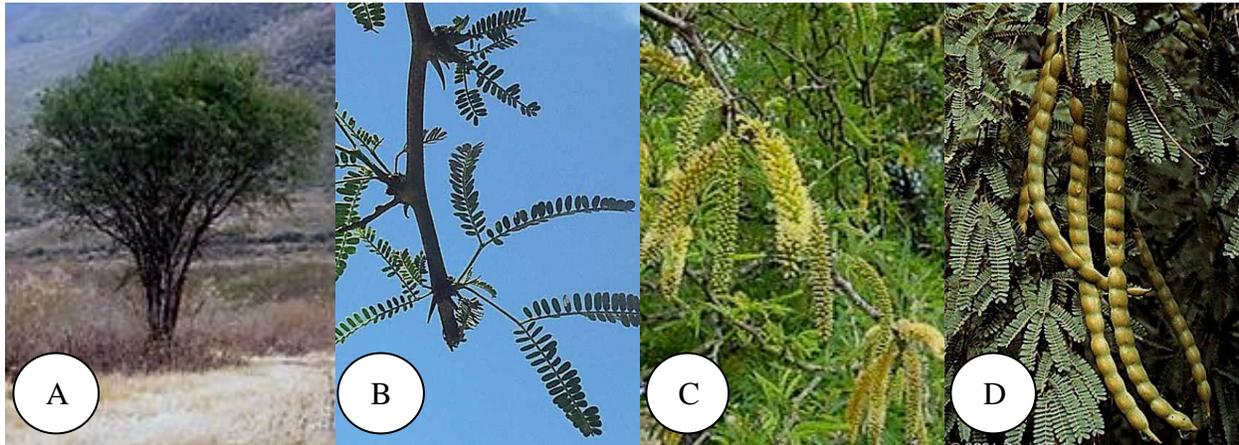


Fig. 2: Características de *Prosopis laevigata* (Humb. et Bonpl. ex Willd) M. C. Johnston: A) morfología del Mezquite en estado arbustivo (www.verarboles.com); B) hojas compuestas bipinnadas (www.backyardnature.com); C) flores agrupadas en racimo de color amarillo (www.mielesxicotl.blogspot.com) y D) fruto en forma de vaina (www.uaq.mx).

Distribución. *P. laevigata* es endémico de América y crece de manera silvestre en las zonas áridas de México. Esta especie vegetal tiene una mayor distribución y abundancia en el centro de la república. Puede ser encontrado en algunas localidades de Guerrero, Querétaro, Estado de México, Distrito Federal, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Veracruz, Nuevo León, Aguascalientes, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco y Zacatecas (INE, 1994).

Importancia. *P. laevigata* representa gran importancia económica, ya que es una fuente importante de alimento, forraje, combustible, material de construcción y medicina para los habitantes de las zonas áridas (Carrillo et al., 2008).

La madera del mezquite es preciada por su alta durabilidad y por su coloración agradable color marrón. La madera es fuerte y durable, buena para la fabricación de muebles, puertas, ventanas, pisos, objetos decorativos, artesanías y es excelente como leña y carbón; se considera como una de las maderas dimensionalmente más estables de otras maderas duras;

su valor calorífico es de unas 5000 Kcal Kg¹; la gravedad específica varía de 0.7 a 1.0, con valores de densidad de la madera de 700 a 1200 Kg m³ (Felker, 1996;).

Además, el aporte del mezquite como fuente de forraje beneficia a los productores de ganado doméstico y a la fauna silvestre. Las flores son eventuales productoras de polen y néctar para la producción de miel y cera en la industria apícola. Un aspecto destacable que le da un valor agregado a los arboles de mezquite, es la producción de un exudado con propiedades semejantes a la goma arábica. Esta goma tiene uso medicinal e industrial (Maldonado-Aguirre et al., 2000).

Desde el punto de vista ecológico, *P. laevigata* es importante en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas, es el hábitat de una buena cantidad de fauna silvestre y mejora la estética del paisaje (Harsh y Tewari, 1998). Además, en las zonas áridas, ayuda a controlar la erosión y a mejorar la fertilidad del suelo (Maldonado-Aguirre et al., 2000).

***Parkinsonia praecox* (Ruiz et Pavon) Hawkins**

Descripción. *Parkinsonia praecox* (*Cercidium praecox*) es conocida comúnmente como brea o palo verde y pertenece a la familia Leguminosae. Tiene porte arbustivo o arbóreo, espinoso, de 3 a 8 m de altura, con tronco de 10 a 30 cm de diámetro, corto, tortuoso y la corteza es lisa a ligeramente rugosa, con pliegues visibles a simple vista, caracterizada por su color verde amarillento que en sus horquetas y curvas se arruga como una piel (Juárez de Varela y Novara, 2005;). Las ramas también son tortuosas y de color verde, generalmente en cada nudo hay espinas solitarias, de hasta 2 cm de longitud. Las heridas e incisiones segregan una goma color ámbar y sabor dulce (Juárez de Varela y Novara, 2005). Las ramas pueden soportar diversos tipos de plantas epífitas, lo cual parece tener un efecto negativo en *P. praecox*. Las hojas son bipinnadas compuestas, fasciculadas, verde grisáceas, con ápice redondeado, pequeñas, de 1 a 3 cm de longitud con 5 a 9 pares de folíolos opuestos elípticos y se caracterizan por brotar después de iniciada la floración (Burkart, 1962). Las flores son perfectas completas, amarillo-anaranjadas, suavemente perfumadas, de aproximadamente 1.5 cm de diámetro. Cáliz pequeño con 5 sépalos y corola con 5 pétalos desiguales, el superior con punteado rojizo. Las semillas son pardogrisáceas de 1 cm de largo y el fruto es una vaina membranosa elíptica, castaña, muy aplanada (García, 2003).



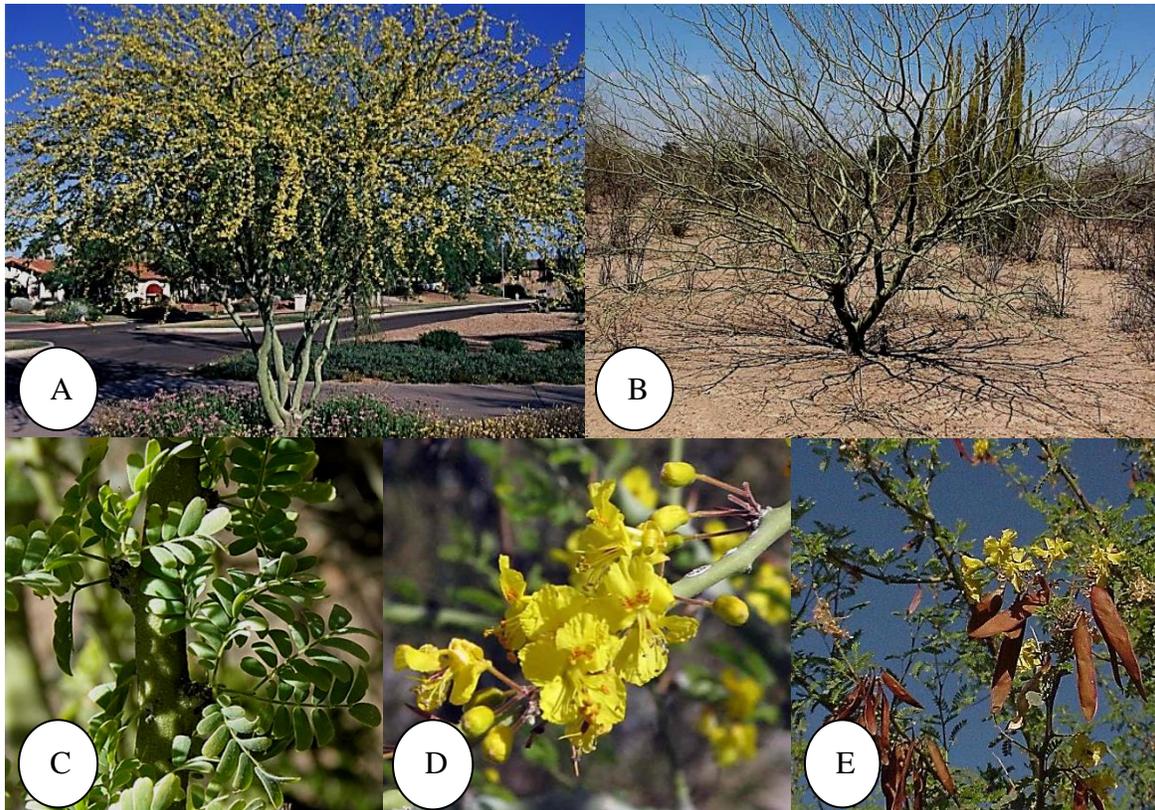


Figura 3. Características de *Parkinsonia praecox* (Ruiz et Pavon) Hawkins: A) morfología de Palo verde en estado arbustivo donde se observa la coloración verdosa característica del tronco y corteza lisa (www.web.gccaz.edu); B) morfología del arbusto durante la pérdida de sus hojas (www.verarboles.com); C) hojas bipinadas con ápice redondeado (www.madrean.org); D) flores de color amarillo (www.desertmuseum.gov) y E) fruto en forma de vaina aplanada (www.aridzonetrees.com).

Distribución. Es una especie vegetal cuya distribución geográfica natural se extiende desde Argentina, Bolivia, Perú, Paraguay, Venezuela, hasta el sur de los Estados Unidos de Norteamérica y en las zonas áridas de México se encuentra en la zona sur, incluyendo el valle de Tehuacán, Puebla (García, 2003).

Importancia. Esta especie tiene un escaso valor económico en comparación con *P. laevigata*, ya que no está vinculada con la actividad de extracción maderera, producción de carbón y postes. Sus usos más habituales han sido de remedio para la tos, curación de artículos de cerámicas, como pegamento casero y como base de producción del insecto comestible cuchama (Velázquez et al., 2010).

Existen pocos estudios sobre el uso de *P. praecox*, en el valle de Tehuacán. Se ha reportado el uso de esta planta en el tratamiento del dolor de cabeza, del oído y contra afecciones cardiacas (Ramírez, 1996; Lara, 1996).

Desde el enfoque fitoquímico, *P. praecox* posee varios compuestos con actividad insecticida en sus hojas, relacionada con la presencia de alcaloides (García, 2003). Este estudio propone que *P. praecox* puede ser utilizado como insecticida, con el fin de proteger los cultivos contra el ataque de diferentes insectos (García, 2003).

También se han realizado estudios de la producción de la goma generada por el árbol de *P. praecox* y se observa que es inferior que la obtenida por otras leguminosas productoras de goma, como *Acacia senegal* y *P. laevigata*. A pesar de ello, actualmente se considera que la extracción de goma de brea puede ser una alternativa económica competitiva, sobre todo por su bajo precio en el mercado, en comparación con la goma arábiga (Alesso et al., 2003).



EL SUELO

El suelo puede definirse como el material mineral no consolidado en la superficie de la Tierra, que ha estado sometido a la influencia de factores genéticos y ambientales (material parental, clima, micro y macro organismos y topografía) (GEO México, 2004).

En otras palabras, procede de la interacción de los elementos que componen la litosfera, la atmósfera, y la biosfera y se origina a partir de la descomposición de la roca madre, por factores climáticos y por la acción de los seres vivos (Killham, 1994). La fracción orgánico-mineral está formada por el material mineral, restos de raíces de las plantas, de biomasa animal y microbiana y por materia orgánica en varios estados de descomposición, además de agua y aire (Killham, 1994).

El suelo es un cuerpo natural involucrado en interacciones dinámicas con la atmósfera y con los estratos que están debajo de él. Influye en el clima y en el ciclo hidrológico del planeta. Además, juega un papel ambiental de suma importancia, ya que puede considerarse como un reactor bio-físico-químico en donde el material de desecho es reciclado (Hillel, 1998).

Los suelos de las zonas áridas son rocosos, de colores claros, someros, generalmente pobres en materia orgánica y se desarrollan sobre material no consolidado. Tienen de pobre a moderado desarrollo de los perfiles, acumulaciones de sales de sílice y de carbonato de calcio en la capa superficial y están expuestos a eventos extremos, como tormentas fuertes y sequías prolongadas. Su fertilidad es variable y por lo regular su productividad está condicionada por su profundidad y pedregosidad (Vásquez-Méndez et al., 2010).

Erosión y degradación del suelo

El suelo es un recurso natural básico, del que depende la producción de muchos bienes y servicios y su pérdida constituye un problema para las generaciones actuales y futuras (Loredo-Osti, 2005).

La satisfacción de las necesidades humanas de alimentación y materias primas han conducido a la deforestación, la fragmentación de los ecosistemas, la desertización, la alteración de los ciclos hidrológicos, la pérdida de la diversidad biológica y contradictoriamente al incremento de la vulnerabilidad de los grupos humanos que dependen del uso de estos recursos (Reyes-Hernández et al., 2005).

La erosión es un proceso físico que consiste en el desprendimiento, transporte y deposición de las partículas del suelo por el agua y el viento (Kirkby, 1984). Si este proceso se lleva a cabo de manera natural, se denomina erosión geológica, pudiendo ser considerada en tal caso, como una forma más de conformación de relieve. Si la erosión se incrementa por las actividades humanas, se manifiesta la erosión acelerada o inducida (Figueroa et al., 1991).

En el caso de la erosión hídrica, la lluvia tiene efecto a través de su impacto sobre la superficie del suelo y por el humedecimiento de éste. Esto provoca desagregación de las partículas primarias, origina también el transporte de partículas por aspersion y proporciona energía al agua del escurrimiento superficial (Schamab et al., 1990).

Los daños causados por la erosión hídrica pueden ser de diferente tipo (Froth y Turk, 1975):

- a) Pérdida de la productividad del suelo. Normalmente el suelo que se pierde por erosión hídrica es la capa superficial, la cual tiene mayor cantidad de materia orgánica y nutrientes. Además, es donde existe la mayor actividad biológica de los microorganismos. Por lo que al perder esta capa, se reduce la capacidad productiva del terreno.
- b) Pérdida de agua por escurrimiento. Cuando llueve, el agua que no se infiltra, además de ocasionar erosión, es agua que se pierde por escurrimiento y que no podrá ser aprovechada localmente por la vegetación o cultivos.
- c) Depósito de tierra infértil en terrenos productivos. Cuando los procesos de erosión son severos, durante la formación de cárcavas, se arrastra material del subsuelo que se puede depositar sobre un terreno productivo, afectando negativamente su capacidad de producción, ya que queda enterrado el suelo de buena calidad.
- d) Formación de cárcavas en terrenos de cultivo. El escurrimiento superficial puede originar pequeños arroyuelos, que posteriormente se llegan a transformar en zanjas y barrancas.

Se estima que el 81 % del territorio de la República Mexicana presenta algún tipo de erosión, la cual varía desde leve hasta muy severa de acuerdo con el Inventario Nacional de Tierras Erosionadas (Aguilar-Robledo, 1995; Fig. 4). La erosión hídrica y eólica se presenta en 158.8 millones de hectáreas, con pérdidas promedio de 2.75 toneladas de suelo por hectárea por año (CONAZA, 1993).



En las zonas áridas y semiáridas de México, el pastoreo extensivo con ganado representa el principal uso de suelo y ocupan el primer lugar en superficie afectada por erosión, ya que el sobrepastoreo ha dañado a más de 60 millones de hectáreas. En segundo lugar de afectación por erosión se ubican las áreas forestales y en tercer lugar la agricultura de temporal, en la cual se han identificado 21 millones de hectáreas con problemas de erosión hídrica y eólica (Ortiz et al., 1994).

Estos daños físicos, químicos y biológicos al suelo, simultáneamente provocan la perturbación de las comunidades vegetales. La degradación del suelo limita además, el restablecimiento de la cobertura vegetal. Esto, a su vez, provoca la alteración en las interacciones planta-microorganismo que son un factor ecológico fundamental en los ecosistemas áridos, que son altamente sensibles a la degradación y extremadamente lentos en la recuperación (Aronson et al., 2003).

En las zonas áridas y semiáridas, la degradación del suelo se puede intensificar por la limitación de N debido a las características propias de los suelos, al régimen climático, o a su uso en actividades pecuarias y agrícolas para las cuales no son aptos (Evans y Ehleringer, 1993).

La desertificación es la degradación del suelo en zonas áridas, semiáridas y subhúmedas secas como resultado de diversos factores, incluyendo las variaciones climáticas y las actividades humanas. En México, las zonas desertificadas representan el 65 % de la superficie nacional con 128 millones de hectáreas (SEMARNAT y Colegio de Postgraduados, 2003).

Entre las principales causas de desertificación se identifican el cambio de uso de suelo para fines agrícolas y sobrepastoreo (17.5 % en ambos casos). La deforestación (7.4 %) ocupa el tercer lugar, seguida de la urbanización (1.5 %). Todas estas causas tienen importante relación con la afectación de la cubierta vegetal, responsable de la conservación del suelo (SEMARNAT y Colegio de Postgraduados, 2003).

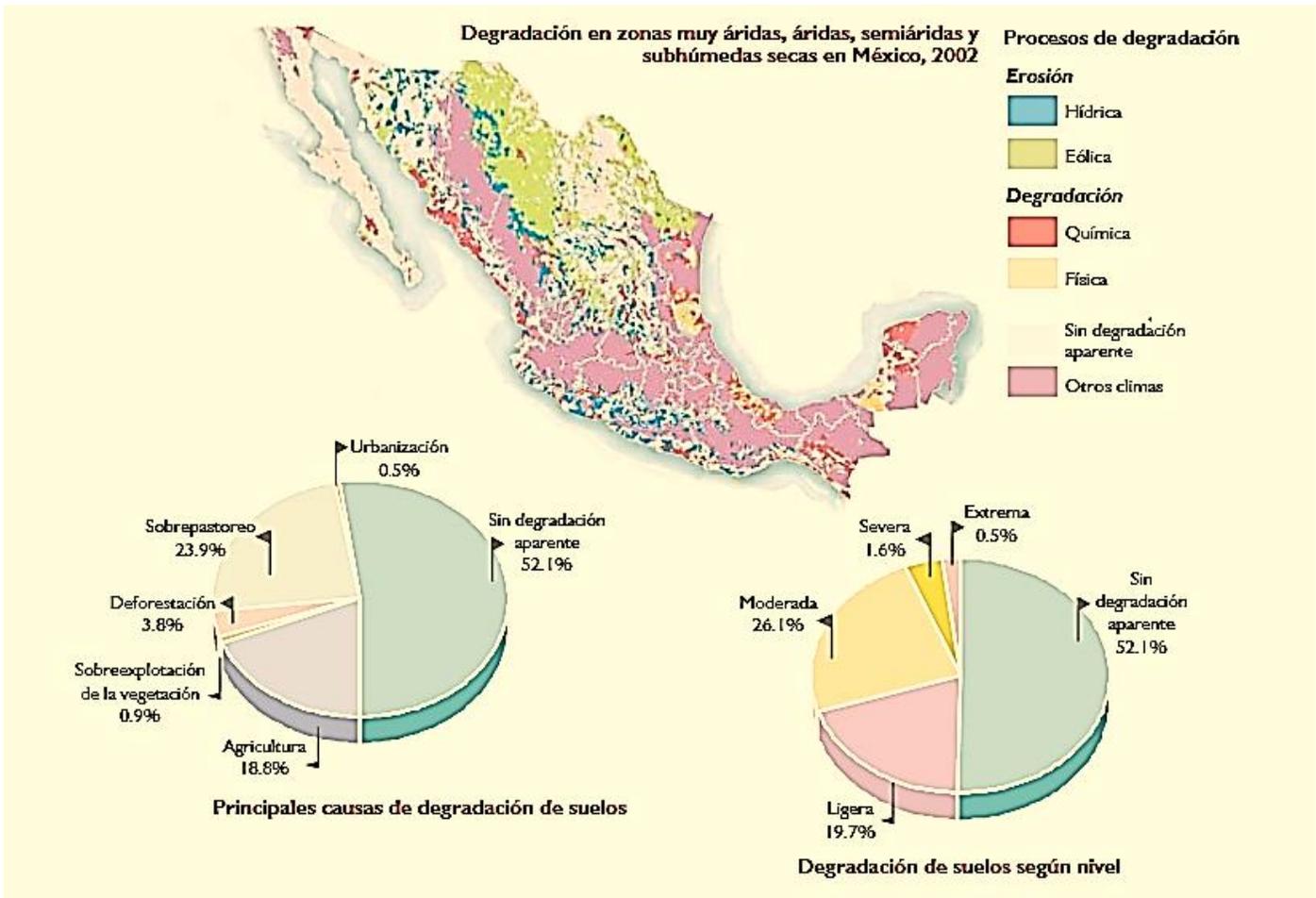


Figura 4. Distribución de las áreas desertificadas en la República Mexicana. Escala 1:250 000. Elaborado por SEMARNAT y Colegio de Postgraduados. Memoria Nacional 2001-2002. México, 2003.

Cobertura del suelo e islas de fertilidad

La cobertura vegetal es uno de los elementos que mayor evidencian la transformación de la superficie terrestre a través del tiempo. La cobertura del suelo se define como la cubierta biofísica observada sobre la superficie terrestre; mientras que el uso del suelo se caracteriza por el arreglo, actividad, y producción que hace la gente en un cierto tipo de cubierta para producir, cambiar o mantener esta cobertura del suelo (Reyes-Hernández et al., 2005).

Uno de los impactos del cambio en la cobertura del suelo tiene que ver con la pérdida de la biodiversidad, la eliminación de la variabilidad genética de las poblaciones e incluso de especies (Meli, 2003).

La cobertura vegetal brinda protección al suelo contra agentes erosivos en tres formas principalmente (Ríos, 1987):

- a) A través del efecto de protección al suelo contra el impacto directo de la lluvia.
- b) Reducción en la velocidad del escurrimiento por el incremento en la rugosidad superficial.
- c) Por los efectos que ejerce la cobertura sobre la estructura y porosidad del suelo en la superficie y el perfil del suelo. Las raíces tienen un efecto sujetador sobre las partículas del suelo, lo cual es favorecido con la descomposición de las raíces, incrementando el contenido de materia orgánica y dejando cavidades tubulares que mejoran el movimiento del aire y agua en el suelo. Los efectos en el contenido de materia orgánica afectan la estabilidad de los agregados, la conductividad hidráulica y otras propiedades físicas que influyen en la capacidad de infiltración y hacen disminuir el volumen de escurrimiento. En el sistema, además, incrementa el contenido de materia orgánica y afecta favorablemente la estabilidad de su estructura (Loredo, 1986). Los suelos bien agregados proporcionan mayor retención de agua, adecuada aireación, fácil penetración de raíces, buena permeabilidad y el establecimiento de comunidades microbianas y de la mesofauna del suelo (Loredo-Osti et al., 2005).

Sin embargo la cobertura vegetal tiene una capacidad de amortiguamiento limitada a la cantidad e intensidad de la lluvia, al momento del evento, así como de la densidad de plantas por hectárea y de la vegetación asociada a la especie principal (Figueroa et al., 1991).

Los ecosistemas áridos tienen una alta heterogeneidad en la distribución de los recursos, con más concentración de nutrientes y mayores densidades microbianas encontradas en suelos con vegetación que en suelos desnudos (Bashan y de-Bashan, 2010).

El patrón de vegetación natural más común en las zonas áridas es el fenómeno de isla de fertilidad o isla de recursos, que es una compleja red de microhábitats (Perroni-Ventura et al., 2007). Muchas plantas atenúan las condiciones ambientales adversas de crecimiento modificando el hábitat y provocando cambios en las propiedades microambientales en el suelo, las que pueden beneficiar el establecimiento de otras plantas y de sus comunidades microbianas. Sin embargo, es muy probable que plantas, como las leguminosas, necesiten



de la ayuda de una gran comunidad de microorganismos del suelo para que puedan funcionar como ingenieros del sistema en las zonas áridas (Burquez y Quintana, 1994; West et al., 2000; González, et al., 2008).

Las leguminosas, permiten la estabilización de las partículas de suelo, acumulan nutrientes y materia orgánica, con mayor contenido de C, N y P bajo su dosel y en su zona de raíces, y crean ambientes idóneos para varias especies vegetales y microorganismos con lo que estimulan la actividad del sistema (Walker et al., 2001; Titus et al., 2002; Schade y Hobbie, 2005; Bashan y de-Bashan, 2010). Sin embargo, se ha observado, también, que aunque algunas especies vegetales que crean islas de fertilidad, tienen efectos nulos o negativos sobre la supervivencia de algunas plántulas que podría ser resultado de la competencia entre las diferentes especies (Walker et al., 2001).

A pesar de ello, la gran diversidad de microorganismos en suelos de desierto está muy relacionada con la acumulación de recursos en las islas de fertilidad, por lo que la interacción entre estos dos componentes (planta-microorganismo) podría retrasar la formación de tierras malas (*badlands*) en suelos degradados como es el caso del desierto de Tehuacán, México (González et al., 2008; Rodríguez-Zaragoza et al., 2008; Bashan y de-Bashan, 2010).

Microambientes del suelo

Para poder entender la diversidad microbiana del suelo y los procesos ambientales bajo su control, se requiere de un conocimiento profundo del ambiente que habitan. Tal comprensión sólo puede ser alcanzada por el análisis a las escalas espacio-temporales pertinentes donde operan las comunidades microbianas (Mummey et al., 2006; Fig. 5).

Los microambientes del suelo consisten de un complejo marco físico-químico-biológico que están determinados, en gran medida, por el sustrato, el soluto y los flujos de energía. Por lo tanto estos microambientes proporcionan un hábitat heterogéneo para los microorganismos, caracterizado por diferentes nutrientes, agua y concentraciones de oxígeno, así como el pH y el tamaño de los poros disponibles para la habitación microbiana (Chotte et al., 1993; Mummey et al., 2006).

Los agregados estructurales se clasifican jerárquicamente en términos de tamaño y de estabilidad relativa. Los macroagregados están formados por asociaciones temporales de



microagregados, minerales y materia orgánica particulada, sobre todo por el efecto aglutinador de las hifas de los hongos y las raíces de las plantas. Los microagregados estables, por lo general, se forman dentro de los macroagregados a través de procesos mediados por microorganismos y en gran parte dependen de agentes orgánicos de unión para la estabilidad estructural. La estructura del suelo es un factor dominante que controla la diversidad microbiana y con ello, muchos otros procesos del suelo (Chenu et al., 2001).

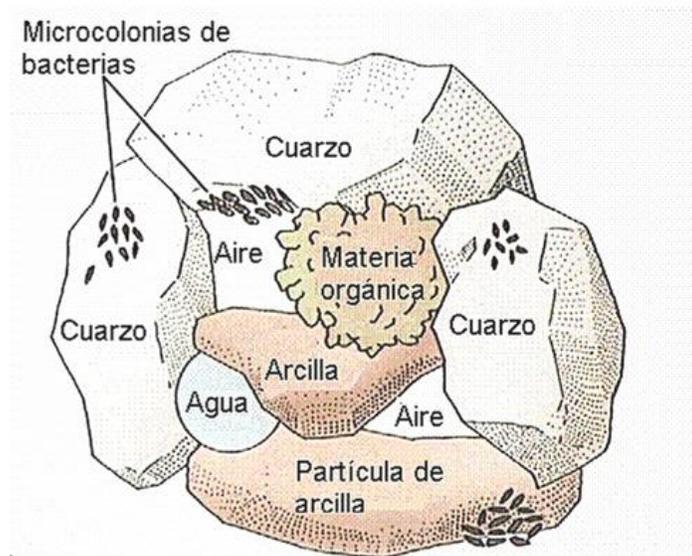


Figura 5. Se muestra la composición de un agregado formado por material mineral, materia orgánica y microorganismos del suelo, así como los poros del suelo cubiertos por agua y/o aire (Killham, 1994).

Es por todo esto que una mayor comprensión de las relaciones entre la composición de la comunidad microbiana del suelo y su microambiente, puede facilitar la integración de los datos bióticos y abióticos, obteniendo así, una mejor comprensión del funcionamiento del sistema (Mummey et al., 2006).

Zona de raíces

Los procesos que están controlados o directamente influenciados por las raíces son referidos como procesos de la rizósfera y son cruciales para el funcionamiento de los ecosistemas terrestres. Tal es el caso de la descomposición de la materia orgánica del suelo y la mineralización del N (Cheng, 2009).

La rizósfera es un ambiente complejo donde las raíces interactúan con las propiedades físicas, químicas y biológicas del edafón. Las características estructurales y funcionales de las raíces condicionan los procesos de la rizósfera y ambas tienen una influencia significativa en la capacidad de las raíces para adquirir nutrientes. Las raíces también interactúan con los microorganismos del suelo, los que influyen sobre la nutrición de las plantas ya sea directamente, participando en la disponibilidad y absorción de los nutrientes, o indirectamente promoviendo el crecimiento de la raíz (Richardson et al., 2009).

Las raíces de las plantas tienen una influencia directa sobre la diversidad de bacterias de la rizósfera que depende del tipo de exudados radiculares de cada planta, lo cual proporciona ciertas condiciones ambientales al suelo, y permite el establecimiento de diferentes especies que facilitan el aprovechamiento de los nutrientes por las plantas (Atlas, 1995).

Los microorganismos de la rizósfera pueden promover el crecimiento de las plantas y algunos pueden también provocar su detrimento, causándoles enfermedades o la muerte. También pueden actuar como saprófitos que descomponen la materia orgánica y realizan los procesos de mineralización y reciclaje de nutrientes en el suelo; en este caso, algunas poblaciones de microorganismos pueden no interactuar directamente con las plantas, pero sus efectos en los procesos del suelo tienen un impacto en su crecimiento (Buée et al., 2009).

Los microorganismos del suelo

El sistema complejo que constituye el suelo (Fig. 6), intrínsecamente heterogéneo espacial y temporalmente, alberga una gran riqueza de especies vegetales, animales y microbianas, las cuales se relacionan estrechamente en las redes tróficas (Atlas, 1995).

Los microorganismos del suelo, que juegan un papel muy importante y necesario en todos los ecosistemas, deben encontrar una serie de recursos que les permita subsistir, además de condiciones ambientales adecuadas (Shamir y Steinberger, 2007; Smith et al., 2002).



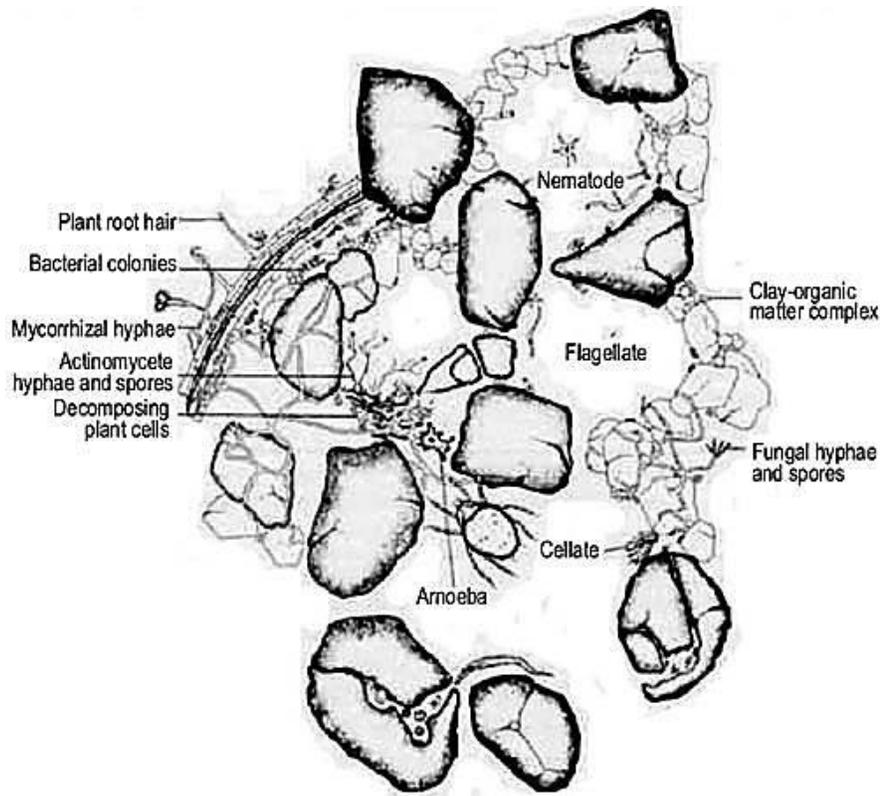


Figura 6. Se muestra la composición de microorganismos presentes en microambientes del suelo. Estos microambientes están formados por material mineral, materia orgánica y los mismos microorganismos, así como los poros del suelo cubiertos por agua y/o aire (Killham, 1994).

La diversidad microbiana global es enorme, probablemente se encuentra representada por 10^7 especies, de las cuales solo el 0.01% al 0.1% son conocidas. Las comunidades microbianas son complejas, presentan una gran riqueza de especies y su estructura es continuamente influenciada por los cambios en las condiciones o factores biológicos, químicos y físicos. La composición de la comunidad de microorganismos es muy importante en el reciclaje de los nutrientes que se llevan a cabo en el suelo pues afectan la productividad vegetal (Richards, 1987).

En los sistemas de desierto, cada tipo de población tiene un periodo de actividad que depende de la disponibilidad de agua (Shamir y Steinberger, 2007). El principal recurso limitante es la humedad, de la que dependen los pulsos de actividad biológica, lo cual a su vez también tiene influencia sobre las variaciones fisicoquímicas del suelo (Whitford, 2002).

FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO

El nitrógeno (N) es el gas más abundante en la atmósfera terrestre y es un elemento esencial para el sostenimiento de todas las formas de vida (Shrimant, 2012). El N forma parte de aminoácidos, proteínas y de otros compuestos orgánicos, todos ellos derivados de la fijación biológica del nitrógeno (Shrimant, 2012).

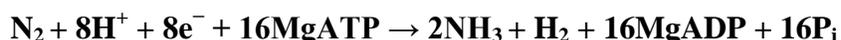
El N reducido es un recurso esencial para la productividad primaria, el cual proviene básicamente del reciclaje de los compuestos nitrogenados del suelo, donde la fijación de N₂ es la principal fuente de ingreso para el mantenimiento de este recurso en los ecosistemas terrestres; con excepción de los aportes antrópicos de N (Poly et al., 2001).

El N reducido es considerado como un recurso limitante y poco se sabe sobre los procesos y mecanismos que afectan su disponibilidad, acumulación, transformación y pérdida en el suelo de las zonas áridas. Sin embargo, la fijación de N₂ es un evento común en muchos ecosistemas de desierto, especialmente en asociación con leguminosas o en poblaciones bacterianas que residen en la superficie y en el interior de plantas que crecen en rocas (Puente et al., 2009).

Para que los seres vivos puedan incorporar el N₂ en moléculas biológicas, este debe ser reducido químicamente a NH₃. Este fenómeno es conocido como fijación de N₂ la cual puede ser química o biológica (Postgate, 1998).

En la fijación química la radiación UV produce óxidos de N, particularmente en las capas superiores de la atmósfera, mientras que la combustión, principalmente de motores de combustión interna y las luces de la ciudad los generan en los niveles bajos. Estos gases pueden ser incorporados al suelo por la lluvia o llegar en forma de deposición seca, contribuyendo a las entradas de N atmosférico a la superficie del planeta (Postgate, 1998).

La fijación biológica del nitrógeno la realizan microorganismos procariontes exclusivamente y consiste en una reacción de reducción del nitrógeno molecular catalizada por la enzima Nitrogenasa (Fig. 6):



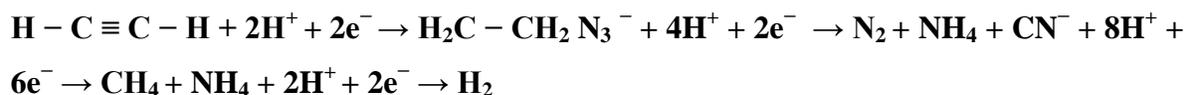
El mecanismo de la enzima se inicia con una reducción de la proteína de Fe por electrones donantes como ferredoxina y flavodoxina (Igarashi y Seefeldt, 2003). Por último, se lleva a



cabo una transferencia de electrones interna en la proteína MoFe del clúster P al clúster FeMo-Co en el sitio de unión al sustrato.

Cada paso de la transferencia de electrones requiere una etapa de ciclado continuo de proteínas de asociación y disociación de la Fe y MoFe. La formación del complejo tiene un papel crucial en el mecanismo de la enzima, ya que se requiere para el acoplamiento de la hidrólisis de ATP para la transferencia de electrones (Thornely y Lowe, 1985).

Sin embargo, esta enzima es capaz de catalizar otras reacciones de reducción, como la del acetileno (Scott et al., 1990):



La nitrogenasa es una enzima compleja de tipo óxido-reductasa que está formada por dos proteínas conservadas (Fig. 7):

- La dinitrogenasa Fe-M (componente I), donde el metal (M) puede ser molibdeno, vanadio o hierro, que está codificada por los genes *nifDK*. Esta proteína es un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ constituido por 30 átomos de hierro y dos del metal correspondiente, distribuidos en dos tipos de cúmulos: los empaques cúbicos o tipo “P” (8Fe, 7S²⁻) y el cofactor Fe-M.
- La dinitrogenasa reductasa (Proteína Fe o componente II) es un dímero compuesto de 2 copias de una sola subunidad α codificado por el gen *nifH*. Esta proteína (sensible al oxígeno) contiene un cluster metálico tipo 4Fe4S, que conecta covalentemente las dos subunidades α , así como dos sitios de enlace MgATP (Eady, 1995).

Para formar la enzima nitrogenasa activa se requiere una molécula del componente I y dos moléculas del componente II (Igarashi y Seefeldt, 2003; Fig. 7).

La nitrogenasa es inhibida también por el ADP y requiere de iones Mg^{2+} para estar activa; también es importante la presencia de Fe, Mo o Va (Postgate, 1998).

Esta enzima es inhibida irreversiblemente por el oxígeno; sin embargo los organismos fijadores poseen una amplia gama de respuestas protectoras de la enzima que evitan los efectos inhibitorios del oxígeno (Lloret y Martínez-Romero, 2005; Shrimant, 2012).



Esta enzima es regulada además, por el N disponible y la humedad (Herman et al., 1993), sin embargo se pueden encontrar casos excepcionales, tales como la expresión de la nitrogenasa de *Paenibacillus azotofixans* (una bacteria que se encuentra en la rizósfera de plantas en regiones tropicales), que no se ve afectada por la presencia de nitratos (Rosado et al., 1998).

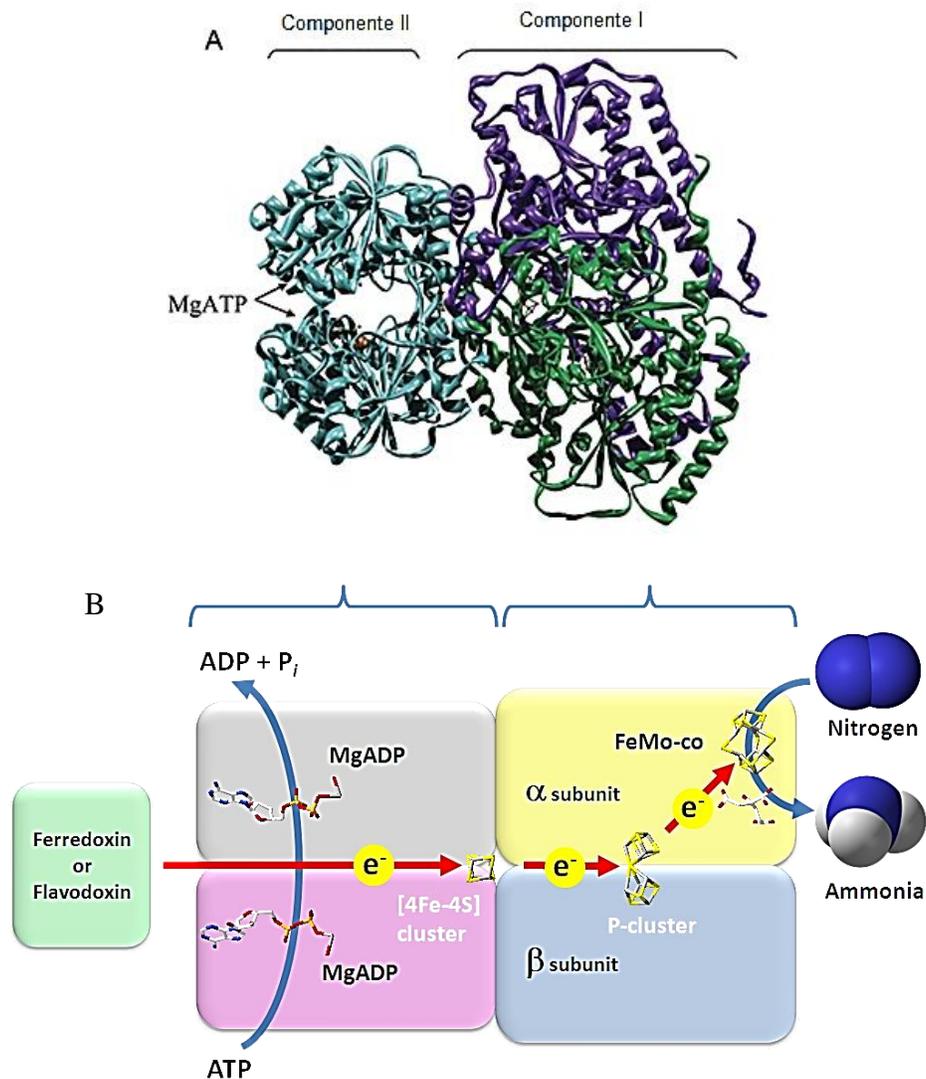
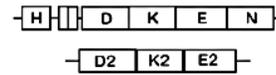


Figura 7. Estructura de A) componentes de la Nitrogenasa (componente I y II) y B) ensamble de la forma activa del complejo Nitrogenasa.

Los genes *nif* están organizados en una unidad transcripcional altamente conservada. Generalmente los operones de estos genes se encuentran en el orden *nifH*, *nifD* y *nifK* (Hernández, 2009; Fig. 8).

Arqueas

M. thermoautotrophicum
Methanococcus marispludis
Methanosarcina barkeri

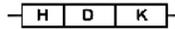


Bacterias

Cyanothece PCC 8801



Cyanothece ATCC 51142



Anabaena variabilis



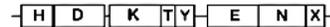
Anabaena PCC7120



Clostridium pasteurianum



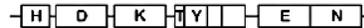
Klebsiella pneumoniae



Enterobacter agglomerans



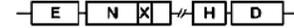
Azotobacter vinelandii



Azospirillum brasilense



Rhodobacter capsulatus



Rhizobium sp NGR 234



Bradyrhizobium japonicum



0.5 Kb

Figura 8. Organización de los genes *nif* en algunas arqueas y bacterias diazótrofes (Fani et al., 2000).

El requerimiento energético en el proceso completo de la fijación de nitrógeno es muy elevado (consume aproximadamente 28 moléculas de ATP), por lo tanto, la síntesis y la actividad de la Nitrogenasa está altamente regulada (Hernández, 2009)

En general, la regulación en la fijación de nitrógeno se puede explicar desde diferentes niveles, que van desde una explicación celular-molecular (incluyendo el control genético, la síntesis de enzimas y otros mecanismos), fisiológica (a nivel de todo el organismo, los fijadores de nitrógeno son sometidos a los controles fisiológicos que determinan cuando puede ocurrir la fijación de nitrógeno), los niveles ecológicos (interacciones bióticas, la disponibilidad de nutrientes) y finalmente a nivel de ecosistemas (los patrones y balances de entradas y salidas de nitrógeno) (Herman et al., 1993; Belnap, 2001; Peter et al., 2002; Orr et al., 2012; Santi et al., 2013).

Diazótrofos del suelo

La fijación biológica del N se produce en una amplia gama de phyla tanto de Arquea como de Bacteria (Young, 1992; Poly et al., 2001). Muchas bacterias heterótrofas tanto Gram

positivas como Gram negativas se han descrito como diazótrofes. Entre ellas se encuentran *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas pseudocalcaligenes*, *Gordonia* sp., *Microbacterium* sp., *Sphingomonas* sp., *Azospirillum* sp. y *Rhizobium* sp. (Chowdhury et al., 2007; González et al., 2008). La mayoría de estos grupos fijan nitrógeno en las superficies de las plantas; mientras que grupos como *Rizobium*, *Frankia* y *Sinorhizobium*, fijan nitrógeno de manera endosimbótica (Sellsted y Richau, 2013).

Los diazótrofes endosimbiontes tienen un papel importante en la vida de las plantas, no solo en su nutrición, sino también como defensa contra agentes patógenos y permiten la adaptación a diversas condiciones de estrés ambiental (Franche, et al., 2009).

Algunos grupos de procariontes, que no se encuentran filogenéticamente relacionados, tienen la capacidad de asociarse con algunas especies vegetales para llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno por endosimbiosis con las plantas (Henson et al., 2004).

Entre ellos se encuentran las cianobacterias, encontradas en asociación con plantas, hongos y algas. Otro grupo importante de bacterias fijadoras de N₂ está conformado por *Frankia* (Actinobacteria) que se puede asociar con plantas de varias familias; y los rizobios, (alfa-proteobacteria) que se asocian principalmente con leguminosas formando nódulos para llevar a cabo la fijación del nitrógeno molecular (Haukka et al., 1998).

Rhizobios es un término colectivo que se utiliza para designar a bacterias fijadoras de nitrógeno capaces de formar simbiosis con leguminosas. En las raíces de las plantas hospederas, los rhizobios provocan la formación de estructuras especializadas llamadas nódulos donde se lleva a cabo la fijación biológica de Nitrógeno (Lloret y Martínez-Romero, 2005; Masson-Boivin et al., 2009).

Por otra parte se encuentran los diazótrofes de vida libre, que son capaces de fijar nitrógeno de manera independiente, cuando este no se encuentra disponible permitiendo la incorporación del N a las redes tróficas del suelo, por lo que estos microorganismos son de gran importancia en el sostenimiento de ecosistemas donde la disponibilidad de nutrientes es limitada, como en el caso de los ecosistemas áridos y semiáridos (Atlas, 1995).

Los organismos fijadores de nitrógeno de vida libre generalmente se encuentran activos en la zona de raíces de las plantas. Éstas a su vez, liberan exudados que estimulan la colonización de bacterias en su zona de raíces y con ello se produce una mayor actividad de fijación de nitrógeno. Se sabe que hasta un 25% de nitrógeno total de las plantas se obtiene

a partir de la fijación de nitrógeno. Pero, además del amoníaco fijado biológicamente, muchos de estos microorganismos son capaces de solubilizar fósforo y hierro y de producir hormonas como auxinas y giberelinas que estimulan el crecimiento de las plantas (Shrimant, 2012).

Los diazótrofos de vida libre están ampliamente distribuidos en grupos parafiléticos con diferentes estilos de vida y metabolismos que incluyen: aerobios, anaerobios, autótrofos, heterótrofos y metanótrofos (Lloret y Martínez-Romero, 2005).

Entre las bacterias fijadoras de nitrógeno se encuentran diferentes especies de los géneros *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia* y *Azospirillum*, algunos anaerobios facultativos y anaerobios obligados como *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Clostridium* y *Desulfovibrio* (Fuentes-Dávila y Ferrera-Cerrato, 2007). En la tabla 1 se muestra el tipo de metabolismo de algunos géneros representativos de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, lo cual nos proporciona información sobre algunos de los requerimientos ambientales que necesitan para crecer en su ambiente natural (Postgate, 1998).

Con excepción de las cianobacterias, que son fijadoras autótrofas, el resto de los diazótrofos de vida libre son heterótrofos y requieren de una fuente externa de carbono orgánico, además de condiciones adecuadas de humedad y de tensión de oxígeno (Postgate, 1998; Chapin et al., 2002). Los fijadores heterótrofos de vida libre que habitan en la rizósfera dependen de los exudados radicales y de la muerte de las propias raíces como fuente de carbono (Chapin et al., 2002).

Tabla 1: Tipo de metabolismo de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre

Tipo de metabolismo	Géneros representativos
Anaerobiosis estricta	<i>Clostridium</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Methanosarcina</i> , <i>Methanococcus</i> .
Anaerobiosis facultativa	* <i>Klebsiella</i> , * <i>Bacillus</i> , * <i>Enterobacter</i> , * <i>Citrobacter</i> , * <i>Escherichia</i> , * <i>Propionibacterium</i> .
Microaerobiosis	* <i>Xantobacter</i> , * <i>Thiobacillus</i> , * <i>Azospirillum</i> , * <i>Aquaspirillum</i> , * <i>Methylosinus</i> , * <i>Burkholderia</i> .
Aerobiosis	<i>Azotobacter</i> , <i>Azomonas</i> , <i>Beijerinckia</i> , <i>Derrxia</i>
Fotótrofia	** <i>Chromatium</i> , ** <i>Chlorobium</i> , ** <i>Thiopedia</i> , ** <i>Ectothiospira</i> , *** <i>Rhodospirillum</i> , *** <i>Rhodopseudomonas</i> , ° <i>Plectonema</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Spirulina</i> , °° <i>Anabaena</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Calothrix</i> , <i>Gloeotheca</i> .

*Son aerobios cuando no fijan nitrógeno; **anaerobios; ***Facultativos; °Microaerobios y °°Aerobios.

Tomada de González, 2008.



Algunos organismos requieren de pH específicos para su crecimiento, por ejemplo, el pH alcalino de un suelo favorece a los actinomicetos (Fuentes-Dávila y Ferrera-Cerrato, 2007); este grupo de fijadores también tienen la capacidad de resistir a condiciones de sequías prolongadas y altas temperaturas (González, 2008).

También existen bacterias ácido-tolerantes con gran capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Tal es el caso de *Saccharobacter nitrocaptans* aislada originalmente de las raíces de caña de azúcar, pero posteriores estudios taxonómicos sobre esta bacteria la ubicaron como *Acetobacter nitrocaptans* (Fuentes-Dávila y Ferrera-Cerrato, 2007).

En cuanto a las Archeas fijadoras de nitrógeno encontramos a las divisiones Methanosarcinales, Methanobacteriales, Halobacteriales y Methanococcales, todas ellas son extremófilas, por lo que requieren de cantidades muy elevadas de sales, de temperatura o de metano para su crecimiento (Postgate, 1998).

Además se encontró que las bacterias fijadoras de nitrógeno como *Azomonas* y *Azotobacter* tienen gran importancia en los procesos de biorremediación. Estos organismos son capaces de crecer en suelos contaminados por hidrocarburos, plaguicidas, metales pesados o compuestos xenobióticos y son tolerantes a diferentes concentraciones de contaminantes orgánicos ya que los pueden utilizar como fuente de carbono y con ello facilitan su degradación y reciclaje (Fuentes-Dávila y Ferrera-Cerrato, 2007).

Identificación molecular de diazótrofos del suelo

La identificación molecular puede representar una ventaja tanto en tiempo como en precisión para la determinación de los diazótrofos del suelo (Poly et al., 2001; Rodicio et al., 2004) debido a que muchos de ellos no pueden cultivarse fácilmente en el laboratorio o existen situaciones en las que su identificación fenotípica consume mucho tiempo y resulta difícil e incluso imposible llevarla a cabo (Little et al., 2008).

Todos los diazótrofos tienen un gen que codifica la proteína Fe de la Nitrogenasa conocido como *nifH*. Este gen ha sido estudiado ampliamente tanto por métodos independientes de cultivo como por los basados en éstos. Técnicas, tales como la PCR, clonación, electroforesis en gel de gradiente de desnaturalización (DGGE), polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP), y el terminal marcado con fluorescencia (FLT)-RFLP,



se han utilizado para analizar la composición de bancos de genes *nifH* en diversos entornos. Los estudios basados en estas técnicas han mostrado que el gen *nifH* está presente en diversos ambientes: suelo forestal, la rizósfera de las especies nativas de los humedales, o de las especies de cultivos, como el arroz, plantas vasculares acuáticas o polares, cianobacterias y las bacterias que se encuentran en los intestinos de termitas. Además, muchos de estos trabajos describen un gran número de secuencias que corresponden a diazótrofos no identificados. Algunos genes *nifH* son característicos de un sitio ecológico particular y otros son cosmopolitas, lo cual podría significar una posible relación entre el hábitat de las bacterias fijadoras de nitrógeno y la estructura del pool de genes *nifH*. Por ello, una alternativa viable para identificar a los diazótrofos es la amplificación por PCR y separación por DGGE y la secuenciación del gen *nifH* a partir de muestras ambientales para tener un acercamiento más preciso sobre las comunidades de estos microorganismos en el suelo (Franche et al., 2009).



¿Cuál es la dinámica de la comunidad de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre de la zona de raíces de *Prosopis laevigata* y *Parkinsonia praecox* en respuesta a las variaciones en las propiedades físicas y químicas del suelo en el valle semiárido de Zapotitlán Salinas, Puebla?

HIPÓTESIS

Si la composición de la comunidad de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre está sujeta a los cambios físico-químicos en el suelo promovidos por las especies vegetales de la terraza aluvial degradada de Zapotitlán Salinas, entonces las comunidades de bacterias fijadoras de nitrógeno del suelo de la zona de raíces de *P. laevigata*, *P. praecox* y del suelo sin cobertura vegetal serán diferentes entre ellas, en respuesta a las modificaciones en las propiedades edáficas promovidas por las plantas, por lo que se encontrarán más especies bajo los dos arbustos que en el suelo sin cobertura vegetal.



JUSTIFICACIÓN

Las zonas áridas son sistemas altamente sensibles a la degradación y uno de los principales factores que la provocan es el breve margen que tienen las ventanas de actividad biológica que permita la recuperación del sistema, además del bajo contenido de N disponible en el suelo.

La degradación del mismo afecta la estructura de la comunidad vegetal y en consecuencia a los microorganismos edáficos y los procesos como la fijación de N_2 , lo cual provoca una disminución de la productividad primaria y atenúa la degradación.

Por ello, es de gran importancia conocer la dinámica de la comunidad de diazótrofos de vida libre del suelo ya que estos organismos son la principal entrada de N disponible para estos sistemas, con lo que se podría estimular la productividad primaria y eventualmente detener la degradación de los sistemas terrestres. Con ello se ganaría tiempo para plantear estrategias de control y de solución a la degradación del suelo.



OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la comunidad de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre de la zona de raíces de *Prosopis laevigata*, *Parkinsonia praecox* y en el suelo sin cobertura vegetal (microambientes) en el valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla, y relacionarla con las variaciones de las propiedades físicas y químicas del suelo.

PARTICULARES

- Determinar las variaciones fisicoquímicas de los tres microambientes del suelo.
- Estandarizar el método para la obtención de DNA de las bacterias del suelo.
- Determinar la riqueza de especies de bacterias fijadoras de nitrógeno cultivables.
- Determinar la riqueza de genes *nifH* del suelo de los tres microambientes del suelo.
- Comparar la diversidad molecular de bacterias fijadoras de nitrógeno de los tres microambientes.
- Correlacionar la diversidad molecular de bacterias fijadoras de nitrógeno con la variación en las propiedades edáficas de los tres microambientes.



CAPÍTULO II: DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO



RESERVA DE LA BIÓSFERA “TEHUACÁN-CUICATLÁN”

El valle de Tehuacán-Cuicatlán se sitúa en el centro-sur de la República Mexicana y abarca la parte sudeste del estado de Puebla y el noreste de Oaxaca, ubicado entre los 17°30' y los 18°53' N y los 96°55' y 97°44' O (Villaseñor et al., 1990). El valle de Tehuacán tiene una extensión de 10,000 km² y sostiene aproximadamente 3000 especies de plantas, de las cuales alrededor del 30% son endémicas y se ha estimado que posiblemente sea la zona árida de Norteamérica con mayor diversidad, por lo que es considerado como un centro de megadiversidad y endemismo a nivel mundial por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (Dávila et al., 2002; Dávila, 2003).

Esta zona tiene una gran historia cultural, entre 12,000 y 14000 años de antigüedad de gran interacción entre la diversidad biológica y los humanos (Casas et al., 2001), lo cual ha resultado en una gran diversidad de saberes y técnicas de manejo de recursos en México, ya que este lugar es conocido por poseer evidencias del inicio de la domesticación de las plantas y de la agricultura en América (Moreno-Calles y Casas, 2008; Blancas et al., 2009; Moreno-Calles y Casa, 2010).

ZAPOTITLÁN SALINAS

Dentro del valle de Tehuacán-Cuicatlán, en la parte nor-occidental, se encuentra el valle de Zapotitlán Salinas, que limita al oriente con las Sierras de Apatzingo y Miahuatepec, al norte con los cerros Chacateca y Pajarito, al poniente con los cerros Viejo y Otate y al sur con los cerros Yistepec y Acatepec (Osorio et al., 1996).

Zapotitlán Salinas tiene una superficie aproximada de 417 km² y se ubica entre los 18°24' y 18°12' N y entre los 97°24' y 97°36' O. En términos hidrográficos, el Valle comprende la cuenca baja del río Zapotitlán (Muñoz et al. en Arizmendi et al., 2007).

Clima. El clima de la cuenca de Zapotitlán, está determinado por el efecto orográfico que ejerce la Sierra Madre Oriental, donde las altas serranías actúan como barrera impidiendo el paso a las corrientes húmedas. Por otra parte, la posición latitudinal sureña, determina en gran medida su régimen térmico cálido que lo diferencia de los desiertos del norte, las lluvias en la cuenca de Zapotitlán son escasas, aleatorias y frecuentemente de carácter torrencial, a veces ocasionadas por las tormentas tropicales o huracanes que se presentan de

septiembre a noviembre en las costas del Golfo y del Pacífico mexicano (Villaseñor et al., 1990).

La clasificación del clima del valle de Zapotitlán de acuerdo al sistema de Köppen modificado por García 1973, corresponde a un clima seco semicálido, con lluvias en verano (BSoHw), con poca oscilación térmica entre los 5° C y 7° C; la temperatura anual es de 21 °C. El mes más caliente se presenta antes del solsticio de verano; el régimen de lluvias ocurre en el verano, hay presencia de una sequía interestival (canícula) en la mitad del periodo de lluvias y con una precipitación media anual que oscila entre 400 y 450 mm (López et al., 2003).

Fisiografía. El valle de Zapotitlán Salinas, por su posición geográfica, pertenece a la zona climática trópico seco; por su origen, forma parte de la división terrestre de la Sierra Madre del Sur, en la región de las Sierras Centrales de Oaxaca, dentro de la provincia de la Alta Mixteca y comprende a la Subprovincia o Sistema Ecogeográfico de la Sierra de Zapotitlán (López et al., 2003).

A nivel local, el valle de Zapotitlán Salinas se divide en nueve tipos de paisaje, atendiendo el origen, geomorfología y tipo de vegetación que presentan, y que son: Sierra de Zapotitlán (Norte), Sierra de Miahuatepec (Oriente), Sistema montañoso Cerro Viejo (Centro-Sur), Sistema Loma Larga (Centro), Sistema Matzitzí (Sur), Sistema Cerro La Hierba (poniente), Dique Agua de Burro (Nor-poniente), Llano de San Martín (Sur-poniente) y planicie de Zapotitlán (porción meridional), la cual constituye el paisaje de menor altitud que comprende el sistema de terrazas aluviales (Barrera, 2001).

Geología. La mayoría de estudios coinciden en que la historia del área se remonta al paleozoico superior, cuando se formó el Complejo Basal (basamento cristalino según Barceló, 1978) o Complejo Acatlán (Ortega y Gutiérrez, 1978) de origen meta-ígneo. Esta región partió de metamorfismo y manifestaciones magmáticas. Se estima una edad para el complejo de 890 millones de años. Desde el final del Pensilvánico al Jurásico tardío, la zona se plegó y emergió para ser cubierta por mares. Con base en estos datos se deduce que el paleoambiente era de zonas pantanosas con clima cálido y sin fuertes cambios estacionales, lo que corresponde a ambientes cercanos a costas poco profundas (Barceló, 1978). Posteriormente en el Cretácico inferior surgió la formación Zapotitlán, cuando se da una transgresión de mares hasta el Altiplano. Durante el Barremiano Tardío existen



intrusiones plutónicas. La formación de Zapotitlán tiene una litología que consiste en secuencias de lutitas calcáreas grises. Más tarde ocurrió un arqueamiento de la formación Zapotitlán creando una paleobahía, donde se depositan las formaciones Agua del Burro y del Cordero, respectivamente. En el Cretácico Inferior afloró la formación Miahuatepec que descansa concordantemente sobre la formación Zapotitlán y yace en forma discordante sobre la formación Tehuacán. Durante el Terciario, ocurrieron eventos de vulcanismo, formándose una serie de cuencas lacustres, las rocas volcánicas principalmente andesitas y conglomerados andesina y olivino afloran discordantemente a las formaciones Zapotitlán, Agua de Burro, San Juan Raya y Acatepec. Aún existen rocas que intrusionan a la Formación Matzitzí aflorando como cuerpos intrusivos. Hacia el Terciario Tardío se registra una falla contemporánea a las rocas volcánicas. Durante el cuaternario se presentaron procesos erosivos muy intensos que permitieron la acumulación de depósitos aluviales principalmente en las zonas bajas cerca del cauce de los ríos producto de la erosión de unidades preexistentes, compuestas de cantos sub-redondeados a redondeados de calizas, arenisca, lutitas y clastos de andesitas con cierta consistencia debido a la cementación fluvial (Muñoz et al. en Arizmendi et al., 2007).

Geomorfología. El valle de Zapotitlán Salinas presenta una variedad altitudinal que va de los 1420 a los 2600 msnm, presenta su cabecera hacia el noroeste y su salida hacia el este. Por su geomorfología presenta las características de un valle intermontano. Está rodeado por un conjunto de elevaciones mayores, en gran parte de origen tectónico, formadas de plegamientos de calizas marinas, lutitas y areniscas. De acuerdo a la hidrología, el área de estudio corresponde a una cuenca exorreica de tamaño pequeño y de forma cuadrada. Esta cuenca se encuentra subdividida hacia el oeste por un conjunto de cuevas de rocas calizas, que la divide naturalmente en una subcuenca alta de 12800 ha y otra baja de 26800 ha, ambas comunicadas en su porción central por una amplia garganta por donde pasa el río Zapotitlán. El fondo del valle es atravesado por el río Zapotitlán, que se extiende en el sentido Oeste-Este, la pendiente de su cauce es muy suave, de tan sólo el 1%, casi plana; por lo tanto, se puede decir que la velocidad del cauce es lento, no obstante, si se considera que durante su trayecto recibe los tributarios, la velocidad de las avenidas en tiempo de lluvias torrenciales puede aumentar considerablemente (Muñoz et al. en Arizmendi et al., 2007).



Suelos. Se han identificado cuatro grupos de suelos, según el sistema de clasificación universal denominado IUSS-WRB (1999), en el valle de Zapotitlán Salinas. Los grupos identificados son: Leptosoles, Regosoles, Calcisoles y Fluvisoles. Los Leptosoles y Regosoles son los más ampliamente distribuidos en el área, son los que ocupan mayor superficie. Se les encuentra formando asociaciones con otros grupos. Debido al incipiente desarrollo morfológico que presentan son considerados como suelos jóvenes, la dureza del material litológico y la falta de precipitación son los principales factores que limitan su desarrollo (Ayala, 2006).

TERRAZAS ALUVIALES

Sobre los márgenes del río Zapotitlán aparece un sistema de terrazas aluviales que presentan superficie relativamente plana con suelos profundos. Las principales formas del relieve son elevaciones menores, lomeríos, escarpes y terrazas aluviales (López et al., 2003).

Las terrazas aluviales son el remanente de una amplia planicie de inundación del río Zapotitlán, que de acuerdo a las dimensiones, forma y pendiente actual, se formaron bajo condiciones climáticas más húmedas. Posteriormente cuando el clima se hizo más seco se disminuyó la energía de la corriente bajando también la carga transportada. Esta misma corriente erosionó sus propios depósitos formando así el actual sistema de terrazas aluviales. Todo indica que estos eventos ocurrieron en el Cuaternario cuando también se presentaron fenómenos extraordinarios de erosión y deposición de material. Este sistema de terrazas aluviales es sumamente dinámico, cambiando frecuentemente de acuerdo a los procesos de maduración y evolución de la cuenca. Por su posición fisiográfica y su composición, se considera como un sistema frágil y susceptible al deterioro.

Estas terrazas ocupan una superficie aproximada de 3500 ha de las cuales el 20 % se clasifican como áreas conservadas, el 15 % como medianamente conservadas, el 60 % como áreas con diferentes grados de degradación y el 5 % como sitios en recuperación. Aproximadamente 700 ha presentan una degradación extrema, considerándose desde el punto de vista geomorfológico como tierras malas, con pérdida casi total de la vegetación. Aquí la terraza original ha sido fuertemente impactada por la erosión fluvial, formando una secuencia interminable de fragmentos o islas con diferente grado de degradación. Las



unidades de suelo predominantes en las terrazas aluviales son Fluvisoles y Regosoles calcáreos. En la mayoría de estas terrazas aluviales, los suelos se formaron por la acumulación de sedimentos fluviales ricos en carbonato de calcio; se distinguen por presentar color gris y texturas entre franco arcillo-limosa, franca y franco-arcillosa; tienen altos contenidos de carbonatos, el subsuelo es pedregoso y con drenaje rápido (López et al. en Arizmendi et al., 2007).

La terraza degradada se encuentra hacia la porción oriental del valle, sobre los márgenes del Río Zapotitlán (Fig. 1). Aproximadamente el 25 % de la terraza presenta un relieve plano irregular muy fragmentado constituido por un conjunto de formaciones (islotos) separados unos de otros por barrancos. Estos islotos presentan toda una gama de condiciones en cuanto a la vegetación se refiere, quedando parches con vegetación más o menos conservados, otros más perturbados y otros sin vegetación. En general, esta terraza presenta efectos muy evidentes de degradación, manifestada por una modificación y fragmentación del paisaje y pérdida de la mayor parte de la biota establecida a causa de procesos naturales de erosión hídrica y eólica (Osorio et al., 1996; López et al. en Arizmendi et al., 2007).



Figura 1. Fotografía que muestra la terraza aluvial degradada cercana a la cabecera municipal de Zapotitlán Salinas, Puebla, que presenta la formación de cárcavas e islotos.

Vegetación en las terrazas aluviales

Existen un total de 145 especies, pertenecientes a 110 géneros y 46 familias de plantas vasculares que prosperan en las terrazas aluviales de Zapotitlán Salinas (Lira et al. En Arizmendi et al., 2007). Esta riqueza específica es relativamente alta, pues representa alrededor del 5% del total de especies de plantas vasculares (2621) encontradas en el valle de Tehuacán-Cuicatlán (Dávila et al., 2002).

Las familias mejor representadas son Cactaceae (19 especies), Asteraceae (15 especies), Leguminosae (14 especies), Poaceae y Euphorbiaceae (cada una con 10 especies). Estas familias comprenden el 46 % del total de especies encontradas en las terrazas aluviales (Lira et al., 2007).

Del total de especies encontradas, 32 % son endémicas (19 especies del valle de Tehuacán-Cuicatlán y 27 especies de México) y 27 % son malezas (39 especies). La proporción de malezas podría ser resultado, hasta cierto punto, del grado de deterioro ambiental existente en la zona (Morín-Valdés, 2003).

En las terrazas aluviales existen cinco tipos de vegetación, representados por una o más asociaciones, cuya presencia depende principalmente de características edafológicas (Lira et al. en Arizmendi et al., 2007). Estas comunidades vegetales son dominadas por algunas especies de árboles y arbustos como *Prosopis laevigata* y *Parkinsonia praecox*, así como por cactáceas columnares como *Neobuxmama tetetzo* y *Myrtillocactus geometrizans*, las cuales proporcionan la fisonomía característica (Mezquital, Cardonal, Tetechera y Matorral espinoso) (Dávila et al, 2002).

La vegetación predominante en la terraza degradada es de matorral de mezquite, donde predomina *P. laevigata* y *P. praecox*, además de cactáceas columnares como *Myrtillocactus geometrizans* y *Pachycerus hollianus* (Valiente-Banuet et al., 2000).

REFERENCIAS

- Ayala, F. 2006. Caracterización hidrográfica de la micro Cuenca de Colonia San Martín, Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Tesis (Licenciatura en Biología), FES Iztcala, UNAM.
- Barrera, C., 2001. Descripción y regionalización fisiográfica del Valle de Zapotitlán, Puebla. Tesis de Licenciatura, FES-Iztacala, UNAM.
- Casas, A., A. Valiente-Banuet, J. Viveris, J. Caballero, L. Cortés, P. Dávila, R. Lira and I. Rodríguez. 2001. Plant resources of the Tehuacan-Cuicatlan Valley, Mexico. *Economic Botany*. 55: 129-166.
- Dávila, P. 2003. La flora útil de dos comunidades indígenas del valle de Tehuacán-Cuicatlán: Coxcatlán y Zapotitlán de las Salinas, Puebla.
- Dávila, P. Arizmendi, M. Valiente-Banuet, A. Villaseñor, J.L. Casas, A. y Lira R; 2002. Biological diversity in Tehuacán-Cuicatlán Valley, México; *Biodiversity and Conservation*. 11: 421- 442.
- Lira, R., P. Dávila, H. Godínez y O. Téllez. El estudio de las plantas en el Proyecto General de la UBIPRO. En Arizmendi, M. C., G. Ávila, F. López, M. Murguía, S. Rodríguez y S. Solórzano (eds). 2007. Deterioro ambiental en zonas áridas. Una década de experiencia multidisciplinaria del proyecto UBIPRO. FES Iztacala, UNAM. México. ISBN: 978-970-32-4828-5.
- López, F., D. Muñoz-Iniestra, M. Hernández-Moreno, A. Soler- Aburto, M. C. Castillo-López, and I. Hernández-Arzate. 2003. Análisis integral de la toposecuencia y su influencia en la distribución de la vegetación y la degradación del suelo en la subcuenca de Zapotitlán Salinas, Puebla. *BSGM*. 56:19-41.
- López, F., D. Muñoz, M. M. Hernández, A. Soler y G. Horta. Evaluación del ambiente físico de las terrazas fluviales y Valle de Zapotitlán. En Arizmendi, M. C., G. Ávila, F. López, M. Murguía, S. Rodríguez y S. Solórzano (eds). 2007. Deterioro ambiental en zonas áridas. Una década de experiencia



multidisciplinaria del proyecto UBIPRO. FES Iztacala, UNAM. México. ISBN: 978-970-32-4828-5.

- Morín-Valdés, C. 2003. Estudio florístico de las terrazas aluviales del Río Salado, en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis de Licenciatura, FES-Iztacala, UNAM.
- Muñoz, D., Horta, G., López, F., Hernández, M. y Soler A. 2007. El valle de Zapotitlán Salinas, Puebla: Marco Geográfico Regional. En Arizmendi, M. C., G. Ávila, F. López, M. Murguía, S. Rodríguez y S. Solórzano (eds). 2007. Deterioro ambiental en zonas áridas. Una década de experiencia multidisciplinaria del proyecto UBIPRO. FES Iztacala, UNAM. México. ISBN: 978-970-32-4828-5.
- Oliveros-Galindo, O. 2000. Descripción estructural de las comunidades vegetales en las terrazas aluviales del Río Salado, en el Valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Tesis de Licenciatura, FES-Iztacala, UNAM.
- Osorio, O., A. Valiente-Banuet, P. Dávila and R. Medina. 1996. Tipos de vegetación y diversidad beta en el Valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México. *BSBM*. 35-58.
- Pavón, N., Briones, O. & Flores-Rivas, J. 2005. Literfall production and nitrogen content in an intertropical semiarid Mexican scrub. *Journal of Arid Environments*. **60**:1-13.
- Tamayo, J. L. y E. Beltrán. 1977. Recursos Naturales de la Cuenca del Papaloapan. SARH-Comisión del Papaloapan. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables. México, D. F.
- Valiente-Banuet, A., A. Casas, A. Alcántara, P. Dávila, N. Flores-Hernández, J. L. Villaseñor, J. Ortega-Ramírez, and J. A. Soriano. 2000. La vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *BSBM*. 67:25-75.
- Villaseñor, J., Dávila, P. y Chiang, F. 1990. Fitogeografía del valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. **50**:135-149.



CAPÍTULO III: CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LOS MICROAMBIENTES DEL SUELO

Serrano-Vázquez A., Rodríguez-Zaragoza S., Pérez-Juárez H., Bazán-Cuenca J., Rivera-Aguilar V. M., and Durán A. 2013. Physical and chemical variation of soil under two desert shrubs in Tehuacan, Mexico. *Soil Science*; 178(2): 87-103.



Los arbustos de desierto modifican las propiedades físicas y químicas del suelo bajo su dosel, en comparación con el suelo sin cobertura vegetal. Por lo que el conocimiento de la variación de las propiedades del suelo provocada por *Prosopis laevigata* (*P. laevigata*) y *Parkinsonia praecox* (*P. praecox*) es necesaria para comprender el funcionamiento de estos microambientes de desierto. El objetivo de este estudio fue determinar la estructura del suelo, la temperatura, la textura, la humedad, la capacidad de retención de agua (WHC), conductividad eléctrica (CE), pH, materia orgánica (MO) y contenido de ortofosfatos (OP) del suelo sin cobertura vegetal y las variaciones de estos factores bajo *P. laevigata* y *P. praecox* de 0 a 50 cm de profundidad (en intervalos de 10 cm), durante un ciclo estacional en Tehuacán, México. Se encontró que bajo los arbustos hay mayor estructura del suelo, sobre todo a profundidades de 0-10 cm. Las propiedades del suelo bajo los arbustos varían más en los 0-10 cm a lo largo del ciclo estacional que en las otras profundidades ($P < 0.05$). Los suelos bajo *P. praecox* tienen la temperatura más baja, mientras que el interespacio presenta la cantidad más baja de humedad y la más alta EC ($P < 0.05$). Las superficies de los arbustos del suelo tienen el mayor WHC, pH, OM y OP ($P < 0.05$). El porcentaje de arenas, limos y arcillas varían según la temporada y la profundidad, pero no entre microambientes ($P < 0.05$). La temperatura, porcentaje de arenas, OM, y OP disminuyen al aumentar la profundidad, mientras que se incrementan tanto el porcentaje de arcillas y CE ($P < 0.05$). Además, CE es la propiedad del suelo más variable ($CV > 60\%$). Se observaron correlaciones significativas entre las propiedades del suelo, siendo la correlación más fuerte entre OM y OP bajo *P. praecox* ($R = 9,86$, $P < 0.05$). El análisis de agregación de las propiedades físicas y químicas del suelo formó tres grupos (90% similitud) que corresponden 1) 0-50 cm suelo sin cobertura vegetal, 10-40 cm de suelo bajo *P. praecox* y 10-40 cm de suelo bajo *P. laevigata*, en tanto que los primeros 10 cm del suelo bajo ambos arbustos son diferentes.

Physical and Chemical Variations of the Soil Under Two Desert Shrubs in Tehuacan, Mexico

Angélica Serrano-Vázquez,^{1,2} Salvador Rodríguez-Zaragoza,² Horacio Pérez-Juárez,^{2,3}
 Jesús Bazán-Cuenca,² Víctor Manuel Rivera-Aguilar,² and Ángel Durán,⁴

Abstract: Desert shrubs modify the soil's physical and chemical properties under their canopies, making it different from bare soil. Knowledge of the bare soil's physical and chemical properties and their variation under *Prosopis laevigata* and *Parkinsonia praecox* is necessary to understand the functioning of desert microenvironments. The objective of this study was to determine the soil structure, temperature, texture, moisture, water-holding capacity, electrical conductivity (EC), pH, organic matter (OM), and orthophosphate (OP) content of bare soil and the variations of these factors under *P. laevigata* and *P. praecox* at 0- to 50-cm depths during a seasonal cycle in Tehuacan, Mexico. Soils under the shrubs have more structure, particularly at depths of 0 to 10 cm. The soil properties vary most from 0 to 10 cm along a seasonal cycle under the shrubs. Soils under *P. praecox* have the lowest temperature, whereas bare soil exhibits the lowest amount of moisture and highest EC. The surfaces of soil shrubs have the highest water-holding capacity, pH, OM, and OP. Sand, silt, and clay content vary with season and depth but not between microenvironments ($\alpha < 0.05$). Temperature, sand, OM, and OP decrease with increasing depth, whereas clay and EC increase ($\alpha < 0.05$). Electrical conductivity is the most variable soil property (coefficient of variation > 60%). Significant correlations were observed among the soil properties, with the strongest correlation between OM and OP under *P. praecox* ($R = 9.86$; $P < 0.05$). Cluster analysis of the physical and chemical soil properties yielded three groups (90% similarity).

Key words: *Prosopis laevigata*, *Parkinsonia praecox*, bare soil, soil microenvironments, plant-soil interaction.

(*Soil Sci* 2013;178: 87–103)

Soil systems are formed by many physical and chemical gradients generated by processes that act with different intensities and scales (Hou-Long et al., 2010). Physical and chemical soil properties can therefore show remarkable variations at the macroscale and microscale because of the spatial and temporal interactions among the different factors (Hou-Long et al., 2010). In general, variations in soil properties determine the function of soil

desert ecosystems in which the availability of water is limited and the environmental conditions are extreme (Passioura, 2002; Hodge et al., 2009; Wallenius et al., 2011). Desert plants modify the physical and chemical properties of the soil under their canopies with litter and root exudation (Barness et al., 2009; Li et al., 2011; Sylvain and Wall, 2011), improving soil microenvironments (over soil without vegetation), diminishing direct sunlight, increasing local moisture content, protecting the surface soil from hydric and eolic erosion, and adding fresh organic matter into the soil (González-Ruiz et al., 2007; Olvera-Carrillo et al., 2009; Li et al., 2011; García-Sánchez et al., 2012).

In areas in which water availability limits plant coverage, desert shrubs may form fertility islands (Perroni-Ventura et al., 2006; González-Ruiz et al., 2007; García-Sánchez et al., 2012). This insular phenomenon has been demonstrated beneath *Prosopis laevigata* and *Parkinsonia praecox* in the Mexican intertropical desert of Tehuacan (Perroni-Ventura et al., 2006; González-Ruiz et al., 2007). Although *P. laevigata* and *P. praecox* share many features, these shrubs may affect soil in different ways and can create specific microenvironments in the soil under their canopies (Reyes-Reyes et al., 2002; Montaña et al., 2006). García-Sánchez et al. (2012) evaluated the effects of *P. laevigata* and *Mimosa biuncifera* on the structure and soil nutrients of the Zapotitlán Desert and found that *P. laevigata* created more resource-rich islands than did *M. biuncifera*. This finding suggests that each legume modifies the microenvironment differently, generating different soils. This result was also reported by Camargo-Ricarde et al. (2010) with 10 legume species in an arid zone. The micro-scale modifications promoted by these desert shrubs are important for preserving soil biodiversity under the extreme abiotic conditions found in desert systems (Barness et al., 2009; Li et al., 2011; Sylvain and Wall, 2011). However, a detailed approximation of the soil behavior under these shrubs is difficult because of the complexity of the desert system. A detailed study based on the variations in soil properties caused by the physical and chemical changes under *P. laevigata* and *P. praecox* is critical to understanding how these two legumes species, which live in the same area, affect the characteristics of the soil under their canopies. We consider how the soil properties vary at different depths in the microenvironments created by *P. laevigata* and *P. praecox* during one seasonal cycle in the Tehuacan Desert. Therefore, we aim to determine the morphology, texture (sand, silt, and clay), temperature, moisture, water-holding capacity (WHC), pH, electrical conductivity (EC), organic matter (OM), and orthophosphate (OP) content in bare soil and their variations under *P. laevigata* and *P. praecox* in the 0- to 50-cm soil layers during drought, light rain, canicula, and heavy rain in an alluvial terrace of the Tehuacan Desert in Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Study Site

The Tehuacan Valley is a semiarid desert formed by rain shadows from the Sierra Madre Oriental and is located 400 km south of Mexico City (Villaseñor et al., 1990). The system of

¹Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México.

²Laboratorio de Microbiología, UBIPRO, FES-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, Estado de México, México.

³Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México.

⁴Carrera de Biología, FES-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, Estado de México, México.

Address for correspondence: Angélica Serrano-Vázquez, Laboratorio de Microbiología, UBIPRO, FES-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, CP: 54090, Estado de México, México. E-mail: anseva_31@yahoo.com.mx

Financial Disclosures/Conflicts of Interest: This study was supported by the following programs: UNAM-DGAPA-PAPIIT (IN221709 and IN217112) and FES-IZTACALA-UNAM-PAPCA (2011-2012). The authors thank CONACyT for their doctoral scholarship program (CVU No. 169204).

The authors report no conflicts of interest.

Received July 24, 2012.

Accepted for publication January 24, 2013.

Copyright © 2013 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN: 0038-075X

DOI: 10.1097/SS.0b013e318289b24a



alluvial terraces deposited along the banks of the Salado River forms a severe badland (Torri and Rudolf, 2000). These terraces exhibit relatively flat surfaces and deep soils (Lopez-Galindo et al., 2003). The predominant soil units are Calcaric Regosols and Fluvisols (according to FAO-WRB, 2006, in López-Galindo et al., 2003). The alluvial terraces are located in Zapotitlan Salinas between 18°12' and 18°25'N latitude and 97°24' to 97°25'W longitude at an elevation gradient ranging from 1,460 to 2,600 m above sea level. The annual mean temperature is 21°C, and the average precipitation is 400 to 450 mm. Rainfall is sparse or random, and torrential rainfall caused by tropical storms or hurricanes can sometimes occur through the end of the rainy season (Lopez-Galindo et al., 2003). The seasonality is divided into a long drought followed by light rain (first rainy season), a season without rain (canicula), and heavy rains (second rainy season). The predominant vegetation in the alluvial terraces is scrubland dominated by *P. laevigata* and followed by *Pachycereus hollianus* and *Myrtillocactus geometrizans*, whereas *P. praecox* is scattered around the terraces (Osorio-Beristain et al., 1996; Valiente-Banuet et al., 2000). *Prosopis laevigata* and *P. praecox* also play a key ecological role because they strongly influence the seed bank of the soil. In addition, these species provide a suitable habitat for other plants, microorganisms, birds, rodents, and insects that are critical for such processes as organic matter decomposition, seed dissemination, pollination, and plant establishment in the Tehuacan Desert (Valiente-Banuet et al., 2000; Perroni-Ventura et al., 2006; González-Ruiz et al., 2007). These shrubs are also economically important to the valley's inhabitants (Velázquez et al., 2008). These two plants belong to the legume family, and both develop phreatophytic roots, enabling them to survive in arid soil conditions (Pen-Mouratov et al., 2008). Both blossom and fructify during the dry season from February to June, producing leaves during the rainy season (Pavon and Briones, 2001). However, *P. laevigata* and *P. praecox* exhibit several differences: *P. praecox* litters at the end of the rainy season and remains devoid of leaves for the rest of the year, whereas *P. laevigata* litters throughout the year and is an evergreen shrub. In addition, the microenvironments under *P. laevigata* and *P. praecox* exhibit differences in terms of the physical and chemical properties of the soil to depths of 50 cm during the season of heavy rains (Rodríguez-Zaragoza et al., 2008). Moreover, the population of *P. laevigata* on the degraded terraces of the Tehuacan Valley is much denser than that of *P. praecox* (Valiente-Banuet et al., 2000).

Sampling and Physicochemical Analysis

Four individual organisms of *P. laevigata* and four of *P. praecox* with similar characteristics, along with four bare soil sites, in a degraded alluvial terrace of the Tehuacan Desert in Mexico were selected. The soil structure characteristics of the bare soil (structure, stability, and root type) and those under the canopy of the two shrubs (four replicates) from 0 to 50 cm deep (three microenvironments by five depths by four replicates = 60 samples) were recorded *in situ* during the drought season (Muñoz et al., 2007). The soil samples were collected during one seasonal cycle, corresponding to the drought season, first

rainy season (Rain I), canicula season, and second rainy season (Rain II) (September 2008 and May, August, and October 2009). The soil temperatures under *P. laevigata* and under *P. praecox* and in bare soil were measured in the field at approximately noon during each season with a Reotemp thermometer (Reotemp Instruments, San Diego, CA) in the 0- to 10-cm and 10- to 20-cm layers (three microenvironments by two depths by four replicates by four seasons = 96 samples). The soil samples were collected using stainless steel nucleators (10 cm in diameter) from under the canopy of each shrub and from a bare soil area at depths of 0 to 10, 10 to 20, 20 to 30, 30 to 40, and 40 to 50 cm. A total of 240 soil samples (three microenvironments by five depths by four replicates by four seasons = 240) were stored in self-sealing bags, deposited in a camp cooler to avoid overheating, and stored at 4°C until being processed for physical and chemical analyses. All soil samples were analyzed separately for each physical and chemical property. The soil moisture was measured using a gravimetric method after arriving at the laboratory (Ortiz and Ortiz, 1980, in Muñoz et al., 2007). The soil samples were oven dried at 110°C for 72 h and sieved through a 2-mm mesh screen. Soil texture (percentages of sand, silt, and clay) was determined using a hydrometer, a method described by Bouyoucos, 1962 (Muñoz et al., 2007). Water-holding capacity was measured via soil saturation (Muñoz et al., 2007). Electrical conductivity was determined from a soil extract with an EC meter (soluble salts tester, Mark Kelway model SST; Kel Instruments Co., Inc., Wyckoff, NJ), following the manufacturer's instructions. pH was determined in a 1:2.5 soil solution in distilled water using a pH meter (Conductronic pH120, pH Electrode BA17; Boeco, Hamburg, Germany) (Bates, 1954; Willarb et al., 1958, in Muñoz et al., 2007). Organic matter content was measured using acid oxidation, a method described by Walkley and Black (1934; Nelson and Sommers, 1982). Available phosphorous was determined using the Olsen extraction method with NaHCO₃ as the extractant (Cajuste, 1986).

Statistical Analysis

The variables were analyzed using descriptive statistical methods to calculate the mean, S.D., SE, coefficient of variation (CV), first quartile (Q1), median, and third quartile (Q3) by the microenvironment, season, and depth of each physicochemical parameter, and box plots were created using the statistical package MINITAB® 1.5 (Minitab, Inc., State College, PA). The mean and median were used as primary estimates of the central tendency, and the S.D., SE, CV, minimum, Q1, Q3, and maximum were used to describe the degree of variability in the physical and chemical properties of the soil. To analyze any significant differences between the seasons, microenvironments, and depths, all quantitative data were normalized and analyzed via multifactorial analysis of variance ($\alpha < 0.05$) using MINITAB 1.5 software. Tukey test was used to determine which means were significantly different ($P < 0.01$) among the microenvironments, stations, and depths with the MINITAB 1.5 software. Pearson correlation analysis was conducted with the physical and chemical parameters of each microenvironment ($P < 0.05$) using the

TABLE 1. Frequency and Characteristics of the Considered Shrub Species From the Degraded Terrace of the Tehuacan Valley Used in This Study

Shrub Species	Frequency, Individuals		Mean ± S.D.		
	per m ²	n	Height, m	Canopy Diameter, m	Basal Diameter, cm
<i>P. laevigata</i>	0.115	4	3.07 ± 0.42	2.57 ± 0.31	27.61 ± 2.83
<i>P. praecox</i>	0.025	4	3.45 ± 0.66	2.97 ± 1.16	21.72 ± 1.50



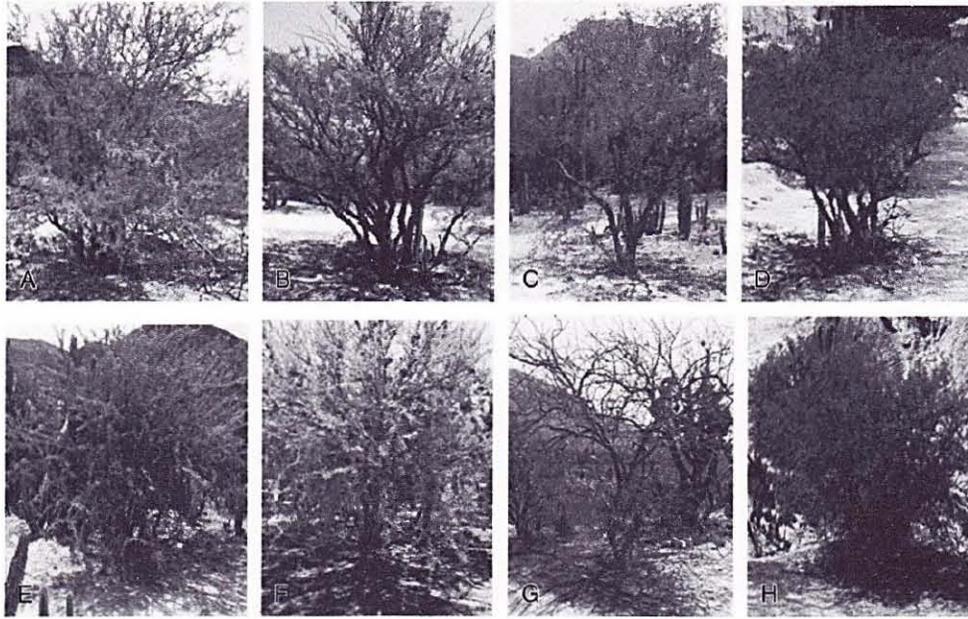


FIG. 1. Phenological changes of *P. laevigata* under (A) drought, (B) first rainy season, (C) canicula, and (D) second rainy season. Phenological changes of *P. praecox* under (E) drought, (F) first rainy season, (G) canicula, and (H) second rainy season.

MINITAB 1.5 software package. Microenvironments were tested for group similarity using Hierarchy cluster analysis with the PRIMER-5© (Version 5.2.8; Primer-E Ltd., United Kingdom) software package.

RESULTS

Characteristics of the Shrubs Used in This Study

We found that *P. laevigata* is present in the alluvial terrace with greater frequency than *P. praecox* (5:1, respectively). However, both shrubs are poorly represented along the terrace, with neither reaching an estimated density of one organism per square

meter (Table 1). In general, the height and canopy diameters and basal diameters of the shrubs were homogeneous among the individuals sampled in this study (Table 1); however, *P. praecox* exhibited more phenological changes during the seasons studied than did *P. laevigata* (Fig. 1).

Soil Structure

Soil microenvironments formed under the canopies of *P. laevigata* and *P. praecox* exhibited a more developed structure at the 0- to 10-cm depths than at the 20- to 50-cm depths (Table 2).

Both shrubs have medium and fine root abundances at the 0- to 10-cm depths, although fine roots may extend further than

TABLE 2. Structure at Different Depths in the Soil Under *P. laevigata*, the Soil Under *P. praecox*, and in Bare Soil

Microenvironment	Depth, cm	n	Structure	Stability	Roots
<i>P. laevigata</i>	0-10	4	Individual particle, microaggregates, and small subangular polyhedral	Moderately stable	Abundant fine, medium rare, and large low
	10-20	4	Individual particle, small and median subangular polyhedral		Few fine
	20-30	4	Individual particle, small and median subangular polyhedral		
	30-40	4	Individual particle, small and median subangular polyhedral		
	40-50	4	Individual particle, small and median subangular polyhedral		
<i>P. praecox</i>	0-10	4	Microaggregates, subaggregates, median subangular polyhedral	Moderately stable	Common fine and rich medium
	10-20	4	Individual particle, small and median subangular polyhedral		Few fine and rich medium
	20-30	4	Individual particle, small and median subangular polyhedral		Abundant fine and medium rare
	30-40	4	Individual particle, small and median subangular polyhedral		
	40-50	4	Individual particle, small and median subangular polyhedral		Common fine
Bare soil	0-10	4	Individual particle and small subangular polyhedral	Weakly stable	Common fine and medium rare
	10-20	4	Individual particle and small subangular polyhedral		Common fine
	20-30	4	Individual particle and small subangular polyhedral		Few fine
	30-40	4	Individual particle and small subangular polyhedral		Rootless
	40-50	4	Individual particle and small subangular polyhedral		



TABLE 3. Physical and Chemical Properties of the Soil Under *P. laevigata*, the Soil Under *P. praecox*, and in Bare Soil, Including Temperature, Sand, Silt, Clay, and WHC

Microenvironment	Season	Depth, cm	n	Mean ± S.D.; CV, %				
				Temperature, °C	Sand, %	Silt, %	Clay, %	WHC, mL g ⁻¹
<i>P. laevigata</i>	Drought	0-10	4	20.23 ± 1.83; 9.06	45.4 ± 8.19; 18.03	31.9 ± 11.8; 34.73	22.7 ± 4.23; 18.61	0.54 ± 0.05; 8.51
		10-20	4	19.88 ± 1.31; 6.62	41.9 ± 3.80; 9.07	34.9 ± 1.05; 3.1	23.2 ± 3.47; 14.96	0.52 ± 0.04; 6.84
		20-30	4	ND	41.4 ± 4.36; 0.54	32.9 ± 4.46; 13.55	25.7 ± 0.89; 3.45	0.43 ± 0.05; 10.57
		30-40	4	ND	43.9 ± 5.98; 13.62	29.8 ± 5.12; 17.17	26.3 ± 2.74; 10.42	0.47 ± 0.04; 9.14
		40-50	4	ND	38.3 ± 6.87; 17.94	35.9 ± 5.06; 14.10	25.8 ± 4.54; 17.61	0.51 ± 0.07; 12.99
	Rain I	0-10	4	24.63 ± 2.56; 10.40	40.1 ± 3.02; 7.53	40.2 ± 2.03; 5.04	19.7 ± 3.35; 17.02	0.59 ± 0.08; 13.99
		10-20	4	21.56 ± 1.71; 7.94	35.7 ± 5.22; 14.62	41.2 ± 5.67; 13.75	23.1 ± 0.89; 3.84	0.59 ± 0.05; 8.94
		20-30	4	ND	35.3 ± 2.96; 8.40	38.7 ± 4.97; 12.84	26.0 ± 3.3; 13.59	0.54 ± 0.05; 9.80
		30-40	4	ND	39.5 ± 10.61; 26.86	36.3 ± 8.87; 24.43	24.2 ± 2.39; 9.87	0.53 ± 0.04; 7.06
		40-50	4	ND	35.7 ± 6.0; 17.00	39.4 ± 3.99; 10.14	24.9 ± 3.35; 13.46	0.52 ± 0.03; 6.32
	Canicula	0-10	4	28.44 ± 1.53; 5.39	34.9 ± 4.00; 11.48	40.0 ± 2.94; 7.35	24.6 ± 0.21; 11.52	0.62 ± 0.15; 23.74
		10-20	4	27.06 ± 2.38; 8.81	32.3 ± 6.26; 19.38	40.6 ± 2.50; 6.15	27.1 ± 6.80; 25.09	0.58 ± 0.10; 16.48
		20-30	4	ND	33.2 ± 11.64; 35.07	34.6 ± 7.40; 21.39	32.2 ± 12.71; 39.47	0.54 ± 0.10; 17.58
		30-40	4	ND	27.7 ± 7.49; 27.03	33.9 ± 9.83; 29.00	38.4 ± 15.04; 39.17	0.58 ± 0.20; 34.97
		40-50	4	ND	27.1 ± 9.15; 33.75	33.7 ± 5.98; 17.75	39.2 ± 14.68; 37.46	0.56 ± 0.12; 22.04
	Rain II	0-10	4	28.44 ± 1.16; 2.35	40.9 ± 9.07; 22.18	37.1 ± 6.61; 17.81	22.0 ± 3.75; 17.06	0.66 ± 0.03; 4.46
		10-20	4	27.06 ± 0.72; 2.32	33.7 ± 11.32; 33.58	37.0 ± 4.30; 11.63	29.3 ± 7.72; 26.36	0.58 ± 0.05; 9.12
		20-30	4	ND	33.0 ± 9.46; 28.66	36.3 ± 3.61; 9.95	30.7 ± 10.42; 33.95	0.57 ± 0.07; 11.72
		30-40	4	ND	37.0 ± 15.00; 40.53	33.5 ± 8.46; 25.24	29.5 ± 12.65; 42.90	0.56 ± 0.08; 14.53
		40-50	4	ND	32.1 ± 11.94; 37.19	38.6 ± 6.63; 17.18	29.3 ± 11.83; 40.37	0.52 ± 0.10; 18.91
<i>P. praecox</i>	Drought	0-10	4	19.75 ± 0.65; 3.27	34.9 ± 8.61; 24.68	40.7 ± 7.97; 19.58	24.4 ± 1.63; 6.69	0.51 ± 0.04; 8.32
		10-20	4	19.25 ± 0.50; 2.60	43.0 ± 14.38; 33.43	33.8 ± 11.69; 34.58	23.2 ± 2.79; 12.03	0.45 ± 0.02; 3.31
		20-30	4	ND	43.6 ± 9.59; 22.01	31.5 ± 7.84; 24.89	24.9 ± 2.20; 8.84	0.46 ± 0.06; 12.65
		30-40	4	ND	38.1 ± 12.68; 33.28	34.6 ± 9.85; 28.47	27.3 ± 3.67; 13.45	0.49 ± 0.07; 14.92
		40-50	4	ND	35.7 ± 12.10; 33.90	31.9 ± 2.45; 7.69	32.4 ± 10.12; 31.25	0.53 ± 0.04; 7.06
	Rain I	0-10	4	20.38 ± 0.75; 3.68	37.9 ± 5.57; 14.68	41.2 ± 4.33; 10.52	20.9 ± 1.91; 9.16	0.58 ± 0.06; 10.09
		10-20	4	20.00 ± 1.08; 5.40	35.4 ± 7.58; 21.41	42.7 ± 4.90; 11.48	21.9 ± 3.27; 14.94	0.58 ± 0.05; 9.20
		20-30	4	ND	34.7 ± 9.27; 26.71	42.3 ± 8.66; 20.46	23.0 ± 0.95; 4.14	0.54 ± 0.07; 12.65
		30-40	4	ND	33.4 ± 10.70; 32.04	41.2 ± 7.25; 17.60	25.4 ± 4.83; 19.01	0.51 ± 0.05; 8.93
		40-50	4	ND	31.3 ± 7.25; 23.18	45.3 ± 8.68; 19.16	23.4 ± 1.74; 7.45	0.51 ± 0.04; 6.98
	Canicula	0-10	4	24.31 ± 1.60; 6.58	37.1 ± 5.26; 14.18	42.5 ± 3.58; 8.43	20.4 ± 1.82; 8.91	0.61 ± 0.10; 16.67
		10-20	4	21.38 ± 1.44; 6.72	33.1 ± 5.26; 15.89	44.5 ± 4.00; 9.00	22.4 ± 2.65; 11.85	0.52 ± 0.10; 19.32
		20-30	4	ND	31.2 ± 6.12; 19.61	44.4 ± 4.30; 9.68	24.4 ± 2.33; 9.56	0.52 ± 0.05; 9.25
		30-40	4	ND	29.0 ± 12.52; 43.16	47.6 ± 12.97; 27.24	23.4 ± 3.40; 14.54	0.47 ± 0.08; 17.23
		40-50	4	ND	34.4 ± 14.17; 41.20	44.3 ± 16.63; 37.54	21.3 ± 5.00; 23.47	0.52 ± 0.02; 2.87
	Rain II	0-10	4	20.38 ± 0.48; 2.35	41.8 ± 4.26; 10.20	36.6 ± 3.83; 10.46	21.6 ± 1.18; 5.45	0.60 ± 0.03; 5.48
		10-20	4	20.63 ± 0.48; 2.32	35.4 ± 2.03; 5.72	41.1 ± 1.91; 4.66	23.5 ± 1.94; 8.27	0.58 ± 0.04; 6.92
		20-30	4	ND	32.8 ± 3.62; 11.04	40.1 ± 1.91; 4.78	27.1 ± 3.61; 13.33	0.55 ± 0.04; 7.42
		30-40	4	ND	26.9 ± 2.74; 10.19	38.1 ± 7.00; 18.37	35.0 ± 9.34; 26.70	0.55 ± 0.03; 5.40
		40-50	4	ND	26.7 ± 2.34; 8.77	31.8 ± 7.05; 22.16	41.5 ± 6.16; 14.84	0.57 ± 0.09; 15.63

Soil	Season	Depth (cm)	n	WHC	Temperature (°C)			Moisture (%)			pH		
					Mean	SE	Range	Mean	SE	Range	Mean	SE	Range
Bare soil	Drought	0-10	4	ND	21.25 ± 0.87	4.08	43.7 ± 4.26; 9.76	34.6 ± 2.00; 5.78	21.7 ± 3.35; 15.45	0.48 ± 0.12; 24.51			
		10-20	4	ND	21.25 ± 0.50; 2.35	47.8 ± 8.55; 17.89	47.8 ± 8.55; 17.89	33.5 ± 6.29; 18.76	18.7 ± 3.58; 19.16	0.42 ± 0.07; 17.96			
		20-30	4	ND	ND	41.4 ± 12.28; 29.67	41.4 ± 12.28; 29.67	36.3 ± 12.56; 34.59	22.3 ± 4.39; 19.67	0.41 ± 0.05; 12.89			
		30-40	4	ND	ND	41.1 ± 6.61; 16.08	41.1 ± 6.61; 16.08	35.6 ± 10.95; 30.77	23.3 ± 5.00; 21.46	0.46 ± 0.02; 4.85			
	Rain I	0-10	4	25.63 ± 2.14; 8.34	40.7 ± 10.09; 24.80	40.7 ± 10.09; 24.80	33.7 ± 6.89; 20.45	25.6 ± 5.78; 22.57	0.45 ± 0.07; 14.74				
		10-20	4	23.75 ± 0.29; 1.22	35.4 ± 4.03; 11.39	35.4 ± 4.03; 11.39	41.4 ± 4.54; 10.97	23.2 ± 3.01; 12.98	0.53 ± 0.03; 4.87				
		20-30	4	ND	32.9 ± 3.43; 10.43	32.9 ± 3.43; 10.43	43.3 ± 4.35; 10.05	23.8 ± 2.03; 8.51	0.53 ± 0.02; 3.30				
		30-40	4	ND	38.9 ± 7.56; 19.44	38.9 ± 7.56; 19.44	39.5 ± 7.58; 18.68	21.6 ± 0.57; 2.62	0.49 ± 0.02; 3.57				
	Canicula	0-10	4	29.75 ± 0.46; 1.53	42.8 ± 6.84; 15.97	42.8 ± 6.84; 15.97	36.1 ± 5.43; 15.04	21.1 ± 2.87; 13.62	0.53 ± 0.05; 8.81				
		10-20	4	29.63 ± 1.30; 4.38	43.7 ± 7.03; 16.12	43.7 ± 7.03; 16.12	33.3 ± 6.59; 19.80	23.0 ± 1.77; 7.71	0.54 ± 0.05; 9.20				
		20-30	4	ND	34.6 ± 2.00; 5.78	34.6 ± 2.00; 5.78	42.4 ± 3.12; 7.35	23.0 ± 2.70; 11.75	0.47 ± 0.02; 5.12				
		30-40	4	ND	33.1 ± 8.54; 25.81	33.1 ± 8.54; 25.81	31.0 ± 17.70; 14.60	24.6 ± 5.94; 24.14	0.45 ± 0.02; 4.30				
Rain II	0-10	4	27.50 ± 4.00; 14.55	24.7 ± 6.20; 25.10	24.7 ± 6.20; 25.10	40.2 ± 10.19; 25.35	30.2 ± 11.21; 37.13	0.47 ± 0.07; 14.22					
	10-20	4	26.31 ± 4.13; 15.70	25.3 ± 5.19; 20.51	25.3 ± 5.19; 20.51	36.6 ± 6.68; 18.25	35.1 ± 13.75; 39.17	0.50 ± 0.06; 12.06					
	20-30	4	ND	31.3 ± 3.22; 10.30	31.3 ± 3.22; 10.30	44.3 ± 3.61; 8.16	38.1 ± 9.87; 25.89	0.52 ± 0.08; 16.20					
	30-40	4	ND	28.2 ± 8.25; 29.26	28.2 ± 8.25; 29.26	39.8 ± 6.07; 15.25	24.4 ± 2.31; 9.46	0.53 ± 0.01; 2.67					
Bare soil	Drought	0-10	4	27.50 ± 4.00; 14.55	24.7 ± 6.20; 25.10	24.7 ± 6.20; 25.10	40.2 ± 10.19; 25.35	30.2 ± 11.21; 37.13	0.47 ± 0.07; 14.22				
		10-20	4	26.31 ± 4.13; 15.70	25.3 ± 5.19; 20.51	25.3 ± 5.19; 20.51	36.6 ± 6.68; 18.25	35.1 ± 13.75; 39.17	0.50 ± 0.06; 12.06				
Bare soil	Rain I	0-10	4	25.63 ± 2.14; 8.34	40.7 ± 10.09; 24.80	40.7 ± 10.09; 24.80	33.7 ± 6.89; 20.45	25.6 ± 5.78; 22.57	0.45 ± 0.07; 14.74				
		10-20	4	23.75 ± 0.29; 1.22	35.4 ± 4.03; 11.39	35.4 ± 4.03; 11.39	41.4 ± 4.54; 10.97	23.2 ± 3.01; 12.98	0.53 ± 0.03; 4.87				
Bare soil	Rain II	0-10	4	29.75 ± 0.46; 1.53	42.8 ± 6.84; 15.97	42.8 ± 6.84; 15.97	36.1 ± 5.43; 15.04	21.1 ± 2.87; 13.62	0.53 ± 0.05; 8.81				
		10-20	4	29.63 ± 1.30; 4.38	43.7 ± 7.03; 16.12	43.7 ± 7.03; 16.12	33.3 ± 6.59; 19.80	23.0 ± 1.77; 7.71	0.54 ± 0.05; 9.20				

ND: not determined; Rain I: first rainy season; Rain II: second rainy season; WHC: water-holding capacity.

50 cm into the soil (Table 2). The bare soil exhibited few roots from 0 to 20 cm and was rootless at the 20- to 50-cm depths (Table 2).

Physical and Chemical Variations in the Three Soil Microenvironments

Variations in Soil Temperature

Under *P. laevigata* and *P. praecox* and in the bare soil, the lowest temperature was recorded during the drought season (0-20 cm). Under *P. laevigata*, the temperatures were higher during the canicula and second rainy seasons (0-10 cm), whereas for the bare soil and under *P. praecox* (0-10 cm), the temperatures were higher during the canicula season only (Table 3).

Higher surface temperatures were recorded during the canicula season in the bare soil, whereas the lowest temperatures occurred during the drought season under *P. praecox* (Table 4). A gradient of decreasing temperatures from the surface to the deep layers (Table 5) was also observed. The pattern in temperature variation differed significantly by season, microenvironment, and depth ($P < 0.05$; Table 6).

Variations in Soil Moisture

The bare soil and the soil under both the *P. laevigata* and *P. praecox* exhibited higher levels of moisture during the first rainy season at depths of 0 to 10 cm, and the lowest moisture percentage was observed in the first depth range during the drought and canicula season (Table 7). All microenvironments exhibited lower moisture levels during the canicula season at shallow depths (Table 7). The bare soil showed the lowest level of moisture at depths of 0 to 50 cm (Table 5). The moisture variation differed significantly by season and microenvironment ($P < 0.05$; Table 6).

Variations in the WHC of the Soil

The bare soil and the soil under *P. laevigata* exhibited a higher WHC during the second rainy season (at depths of 40 to 50 cm and 0 to 10 cm, respectively), whereas the WHC of the soil under *P. praecox* was maximum during the canicula season (0 to 10 cm; Table 3). A reduced WHC was observed in all microenvironments at intermediate depths during the drought season (Table 3). The lowest WHC was observed during the drought season in all microenvironments (Table 4). The surface soils under the shrubs (0-10 cm) exhibited the highest WHC, which diminished through the deep soil layers, whereas bare soil layers exhibited the lowest WHC compared with those in soils under the shrubs (Table 5). The variations in the WHC by microenvironment, depth, and season were significant ($P < 0.05$; Table 6).

Variations in the Percentage of Sand, Silt, and Clay

In general, according to the International Soil Textural Classification System, the combination of sand, silt, and clay found in this study indicates a clay loam textural type in all microenvironments.

The soil under *P. laevigata* exhibited a higher percentage of sand (0-10 cm) during the drought season, of silt (0-20 cm) during the first rainy season and canicula season, and of clay during the canicula season (40-50 cm). The soil under *P. praecox* contained more sand during the drought season (0-20 cm), more silt (30-40 cm) during the canicula season, and more clay (40-50) during the second rainy season. The bare soil exhibited an increased percentage of sand during the drought season (10-20 cm), silt during the second rainy season (0-10 cm), and clay during the canicula season (40-50 cm; Table 3). In the three





TABLE 4. Physical and Chemical Seasonal Variations of the Three Soil Microenvironments

Soil Properties	n	Mean ± S.D.; CV, %				
		Drought	Rain I	Canicula	Rain II	
<i>P. laevigata</i>	Temperature, °C	8	20.05 ± 1.49; 7.43	23.09 ± 2.60; 11.25	27.75 ± 2.00; 7.19	27.75 ± 1.16; 4.17
	Moisture, %	20	9.40 ± 1.81; 19.25	11.93 ± 5.51; 46.15	8.32 ± 3.04; 36.56	10.28 ± 4.22; 41.11
	WHC, mL g ⁻¹	20	0.49 ± 0.06; 11.84	0.55 ± 0.06; 10.19	0.58 ± 0.13; 21.89	0.58 ± 0.08; 13.53
	Sand, %	20	42.18 ± 5.92; 14.04	37.26 ± 5.94; 15.95	31.04 ± 7.89; 25.42	35.34 ± 10.79; 30.52
	Silt, %	20	33.08 ± 5.98; 18.09	39.16 ± 5.24; 13.38	36.56 ± 6.47; 17.70	36.50 ± 5.75; 15.76
	Clay, %	20	24.74 ± 3.41; 13.77	23.58 ± 3.38; 14.35	32.40 ± 11.76; 36.30	28.16 ± 9.30; 33.02
	EC, millimhos cm ⁻¹	20	1.63 ± 0.85; 52.20	2.03 ± 1.07; 52.75	1.87 ± 1.23; 66.07	1.34 ± 0.93; 69.11
	pH	20	7.69 ± 0.11; 1.42	7.57 ± 0.29; 3.88	7.92 ± 0.17; 2.19	7.95 ± 0.20; 2.53
	OM, %	20	2.41 ± 0.55; 22.70	1.36 ± 0.50; 36.46	2.61 ± 1.12; 42.97	2.64 ± 1.18; 44.69
	OP, mg kg ⁻¹	20	5.10 ± 1.25; 24.62	3.74 ± 0.68; 18.27	5.36 ± 2.03; 37.91	4.11 ± 1.09; 26.53
<i>P. praecox</i>	Temperature, °C	8	19.50 ± 0.60; 3.06	20.19 ± 0.88; 4.38	22.84 ± 2.11; 9.23	20.50 ± 0.46; 2.26
	Moisture, %	20	9.66 ± 1.93; 19.94	12.44 ± 6.51; 52.28	5.55 ± 3.68; 66.34	11.68 ± 3.59; 30.70
	WHC, mL g ⁻¹	20	0.49 ± 0.05; 10.82	0.54 ± 0.06; 10.50	0.52 ± 0.08; 15.54	0.57 ± 0.05; 8.73
	Sand, %	20	39.06 ± 11.01; 28.19	34.54 ± 7.68; 22.23	32.96 ± 8.89; 26.98	32.72 ± 6.42; 19.63
	Silt, %	20	34.50 ± 8.31; 24.09	42.54 ± 6.42; 15.08	44.66 ± 8.97; 20.09	37.54 ± 5.50; 14.66
	Clay, %	20	26.44 ± 5.65; 21.38	22.92 ± 3.00; 13.09	22.38 ± 3.23; 14.42	29.74 ± 9.01; 30.30
	EC, millimhos cm ⁻¹	20	2.66 ± 1.23; 46.27	2.47 ± 1.69; 68.34	2.03 ± 1.08; 53.12	1.04 ± 0.92; 88.66
	pH	20	7.84 ± 0.31; 4.02	7.63 ± 0.27; 3.51	7.88 ± 0.17; 2.16	7.88 ± 0.33; 4.24
	OM, %	20	1.82 ± 0.43; 23.75	1.58 ± 0.43; 27.30	2.26 ± 0.85; 37.74	2.72 ± 1.03; 37.86
	OP, mg kg ⁻¹	20	4.52 ± 1.24; 27.51	3.92 ± 0.71; 18.03	4.39 ± 1.21; 27.47	4.61 ± 1.04; 22.50
Barc soil	Temperature, °C	8	21.25 ± 0.65; 3.08	24.69 ± 1.73; 7.01	29.69 ± 0.90; 3.04	26.91 ± 3.82; 14.19
	Moisture, %	20	6.70 ± 1.75; 26.08	7.99 ± 2.68; 33.60	4.49 ± 4.42; 98.33	8.60 ± 3.46; 40.21
	WHC, mL g ⁻¹	20	0.44 ± 0.07; 15.80	0.52 ± 0.04; 6.24	0.48 ± 0.06; 11.81	0.51 ± 0.05; 10.93
	Sand, %	20	42.94 ± 8.28; 19.29	38.74 ± 6.85; 17.67	30.06 ± 7.79; 25.90	31.48 ± 6.80; 21.60
	Silt, %	20	34.74 ± 7.71; 22.19	38.72 ± 6.33; 16.34	39.74 ± 6.18; 15.54	39.50 ± 7.49; 18.95
	Clay, %	20	22.32 ± 4.62; 20.71	22.54 ± 2.24; 9.94	30.20 ± 10.37; 34.33	29.02 ± 9.14; 31.50
	EC, millimhos cm ⁻¹	20	3.81 ± 2.16; 56.65	4.00 ± 2.50; 62.41	1.59 ± 1.30; 81.66	2.67 ± 1.46; 54.74
	pH	20	7.71 ± 0.11; 1.41	7.45 ± 0.24; 3.21	7.83 ± 0.26; 3.33	7.67 ± 0.27; 3.48
	OM, %	20	1.79 ± 0.46; 25.82	1.46 ± 0.22; 15.03	1.93 ± 0.57; 29.41	2.08 ± 0.42; 20.37
	OP, mg kg ⁻¹	20	4.30 ± 0.76; 17.70	3.85 ± 0.44; 11.47	4.00 ± 0.50; 12.41	4.60 ± 0.60; 14.86

OM: organic matter; OP: orthophosphates; Rain I: first rainy season; Rain II: second rainy season; WHC: water-holding capacity.



TABLE 5. Physical and Chemical Variations of the Three Soil Microenvironments by Depth

Soil Properties	n	Mean ± S.D.; CV, %					
		0–10 cm	10–20 cm	20–30 cm	30–40 cm	40–50 cm	
<i>P. laevigata</i>	Temperature, °C	16	25.43 ± 3.87; 15.20	23.89 ± 3.64; 15.26	ND	ND	ND
	Moisture, %	16	9.72 ± 6.35; 65.32	10.5 ± 4.54; 43.15	9.59 ± 2.24; 23.41	10.27 ± 3.33; 32.47	9.82 ± 2.91; 29.63
	WHC, mL g ⁻¹	16	0.60 ± 0.09; 15.27	0.57 ± 0.06; 11.15	0.52 ± 0.08; 15.72	0.53 ± 0.11; 20.58	0.53 ± 0.08; 15.23
	Sand, %	16	40.33 ± 7.05; 17.48	35.90 ± 7.49; 20.87	35.73 ± 7.93; 22.20	37.03 ± 11.10; 29.99	33.30 ± 8.99; 27.01
	Silt, %	16	37.30 ± 6.91; 18.54	38.43 ± 4.33; 11.27	35.63 ± 5.23; 14.69	33.38 ± 7.77; 23.28	36.90 ± 5.45; 14.77
	Clay, %	16	22.37 ± 3.78; 16.88	25.68 ± 5.59; 21.75	28.65 ± 8.08; 28.22	29.60 ± 10.55; 35.63	29.80 ± 10.57; 35.48
	EC, millimhos cm ⁻¹	16	0.67 ± 0.53; 79.21	1.65 ± 1.00; 61.02	2.05 ± 1.04; 50.98	2.08 ± 1.12; 53.78	2.14 ± 0.70; 32.50
	pH	16	7.82 ± 0.19; 2.44	7.78 ± 0.33; 4.23	7.76 ± 0.23; 2.94	7.77 ± 0.26; 3.31	7.79 ± 0.28; 3.62
	OM, %	16	3.33 ± 1.44; 43.08	2.19 ± 0.72; 32.68	2.00 ± 0.62; 31.22	1.91 ± 0.68; 35.66	1.85 ± 0.69; 37.34
	OP, mg kg ⁻¹	16	5.62 ± 1.98; 35.32	4.46 ± 1.51; 33.82	4.36 ± 1.58; 36.28	4.15 ± 0.89; 21.34	4.29 ± 0.87; 20.28
<i>P. praecox</i>	Temperature, °C	16	21.20 ± 2.06; 9.73	20.31 ± 1.18; 5.82	ND	ND	ND
	Moisture, %	16	10.53 ± 7.88; 74.86	9.90 ± 4.77; 48.20	8.45 ± 2.85; 33.76	9.17 ± 3.77; 41.16	11.13 ± 4.23; 37.97
	WHC, mL g ⁻¹	16	0.57 ± 0.07; 12.15	0.53 ± 0.08; 14.45	0.52 ± 0.06; 11.65	0.50 ± 0.06; 12.56	0.53 ± 0.5; 9.75
	Sand, %	16	37.93 ± 6.07; 16.00	36.73 ± 8.61; 23.44	35.58 ± 8.38; 23.56	31.85 ± 10.38; 32.58	32.03 ± 9.69; 30.26
	Silt, %	16	40.25 ± 5.21; 12.95	40.53 ± 7.33; 18.08	39.58 ± 7.57; 19.14	40.38 ± 9.89; 24.48	38.33 ± 11.24; 29.33
	Clay, %	16	21.82 ± 2.18; 9.99	22.75 ± 2.51; 11.02	24.85 ± 2.68; 10.77	27.77 ± 6.91; 24.87	29.65 ± 10.11; 34.09
	EC, millimhos cm ⁻¹	16	0.78 ± 1.06; 136.19	1.94 ± 1.39; 71.85	2.25 ± 1.44; 63.98	2.50 ± 1.11; 44.58	2.81 ± 1.11; 39.56
	pH	16	0.98 ± 0.30; 3.71	7.78 ± 0.22; 2.90	7.70 ± 0.22; 2.86	7.79 ± 0.37; 4.78	7.79 ± 0.28; 3.63
	OM, %	16	2.56 ± 1.32; 51.57	2.26 ± 0.87; 38.77	2.00 ± 0.63; 31.53	1.86 ± 0.41; 22.30	1.80 ± 0.50; 27.64
	OP, mg kg ⁻¹	16	5.11 ± 1.52; 29.83	4.36 ± 0.72; 16.64	3.84 ± 0.73; 18.98	4.13 ± 0.87; 21.03	4.37 ± 1.05; 24.05
Bare soil	Temperature, °C	16	26.03 ± 3.83; 14.73	25.23 ± 3.75; 14.87	ND	ND	ND
	Moisture, %	16	6.49 ± 3.99; 61.46	6.94 ± 3.53; 50.78	5.93 ± 2.02; 34.15	7.83 ± 4.61; 58.86	7.54 ± 3.13; 41.60
	WHC, mL g ⁻¹	16	0.50 ± 0.06; 12.58	0.46 ± 0.06; 12.28	0.46 ± 0.05; 10.95	0.50 ± 0.05; 9.96	0.51 ± 0.08; 14.92
	Sand, %	16	36.25 ± 5.66; 15.61	35.50 ± 10.15; 28.60	36.50 ± 9.77; 26.71	34.83 ± 9.76; 28.04	35.88 ± 10.10; 28.15
	Silt, %	16	40.68 ± 4.87; 11.98	39.73 ± 6.50; 16.35	37.18 ± 7.23; 19.45	37.95 ± 8.65; 22.80	35.35 ± 7.42; 21.00
	Clay, %	16	23.07 ± 2.75; 11.92	24.77 ± 7.49; 30.21	26.25 ± 7.94; 30.23	27.22 ± 10.63; 39.03	28.77 ± 9.22; 32.05
	EC, millimhos cm ⁻¹	16	2.06 ± 2.57; 124.97	3.24 ± 2.22; 68.57	3.65 ± 2.28; 62.56	3.27 ± 1.69; 51.70	2.87 ± 1.58; 54.97
	pH	16	7.74 ± 0.34; 4.46	7.65 ± 0.28; 3.74	7.62 ± 0.21; 2.86	7.66 ± 0.19; 2.48	7.66 ± 0.27; 3.49
	OM, %	16	1.82 ± 0.41; 22.69	1.79 ± 0.35; 19.55	1.75 ± 0.41; 23.64	1.93 ± 0.77; 39.88	1.80 ± 0.42; 23.17
	OP, mg kg ⁻¹	16	4.03 ± 0.77; 19.13	3.94 ± 0.41; 10.39	3.88 ± 0.43; 11.07	4.20 ± 0.63; 15.03	4.21 ± 0.67; 15.95

CV: coefficient of variation; EC: electrical conductivity; ND: not determined; OM: organic matter; OP: orthophosphates; WHC: water-holding capacity.

TABLE 6. F and P Values From the Multifactorial Analysis of Variance for Each Soil Property Versus the Season, Microenvironment, and Depth

	Temperature		Moisture		WHC		Sand		Silt		Clay		EC		pH		OM		OP	
	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P
Season	63.70	0.000	24.62	0.000	15.52	0.000	17.70	0.000	10.03	0.000	11.33	0.000	10.66	0.000	21.21	0.000	28.84	0.000	7.77	0.000
ME	70.47	0.000	22.18	0.000	17.64	0.000	0.81	0.445	4.86	0.009	1.58	0.209	18.60	0.000	7.95	0.000	10.11	0.000	5.89	0.003
Depth	9.19	0.003	1.44	0.224	4.97	0.001	2.06	0.088	1.57	0.185	8.60	0.000	9.77	0.000	2.65	0.035	11.00	0.000	5.77	0.000
S * M	6.65	0.000	2.00	0.068	1.14	0.340	1.21	0.302	1.60	0.151	4.40	0.000	4.23	0.001	1.65	0.136	2.91	0.010	3.28	0.004
S * D	0.90	0.443	8.39	0.000	0.52	0.899	0.87	0.576	0.21	0.998	0.96	0.489	0.92	0.530	0.85	0.596	1.56	0.106	0.76	0.688
M * D	0.43	0.649	0.70	0.691	1.92	0.060	0.73	0.669	0.65	0.737	0.34	0.950	0.66	0.723	0.47	0.875	4.18	0.000	1.86	0.069
S * M * D	0.88	0.513	0.92	0.580	0.54	0.962	0.65	0.893	0.66	0.886	1.09	0.355	0.46	0.987	0.76	0.778	0.75	0.794	1.06	0.399

EC: electrical conductivity; OM: organic matter; OP: orthophosphates; ME: microenvironment; M * D: synergy between microenvironments with depths; S * D: synergy between seasons with depths; S * M: synergy between seasons with microenvironments; S * M * D: synergy between seasons with microenvironments and depths; WHC: water-holding capacity.

microenvironments, the highest percentage of clay was observed during the drought season, and we found seasonal variations in the silt and clay contents (Table 4). The 0- to 10-cm depths had higher percentages of sand under the two shrubs and the lowest percentages of clay among the three microenvironments (Table 5). The variation in sand percentage differed significantly by season, the silt percentage varied by season and microenvironment, and the clay percentage varied significantly by season and depth ($P < 0.05$; Table 6).

Variations in Soil EC

Higher EC values were observed during the first rainy season (20–30 cm) in the soil under *P. laevigata* and in the bare soil, whereas the EC values were higher during the drought and first rainy seasons (40–50 and 30–40, respectively) under *P. praecox*. The lowest EC was observed during the second rainy season (0–10 cm) under the two shrubs. The lowest EC was observed in the bare soil at the same depth but during the canicula season (Table 7). The EC varied by season in all microenvironments (Table 4). A lower EC was always registered in the 0- to 10-cm layer for the three microenvironments (Table 5). The variation in EC was statistically significant by season, microenvironment, and depth, and synergy was observed between the seasons and microenvironments ($P < 0.05$; Table 6).

Variations in Soil pH Range

The highest pH value was recorded during the second rainy season under *P. laevigata* and *P. praecox* (10–20 and 30–40 cm, respectively) and during the canicula season in the bare soil (0–10 cm; Table 7). The lowest pH was observed during the drought season under *P. laevigata* (0–10 cm) and during the first rainy season under *P. praecox* and in the bare soil (30–40 and 40–50 cm, respectively) (Table 7). In general, the pH was lowest during the first rainy season in all three microenvironments (Table 4), whereas the highest pH values were observed at depths of 0 to 10 cm in all microenvironments (Table 5). The pH values differed significantly by season, microenvironment, and depth ($P < 0.05$; Table 6).

Variations in Soil OM

The OM content under both shrubs was higher during the second rainy season (0–10 cm) but higher during the canicula and second rainy season in the bare soil (30–40 cm; Table 7). The OM content was lower under *P. laevigata* (40–50 cm) and *P. praecox* and in the bare soil (30–40 cm) during the first rainy season (Table 7). A higher OM content was observed during the second rainy season in all microenvironments (Table 4). Under the shrubs, OM was higher at depths of 0 to 10 cm (Table 5). Changes in the OM differed significantly by season, environment, and depth, and synergy was observed between both the seasons and microenvironments and the microenvironments and depths ($P < 0.05$; Table 6).

Variations in Soil OP Content

Higher OP quantities were recorded during the canicula season (0–10 cm) under *P. laevigata* and *P. praecox* and during the drought season in the bare soil (30–40 cm; Table 7). The lowest OP quantity was observed during the first rainy season under *P. laevigata* (40–50 cm) and *P. praecox* and in the bare soil (30–40 cm; Table 7). The OP quantities were lower during the first rainy season in all microenvironments and higher during the canicula season under *P. laevigata* and during the second rainy season under *P. praecox* and in the bare soil (Table 4). The





TABLE 7. Physical and Chemical Properties of the Soil Under *P. laevigata*, the Soil Under *P. praecox*, and in Bare Soil, Including Moisture, EC, pH, OM Content, and OP Content

Microenvironment	Season	Depth, cm	n	Mean ± S.D.; CV, %				
				Moisture, %	EC, millimhos cm ⁻¹	pH	OM, %	OP, mg kg ⁻¹
<i>P. laevigata</i>	Drought	0–10	4	7.77 ± 1.86; 23.94	0.68 ± 0.59; 87.54	7.66 ± 0.10; 1.37	3.13 ± 0.63; 20.23	6.50 ± 0.49; 7.50
		10–20	4	9.40 ± 2.07; 22.05	1.59 ± 1.01; 63.85	7.71 ± 0.17; 2.25	2.28 ± 0.37; 16.24	4.71 ± 1.79; 37.93
		20–30	4	9.84 ± 1.73; 17.57	1.65 ± 0.81; 49.11	7.75 ± 0.06; 0.74	2.23 ± 0.39; 17.54	4.62 ± 1.51; 32.80
		30–40	4	10.17 ± 1.57; 15.43	1.99 ± 0.75; 37.90	7.70 ± 0.11; 1.48	2.23 ± 0.38; 17.12	4.44 ± 0.68; 15.25
		40–50	4	9.84 ± 1.65; 16.74	2.25 ± 0.29; 12.83	7.67 ± 0.10; 1.37	2.20 ± 0.47; 21.35	5.15 ± 0.40; 7.81
	Rain I	0–10	4	17.06 ± 5.97; 34.99	0.51 ± 0.53; 102.75	7.84 ± 0.25; 3.18	1.91 ± 0.40; 20.90	4.59 ± 1.01; 22.00
		10–20	4	14.05 ± 5.17; 36.76	2.13 ± 0.66; 31.07	7.41 ± 0.25; 3.32	1.46 ± 0.63; 42.88	3.81 ± 0.36; 9.59
		20–30	4	8.34 ± 2.00; 24.00	3.00 ± 0.41; 13.61	7.51 ± 0.21; 2.86	1.34 ± 0.52; 38.51	3.46 ± 0.40; 11.52
		30–40	4	10.87 ± 5.98; 54.97	2.18 ± 1.11; 50.84	7.56 ± 0.33; 4.31	1.07 ± 0.24; 22.57	3.42 ± 0.32; 9.51
		40–50	4	9.32 ± 4.60; 49.34	2.35 ± 0.82; 35.00	7.56 ± 0.37; 4.89	1.04 ± 0.15; 14.17	3.39 ± 0.39; 11.42
	Canicula	0–10	4	7.22 ± 4.97; 68.92	1.15 ± 0.44; 37.90	7.92 ± 0.18; 2.30	3.87 ± 1.96; 50.72	6.76 ± 3.21; 47.59
		10–20	4	6.80 ± 1.40; 20.58	1.88 ± 1.45; 77.09	7.91 ± 0.24; 2.98	2.47 ± 0.62; 25.03	5.31 ± 2.11; 39.72
		20–30	4	8.57 ± 2.52; 29.41	1.90 ± 1.41; 74.18	7.97 ± 0.23; 2.86	2.30 ± 0.63; 27.37	5.64 ± 2.47; 43.85
		30–40	4	8.96 ± 2.55; 28.43	2.20 ± 1.90; 86.16	7.85 ± 0.17; 2.11	2.29 ± 0.48; 21.11	4.69 ± 0.64; 13.67
		40–50	4	10.06 ± 3.11; 30.97	2.23 ± 0.90; 40.26	7.98 ± 0.09; 1.15	2.15 ± 0.67; 31.25	4.41 ± 0.58; 13.27
	Rain II	0–10	4	8.30 ± 4.91; 59.16	0.34 ± 0.31; 93.21	7.89 ± 0.15; 1.87	4.43 ± 1.08; 24.43	4.62 ± 1.60; 34.61
		10–20	4	11.80 ± 5.57; 47.19	1.00 ± 0.75; 74.83	8.08 ± 0.25; 3.15	2.57 ± 0.81; 31.43	3.98 ± 1.27; 32.27
		20–30	4	11.61 ± 1.70; 14.64	1.65 ± 0.99; 60.30	7.84 ± 0.10; 1.29	2.14 ± 0.59; 27.43	3.73 ± 0.17; 4.50
		30–40	4	11.08 ± 2.69; 24.33	1.98 ± 0.92; 46.47	7.99 ± 0.21; 2.66	2.07 ± 0.76; 36.93	4.00 ± 1.28; 31.97
		40–50	4	10.07 ± 2.88; 28.60	1.75 ± 0.76; 43.39	7.95 ± 0.27; 3.37	2.02 ± 0.71; 35.38	4.20 ± 1.03; 24.40
<i>P. praecox</i>	Drought	0–10	4	8.70 ± 3.48; 40.01	1.50 ± 2.01; 134.11	8.13 ± 0.49; 6.01	1.63 ± 0.68; 41.79	3.57 ± 1.21; 34.00
		10–20	4	9.13 ± 0.84; 9.19	2.45 ± 1.08; 44.28	7.76 ± 0.19; 2.44	1.56 ± 0.35; 22.18	4.76 ± 0.97; 20.45
		20–30	4	9.26 ± 1.15; 12.47	2.88 ± 0.63; 21.88	7.70 ± 0.14; 1.77	2.10 ± 0.53; 25.13	4.25 ± 1.29; 30.40
		30–40	4	10.03 ± 0.70; 7.01	3.13 ± 0.63; 20.13	7.78 ± 0.29; 3.67	1.89 ± 0.19; 10.07	4.82 ± 1.26; 26.24
		40–50	4	11.20 ± 1.93; 17.26	3.38 ± 0.85; 25.30	7.83 ± 0.33; 4.16	1.93 ± 0.15; 7.84	5.14 ± 1.44; 27.99
	Rain I	0–10	4	21.44 ± 5.78; 26.96	0.46 ± 0.26; 55.39	7.94 ± 0.19; 2.41	2.01 ± 0.57; 28.41	4.74 ± 0.84; 17.73
		10–20	4	15.34 ± 4.12; 26.87	2.26 ± 2.02; 89.08	7.68 ± 0.15; 1.97	1.71 ± 0.46; 26.61	3.86 ± 0.75; 19.56
		20–30	4	9.62 ± 3.12; 32.44	3.28 ± 2.00; 61.09	7.49 ± 0.30; 4.06	1.47 ± 0.27; 18.55	3.62 ± 0.29; 8.00
		30–40	4	6.26 ± 1.01; 16.10	3.38 ± 0.63; 18.64	7.44 ± 0.25; 3.35	1.38 ± 0.24; 17.65	3.56 ± 0.50; 13.93
		40–50	4	9.56 ± 3.88; 40.55	3.00 ± 1.35; 45.13	7.62 ± 0.18; 2.30	1.36 ± 0.34; 25.34	3.82 ± 0.60; 15.76
	Canicula	0–10	4	2.30 ± 0.97; 42.26	0.75 ± 0.62; 82.55	7.94 ± 0.24; 3.00	2.74 ± 0.89; 32.49	6.16 ± 1.54; 24.94
		10–20	4	4.01 ± 1.45; 36.17	2.30 ± 1.04; 45.18	7.87 ± 0.19; 2.38	2.78 ± 1.07; 38.53	4.36 ± 0.24; 5.55
		20–30	4	4.94 ± 1.09; 22.10	2.08 ± 0.83; 40.01	7.85 ± 0.17; 2.17	2.31 ± 0.88; 38.25	3.84 ± 0.71; 18.47
		30–40	4	8.47 ± 5.84; 68.92	2.38 ± 0.95; 39.85	7.82 ± 0.15; 1.97	1.91 ± 0.33; 17.25	3.83 ± 0.36; 9.52
		40–50	4	8.05 ± 3.20; 39.75	2.68 ± 1.16; 43.53	7.93 ± 0.16; 2.00	1.56 ± 0.53; 34.14	3.74 ± 0.74; 19.78

(Continued on next page)

TABLE 7. (Continued)

Microenvironment	Season	Depth, cm	n	Mean ± S.D.; CV, %				
				Moisture, %	EC, millimhos cm ⁻¹	pH	OM, %	OP, mg kg ⁻¹
Bare soil	Rain II	0–10	4	9.66 ± 3.08; 31.86	0.40 ± 0.30; 74.92	7.91 ± 0.26; 3.27	3.85 ± 1.81; 46.97	5.96 ± 1.19; 18.78
		10–20	4	11.11 ± 2.37; 21.33	0.75 ± 0.92; 122.69	7.82 ± 0.37; 4.70	2.98 ± 0.51; 16.99	4.45 ± .71; 15.91
		20–30	4	10.00 ± 2.47; 24.67	0.77 ± 0.63; 81.22	7.76 ± 0.07; 0.86	2.13 ± 0.56; 26.53	3.67 ± 0.29; 7.96
		30–40	4	11.94 ± 3.55; 29.72	1.11 ± 0.61; 55.21	8.14 ± 0.44; 5.44	2.27 ± 0.35; 15.40	4.18 ± 0.74; 17.72
		40–50	4	15.72 ± 4.04; 25.68	2.18 ± 1.10; 50.56	7.78 ± 0.42; 5.34	2.37 ± 0.18; 7.64	4.77 ± 0.79; 16.49
	Drought	0–10	4	7.26 ± 2.60; 35.76	3.70 ± 3.74; 101.10	7.67 ± 0.15; 2.00	1.85 ± 0.46; 24.73	4.27 ± 1.45; 78.78
		10–20	4	6.41 ± 1.39; 21.74	4.38 ± 2.56; 58.55	7.70 ± 0.12; 1.58	1.88 ± 0.38; 20.04	3.99 ± 0.37; 9.28
		20–30	4	6.24 ± 0.67; 10.77	4.08 ± 2.07; 50.82	7.71 ± 0.06; 0.77	1.51 ± 0.32; 21.14	4.15 ± 0.20; 10.12
		30–40	4	6.78 ± 1.65; 24.37	3.38 ± 0.63; 18.64	7.68 ± 0.11; 1.46	1.94 ± 0.65; 33.71	4.48 ± 0.73; 16.37
		40–50	4	6.80 ± 2.57; 37.85	3.53 ± 1.84; 52.07	7.79 ± 0.09; 1.19	1.77 ± 0.57; 32.17	4.22 ± 0.13; 3.03
	Rain I	0–10	4	10.66 ± 1.81; 16.98	2.25 ± 3.22; 143.26	7.56 ± 0.40; 5.29	1.38 ± 0.16; 11.52	4.28 ± 0.26; 6.19
		10–20	4	10.92 ± 1.04; 9.52	3.20 ± 2.70; 84.32	7.50 ± 0.22; 2.89	1.54 ± 0.15; 9.66	3.82 ± 0.45; 11.76
		20–30	4	6.35 ± 1.72; 27.13	5.83 ± 2.49; 42.71	7.39 ± 0.18; 2.46	1.45 ± 0.16; 10.96	3.46 ± 0.11; 3.27
		30–40	4	5.29 ± 0.51; 9.66	4.75 ± 1.89; 39.85	7.44 ± 0.09; 1.21	1.36 ± 0.11; 8.01	3.96 ± 0.57; 14.54
		40–50	4	6.75 ± 1.35; 20.00	4.00 ± 1.41; 35.36	7.38 ± 0.29; 3.95	1.58 ± 0.41; 26.30	3.75 ± 0.37; 9.89
	Canicula	0–10	4	1.43 ± 0.87; 6.11	1.13 ± 1.34; 118.23	7.96 ± 0.39; 4.90	1.87 ± 0.27; 14.36	3.81 ± 0.36; 9.55
		10–20	4	2.20 ± 0.84; 38.18	1.50 ± 1.45; 96.76	7.89 ± 0.40; 5.03	1.78 ± 0.36; 20.38	3.83 ± 0.17; 4.58
		20–30	4	3.51 ± 1.40; 39.88	1.71 ± 1.30; 75.78	7.76 ± 0.21; 2.74	1.91 ± 0.44; 23.00	3.83 ± 0.17; 4.42
		30–40	4	8.61 ± 6.83; 79.26	1.75 ± 1.55; 88.83	7.83 ± 0.07; 0.95	2.24 ± 1.12; 50.08	4.36 ± 0.82; 18.74
		40–50	4	6.72 ± 4.85; 72.26	1.85 ± 1.49; 80.72	7.73 ± 0.15; 1.97	1.87 ± 0.48; 25.81	4.18 ± 0.60; 14.48
Rain II	0–10	4	6.61 ± 3.25; 49.18	1.15 ± 1.01; 87.68	7.77 ± 0.38; 4.91	2.16 ± 0.35; 16.21	3.76 ± 0.60; 15.88	
	10–20	4	8.24 ± 2.19; 26.52	3.88 ± 1.55; 39.94	7.54 ± 0.25; 3.36	1.94 ± 0.43; 22.37	4.13 ± 0.62; 15.00	
	20–30	4	7.61 ± 1.78; 23.39	3.00 ± 1.35; 45.13	7.62 ± 0.22; 2.84	2.14 ± 0.33; 15.34	4.1 ± 0.55; 13.42	
	30–40	4	10.65 ± 5.94; 55.77	3.20 ± 1.35; 42.62	7.69 ± 0.22; 2.81	2.20 ± 0.79; 36.08	3.98 ± 0.55; 10.40	
	40–50	4	9.88 ± 2.72; 27.50	2.13 ± 0.70; 32.91	7.74 ± 0.32; 4.11	1.98 ± 0.15; 7.71	4.31 ± 0.93; 21.62	

EC: electrical conductivity; OM: organic matter; OP: orthophosphates; Rain I: first rainy season; Rain II: second rainy season.



TABLE 8. Significant Variations in the Soil Properties Between the Microenvironments

Soil Properties	n	Mean ± S.D.		
		<i>P. laevigata</i>	<i>P. praecox</i>	Bare Soil
Temperature, °C	32	24.66 ^a ± 3.78	20.76 ^b ± 1.71	25.63 ^a ± 3.75
Moisture, %	80	9.98 ^a ± 4.04	9.84 ^a ± 4.97	6.94 ^b ± 3.54
WHC, mL g ⁻¹	80	0.55 ^a ± 0.09	0.53 ^a ± 0.07	0.49 ^b ± 0.06
Sand, %	80	36.45 ^a ± 8.72	34.82 ^a ± 8.88	35.80 ^a ± 9.03
Silt, %	80	36.32 ^a ± 6.16	39.81 ^a ± 8.33	38.17 ^a ± 7.12
Clay, %	80	27.22 ^a ± 8.46	25.37 ^a ± 6.39	26.02 ^a ± 8.09
EC, millimhos cm ⁻¹	80	1.72 ^b ± 1.05	2.05 ^b ± 1.39	3.02 ^a ± 2.12
pH	80	7.78 ^a ± 0.26	7.81 ^a ± 0.29	7.67 ^b ; 0.26
OM, %	80	2.26 ^a ± 1.02	2.09 ^a ± 0.84	1.82 ^b ± 0.49
OP, mg kg ⁻¹	80	4.58 ^a ± 1.49	4.36 ^{ab} ± 1.08	4.05 ^b ± 0.60

Means that do not share a letter are significantly different ($\alpha < 0.05$).

EC: electrical conductivity; OM: organic matter; OP: orthophosphates; WHC: water-holding capacity.

surface layer (0–10 cm) under the two shrubs and the 40- to 50-cm depth in the bare soil exhibited higher OP contents (Table 5). Orthophosphate content varied significantly by season, microenvironment, and depth, and synergy was observed between the seasons and microenvironments ($P < 0.05$; Table 6).

Comparison of Physical and Chemical Soil Properties

In general, we observed that the moisture, WHC, silt, clay, OM content, and OP content had oscillating variations throughout the four seasons in each microenvironment. During the drought season to the second rainy season, the temperature increased and the percentage of sand decreased in the three microenvironments (Table 4). A vertical variation in the temperature, sand, OM content, and OP content was observed in which the properties decreased with increasing depth, whereas the clay and EC tended to increase under *P. laevigata* and *P. praecox*. Moisture and silt oscillated between the soil layers. Only temperature and EC exhibited similar behaviors under the two shrubs and in the bare soil (Table 5).

Using Tukey test, significant differences were detected among the soil properties of the three microenvironments except for sand, silt, and clay percentages, which were not significantly different in any microenvironment ($P < 0.01$; Table 8). The soils under *P. laevigata* and *P. praecox* did not differ significantly in terms of moisture, WHC, sand, silt, clay, EC, pH, or OM content ($P < 0.01$; Table 8), but both exhibited significant differences with the bare soil. The soil under *P. praecox* and the bare soil did not differ significantly in terms of OP content, whereas the soil under *P. laevigata* was different from the bare soil ($P < 0.01$; Table 8). The soil under *P. praecox* showed a tendency toward lower temperature than under *P. laevigata* and in the bare soil ($P < 0.01$; Table 8). The soil moisture, WHC, pH, and OM content were significantly higher in the soil under the two shrubs than in the bare soil ($P < 0.01$; Table 8). The OP content was significantly higher under *P. laevigata* than in the bare soil ($P < 0.01$; Table 8). The temperature, moisture, sand, and silt exhibited no significant differences in the various soil depths, whereas the WHC, EC, OM, and OP were significantly higher in the 0- to 10-cm layer than in the 10- to 50-cm layer. The clay varied along a gradient (0–10 \neq 20–50; 10–20 \neq 30–50), and differences in the pH occurred only at

TABLE 9. Significant Variations in the Soil Properties Between the Seasons

Soil Properties	n	Mean ± S.D.			
		Drought	Rain I	Canicula	Rain II
Temperature, °C	48	20.27 ^d ± 1.21	22.66 ^c ± 2.61	26.76 ^b ± 3.39	25.05 ^a ± 3.98
Moisture, %	48	8.59 ^b ± 2.25	10.79 ^a ± 5.45	6.12 ^c ± 4.04	10.19 ^a ± 3.92
WHC, mL g ⁻¹	48	0.47 ^b ± 0.06	0.54 ^a ± 0.05	0.53 ^a ± 0.10	0.55 ^a ± 0.07
Sand, %	48	41.39 ^a ± 8.68	36.85 ^b ± 6.96	31.35 ^c ± 8.16	33.18 ^{bc} ± 8.26
Silt, %	48	34.11 ^b ± 7.31	40.14 ^a ± 6.16	40.32 ^a ± 7.94	37.85 ^a ± 6.33
Clay, %	48	24.50 ^a ± 4.88	23.01 ^b ± 2.90	28.33 ^a ± 10.07	28.97 ^a ± 9.02
EC, millimhos cm ⁻¹	48	2.70 ^a ± 1.74	2.84 ^a ± 2.01	1.83 ^a ± 1.20	1.68 ^a ± 1.32
pH	48	7.74 ^b ± 0.21	7.55 ^c ± 0.27	7.88 ^a ± 0.20	7.83 ^{ab} ± 0.29
OM, %	48	2.01 ^b ± 0.56	1.47 ^c ± 0.40	2.27 ^{ab} ± 0.91	2.48 ^a ± 0.96
OP, mg kg ⁻¹	48	4.60 ^a ± 1.14	3.84 ^b ± 0.62	4.58 ^a ± 1.49	4.26 ^{ab} ± 0.95

Means that do not share a letter are significantly different ($\alpha < 0.05$).

EC: electrical conductivity; OM: organic matter; OP: orthophosphates; WHC: water-holding capacity.



depths of 10 to 20 cm ($P < 0.01$; Table 9). Electrical conductivity was the only parameter that was not significantly affected by the seasonal cycles ($P < 0.01$; Table 10).

Variability in the Physical and Chemical Properties of the Soil

Descriptive statistics (CV, SE, S.D., minimum, and maximum) indicated high variability in all physical and chemical properties of the soil microenvironments (Table 11) and that EC was the most variable parameter under *P. laevigata* and *P. praecox* and in the bare soil (Table 11). The CVs differed for each of the studied variables. The greatest variation was observed in EC, followed by moisture level; the smallest variations were found in pH and WHC. According to the guidelines for variability in soil properties (low variation, <15%; medium variation, 15%–50%; and high variation, >50% from Warrick (1988), the soil pH under *P. laevigata* exhibited only low variations. In contrast, there were medium variations in temperature, moisture, WHC, salt, silt, clay, OM content, and OP content and high variations in EC under *P. laevigata* (Table 11). Soil temperature, WHC, pH, and OM had low variations; sand, silt, clay, and OP content showed medium variations; and EC and moisture level had high variations under *P. praecox* (Table 11). In the bare soil, temperature, WHC, pH, and OP exhibited low variations; sand, silt, clay, and OM exhibited medium variations; and moisture level and EC exhibited high variations (Table 11).

Correlation Analysis

Significant correlations ($P < 0.05$) were observed in 14 out of the 45 soil properties under *P. laevigata* (Table 10), in 20 out of the 45 properties under *P. praecox* (Table 11), and in 22 out of the 45 in the bare soil (Table 12). The greatest correlation was observed under *P. praecox* between OM and OP contents ($R = 0.984$; $P < 0.01$; Table 13).

Positive correlations were observed in pH with temperature and OM content; in WHC with moisture, clay, and OM content; and between OM and OP contents. Negative correlations were observed in sand with WHC, silt, and clay; between silt and clay; in EC with WHC, pH, OM content, and OP content under *P. laevigata* ($P < 0.05$; Table 12).

In contrast, temperature was positively correlated with WHC, OM content, and OP content; WHC with moisture, OM content, and OP content; clay with EC; and OP content with

sand and OM content. Temperature was negatively correlated with moisture level and clay; WHC with EC; sand with silt, clay, and pH; silt with clay and OP content; clay with pH; and EC with pH and OM content in the soil under *P. praecox* ($P < 0.05$; Table 13).

In the bare soil, moisture was positively correlated with WHC, clay, and OP content; WHC with clay and OP content; sand with EC; clay with OM and OP contents; and OM content with OP content. Moisture was negatively correlated with temperature, sand, and pH; sand with WHC, silt, clay, and OM content; silt with clay, EC, and OP content; and EC with clay, pH, and OP content ($P < 0.05$; Table 14).

Clustering of Soil Microenvironments

Under Euclidean analysis, the physical and chemical properties of the soils yielded different groups. The 10- to 50-cm soil layers from bare soil and under *P. laevigata* and *P. praecox* formed three different groups, one for each plant and one for bare soil (90% similarity). The surface soils (0–10 cm) from under both plants and bare soil are different (<90% similarity; Fig. 2).

DISCUSSION

Arid soil microenvironments result from complex interactions between plants, microorganisms, and mineral particulate matter. However, desert plants strongly influence physical and chemical variations in the soil (Mulder, 2006; Schaaf et al., 2011). To examine the roles of two legume shrubs in this system, we evaluated how *P. laevigata* and *P. praecox* modify the physical and chemical properties in the soil at the first 50 cm of depth (in 10-cm intervals) throughout a year of seasonal changes.

The texture, structure, and presence of roots indicated that the 0- to 10-cm soil layer under *P. laevigata* and *P. praecox* is well aerated and drained, allowing for the preservation of nutrients in the surface layers. We observed that these properties form a gradient from the superficial to the deeper layers under *P. laevigata* and *P. praecox*. These characteristics can be influenced by the percentage of organic matter, are directly related to the pore spacing and thus the gas exchange, and indicate an efficient absorption of soil nutrients favored by the water flow that decreases with increasing depth (Lavelle et al., 2006; Schroeder et al., 2010). The texture and structure of the soil have the same pattern and can exhibit a low infiltration rate at the deeper layers. Consequently, water infiltrated the soil at depths of 0 to 10 cm with relative ease

TABLE 10. Significant Variations in the Soil Properties Between the Depths

Soil Properties	n	Mean ± S.D.				
		0–10 cm	10–20 cm	20–30 cm	30–40 cm	40–50 cm
Temperature, °C	48	24.22 ± 3.94	23.15 ± 3.69	ND	ND	ND
Moisture, %	48	8.91 ± 6.39	9.12 ± 4.50	7.99 ± 2.81	9.09 ± 3.99	9.50 ± 3.99
WHC, mL g ⁻¹	48	0.56 ^a ± 0.08	0.52 ^b ± 0.08	0.50 ^b ± 0.07	0.51 ^b ± 0.08	0.52 ^{ab} ± 0.07
Sand, %	48	38.17 ± 6.38	36.04 ± 8.65	35.96 ± 8.55	34.57 ± 10.43	33.73 ± 9.54
Silt, %	48	39.41 ± 5.81	39.56 ± 6.11	37.46 ± 6.81	37.23 ± 9.11	36.86 ± 8.30
Clay, %	48	22.42 ^c ± 2.96	24.40 ^{bc} ± 5.60	26.58 ^{ab} ± 6.76	28.20 ^a ± 9.37	29.41 ^a ± 9.78
EC, millimhos cm ⁻¹	48	1.17 ^b ± 1.72	2.27 ^a ± 1.73	2.65 ^a ± 1.79	2.62 ^a ± 1.40	2.61 ^a ± 1.21
pH	48	7.85 ^a ± 0.29	7.74 ^b ± 0.28	7.69 ^{ab} ± 0.22	7.74 ^{ab} ± 0.28	7.76 ^{ab} ± 0.29
OM, %	48	2.57 ^a ± 1.29	2.08 ^b ± 0.70	1.92 ^b ± 0.57	1.90 ^b ± 0.63	1.82 ^b ± 0.54
OP, mg kg ⁻¹	48	4.92 ^a ± 1.62	4.25 ^b ± 1.00	4.03 ^b ± 1.04	4.14 ^b ± 0.78	4.26 ^b ± 0.84

Means that do not share a letter are significantly different ($\alpha < 0.05$).

EC: electrical conductivity; OM: organic matter; OP: orthophosphates; WHC: water-holding capacity.



TABLE 11. Descriptive Statistics, Including SE, CV, Median, Minimum, Maximum, Q1, and Q3 Under *P. laevigata*, Under *P. praecox*, and in Bare Soil

	Soil Properties	n	SE	CV, %	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
<i>P. laevigata</i>	Temperature, °C	32	0.67	15.32	18.75	21.06	25.62	27.81	30.50
	Moisture, %	80	0.45	40.52	0.19	7.30	9.58	11.67	25.49
	WHC, mL g ⁻¹	80	0.01	16.36	0.39	0.49	0.54	0.60	0.87
	Sand, %	80	0.97	23.93	17.60	32.00	37.60	41.60	56.00
	Silt, %	80	0.69	16.96	16.00	33.60	36.20	41.60	48.00
	Clay, %	80	0.95	31.07	14.80	22.40	24.80	28.00	52.80
	EC, millimhos cm ⁻¹	80	0.12	60.84	0.10	0.82	1.55	2.47	5.00
	pH	80	0.03	3.29	7.04	7.66	7.78	7.95	8.36
	OM, %	80	0.11	45.32	0.65	1.60	2.13	2.67	5.81
	OP, mg kg ⁻¹	80	0.17	32.64	2.86	5.26	4.04	3.60	11.37
<i>P. praecox</i>	Temperature, °C	32	0.30	8.26	19.00	19.62	20.50	21.00	26.00
	Moisture, %	80	0.55	50.49	0.85	6.25	9.29	12.27	27.21
	WHC, mL g ⁻¹	80	0.01	12.70	0.38	0.48	0.53	0.58	0.74
	Sand, %	80	0.99	25.50	20.00	28.00	34.00	40.00	57.60
	Silt, %	80	0.93	20.93	20.40	35.00	39.60	45.20	63.60
	Clay, %	80	0.71	25.17	14.80	22.40	23.60	26.70	48.80
	EC, millimhos cm ⁻¹	80	0.16	67.79	0.09	0.80	2.10	3.00	6.00
	pH	80	0.03	3.75	7.17	7.61	7.78	7.98	8.84
	OM, %	80	0.09	0.65	0.76	1.52	1.95	2.42	6.40
	OP, mg kg ⁻¹	80	0.12	24.82	2.39	4.96	4.15	3.62	7.57
Bare soil	Temperature, °C	32	0.66	14.65	20.50	22.75	24.3	29.12	33.50
	Moisture, %	80	0.40	50.99	0.16	4.80	6.42	8.78	19.33
	WHC, mL g ⁻¹	80	0.01	12.91	0.34	0.45	0.49	0.52	0.67
	Sand, %	80	1.01	25.23	19.60	30.00	35.20	39.60	59.60
	Silt, %	80	0.80	18.65	19.60	33.60	39.00	42.00	53.60
	Clay, %	80	0.90	31.11	14.80	22.00	24.00	26.70	50.80
	EC, millimhos cm ⁻¹	80	0.24	70.24	0.08	1.35	2.5	4.00	9.00
	pH	80	0.03	3.43	7.13	7.48	7.67	7.80	8.50
	OM, %	80	0.05	26.82	1.07	1.45	1.68	2.11	3.85
	OP, mg kg ⁻¹	80	0.07	14.77	2.92	4.29	3.94	3.69	6.38

CV: coefficient of variation; EC: electrical conductivity; OM: organic matter; OP: orthophosphates; Q1: quartile 1; Q3: quartile 3; WHC: water-holding capacity.

during light showers and formed runoff once the water saturated the pore spaces (Wigmosta et al., 1994; Liang and Zhenghui, 2001; Canton et al., 2011).

Our results support the statement that plants with deep roots, such as *P. laevigata* and *P. praecox*, may remain active well into the drought season because of their root patterns (Villaseñor et al., 1990). The soil moisture is higher in the surface layers during the early rains and at the onset of the heavy rains. However, significant differences were found in the soil moisture under the plants and in the bare soil, which were also reported by Pen-Mouratov et al. (2008). Alpha Water evaporation in deep soil is prevented by the protective overlying layers, whereas the surface layers are exposed to sunlight, wind desiccation, and high temperatures (Breshears et al., 1997; Pandey and Pandey, 2010).

Temperature affects the moisture under *P. praecox* and in the bare soil. The temperature and moisture differences recorded in the three microenvironments can be explained by the shade provided by the vegetation in both the dry and two rainy seasons (Fig. 1). *Parkinsonia praecox* loses all of its leaves at the end of the dry season (Villaseñor et al., 1990), leaving the soil surface exposed to wind and sunlight during the drought season, similar to the bare soil. Meanwhile, *P. laevigata* litters steadily during the

dry season (Villaseñor et al., 1990), projecting a shadow on the soil throughout all seasons. Both the temperature and moisture were higher in the bare soil because of the increased exposure to sunlight and hot air currents, which led to increased evaporation and desiccation (Ostertag, 1998). The texture analysis indicated no significant difference in sand, silt, or clay between the shrubs and bare soil because these soil variations are not influenced by the shrubs but are instead determined by the nature of the soil and by temporal variations (Schroeder et al., 2010). We observed that plants modify the WHC of the soil, which is interesting because WHC is primarily related to soil texture and OM content. Thus, changes in this feature are expected to be long-term (Domingo-Santos et al., 2006). However, we found that *P. laevigata* and *P. praecox* can improve the WHC of the soil through a seasonal cycle, which is strongly influenced by changes in the OM content of the soil.

The OM content of the soil is primarily determined by littering at the surface layer, and one could assume that the addition of OM in the layers below 10 cm is caused by root activity, passive diffusion, leaching, and other physical transport phenomena (Nguyen, 2003). If littering were the only source of OM in the soil, greater differences would be noted in the deep



TABLE 12. Pearson Correlation Coefficient and *P* Value Among the Physical and Chemical Properties of the Soil Under *P. laevigata*

	Temperature		Moisture		WHC		Sand		Silt		Clay		EC		pH		OM		
	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	
Moisture	-0.076	0.680																	
WHC	0.320	0.074	<i>0.273</i>	<i>0.014</i>															
Sand	-0.320	0.074	-0.080	0.478	<i>-0.319</i>	<i>0.004</i>													
Silt	0.259	0.152	-0.065	0.568	0.021	0.857	<i>-0.396</i>	<i>0.000</i>											
Clay	0.185	0.312	0.130	0.250	<i>0.314</i>	<i>0.005</i>	<i>-0.743</i>	<i>0.000</i>	<i>-0.320</i>	<i>0.004</i>									
EC	-0.049	0.790	-0.168	0.137	<i>-0.392</i>	<i>0.000</i>	0.007	0.951	0.060	0.598	-0.051	0.654							
pH	<i>0.438</i>	<i>0.012</i>	0.023	0.842	0.130	0.252	-0.154	0.172	-0.001	0.994	0.160	0.157	<i>-0.456</i>	<i>0.000</i>					
OM	0.274	0.129	-0.130	0.251	<i>0.447</i>	<i>0.000</i>	0.018	0.877	-0.113	0.319	0.064	0.573	<i>-0.548</i>	<i>0.000</i>	<i>0.351</i>	<i>0.001</i>			

Values in italics are values of *P* only for significant pairs. *P* < 0.05 is significantly correlated.
 EC: electrical conductivity; OM: organic matter; OP: orthophosphates; WHC: water-holding capacity.

TABLE 13. Pearson Correlation Coefficient and *P* Value Among the Physical and Chemical Properties of the Soil Under *P. praecox*

	Temperature		Moisture		WHC		Sand		Silt		Clay		EC		pH		OM		
	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	
Moisture	<i>-0.366</i>	<i>0.040</i>																	
WHC	<i>0.517</i>	<i>0.002</i>	<i>0.312</i>	<i>0.005</i>															
Sand	-0.100	0.586	-0.045	0.693	-0.146	0.195													
Silt	0.286	0.113	-0.120	0.287	0.122	0.281	<i>-0.726</i>	<i>0.000</i>											
Clay	<i>-0.445</i>	<i>0.011</i>	0.219	0.050	0.044	0.697	<i>-0.442</i>	<i>0.000</i>	<i>-0.295</i>	<i>0.008</i>									
EC	-0.246	0.174	-0.059	0.605	<i>-0.391</i>	<i>0.000</i>	0.209	0.063	-0.101	0.373	<i>0.260</i>	<i>0.020</i>							
pH	0.099	0.591	-0.112	0.322	0.130	0.251	<i>-0.268</i>	<i>0.016</i>	0.148	0.190	<i>-0.307</i>	<i>0.006</i>	<i>-0.514</i>	<i>0.000</i>					
OM	<i>0.377</i>	<i>0.034</i>	-0.026	0.822	<i>0.432</i>	<i>0.000</i>	0.059	0.606	-0.053	0.643	0.039	0.734	<i>-0.414</i>	<i>0.000</i>	0.023	0.839			
OP	<i>0.365</i>	<i>0.040</i>	0.083	0.463	<i>0.371</i>	<i>0.001</i>	<i>2.55</i>	<i>0.023</i>	<i>-0.281</i>	<i>0.012</i>	0.012	0.916	-0.100	0.375	-0.061	0.590	<i>0.984</i>	<i>0.000</i>	

Values in italics are values of *P* only for significant pairs. *P* < 0.05 is significantly correlated.
 EC: electrical conductivity; OM: organic matter; OP: orthophosphates; WHC: water-holding capacity.

TABLE 14. Pearson Correlation Coefficient and P Value Among the Physical and Chemical Properties of Bare Soil

	Temperature		Moisture		WHC		Sand		Silt		Clay		EC		pH		OM		
	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	
Moisture	<i>-0.416</i>	0.018																	
WHC	-0.010	0.958	0.441	0.000															
Sand	-0.332	0.064	<i>-0.242</i>	0.031	<i>-0.352</i>	0.001													
Silt	0.333	0.063	-0.150	0.184	-0.014	0.904	<i>-0.519</i>	0.000											
Clay	0.142	0.437	0.402	0.000	0.405	0.000	<i>-0.659</i>	0.000	<i>-0.300</i>	0.007									
EC	<i>-0.346</i>	0.053	0.138	0.221	-0.192	0.087	0.430	0.000	<i>-0.256</i>	0.022	<i>-0.254</i>	0.023							
pH	0.068	0.713	<i>-0.257</i>	0.022	-0.136	0.228	-0.219	0.051	0.192	0.088	0.076	0.504	<i>-0.546</i>	0.000					
OM	0.124	0.499	0.181	0.107	0.123	0.277	<i>-0.277</i>	0.013	-0.065	0.567	0.366	0.001	-0.100	0.375	0.174	0.124			
OP	-0.187	0.304	0.352	0.001	0.368	0.001	-0.140	0.215	<i>-0.249</i>	0.026	0.375	0.001	<i>-0.222</i>	0.048	0.099	0.383	0.301	0.007	

Values in italics are values of P only for significant pairs. P < 0.05 is significantly correlated.

EC: electrical conductivity; OM: organic matter; OP: orthophosphates; WHC: water-holding capacity.

layers from the bare soil and under the shrubs (Kuz'yakov and Domanski, 2000; Nguyen, 2003; Fustec et al., 2010).

Perroni-Ventura et al. (2006) found a higher quantity of nutrients, including OC, under *P. laevigata* and *P. praecox* than in bare soil. In contrast, Pen-Mouratov et al. (2008) found insignificant differences between the shrubs and bare soil. Our results indicated significant differences in OM between the shrubs and bare soil during all seasons.

The two previous studies and the present study exhibit a similar pattern of consistent reduction in OM content along the deep layers, with the major percentage of OM found at a depth of 0 to 10 cm.

Organic matter causes the soil to have a higher nutrient retention, reduced salinity, and pH changes, which may increase the WHC of the soil under *P. laevigata* and *P. praecox*. In addition, a consistent reduction in OM content may explain the variation in OP found in the present study because phosphorus (P) is slowly released from organic sources (Stewart and Tiessen, 1987; Braschi et al., 2003).

In highly alkaline arid soils, this nutrient may produce mineral complexes, making it unavailable to plants and many species of microorganisms (Tunisi et al., 1999), particularly during the dry season. During the rainy seasons, P may be leached from the soil when the pH approaches neutral values (7.1) because of the solvent activity of water. However, during droughts, the soil pH may rise to 8.6. Salt accumulation during the drought season increases the alkalinity of the soil and plays a significant role in P sequestration by carbonate minerals (Stewart and Tiessen, 1987; Tunisi et al., 1999). We found that the greatest quantity of orthophosphates is found in the surface soils under *P. laevigata*, but the OP content under *P. praecox* is similar to that in the bare soil, which coincides with the alkaline pH that occurs at depths of 0 to 10 cm. Therefore, we believe that this nutrient may be immobilized in the topsoil.

These changes in physical and chemical soil properties are important for plant development and to the communities of macroorganisms, mesoorganisms, and microorganisms that live in and are distributed along the soil (Pugnaire et al., 2004; Avis et al., 2008).

The soil layer characteristics caused by the plant species were segregated from those of the bare soil after Hierarchy cluster analysis. The bare soil forms a gradient from the deepest soil layers to the surface layers. In contrast, *P. laevigata* and *P. praecox* did not form such a gradient. This change under *P. laevigata* was also noted on the microbial counts during the studies performed by Pen-Mouratov et al. (2008) and Rodriguez-Zaragoza et al. (2008), in which nitrogen fixers were not found below depths of 30 cm and nitrogenase activity was greatly reduced below this layer (Rodriguez-Zaragoza et al., 2008). Soil microenvironments were strongly influenced by moisture, which is the principal driver of environmental processes in arid ecosystems (Whitford, 2002). The soil characteristics under *P. praecox* were similar to those of the bare soil during the drought season and were found to aggregate with those of *P. laevigata* during the rainy seasons. However, the full ecological impact of these two shrubs must be considered when planning revegetation of abandoned lands for soil reclamation. Because both shrubs are part of the natural vegetation of the Zapotitlan terraces, self-recovery of the vegetation, as proposed by Zhang et al. (2011), combined with planting of these two species offers the best opportunity for restoring this arid zone.

This study provides evidence that *P. laevigata* and *P. praecox* modify the soil properties at depths of 0 to 50 cm. The microenvironments formed under the canopies of *P. laevigata* and *P. praecox* differ from each other and from that in bare soil.



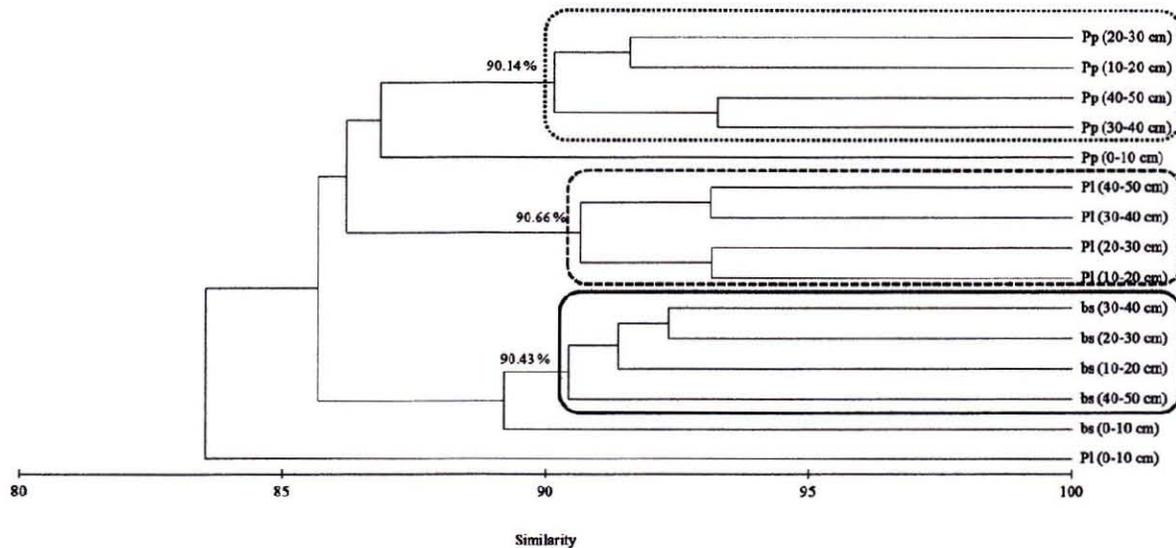


FIG. 2. Clustering of the soil microenvironments under *P. laevigata* (Pl), under *P. praecox* (Pp), and in bare soil (bs) based on physicochemical parameters. Depth: 0 to 10 cm, 10 to 20 cm, 20 to 30 cm, 30 to 40 cm, and 40 to 50 cm.

In addition, we demonstrated that both shrubs have specific effects on the physicochemical characteristics of the soil because of their phenological changes with seasonal variation. This study also explains the variation in soil properties of the microenvironments developed under *P. laevigata* and *P. praecox* and the soil dynamics. Understanding the role of these shrubs in the Tehuacan Desert is helpful for the development of site management.

ACKNOWLEDGMENTS

A.S-V thanks Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, for the training received during doctoral studies, and CONACyT for their doctoral scholarship program (CVU No. 169204). (This article is a requirement to obtain the Doctor in Sciences degree from Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.) The authors are grateful to Mayra Hernández Moreno, Daniel Muñoz Iniestra (FES-Iztacala, UNAM), Arturo Carlos II Becerra Bracho (Facultad de Ciencias, UNAM), María del Pilar Ortega Larrocea, Lucy Mora, and Christine Desiree Siebe Grabach (Instituto de Geología, UNAM) for writing assistance and proofreading of this article. Last, the authors thank Mr. Pacheco for his support and facilities in the field.

REFERENCES

- Avis, T. J., V. Gravel, H. Antoun, and R. Tweddell. 2008. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biol. Biochem.* 40:1733–1740.
- Barnes, G., S. Rodríguez-Zaragoza, I. Shmueli, and Y. Steinberger. 2009. Vertical distribution of a soil microbial community as affected by plant ecophysiological adaptation in a desert system. *Microb. Ecol.* 57:36–49.
- Braschi, I., C. Ciavatta, C. Giovanni, and C. Gessa. 2003. Combined effect of water and organic matter on phosphorus availability in calcareous soils. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 67:67–74.
- Breshears, D. D., P. M. Rich, F. J. Barnes, and K. Campbell. 1997. Overstory-imposed heterogeneity in solar radiation and soil moisture in a semiarid woodland. *Ecol. Appl.* 7:1201–1215.
- Cajuste, L. J. 1986. El Fosforo Aprovechable en Los Suelos. Cuadernos de Edafología. Vol. 6. Centro de Edafología, Colegio de Postgraduados, México.
- Camargo-Ricalde, S. L., I. Reyes-Jaramillo, and N. M. Montaña. 2010. Forestry insularity effect of four *Mimosa* L. species (Leguminosae-Mimosoideae) on soil nutrients of a Mexican semiarid ecosystem. *Agrof. Syst.* 80:385–397.
- Canton, Y., A. Sole-Benet, J. de Vente, C. Boix-Fayos, A. Calvo-Cases, C. Asensio, and J. Puigdefabregas. 2011. A review of runoff generation and soil erosion across scales in semiarid south-eastern Spain. *J. Arid Environ.* 75:1254–1261.
- Domingo Santos, J. M., R. Fernández de Villarán San Juan, E. Corral Pazos de Provencs, and I. Rapp Arraras. 2006. Estimación de la capacidad de retención de agua en el suelo: Revisión del parámetro CRA. *Invest. Agrar. Sist. Recur. For.* 15:14–23.
- Fustec, J., F. Lesuffleur, S. Mahieu, and J-B. Cliquet. 2010. Nitrogen rhizodeposition of legumes. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 30:57–66.
- García-Sánchez, R., S. L. Camargo-Ricalde, E. García-Moya, M. Luna-Cavazos, A. Romero-Manzanares, and N. M. Montaña. 2012. *Prosopis laevigata* and *Mimosa biuncifera* (leguminosae), jointly influence plant diversity and soil fertility of a Mexican semiarid ecosystem. *Rev. Biol. Trop.* 60:87–103.
- González-Ruiz, T., S. Rodríguez-Zaragoza, R. Ferrera-Cerrato. 2007. Fertility islands around *Prosopis laevigata* and *Pachycereus hollianus* in the drylands of Zapotitlan Salinas, Mexico. *J. Arid Environ.* 72:1202–1212.
- Hou-Long, J., L. Guo-Shun, W. Xin-Zhong, S. Wen-Feng, Z. Rui-Na, Z. Chun-Hua, H. Hong-Chao, and L. Yan-Tao. 2010. Spatial variability of soil properties in a long-term tobacco plantation in central China. *Soil Sci.* 175:137–144.
- Hodge, A., G. Berta, C. Doussan, F. Merchan, and M. Crespi. 2009. Plant root growth, architecture and function. *Plant Soil* 321:153–187.
- Kuzyakov, Y., and G. Domanski. 2000. Carbon input by plants into the soil. *Rev. J. Plant Nutr. Soil Sci.* 163:421–431.
- Lavelle, P., T. Decaens, M. Aubert, S. Barot, M. Blouin, F. Bureau, P. Margerieb, P. Mora, and J. P. Rossi. 2006. Soil invertebrates and ecosystem services. *Eur. J. Soil Biol.* 42:S3–S15.



- Li, C., Y. Li, and J. Ma. 2011. Spatial heterogeneity of soil chemical properties at fine scales induced by *Haloxylon ammodendron* (Chenopodiaceae) plants in a sandy desert. *Ecol. Res.* 26:385–394.
- Liang, X., and X. Zhenghui. 2001. A new surface runoff parameterization with sub grid-scale soil heterogeneity for land surface models. *Adv. Water Resour.* 24:1173–1193.
- Lopez-Galindo, F., D. Muñoz-Iniestra, M. Hernández-Moreno, A. Soler-Aburto, M. C. Castillo-López, and I. Hernández-Arzate. 2003. Análisis integral de la toposecuencia y su influencia en la distribución de la vegetación y la degradación del suelo en la subcuena de Zapotitlán Salinas, Puebla. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana.* 56:19–41.
- Montaña, N. M., R. García-Sánchez, G. Ochoa de la Rosa, and A. Monroy-Ata. 2006. Relación entre la vegetación arbustiva, el mezquite y el suelo de un ecosistema semiárido en México. *Terra Lat.* 24:193–205.
- Mulder, C. 2006. Driving forces from soil invertebrates to ecosystem functioning: The allometric perspective. *Naturwissenschaften* 93:467–479.
- Muñoz, D., A. Mendoza, F. López-Galindo, M. M. Hernández-Moreno, and A. Soler-Aburto. 2007. *Manual de Análisis de Suelos: México.* Universidad Nacional Autónoma de México, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Mexico.
- Nelson, D. W., and L. E. Sommers. 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. In: *Methods of Soil Analysis. Part 2. Agron. Monogr.* 9. ASA and SSSA, Madison, WI, pp. 539–577.
- Nguyen, C. 2003. Rhizodeposition of organic C by plant: Mechanisms and controls. *Agronomie* 23:375–396.
- Olvera-Carrillo, Y., I. Mendez, M. E. Sanchez-Coronado, J. Marquez-Guzman, V. L. Barradas, P. Huante, and A. Orozco-Segovia. 2009. Effect of environmental heterogeneity on field germination of *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae) seeds. *J. Arid Environ.* 73:414–420.
- Osorio-Beristain, O., A. Valiente-Banuet, P. Dávila, and R. Medina. 1996. Tipos de vegetación y diversidad beta en el Valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 59:35–58.
- Ostertag, R. 1998. Belowground effects of canopy gaps in a tropical wet forest. *Ecology* 79:1294–1304.
- Pandey, V., and P. K. Pandey. 2010. Spatial and temporal variability of soil moisture. *Int. J. Geosci.* 1:87–98.
- Passioura, J. B. 2002. Soil conditions and plant growth. *Plant Cell Environ.* 25:311–318.
- Pavon, N., and O. Briones. 2001. Phenological patterns of nine perennial plants in an intertropical semi-arid Mexican scrub. *J. Arid Environ.* 49:265–277.
- Pen-Mouratov, S., S. Rodríguez-Zaragoza, and Y. Steinberger. 2008. The effect of *Cercidium praecox* and *Prosopis laevigata* on vertical distribution of soil free-living nematode communities in the Tehuacan Desert, Mexico. *Ecol. Res.* 23:973–982.
- Perroni-Ventura, Y., C. Montaña, and F. Garcia-Oliva. 2006. Relationship between soil nutrient availability and plant species richness in a tropical semiarid environment. *J. Veg. Sci.* 17:719–728.
- Pugnaire, F. I., C. Armas, and F. Valladares. 2004. Soil as a mediator in plant-plant interactions in a semi-arid community. *J. Veg. Sci.* 15:85–92.
- Reyes-Reyes, G., L. Barón-Ocampo, I. Cuali-Álvarez, J. T. Frias-Hernández, V. Olalde-Portugal, L. Varela, and L. Dendooven. 2002. C and N dynamics in soil from the central highlands of Mexico as affected by mesquite (*Prosopis* spp.) and huizache (*Acacia tortuosa*): A laboratory investigation. *Appl. Soil Ecol.* 19:27–34.
- Rodríguez-Zaragoza, S., T. González-Ruiz, E. González-Lozano, A. Lozada-Rojas, E. Mayzlish-Gati, and Y. Steinberger. 2008. Vertical distribution of microbial communities under the canopy of two legume bushes in the Tehuacan Desert, Mexico. *Eur. J. Soil Biol.* 44:373–380.
- Schaaf, W., O. Bens, A. Fischer, H. H. Gerke, W. Gerwin, U. Grunewald, H. M. Holländer, I. Kögel-Knabner, M. Mutz, M. Schloter, R. Schulim, M. Veste, S. Winter, and R. F. Hüttl. 2011. Patterns and processes of initial terrestrial-ecosystem development. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 174:229–239.
- Schroeder, P. D., W. L. Daniels, and M. M. Allely. 2010. Chemical and physical properties of reconstructed mineral sand mine soils in South-eastern Virginia. *Soil Sci.* 175:2–9.
- Stewart, J. W. B., and H. Tiessen. 1987. Dynamics of soil organic phosphorus. *Biogeochemistry* 4:41–60.
- Sylvain, Z. A., and D. H. Wall. 2011. Linking soil biodiversity and vegetation: Implications for a changing planet. *Am. J. Bot.* 98:517–527.
- Torri, D., and G. Rudolf. 2000. Badlands in changing environments: An introduction. *Catena* 40:119–125.
- Tunesi, S., V. Poggi, and C. Gessa. 1999. Phosphate adsorption and precipitation in calcareous soils: The role of calcium ions in solution and carbonate minerals. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 53:219–227.
- Valiente-Banuet, A., A. Casas, A. Alcántara, P. Dávila, N. Flores-Hernández, J. L. Villaseñor, J. Ortega-Ramírez, and J. A. Soriano. 2000. La vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México.* 67:25–75.
- Velázquez, I., A. Porras, and L. Touron. 2008. Estrategia de desarrollo sustentable para generar alimento y empleo: El gusano cuchamán en Zapotitlán Salinas, Puebla, México. *Argumentos (México).* 56:119–135.
- Villaseñor, J., P. Dávila, and F. Chiang. 1990. Fitogeografía del valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México.* 50:135–149.
- Walkley, A., and I. A. Black. 1934. An examination of the method for determining organic carbon in soils: Effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. *Soil Sci.* 63:251–263.
- Wallenius, K., R. M. Niemi, and H. Rita. 2011. Using stratified sampling based on pre-characterization of samples in soil microbiological studies. *Appl. Soil Ecol.* 51:111–113.
- Warrick, A. W. 1988. Spatial variability. In: *Environmental Soil Physics*, D. Hillel (ed). Academic Press, San Diego, CA, pp 655–675.
- Whitford, W. 2002. *Ecology of Desert Systems.* Academic Press, London, UK.
- Wigmosta, M. S., L. W. Vail, and D. P. Lettenmaier. 1994. A distributed hydrology-vegetation model for complex terrain. *Water Resour. Res.* 30:1665–1680.
- Zhang, C., S. Xue, G. B. Liu, and Z. L. Song. 2011. A comparison of soil quality of different revegetation types in the Loess Plateau, China. *Plant Soil* 347:163–178.



CAPÍTULO IV:

COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA



Los *Streptomyces* son actinobacterias gram positivas que desempeñan una gran variedad de funciones en el suelo. La elucidación de la participación de estos microorganismos en los procesos clave del suelo se puede lograr mediante el análisis de su DNA en el suelo. Sin embargo, la extracción de DNA de estas bacterias, que es el paso inicial para los estudios de biología molecular, es una tarea muy difícil. Por ello, nuestro objetivo fue comparar diferentes métodos de extracción de DNA para determinar el más eficiente en tres cepas diferentes de *Streptomyces* a partir de cultivos puros y de muestras de suelo inoculado con las tres cepas. Se probaron cuatro métodos: I) lisis celular mediante agitación mecánica; II) lisis alcalina; III) lisis celular después de tratamiento con nitrógeno líquido, más el tratamiento con enzimas y IV) lisis celular después del tratamiento con nitrógeno líquido con un tratamiento químico y finalmente, 2 kits comerciales (GenElute™Bacterial Genomic DNA Kit, SIGMA y PowerLyzer™ Power Soil®DNA Isolation Kit Sample, MoBio). Los métodos III y IV permitieron la extracción de DNA de las tres diferentes especies de *Streptomyces*, pero se tuvo que hacer modificaciones en los protocolos para poder obtener DNA en buen estado (no degradado). Además, para lograr la amplificación por PCR se necesitó purificar el DNA obtenido y utilizar 1 µl de dimetil sulfóxido en las reacciones para permitir que la polimerasa funcionara adecuadamente. El kit MoBio fue el que arrojó mejores resultados, ya que nos permitió obtener DNA suficiente y de buena calidad, a partir de cultivos y de muestras de suelo inoculadas así como de muestras ambientales, para hacer análisis posteriores como PCR. Con este kit se logró obtener productos amplificados del gen rDNA 16S de aproximadamente 1500 pb de las tres cepas de *Streptomyces*, los cuales se secuenciaron y se analizaron para establecer su filogenia.

Palabras clave: Actinobacterias, Gram positivos, DNA total, Lisis celular, rDNA 16S.

COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA DE BACTERIAS DEL GÉNERO *Streptomyces*

INTRODUCCIÓN

Las bacterias son el nodo microbiano fundamental de la transformación de la materia orgánica y del reciclaje de los nutrientes del suelo, por lo que pueden ser indicadores del estado de salud del mismo (Arias et al., 2005; Griffiths et al., 2002; Carrigg et al., 2007; Amorim et al., 2008).

Las bacterias del género *Streptomyces*, son bacterias grampositivas que interactúan positivamente con las raíces de las plantas pues mejoran el crecimiento vegetal, protegen las raíces contra el ataque de fitopatógenos y algunas de ellas también fijan nitrógeno y solubilizan fósforo (Whitman et al., 1998; Doumbou et al., 2002; González-Ruiz, 2008).

Algunas especies de *Streptomyces* del suelo, también tienen la capacidad de degradar una gran variedad de compuestos xenobióticos, compuestos recalcitrantes como lignocelulosas y muchos otros polímeros presentes en la zona de raíces de las plantas y también en la hojarasca (Crawford, 1987; Warren, 1996). Además, los organismos del género *Streptomyces*, producen una gran cantidad de enzimas líticas, antibióticos y una gran variedad de metabolitos bioactivos (Anderson et al., 1993).

Por todo lo anterior, las bacterias del género *Streptomyces* que habitan en el suelo son un reservorio importante de biomoléculas con gran potencial de uso en el cuidado de la salud, en aplicaciones industriales, en la producción de alimentos y podrían ser claves en la recuperación de los suelos (Amorim et al., 2008).

Sin embargo, a pesar de la gran importancia que tienen estos microorganismos, se conoce poco sobre el número y riqueza de especies de *Streptomyces* presentes en diferentes suelos, y menos aún, sobre las funciones e interacciones de estas comunidades microbianas edáficas (Garbeva et al., 2004).

Se ha estimado que con las técnicas de cultivo convencionales solo se conoce entre el 1 y el 10% del total de los microorganismos presentes en el suelo, lo cual limita el conocimiento de los *Streptomyces* a muy pocas especies edáficas (Amann et al., 1995; McCaig et al., 1999). Por lo que los métodos moleculares representan alternativas independientes al cultivo para el estudio de estos microorganismos (Nogales et al., 2001; Rodicio y Mendoza,



2004; Little et al., 2008). Estas herramientas ofrecen un análisis más certero y rápido de la estructura y composición de las comunidades bacterianas del suelo (Rodicio y Mendoza, 2004; González-Franco et al., 2009). Sin embargo, estas técnicas requieren la extracción de DNA como paso inicial, y es aquí donde se encuentran las mayores dificultades para el estudio de estos microorganismos (Holben, 1992; González-Franco et al., 2009).

Estos problemas se han resuelto comparando diferentes métodos para la extracción de DNA, ya que no existe un método universal para todos los tipos de suelo, ni para las características específicas de todos los microorganismos presentes en el, por lo que se requiere adecuar el método para cada tipo de muestra (Nogales, 2005; Sagova-Marekova et al., 2008).

En la zona semiárida de Zapotitlán Salinas, Puebla, se reportó que las bacterias del género *Streptomyces*, son las mejor representadas de la comunidad de diazótrofos cultivables del suelo de la zona de raíces de dos especies vegetales de desierto, una leguminosa y una cactácea (González-Ruiz, 2008). Sin embargo, estas conclusiones se basaron en cepas cultivadas e identificaciones morfológicas, ya que el estudio de estos microorganismos por medio de técnicas moleculares presentó dificultades en lo que corresponde a la obtención de DNA genómico de cepas cultivadas, más aún cuando se pretendió obtener DNA a partir de muestras ambientales (González-Ruiz et al., 2007).

Por lo anterior, es de gran importancia establecer métodos adecuados para la extracción de DNA del suelo de Zapotitlán Salinas, Puebla que rinda cantidades sustanciales y de buena calidad de DNA como la base para determinar mejor la diversidad de bacterias del suelo del género *Streptomyces*, así como para el estudio de genes implicados en procesos importantes del suelo, como es la fijación de nitrógeno. Por lo que nuestro objetivo fue comparar diferentes métodos para establecer cuál de ellos permite obtener DNA de buena calidad de bacterias del género *Streptomyces* del suelo para el análisis de las comunidades de estos microorganismos del suelo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de suelo

Se utilizaron muestras de suelo de la zona de raíces de tres individuos de *Prosopis laevigata* y tres sitios sin cobertura vegetal de Zapotitlán Salinas, Puebla para ser

inoculados con tres cepas diferentes de *Streptomyces*. Las muestras del suelo fueron tomadas en una terraza aluvial degradada de Zapotitlán Salinas, Puebla de los primeros 0 a 50 cm de profundidad (en intervalos de 10 cm) de la zona de raíces de *P. laevigata*, *P. praecox* y de suelo sin cobertura vegetal (interespacio), con un nucleador de acero inoxidable de 10 cm de diámetro (cuatro réplicas para cada microambiente) y se colocaron en bolsas autosellables Ziploc[®]. Las muestras se rotularon y se transportaron en una hielera y se guardaron a 4°C hasta su análisis.

Microorganismos utilizados

Se utilizaron tres cepas del género *Streptomyces* (*Streptomyces* Zapt 6, *Streptomyces* Zapt 8 y *Streptomyces* Zapt13) aisladas y descritas previamente como fijadoras de nitrógeno del suelo de Zapotitlán Salinas, Puebla por González-Ruíz en el 2007 (Fig. 1).

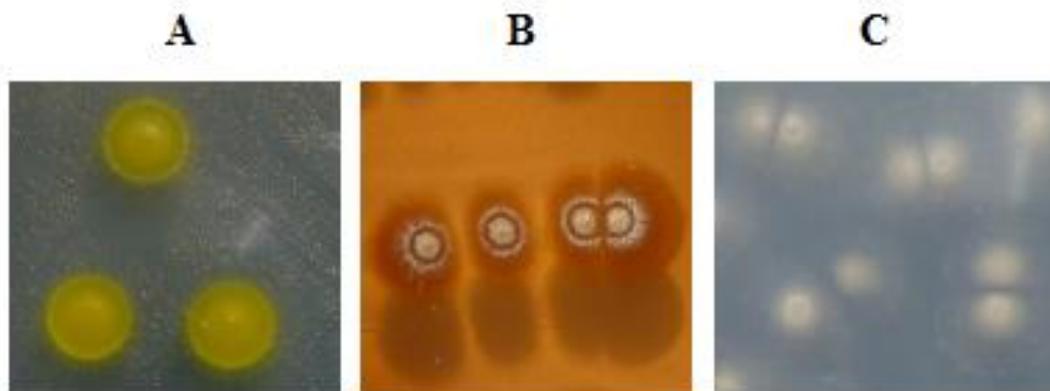


Figura 1. Morfología colonial de las cepas A: *Streptomyces* Zapt 6, B: *Streptomyces* Zapt 8 y C: *Streptomyces* Zapt 13, crecidas en medio Rennie (1981).

Cultivo de microorganismos

Para el cultivo de los microorganismos se utilizó medio Rennie líquido y sólido (1981). Las cepas de *Streptomyces* fueron cultivadas en medio líquido durante 7 días a 23 °C en agitación orbital. Los cultivos se utilizaron para la inoculación de suelo previamente esterilizado en calor seco (en una mufla a 110 °C durante 72 hr) y para la extracción de DNA a partir de las células bacterianas. Para la inoculación de suelo se empastillaron 10 ml de cultivo de cada cepa. La pastilla se resuspendió en 2 ml de agua milli Q estéril. Cada

suspensión se inoculó en cajas Petri de vidrio con 5 g de suelo estéril (por triplicado) y se secaron a 38 °C por 24 h (para esto se colocó gasa con algodón para tapar las cajas y permitir la evaporación del agua).

Extracción de DNA

Se probaron por triplicado cuatro métodos, basados en diferencias en la lisis celular, para la obtención de DNA de cultivos bacterianos y de suelo inoculado con cultivos bacterianos (Tabla 1): González-Franco et al., 2009 (Método I), Hu et al., 2010 (Método II), Carrig et al., 2007 (Método III) y Atashpaz et al., 2010 (Método IV). Además se probaron los kits comerciales para realizar las extracciones de DNA de las cepas cultivadas con ambos kits, GenElute™Bacterial Genomic DNA Kit (SIGMA) y PowerLyzer™ Power Soil®DNA Isolation Kit Sample (MoBio), pero sólo se utilizó el kit MoBio para la extracción del DNA del suelo inoculado, siguiendo en ambos casos las instrucciones de los fabricantes.

Determinación de la eficiencia en la extracción de DNA

Para observar la presencia del DNA con cada uno de los métodos, tanto de las cepas cultivadas como del suelo inoculado, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% (110 V, 94 mA durante 30 min). Se cargaron 5 µl de cada muestra y 1µl de 6X GelRed Loading Buffer y se utilizó el marcador de 1Kb plus DNA Ladder. Las imágenes se tomaron con un fotodocumentador 1D KODAK 3,5 software, después de las electroforesis.

Cuantificación y pureza del DNA

Se tomaron 2µl de cada extracto donde se observó DNA en los geles de agarosa y se leyeron con un Thermo Scientific NanoDrop 2000c, a una absorción de 230 nm, 260 nm y 280 nm. La concentración de DNA se obtuvo a partir de la lectura a 260 nm. La pureza se determinó a partir de la relación 260/280 nm (indica si existen contaminantes como proteínas y ácidos húmicos en los extractos de DNA) y de la relación 260/230 nm (es un indicador de contaminación por la presencia de ácidos húmicos) (Steffan et al., 1988).

Viabilidad

Las viabilidad del DNA obtenido se evaluó mediante la amplificación el gen rDNA 16S por PCR con los oligonucleótidos universales F515: AGAGTTTGATCCTGG y R1492: TACCTTGTTACGACTT. Se utilizaron perlas de reacción PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR beads (GE Healthcare). Cada perla se pasó a un tubo nuevo estéril para PCR de 50 µl Tehrmo Scientific. A cada tubo se le agregó 18 µl de agua milliQ estéril, 1 µl de



oligonucleótido forward y 1 µl de oligonucleótido reverse a una concentración de 10 pmol/µL y 5 µl de DNA. La mezcla se homogeneizó y se centrifugó 10 seg a máxima velocidad. La PCR se realizó en un termociclador PIKO Thermal Cycler (Thermo Scientific). El programa para la PCR se estandarizó a partir de 1 ciclo de 3 min a 94 °C, 30 ciclos de 45 seg a 94 °C / de 30 a 45 seg a 46-56 °C / 60 seg a 72 °C, un ciclo de 5 min a 72 °C y posteriormente se mantuvo a 4 °C.

Los productos de PCR se observaron en geles de agarosa al 1% (110 V, 94 mA, durante 35 min), donde se esperaba observar fragmentos de aproximadamente 1500 pb. Las imágenes se tomaron con un fotodocumentador 1D KODAK 3,5.

Los productos amplificados se purificaron con USB® ExoSAP-it® PCR Product Cleanup de acuerdo al protocolo del fabricante y se secuenciaron con un secuenciador ABI 3100 de 16 capilares que utiliza el método BIG DYE Terminator fluorescence based sequencing en el Laboratorio de bioquímica molecular de la UBIPRO, FES-Iztacala, UNAM. Las secuencias se editaron con el programa Lasergene y se realizaron alineamientos múltiples con secuencias tomadas del NCBI y se realizó un encadenamiento por Neighbor-Joining con el software Mega 4.

Se comprobó la eficiencia del método con mejor rendimiento probándolo en la extracción de DNA total de suelo (descrito en toma de muestras) de la zona de raíces de *P. laevigata*, *P. praecox* y del interespacio del valle de Zapotitlán Salinas, Puebla y se determinó su calidad y cantidad cuantificando con un Thermo Scientific NanoDrop 2000c y por amplificación del gen rDNA 16S por PCR,



Tabla 1. Métodos de extracción de DNA que se probaron

Método	Descripción
Método I González-Franco et al., 2009	1 g de suelo inoculado y/o la pastilla de células de cada cepa bacteriana se resuspendió en 1 ml de TE buffer y se realizó una agitación mecánica con perlas de ebullición y un shock térmico. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 14000 rpm/5 min a temperatura ambiente. La pastilla se mezcló con 1 ml de buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0; EDTA 25 mM, Acetato de sodio 0.3 mM y SDS al 3%) y 20 µl de lisozima (10 mg ml ⁻¹). Se incubó a 65 °C por 30 min. Se centrifugó la mezcla a 6000 rpm durante 2 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le agregó un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm/10 min a temperatura ambiente. La fase acuosa se recuperó en un tubo nuevo y se precipitó con 0.6 vol de isopropanol 4 h a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm/10 min. Las pastillas se lavaron con 1 ml de etanol frío al 70% y se centrifugaron a 14000 rpm/5 min. El DNA se resuspendió en 50 µl de agua Milli Q estéril.
Método II Hu et al., 2010	1 g de suelo inoculado y/o pastilla de células de cada cepa bacteriana se resuspendió en 15 ml de buffer de fosfatos (PBS) 0.2 M (pH 8.0) y se agitó durante 5 min. La suspensión se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos. Las pastillas se lavaron con PBS y se suspendieron en 1 ml de solución de lisis (NaCl 0.5 M, EDTA 1M, pH 8.0), se incubaron durante 15 minutos a 37 °C con agitación suave, se les adicionó 1 ml solución II (NaCl 0.1 M, Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0 y SDS al 10%) y se incubaron a 65 °C durante 1 h. Posteriormente se centrifugaron las mezclas a 6000 rpm durante 10 min y las pastilla se desecharon. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se le agregó 2.5 ml de NaCl 5M, y se incubó a 65 °C durante 5 min. Posteriormente el DNA se extrajo con Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). El DNA se precipitó con 0.6 volúmenes de isopropanol a -20 °C durante toda la noche. Se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos, para obtener el DNA. La pastilla se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 50 µl de TE.
Método III Carrig et al., 2007	0.250 g de suelo inoculado y/o la pastilla de células de cada cepa bacteriana se congelaron con nitrógeno líquido y se maceraron mecánicamente con pistilos plásticos en tubos eppendorff estériles en el caso de las células cultivadas y en morteros con pistilo previamente enfriados (-20 °C) en el caso de los suelos inoculados. Posteriormente se agregaron 500 µl de buffer de extracción CTAB (Griffiths et al., 2000) y se mezcló con vortex por 30 seg. Se adicionaron 500 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 40 mM, pH 8, 750 mM de sacarosa esterilizada por filtración) y 20 µl de lisozima (10 mg ml ⁻¹); se mezclaron con vortex y se incubaron a 37 °C por 30 min. Posteriormente se adicionó SDS a una concentración final de 2%, se agitó con vortex y se incubó 70 °C durante 1 h. Después se agregaron 6µl de proteinasa K, se agitaron con vortex y se incubaron a 50 °C por 30 min. Posteriormente se centrifugó la mezcla a 10000 rpm por 15 min. El sobrenadante se



transfirió a un tubo eppendorff nuevo y se mezcló con un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (24:) y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min. El DNA se precipitó con 0.6 volúmenes de isopropanol toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min, la pastilla se lavó con etanol al 70% (v/v) ice-cold y se dejó secar a temperatura ambiente. El DNA se resuspendió con 50 µl de agua milli Q tratada con DEPC (0.1%).

Método IV
Atashpaz et al., 2010

0.250 g de suelo inoculado y/o la pastilla de células de cada cepa bacteriana se congelaron con nitrógeno líquido, se agregaron 800 µl de buffer de lisis (CTAB 2%, Tris-HCL 100 mM, NaCl 1.4 M, PVP 1%, EDTA 20 mM pH 8.0 y LiCl 0.2%) y se molieron con un mortero con pistilo de en el caso del suelo y con un pistilo plástico estéril en tubos eppendorf en el caso de las células aisladas. Posteriormente se incubó a 65 °C durante 2 h. Se agitó suavemente por inversión cada 10 min. Se centrifugó la muestra a 10000 rpm durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, se le agregó un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se agitó por inversión. Cada muestra se centrifugó a 12000 rpm por 8 min a 4 °C. La fase superior se transfirió a un tubo nuevo, se le agregó 100 µl de acetato de sodio 5M y se mezcló gentilmente por inversión. Posteriormente se agregó, gota a gota, un volumen equivalente de isopropanol (-20 °C) para precipitar el DNA. La muestra se incubó a -20 °C por 30 min y después se centrifugó a 14000 rpm por 10 min a 4 °C. Se removió el sobrenadante y se hizo un primer lavado con 500 µl de etanol al 96% (4 °C), se centrifugó a 12000 rpm por 5 min. Se realizó un segundo lavado, se removió el sobrenadante y se agregaron 500 µl de etanol al 70%. Después se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se desechó. La pastilla se secó a temperatura ambiente y el DNA se disolvió en 50 µl de TE buffer y se guardó a -20 °C.

**GenElute™Bacterial
Genomic DNA kit**

Se utilizó el protocolo descrito por el fabricante para la extracción de DNA de bacterias gram positivas a partir de cultivos bacterianos.

**PowerLyzer™
Power Soil®DNA
Isolation Kit Sample**

Se utilizó el protocolo descrito por el fabricante a partir de 0.25 g de suelo y/o pastillas cosechadas de las cepas cultivadas en medio Rennie sólido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El acercamiento a las comunidades microbianas del suelo en la actualidad, se basa fundamentalmente en análisis moleculares. Por lo que el paso inicial obligado, es obtener el DNA de los microorganismos del suelo donde muchos de ellos, como es el caso de las bacterias del género *Streptomyces*, presentan dificultades en la lisis celular. Está bien documentado que los *Streptomyces* poseen una arquitectura de la pared celular compleja,



junto con la concentración extensa de peptidoglicano dentro de su pared celular, por lo que la extracción de DNA de estas bacterias suele ser difícil y problemática (Frostegard et al, 1999). Por lo que la eficiencia en la extracción de DNA genómico y metagenómico de los microorganismos del suelo va a ser preponderante para el estudios de las comunidades microbianas, donde estos microorganismos tienen funciones elementales en el crecimiento vegetal, en la fijación de N y en la solubilización de P, en la degradación de compuestos xenobióticos, recalcitrantes y forman parte importante de las redes tróficas del suelo (Crawford, 1987; Warren, 1996; Whitman et al., 1998; Doumbou et al., 2002; González-Ruiz, 2008).

Los métodos que probamos, proponen liberar el DNA mediante la ruptura de la pared y las membranas de los microorganismos de manera mecánica, alcalina, enzimática y química.

Se observó que con el Método I, los ácidos grasos de las bacterias se acumulaban en la parte superior de los tubos, lo que impedía terminar la técnica, sobre todo con la cepa *Streptomyces* Zapt 6. Este mismo método tampoco permitió obtener DNA de los suelos inoculados con las cepas bacterianas. Esto es muy importante ya que en los estudios moleculares que se hacen a partir de muestras ambientales, no están siendo tomados en cuenta muchos de estos organismos porque son difíciles de lisar. Es por esto que la lisis de las células bacterianas es uno de los pasos críticos y limitantes en la obtención de DNA (Carrig et al., 2007; Sagova-Marekova et al., 2008).

Con el método II se logró obtener DNA de las cepas *Streptomyces* Zapt 8 y *Streptomyces* Zapt 13, pero no fue posible obtener DNA de *Streptomyces* Zapt 6. Con este método no se logró obtener DNA de los suelos inoculados en buena cantidad (Fig. 1).

Los métodos III y IV nos permitieron obtener DNA de los cultivos de las tres cepas bacterianas. Pero en el caso de los suelos inoculados, la cantidad de DNA que se obtuvo fue mayor con el método III, sin embargo se observaba con poca calidad, en el caso del método IV, se logró obtener DNA de mejor calidad (Fig. 1).

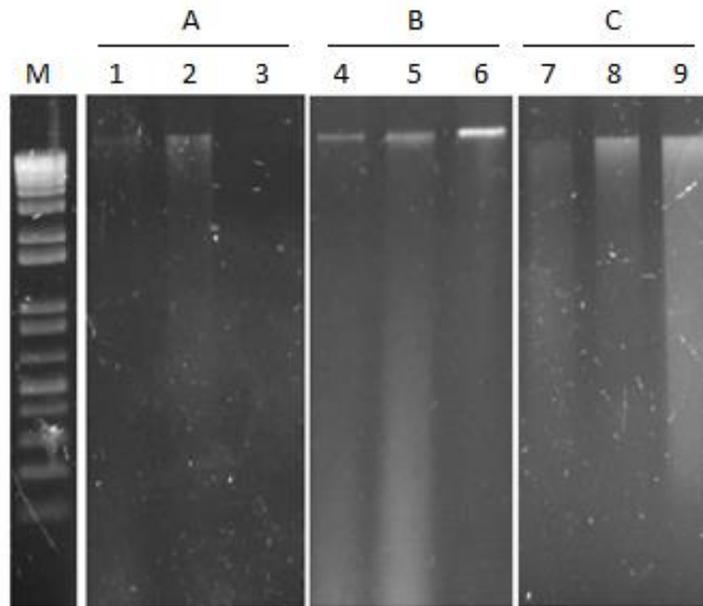


Figura 1. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.1% de DNA de suelo obtenido con A: Método II; B: Método III y C: Método IV. Carriles 1, 4, 7) *Streptomyces* Zapt 6; 2, 5, 8) *Streptomyces* Zapt 8 y 3, 6, 9) Zapt 13; M) Marcador 1kb plus DNA ladder.

Para mejorar la cantidad y calidad de DNA del método IV se hicieron algunas modificaciones (Fig. 2), que consistieron en quitar el macerado con nitrógeno líquido, ya que la congelación con nitrógeno líquido y la maceración, al ser muy abrupta podría estar rompiendo el DNA formando fragmentos del material genético, los cuales reaccionaban más rápidamente con las partículas del suelo. En su lugar se hizo una agitación en vortex a máxima velocidad, con perlas de vidrio durante 30 min en presencia del buffer de extracción descrito en la tabla 1. Para la disgregación como para la ruptura de las células de *Streptomyces*, fue necesaria la lisis enzimática (Lombard et al., 2011). En este caso, la lisozima y la proteinasa K se utilizaron para digerir las proteínas contaminantes que interfieren con la extracción de DNA (Marstop & Witter, 1999). Además el CTAB fue un detergente eficaz que separó los polisacáridos de DNA durante la extracción y ayudó a remover la contaminación por RNA y proteínas (Atasphaz et al., 2010). Los compuestos orgánicos inhiben las reacciones enzimáticas por lo que interfieren negativamente con estudios subsecuentes a la extracción, como es la amplificación por PCR o en

procedimientos de clonación (Lombard et al., 2011). Por lo que, además del CTAB, se utilizó el PVP, ya que ambos ayudaron a disminuir la concentración de contaminantes. En este método utilizamos también EDTA, que evita la degradación por los contaminantes que se unen al DNA, funcionando como quelante (Marstop & Witter, 1999). Para eliminar el RNA, los polisacáridos y los metabolitos secundarios, se utilizó cloruro de litio y acetato de potasio (Atashpaz et al., 2010). Posteriormente un paso muy importante fue la separación de DNA, la cual se realizó con cloroformo-alcohol isoamílico y su precipitación se realizó de manera muy cuidadosa con isopropanol para evitar la ruptura del DNA; en caso contrario no se lograba obtener DNA de buena calidad

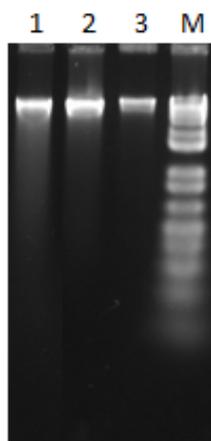


Figura 2. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.1% de DNA de suelo obtenido con Método IV modificado. Carriles 1) *Streptomyces* Zapt 6; 2) *Streptomyces* Zapt 8 y 3) *Streptomyces* Zapt 13; M) Marcador 1kb plus DNA ladder.

Sin embargo, el DNA que se obtuvo con el método IV modificado, aunque era buena cantidad, se perdía rápidamente, (aproximadamente, después de una semana de haberlo obtenido) y también se observó que la eficiencia de este método disminuía considerablemente si los reactivos no eran frescos.

En cuanto al Kit MoBio, únicamente se extendió el periodo de agitación en vortex a 20 min para obtener una mayor cantidad de DNA ya que se obtenía poco DNA del suelo. Lo demás se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, con lo cual se obtuvo buena calidad del DNA de todas las cepas y de los suelos inoculados (Fig. 3).

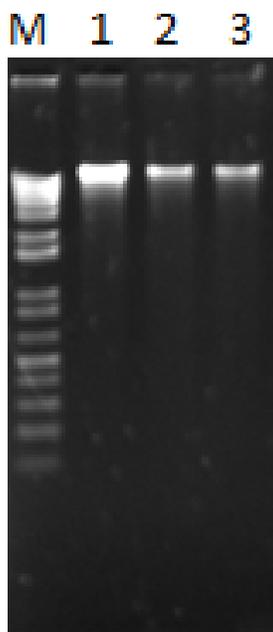


Figura 3. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.1% de DNA de suelo obtenido con kit MoBio. Carriles 1) *Streptomyces* Zapt 6; 2) *Streptomyces* Zapt 8 y 3) *Streptomyces* Zapt 13; M) Marcador 1kb plus DNA ladder.

Generalmente, se extraen junto con los ácidos nucleicos, contaminantes que pueden interferir en análisis posteriores como la PCR, hibridación, digestión con enzimas, entre otros (Garbeva et al., 2004; Sagova-Marekova et al., 2008), por lo que las muestras donde se logró observar DNA en los geles de agarosa (Método III, IV y IV-modificado), se purificaron con el kit UltraClean MoBio, posteriormente se hicieron las cuantificaciones, incluyendo el DNA obtenido con el kit MoBio y se determinó la pureza. La mayor concentración y pureza de DNA de las cepas cultivadas se obtuvo con los Kits SIGMA y MoBio y con el método IV para las cepas Zapt 6, Zapt 8 y Zapt 13 cultivadas y para el suelo inoculado fue con el Kit MoBio seguido por el método IV modificado, sin embargo las concentraciones fueron muy bajas en general, ya que ningún método supera los $16 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración y pureza de los extractos de DNA de suelo inoculado

	Cepa inoculada	[ng μl^{-1}]	260 nm	280 nm	260/280	260/230	
Método III	<i>P. laevigata</i>	<i>Streptomyces</i> Zapt 6	1.9	0.038	0.025	1.48	0.83
		<i>Streptomyces</i> Zapt 8	1.1	0.021	0.018	1.19	0.90
		<i>Streptomyces</i> Zapt 13	2.2	0.045	0.029	1.55	0.31
	Interespacio	<i>Streptomyces</i> Zapt 6	1.7	0.010	0.36	0.18	1.7
		<i>Streptomyces</i> Zapt 8	1.2	0.023	0.013	1.75	0.30
		<i>Streptomyces</i> Zapt 13	2.5	0.057	0.024	2.06	0.21
Método IV	<i>P. laevigata</i>	<i>Streptomyces</i> Zapt 6	5.57	0.147	0.106	1.41	0.66
		<i>Streptomyces</i> Zapt 8	5.80	0.117	0.082	1.54	0.69
		<i>Streptomyces</i> Zapt 13	5.20	0.104	0.072	1.55	0.41
	Interespacio	<i>Streptomyces</i> Zapt 6	5.60	0.112	0.080	1.88	0.70
		<i>Streptomyces</i> Zapt 8	5.50	0.110	0.073	1.79	1.11
		<i>Streptomyces</i> Zapt 13	6.43	0.128	0.083	1.64	0.65
Kit MoBio	<i>P. laevigata</i>	<i>Streptomyces</i> Zapt 6	13.6	0.272	0.190	1.44	0.81
		<i>Streptomyces</i> Zapt 8	12.7	0.254	0.785	1.38	0.63
		<i>Streptomyces</i> Zapt 13	15.9	0.317	0.221	1.43	0.58
	Interespacio	<i>Streptomyces</i> Zapt 6	9.3	0.186	0.146	1.27	0.62
		<i>Streptomyces</i> Zapt 8	14.6	0.292	0.221	1.32	0.77
		<i>Streptomyces</i> Zapt 13	11.1	0.222	0.153	1.45	0.67

Las concentraciones que se muestran del método III y IV (modificado) son posteriores a la purificación.

También se debe poner especial atención en la pureza, ya que de esto depende que se pueda utilizar el DNA en estudios posteriores, lo cual es medular para hacer análisis moleculares (Lakay et al., 2005; Feinstein y col., 2009). Se puede observar en general que el DNA del suelo extraído con el kit MoBio se encuentra relativamente puro (Tabla 2).

El DNA de las células cultivadas dieron positivo a la amplificación del gen rDNA 16S por PCR (Figura 4 y 5). De las muestras de DNA del suelo obtenidas, no se pudo obtener ningún producto amplificado con los métodos III, IV y IV modificado pero sí con el DNA obtenido del Kit MoBio (Fig. 6). Las muestras que no mostraron resultados positivos en la PCR se volvieron a amplificar agregando a la mezcla de reacción 1 μl de dimetil sulfóxido.

Las condiciones óptimas para la PCR fueron 45 seg a 94 °C para la desnaturalización, 45 seg a 50.7 °C para alinear y una extensión de 60 seg a 72 °C, por 30 ciclos. Con estas condiciones se logró obtener productos amplificados de gen rDNA 16S de aproximadamente 1500 pb a partir del DNA de las tres cepas cultivadas y del suelo inoculado.

Con el kit MoBio se logró obtener DNA del suelo, puro, no degradado y en cantidad suficiente, ya que se pudo tener éxito en las amplificaciones (Fig. 7). En este caso, la amplificación por PCR nos permitieron determinar cuáles métodos fueron los más exitosos, lo cual es importante, ya que la eficiencia general de un método de aislamiento de DNA genómico y metagenómico, nos indicará los alcances de los estudios posteriores entre profundidades, entre microambientes y entre estaciones (Rajendhran y Gunasekaran., 2008).

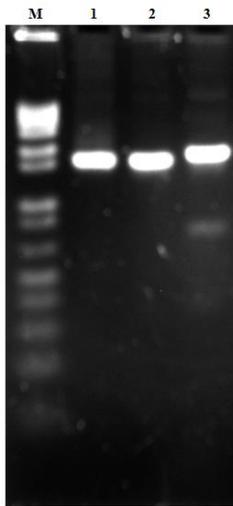


Figura 4. Análisis electroforético, en gel de agarosa al 0.1 %, del producto de PCR del gen rDNA 16S a partir de DNA genómico de las tres cepas de *Streptomyces* utilizando el kit SIGMA. 1) *Streptomyces* Zapt 6, 2) *Streptomyces* Zapt 8, 3) Zapt 13 y M) Marcador 1kb plus DNA ladder.

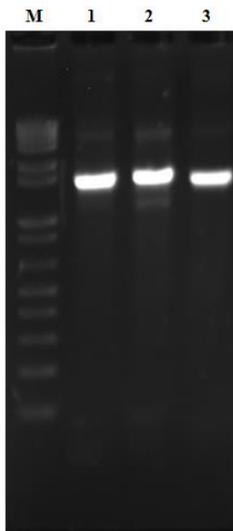


Figura 5. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.1 %, del producto de PCR del gen rDNA 16S a partir de DNA genómico de las tres cepas de *Streptomyces* utilizando el kit DNA Power Soil (MoBio). 1) *Streptomyces* Zapt 6, 2) *Streptomyces* Zapt 8, 3) Zapt 13 y M) Marcador 1kb plus DNA ladder.

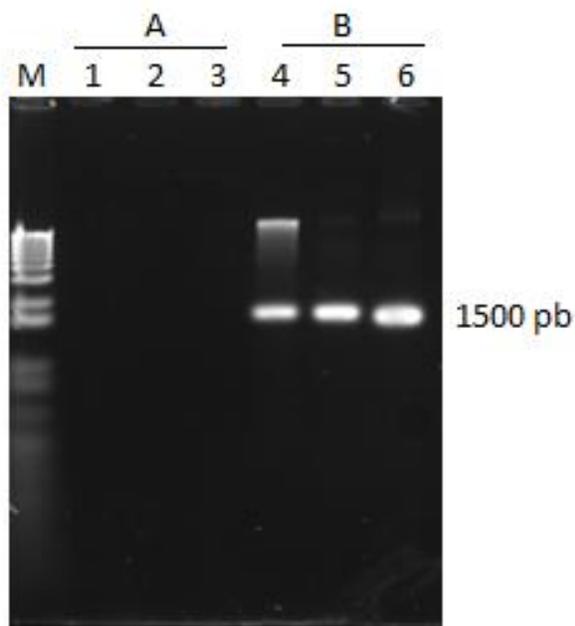


Figura 6. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.1 %, del producto de PCR del gen rDNA 16S a partir de DNA de suelo inoculado con las tres cepas de *Streptomyces* utilizando A) Método IV sin purificar el DNA y sin agregar dimetil sulfóxido a la mezcla de reacción y B) kit MoBio. Carriles 1 y 4) *Streptomyces* Zapt 6; 2 y 5) *Streptomyces* Zapt 8, 3 y 6) Zapt 13 y M) Marcador 1kb plus DNA ladder.

Con los productos amplificados se lograron tener secuencias de buena calidad las cuales se editaron para unir las por ambos lados (5'→3') y así obtener la secuencia completa para los tres organismos utilizados. Con estas secuencias y algunas tomadas del GenBank se logró hacer el alineamiento múltiple. A partir de esto, se realizó un análisis filogenético y se encontró que las tres cepas de *Streptomyces* aisladas de Zapotitlán Salinas, Puebla tienen una alta similitud con secuencias de organismos tanto cultivados como no cultivados del género *Streptomyces* encontradas en el GenBank. De secuencias obtenidas del gen rDNA 16S, se encontró que la cepa *Streptomyces* Zapt 6 tenía una alta identidad con *Streptomyces spiralis*, la cepa de *Streptomyces* Zapt 8 con *Streptomyces purpurasens* y *Streptomyces* Zapt 13 con *Streptomyces collinus* (Fig. 7).

Todos estos resultados nos muestran que la calidad del DNA fue buena y la cantidad suficiente ya que nos permitió hacer varios análisis que son la base para el estudio de estos microorganismos.

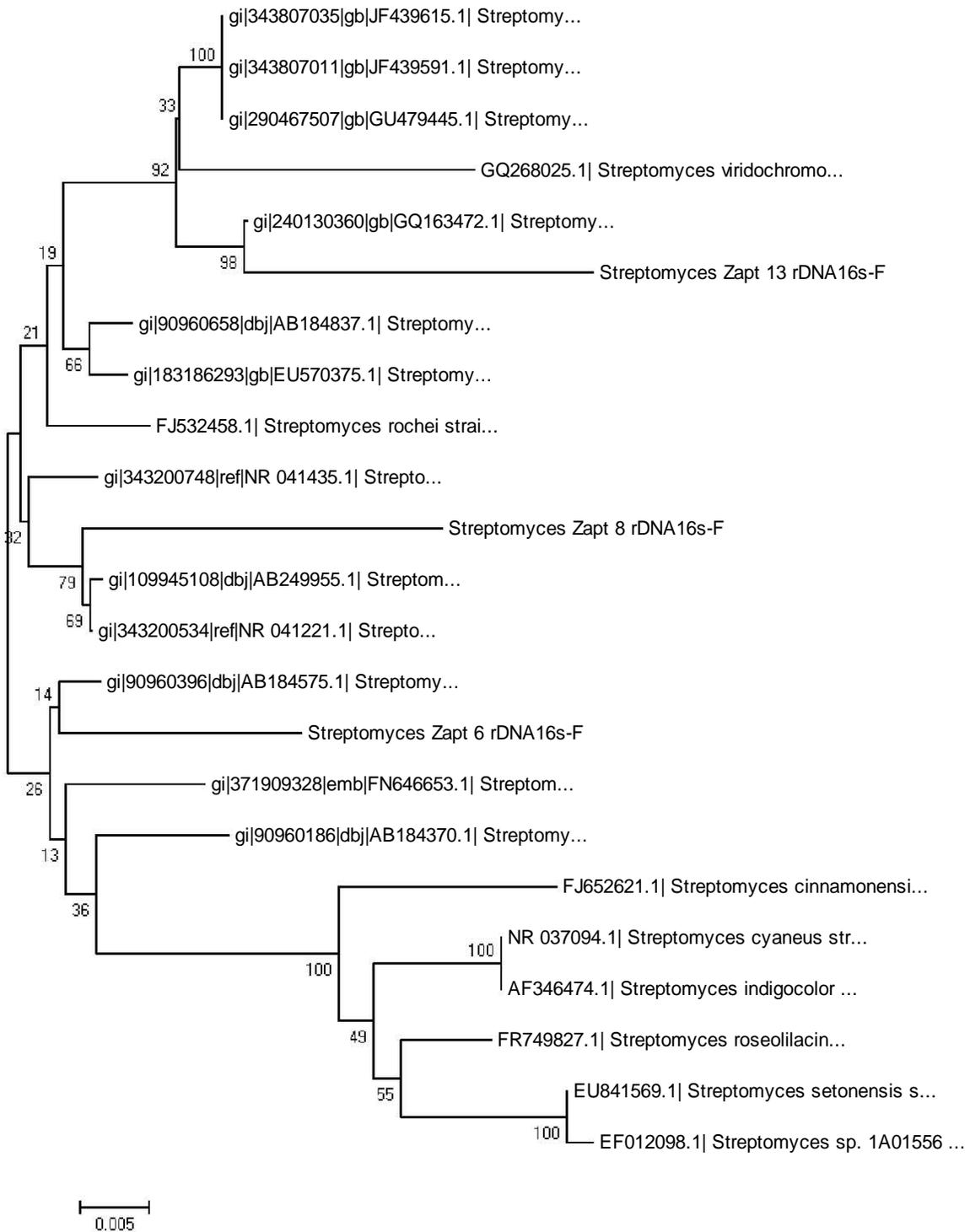


Figura 7. Análisis de reconstrucción filogenética del gen rDNA 16S de bacterias del género *Streptomyces* por el método de Neighbor-Joining (Bootstrap 1000 réplicas), con el Software Mega4 a partir de alineamiento múltiple con ClustalW.

Para corroborar la confiabilidad del método, se realizaron extracciones de muestras ambientales y en todos los casos se logró obtener DNA de buena calidad (Fig. 8), aunque las concentraciones variaron entre profundidades, entre microambientes y entre estaciones (Fig. 9).

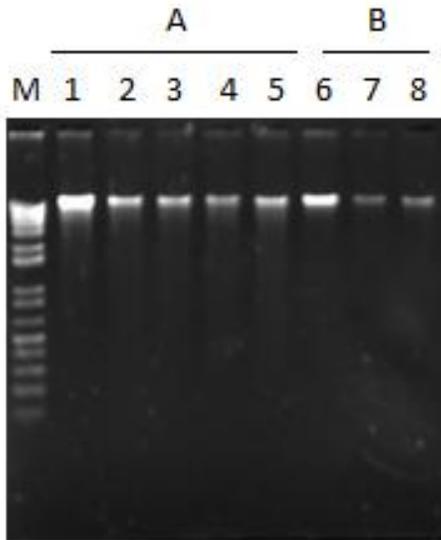


Figura 8. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.1% de DNA de suelo obtenido con kit MoBio. Suelo de A: *P. laevigata* y B: *P. praecox*. Carriles 1, 6) 0-10 cm; 2, 7) 10-20 cm; 3, 8) 20-30 cm de profundidad 13; M) Marcador 1kb plus DNA ladder.

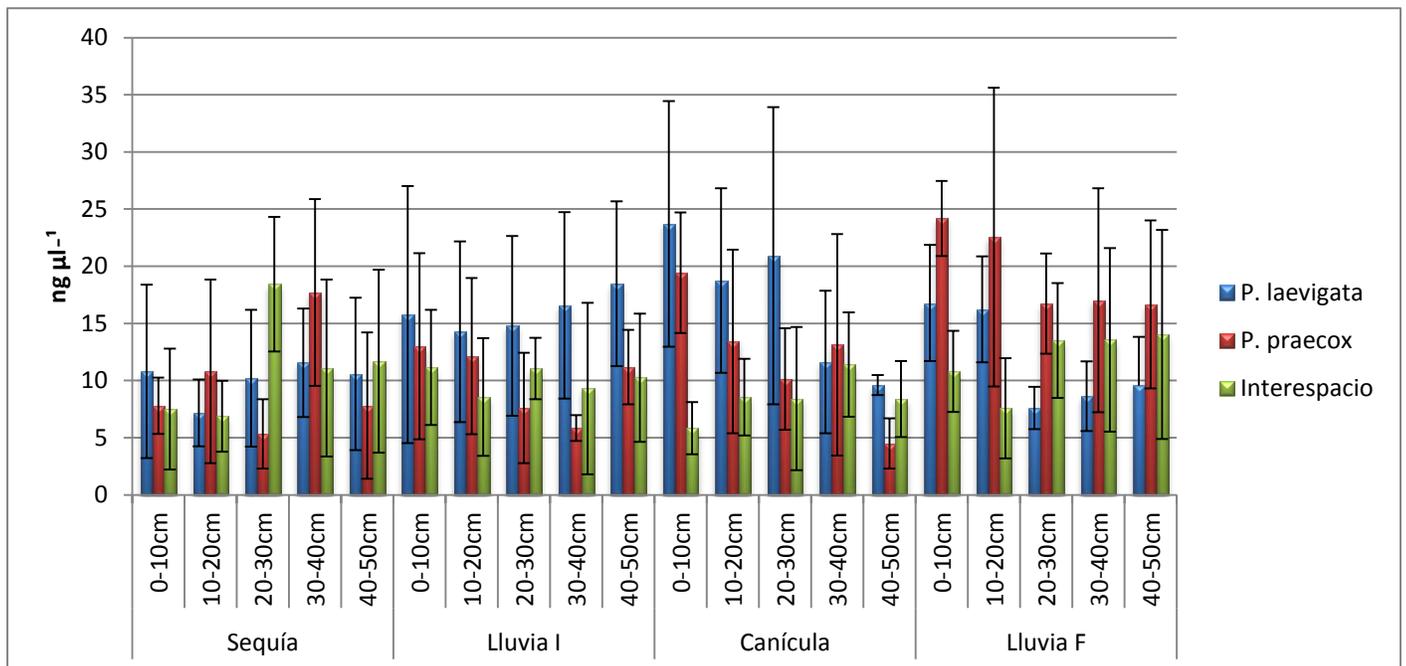


Figura 9. Variación en la concentración de DNA del suelo obtenido con el kit MoBio de diferentes microambientes a lo largo de un ciclo anual en una terraza aluvial degradada de Zapotitlán Salinas, Puebla. Las líneas indican la desviación estándar de las determinaciones (n=4).

En conclusión, no todos los métodos nos permitieron obtener DNA de las cepas de *Streptomyces* cultivadas, y de las muestras de suelo y menos aún realizar ampliaciones por PCR. Muchos métodos han sido propuestos como universales para la extracción de DNA, sin embargo, nosotros comprobamos que no todos los métodos nos permiten obtener DNA de las cepas *Streptomyces* Zapt 6 y *Streptomyces* Zapt 8 y *Streptomyces* Zapt 13. Por lo tanto, se deben adecuar y optimizar los métodos de extracción de DNA del suelo y de todos los tipos de muestras ambientales, ya que por la propia naturaleza y plasticidad fenotípica de los microorganismos presentes y el tipo de suelo, no se puede hablar de métodos de extracción de DNA universales.

REFERENCIAS

- Aoshima, O., Kimura, A., Shibutani, A., Okada, C., Matsumiya, Y. and Kubo, M. 2006. Applied Microbiology and Biotechnology. **71**: 875-880.
- Atashpaz, S., Khani, S., Barzegari, A., Barer, J., Zunini-Vahed, S., Azarbaijani, R. and Omidi, Y. 2010. A robust universal method for extraction of genomic DNA from bacterial species. Microbiology. **79** (4): 538-542.
- Atlas, R. 1995. Principles of Microbiology. 1ª Edition. Ed. Mosby-Year Book, Inc. EUA. Pags. 887.
- Carrig, c., Rice, O., Kavanagh, S., Collins, G and O'Flaherty, V. 2006. DNA extraction method affects microbial community profiles from soils and sediment. Applied Microbiology and Biotechnology. **77**: 95-964.
- Dineen, S. M., Aranda IV, R., Anders, DL. and Robertson, JM. 2010. An evaluation of commercial DNA extraction kits for the isolation of bacterial spore DNA from soil. Journal of Applied Microbiology. **109**: 186-1896.
- Feinstein, L. M., Jun Sul, W. and Blackwood, CB. 2009. Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil. Applied and Environmental Microbiology. **75** (16): 5428-5433.
- Frostegard, A., Courtois, S., Ramisse, V., Clerc, S., Bernillon, D., Le Gall F., Jeannin, P., Nesme, X. and Simonet, P. 1999. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. Applied and Environmental Microbiology. **65** (12): 5409-5420.



- Gonzalez-Franco, AC., Robles-Hernandez, L., Nuñez-Barrios, A., Strap, JL. and Crawford, DL. 2009. Molecular and cultural análisis of seasonal actinomycetes in soil from *Artemisia tridentata* habitat. *International Journal of Experimental Botany*. **78**: 83-90.
- Handelsman J., Rondon, M., Brandy, S., Clardy, J. and Goodman, R. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemical and Biology*. **5**: R245-R249.
- Hu, Y., Liu, Z., Yan, J., Qi, X., Li, J., Zhong, S., Yu, J. & Liu, Q. 2010. A developed DNA extraction method for different soil samples. *Journal of Basic Microbiology*. **50**: 401-40.
- Inceoglu, O., Hoogwout, EF., Hill, P. and van Elsas, JD. 2010. Effect of DNA extraction method on the apparent microbial diversity soil. *Applied and Environmental Microbiology*. **76** (10): 338-3382.
- Insam, H. 2001. Developments in soil microbiology since the mid 1960s. *Geoderma* **100**: 389-402.
- Kauffmann, IM., Schmitt, J. and Schmid, RD. 2004. DNA isolation from soil samples for cloning in different hosts. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **64**: 665-670.
- Lakay, FM., Botha, A. and Prior, BA. 2006. Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils. *Journal of Applied Microbiology*. **102**: 265-273.
- Nogales, B. 2005. La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas*. **14** (2): 41-51.
- Purohit, MK. and Singh, SP. 2009. Assessment of various methods for extraction of metagenomic DNA from saline habitats of coastal Gujarat (India) to explore molecular diversity. *Letters in Applied Microbiology*. **49**: 338-344.
- Rajendhran, J. and Gunasekaran, P. 2008. Strategies for accessing soil metagenome fo desired applications. *Biotechnology Advances*. **26**: 576-590.
- Sagova-Mareckova, M., Cermak, L., Novotna, J., Plhackova, K., Forstova, J. and Kopecky, J. 2008. Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with



Widely differing Characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*. **74** (9): 2902-2907.

- Sheu, C., Wu, C.Y., Chen, SC. and Lo, C. C. 2008. Extraction of DNA from soil for analysis of bacterial diversity in transgenic and nontransgenic Papaya sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**: 11969-1195.
- Somerville, C., Knight, IT., Straube, WL. and Colwell, RR. 1989. Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*. **55**(3): 548-554.
- Trevors, J. T. 2010. One gram of soil: a microbial biochemical genen library. *Antonie van Leewenhoek*. **97**: 99-106.
- Verma, D. and Satyanarayana, T. 2011. Aan improved protocol for DNA extraction from Alkaline soil and sediment samples for constructing metagenomic libraries. *Applied Biochemical and Biotechnology*. DOI 10.107/s12010-011-9264-5.
- Whitman W., D., Coleman, C. & Wiebe, W. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad.Sci.USA*.
- Woese, C. 1987. Bacterial evolution. *Microbiology Review*. **51**:221-271.
- Marstorp, H. and Witter, E. 1999. Extractable dsDNA and product formation as measures of microbial growth in soil upon substrate addition. *Soil Biology and Biochemistry*. **31**: 1443-1453.



CAPÍTULO V:

BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE CULTIVABLES

Serrano-Vázquez A., Pérez-Juárez H., Hernández, A., Ayala, M., Antonio, I., Bazán-Cuenca, J., Tapia, M. A., Rodríguez-Zaragoza S., Vázquez-Cruz, C. y Rivera-Aguilar V. M. 2013. Comunidades microbianas del suelo bajo el dosel de *Prosopis laevigata* en Zapotitlán Salinas, Puebla. En el IV Congreso sobre Manejo de Ecosistemas y Biodiversidad de la IX Convención Internacional sobre Medio Ambiente y Desarrollo. ISBN 978-959-300-034-5.



Prosopis laevigata tiene un papel ecológico esencial en el valle de Tehuacán, Puebla, ya que mejora significativamente las condiciones ambientales para las redes tróficas del suelo. Los microorganismos son fundamentales en el mantenimiento de la productividad de las zonas áridas. Pese a su papel preponderante, el ensamble de las comunidades microbianas del suelo es poco conocido en estos ambientes. En este trabajo se identificaron las comunidades de bacterias, amebas, rotíferos y nemátodos del suelo bajo el dosel de *P. laevigata* y del interespacio (control) en el valle de Tehuacán, Puebla. Se encontró que las bacterias solubilizadoras de fósforo bajo *P. laevigata* pertenecen, principalmente, a los géneros *Burkholderia* y *Streptomyces*. Las bacterias fijadoras de nitrógeno mejor representadas fueron las Rhizobiaceae, Burkholderiaceae y Streptomycetaceae. Los principales géneros de amebas fueron *Vahlkampfia*, *Acanthamoeba*, *Platyamoeba* y *Hartmannella*. La riqueza total de amebas fue de 12 especies en *P. laevigata* y 8 en el interespacio. Los rotíferos bajo *P. laevigata*, pertenecen a los géneros *Rotaria*, *Adineta*, *Macrotrachela* y *Lecane*. Se observó que los géneros más representativos de nemátodos bajo *P. laevigata* fueron: *Aphelenchoides*, *Acrobeloides*, *Monhystera*, *Hoplolaimus* y *Panagrolaimus*. En todos los casos se observó que la composición de la comunidad fue mayor en el suelo bajo *P. laevigata*. Para poder entender las variaciones en las comunidades microbianas, se determinaron algunas propiedades edáficas. Las comunidades microbianas se correlacionaron positivamente con humedad y materia orgánica y negativamente con la temperatura ($p < 0.05$).

Palabras clave: Desierto intertropical, Redes tróficas del suelo, Interacción planta-microorganismo, Mezquite.

COMUNIDADES MICROBIANAS DEL SUELO BAJO EL DOSEL DE *Prosopis laevigata* EN ZAPOTITLÁN SALINAS, PUEBLA

Angélica Serrano Vázquez (1)*, *Horacio Pérez Juárez (1)*, *Abbid Hernández Chimal (1)*, *Mario Ayala Arce (1)*, *Isabel Antonio Luna (1)*, *Jesús Bazán Cuenca (1)*, *Miguel Ángel Tapia Ramírez (1)*, *Salvador Rodríguez Zaragoza (1)*, *Candelario Vázquez Cruz (2)*, *Víctor Manuel Rivera Aguilar (1)*.

(1)Laboratorio de Microbiología, UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, UNAM. Av. de los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, 54090, Edo. de México; Tel 55-56231103. (2)CIM-ICUAP, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Apdo. Postal 1622, Puebla, Puebla. Tel. 2444518, ext. 26.

Autor de correspondencia: *anseva_31@yahoo.com.mx

INTRODUCCIÓN

Prosopis laevigata tiene un papel ecológico muy importante en las zonas áridas, ya que mejora las propiedades físicas y químicas del suelo bajo su dosel, en comparación con la zona sin cobertura vegetal (interespaicio), formando islas de fertilidad (Montaño et al., 2006; Olvera-Carrillo et al., 2009; Perroni-Ventura et al., 2010; Li et al., 2011; García-Sánchez et al., 2012; Godínez-Álvarez et al., 2012; Serrano-Vázquez et al., 2013). Esto es muy importante en los ecosistemas de desierto, donde las condiciones ambientales son extremas, ya que tanto el agua como los nutrimentos en el suelo son limitados (Witford, 2002; Perroni-Ventura et al., 2006; Rivera-Aguilar et al., 2009; García-Sánchez et al., 2012).

Además, las modificaciones hechas por *P. laevigata* a nivel de microescala, son importantes para preservar la biodiversidad de la microbiota del suelo en estos ambientes (Barness et al., 2009; Li et al., 2011; Sylvain y Wall, 2011; Serrano-Vázquez et al., 2013). Por lo que los microambientes generados por *P. laevigata* son favorables para el establecimiento y mantenimiento de las comunidades microbianas, además de que son el marco de interacción entre el sistema planta-suelo-microorganismo (González-Ruiz et al., 2007). Esto es muy importante ya que, a su vez, las comunidades microbianas son fundamentales en el mantenimiento de la productividad de las zonas áridas, ya que facilitan muchos procesos como la descomposición, mineralización y movilización de nutrimentos del suelo que medían los servicios ecosistémicos (Witford, 2006; Barness et al., 2009; Bissett et al., 2013).



En las comunidades microbianas del suelo, algunas bacterias fijan nitrógeno y solubilizan fósforo, lo que contribuye a la conservación del suelo (Anderson et al. 1984; Bongers et al., 1999; Michael, 2011). Por otra parte, los depredadores bacterianos como amebas, rotíferos y nemátodos, liberan los nutrientes secuestrados en la biomasa bacteriana, contribuyendo con los ciclos biogeoquímicos y manteniendo así la productividad primaria (Schmid-Araya, 1998; Bardgett et al., 1999; Garbeva et al., 2004). Además, estos depredadores controlan el crecimiento de las comunidades bacterianas y las mantienen fisiológicamente jóvenes (Esteban et al., 2006; Rodríguez-Zaragoza y González-Lozano, 2007).

Se ha observado la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) de vida libre en el suelo bajo *P. laevigata* en el valle de Tehuacán, siendo *Streptomyces* el género más representado (González-Ruiz et al., 2007). También se ha encontrado que las comunidades de amebas de vida libre (AVL) del suelo bajo dos leguminosas responden a las condiciones fisicoquímicas del suelo, por lo que el ensamblaje de las comunidades varía en función del microambiente (Rodríguez-Zaragoza y González-Lozano et al., 2007). Además, los nemátodos están influenciados por leguminosas, principalmente en los primeros 10 cm de profundidad (Pen-Moratov et al., 2008).

Sin embargo, pese a su papel preponderante en las zonas áridas, el ensamble de las comunidades microbianas del suelo es poco conocido. El objetivo de este trabajo fue identificar las comunidades de BFN, bacterias solubilizadoras de fósforo BSP, AVL, rotíferos (RS) y nemátodos (NVL) del suelo, bajo el dosel de *P. laevigata* y del interespacio (control) y su relación con factores físicos y químicos, para entender la dinámica de las comunidades microbianas en una terraza aluvial de Zapotitlán Salinas, en el valle de Tehuacán, Puebla, México.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sitio de estudio

El valle de Tehuacán es un desierto semiárido formado por efecto de la sombra orográfica de la Sierra Madre Oriental y se encuentra localizado a 400 km al sur de la ciudad de México (Fig. 1; Villaseñor et al., 1990).

El clima de la región de acuerdo al sistema de clasificación de Köppen (modificado por García en 1973), es seco semicálido, con lluvias durante el verano (BSohw) y poca

oscilación térmica, variando entre 5 y 7°C, con una temperatura fluctuante entre los 17.6 y los 23.7°C y una media anual 21°C. El Valle tiene una precipitación anual que va de los 400 a los 450 mm, la cual alcanza su mayor proporción durante la estación lluviosa y se extiende de junio a agosto, con un periodo bien definido de sequía durante el mes de julio, conocido como “canícula” (Dávila et al, 2002; López-Galindo et al, 2003; Rivera-Aguilar et al, 2006).

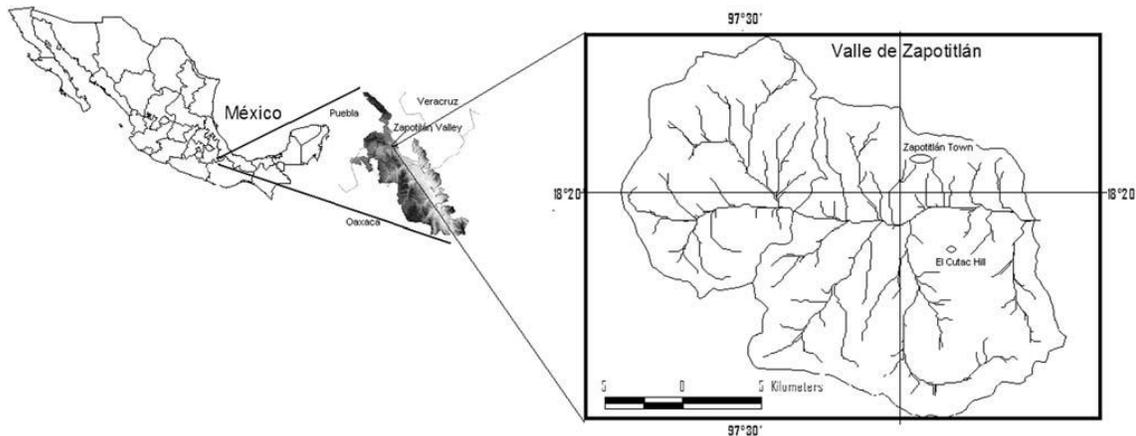


Figura 1. Mapa de localización de Zapotitlán Salinas, Puebla (tomado de Pen-Mouratov *et al.*, 2008).

Zapotitlán Salinas cuenta con un sistema de terrazas aluviales que exhiben diferentes grados de degradación, con suelos profundos (López-Galindo et al., 2003). Los tipos de suelo dominantes en estas terrazas son Regosol calcáreo y Fluvisol (de acuerdo a FAO-WRB, 2006 en López-Galindo et al., 2003).

El presente estudio se realizó en una terraza aluvial en estado de degradación que se caracteriza por presentar canales y cárcavas que incrementan el movimiento en masa y los procesos de arrastre del suelo durante la época de lluvias torrenciales (López-Galindo et al., 2003).

La vegetación es considerada matorral xerófilo, en el que predominan los cactus columnares como *Neubuxbamia tetetzo*, seguido de *Prosopis levigata* (mezquite) (Rzedowski, 1981; Osorio-Beristain et al., 1996; Valiente-Banuet et al., 2000; Dávila et al, 2002; López-Galindo et al, 2003).

P. laevigata (Fig. 2) es una especie clave en la zona, ya que influye en el banco de semillas del suelo, permite el establecimiento de otras plantas, microorganismos, aves, roedores e insectos, que son críticos para procesos tales como la descomposición de materia orgánica, la difusión de semillas y la polinización (Valiente-Banuet et al., 2000; Perroni-Ventura et al., 2006; González-Ruiz et al., 2007). Además este arbusto es económicamente importante para los pobladores del valle (Velázquez et al., 2008).



Figura 2. Ejemplar de *Prosopis laevigata* (Mezquite) presente en una terraza degradada de Zapotitlán Salinas, Puebla, México.

Toma de muestras

El muestreo se realizó en una terraza aluvial degradada de Zapotitlán Salinas, Puebla, dentro de la reserva de la biósfera de Tehuacán-Cuicatlán durante septiembre del 2008. Se seleccionaron tres individuos adultos de *P. laevigata*, con misma altura, diámetro basal y diámetro de la copa y tres zonas de interespacio como control. Las muestras se tomaron, en el caso de los arbustos del suelo, con 50 cm de separación del tronco, tomada como zona de raíces. Se colectaron muestras del suelo de los primeros 10 cm de profundidad con un nucleador de acero inoxidable de 10 cm de diámetro y se guardaron en bolsas autosellables Ziploc[®], se rotularon y se transportaron al laboratorio de Microbiología de la FES-Iztacala, UNAM en una hielera para su análisis microbiológico y fisicoquímico.

Análisis fisicoquímico

La temperatura del suelo se midió en campo con un termómetro modelo Reotemp (Reotemp Instruments, San Diego, CA USA). Se determinó la humedad del suelo por el método de gravimetría (Ortiz y Ortiz, 1980 en Muñoz et al., 2007). Posteriormente las muestras se tamizaron con una malla de 2 mm y se secaron a 110° C durante 72 h. Se determinó el porcentaje de materia orgánica, por el método de oxidación con ácido crómico y ácido sulfúrico de Walkley y Black, 1934 (Nelson y Sommers, 1982 en Muñoz et al., 2007).

Análisis microbiológico

Las posibles bacterias fijadoras de nitrógeno se cultivaron en medio Rennie y en medio Pikovskaya las bacterias solubilizadoras de fósforo y se identificaron por medio de la extracción de DNA con el kit PowerLyzer™PowerSoil®DNA Isolation Kit Sample, siguiendo las instrucciones del fabricante y se realizó la amplificación del gen rDNA 16S de cada cepa utilizando perlas de reacción PureTaq™Ready-To-Go™; con los iniciadores F27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y R1494 (5'-CTACGGRTACCTTGTTACGAC-3') y F515 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y R1492 (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') con una temperatura de desnaturalización de 95° C durante 40 seg, una temperatura de alineación de 55° C durante 30 seg y una temperatura de extensión de 72° C durante un minuto y medio, todo durante 25 ciclos para el primer par de iniciadores. El programa para el segundo par de iniciadores consistió de una temperatura de desnaturalización de 94° C 45 segundos, una temperatura de alineación de 50.7° C durante 45 segundos y una temperatura de extensión de 72° C durante 1 minuto, todo durante 30 ciclos. Los productos amplificados se purificaron con el kit Ultraclean Gelspin DNA Extraction y se enviaron a secuenciar a la unidad de secuenciación de la UBIPRO, FES-I, UNAM. La edición de las secuencias se realizó con el programa Lasergene y se realizó un alineamiento múltiple con el programa ClustalW2.

Las amebas fueron extraídas del suelo y cultivadas por la técnica descrita por Rodríguez-Zaragoza et al. (2005). La identificación se realizó por morfología de las amebas *in vivo* con un microscopio de contraste de fases (Olympus modelo CH2) y se utilizaron las claves especializadas de Page y Siemensma (1991). Las especies fueron reportadas como presentes (1) / ausentes (0).



Para la obtención de rotíferos se utilizó la técnica propuesta por Deveter (2010) y los organismos se identificaron por microscopía con ayuda de claves taxonómicas de Bartos (1959), Donner (1965), Melone y Ricci (1995) y Melone et al. (1998).

La obtención de nemátodos se realizó por el método del embudo de Baermann (1917) y se fijaron con formaldehído (4%). Los organismos obtenidos se identificaron por microscopía óptica con ayuda de las claves que se encuentran en la página web <http://nematode.unl.edu/> de la Universidad de Nebraska y claves de Jairajpuri et al. (1992). La identificación a nivel de género se realizó en base a estructuras morfológicas como las del aparato bucal, cutícula y esófago principalmente.

Análisis estadístico

Las variables fisicoquímicas fueron analizadas por medio de estadística descriptiva para calcular la media y desviación estándar. Para analizar si existían diferencias significativas ($\alpha < 0.05$; $p < 0.01$) entre cada una de las propiedades fisicoquímicas del suelo bajo *P. laevigata* y el interespacio, los datos de materia orgánica y humedad fueron normalizados por el cálculo del arco seno (Podani, 2000) y analizados por ANOVA de una vía, con el paquete estadístico MINITAB® 16 (Minitab, Inc., State College, PA, USA). Se realizó el análisis de correlación de Pearson entre los parámetros fisicoquímicos y con la riqueza genérica de toda la comunidad de microorganismos, utilizando el programa MINITAB® 16.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El sistema complejo que constituye el suelo, característicamente heterogéneo, alberga una gran riqueza de especies vegetales, animales y microbianas, las cuales se relacionan estrechamente entre sí (Atlas, 1995). Los microorganismos del suelo, que juegan un papel muy importante y necesario en todos los ecosistemas, deben encontrar una serie de recursos que les permita subsistir, además de condiciones ambientales adecuadas (Shamir y Steinberger, 2007; Smith et al., 2002).

En este estudio se encontró un total de 11 especies de bacterias fijadoras de nitrógeno, distribuidas en 8 géneros y 6 familias (Tabla 1). En el interespacio se observó únicamente la presencia de 8 especies distribuidas en cinco géneros y cinco familias (Tabla 1).

Se observó que los géneros *Bacillus*, *Cupriavidus* y *Sinorhizobium* únicamente se encuentran presentes en el suelo bajo *P. laevigata* y no en el interespacio, lo que se podría explicar ya que se ha reportado que estos géneros se asocian con las raíces de las plantas.

La mayor cantidad de especies presentes en el suelo bajo *P. laevigata* se puede explicar porque la mayoría de las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre requieren de condiciones adecuadas de materia orgánica, humedad y oxígeno para su desarrollo (Postgate, 1998; Chapin et al., 2002; Lloret y Martínez-Romero, 2005). Algunas de las especies que se encontraron en ambos microambientes, han sido reportadas en una gran variedad de suelos, siendo las rhizobiaceas principalmente endosimbiontes (Postgate, 1998; Fuentes-Dávila y Ferrera-Cerrato, 2007; González-Ruiz et al., 2008). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por González-Ruiz et al., (2007) en Zapotitlán Salinas Puebla, donde la mayoría de las bacterias fijadoras de nitrógeno, en el suelo bajo *P. laevigata* y el interespacio, pertenecían al género *Streptomyces*. Sin embargo, se encontraron algunas diferencias, ya que nosotros encontramos que las comunidades de bacterias fijadoras de nitrógeno variaban entre los microambientes. Encontramos los géneros *Bacillus* y *Burkholderia*, los cuales no se presentaron en el trabajo anterior, sin embargo, nosotros reportamos una menor riqueza de especies, debido al periodo en que se realizó cada estudio.

Tabla 1. Estructura de la comunidad de bacterias fijadoras de nitrógeno del suelo

Familia	Género	Especie	<i>Prosopis laevigata</i>	Interspacio
BACILLACEAE	<i>Bacillus</i>	<i>B. niacini</i>	1	0
BURKHOLDERIACEAE	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp	1	1
		<i>Cupriavidus</i>	<i>C. respiraculi</i>	1
MICROBACTERIACEAE	<i>Microbacterium</i>	<i>M. foliorum</i>	1	1
RHIZOBIACEAE	<i>Rhizobium</i>	<i>R. etli</i>	1	1
		<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. meliloti</i>	1
SPHINGOMONADACEAE	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas</i> sp	1	1
STREPTOMYCETACEAE	<i>Streptomyces</i>	<i>S. coelicolor</i>	1	1
		<i>S. collinus</i>	1	1
		<i>S. pseudogriseolus</i>	1	1
		<i>S. purpurascens</i>	1	1

1: presencia; 0: ausencia



El nitrógeno en el suelo es considerado como un recurso limitante y se ha propuesto que la principal ruta de incorporación de este nutriente es la fijación biológica de nitrógeno (González-Ruiz et al., 2007).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre son microorganismos que crecen en el suelo y no tienen necesariamente una relación simbiótica con las plantas para poder realizar la fijación de nitrógeno (Haukka et al., 1998; Fustec et al., 2010).

Un grupo muy pequeño de bacterias es capaz de fijar nitrógeno en vida libre cuando este no se encuentra disponible en el suelo, por lo que estos microorganismos son de gran importancia en el sostenimiento de ecosistemas donde la disponibilidad de nutrientes es limitada, como en el caso de los ecosistemas áridos y semiáridos (Atlas, 1995).

Estas bacterias fijadoras de nitrógeno tienen gran importancia en los procesos de biofertilización de las zonas degradadas, donde géneros como *Streptomyces* que son muy resistentes a condiciones microambientales desfavorables pueden ser utilizadas, ya que además de fijar nitrógeno, pueden solubilizar fósforo (Kumar et al., 1999).

Después de la humedad y el nitrógeno, el fósforo es uno de los recursos que limitan la productividad en los suelos áridos, ya que se encuentra en estados que no son biodisponibles (Cajuste, 1986; Paul y Clarck, 1988; Brady y Weil 1996). Sin embargo existen bacterias con capacidad para solubilizar fósforo, por lo que estos microorganismos tienen un papel esencial en la disponibilidad de este elemento en el suelo (Hameeda et al., 2006).

En el presente estudio se encontró un total de nueve especies de bacterias solubilizadoras de fósforo distribuidas en cinco géneros y cinco familias (Tabla 2). En el suelo bajo *P. laevigata* se encontró un total de cinco especies dentro de cuatro géneros y cuatro familias y en el interespacio se encontraron 6 especies, con cuatro géneros y cuatro familias (Tabla 2). Además, se observó que el género *Serratia* únicamente se encuentra en el interespacio, mientras que el género *Sinorhizobium* sólo se encuentra en el suelo bajo *P. laevigata* (Tabla 2).

Tabla 2. Estructura de la comunidad de bacterias solubilizadoras de fósforo del suelo

Familia	Género	Especie	<i>Prosopis laevigata</i>	Interespacio
BURKHOLDERIACEAE	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia sp</i>	1	1
		<i>B. cepacia</i>	0	1
		<i>B. fungorum</i>	0	1
ENTEROBACTERIACEAE	<i>Serratia</i>	<i>S. nematodiphila</i>	0	1
MICROBACTERIACEAE	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium sp</i>	1	1
RHIZOBIACEAE	<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. meliloti</i>	1	0
STREPTOMYCETACEAE	<i>Streptomyces</i>	<i>S. spinicoomarensis</i>	1	0
		<i>Streptomyces sp</i>	1	1
		<i>S. viridis</i>	1	0

1: presencia; 0: ausencia

En este estudio se encontró una mayor cantidad de especies solubilizadoras de fósforo en el interespacio, lo cual podría ser explicado porque su establecimiento y función son afectados por los factores ambientales, donde el fósforo no se encuentra en estado disponible (Kumar et al., 1999).

Las amebas de vida libre son un grupo muy importante de eucariotes microbianos que unen el flujo de energía de los microorganismos (bacterias, algas y hongos) hacia los microinvertebrados (rotíferos, nematodos y ácaros) y permiten reciclar los nutrientes del suelo. Además, controlan el crecimiento de bacterias y las mantienen fisiológicamente jóvenes (Esteban et al., 2006; Garbeva et al., 2004).

Se encontró en *P. laevigata* un total de cuatro familias, seis géneros y 14 especies, donde la mejor representada es la Vahlkampfiidae, con cuatro géneros y 11 especies (Tabla 3). Las familias Acanthamoebidae, Hartmannellidae y Gruberellidae sólo se observaron en este microambiente. En el interespacio se observaron tres familias, cuatro géneros y siete especies, donde la familia mejor representada también fue Vahlkampfiidae, con dos géneros y cinco especies. Las familias Vampyrellidae y Nucleariidae se encontraron únicamente en el interespacio (Tabla 3).



Tabla 3. Estructura de la comunidad de amebas de vida libre del suelo

Familia	Género	Especie	<i>Prosopis laevigata</i>	Interespacio
ACANTHAMOEBIDAE	<i>Acanthamoeba</i>	<i>A. castellanni</i>	1	0
		<i>A. lugdunensis</i>	1	0
HARTMANNELLIDAE	<i>Hartmannella</i>	<i>H. vermiformis</i>	1	0
GRUBERELLIDAE	<i>Stachyamoeba</i>	<i>S. lipophora</i>	1	0
NUCLEARIIDAE	<i>Nuclearia</i>	<i>N. radians</i>	0	1
VAHLKAMPFIIDAE	<i>Adelphamoeba</i>	<i>A.galeacystis</i>	1	0
		<i>Paratetramitus</i>	0	1
		<i>Tetramitus</i>	1	0
		<i>Vahlkampfia</i>	1	1
		<i>V. atopa</i>	1	0
		<i>V. avara</i>	1	1
		<i>V. enterica</i>	1	0
		<i>V. inornata</i>	1	1
		<i>V. lacustris</i>	1	0
		<i>V. magna</i>	1	1
VAMPYRELLIDAE	<i>Vampirella</i>	<i>V. ustiana</i>	1	0
		<i>V. vagans</i>	0	1

1: presencia; 0: ausencia

La familia Vahlkampfiidae, que fue la que se encontró en los dos los microambientes, con el mayor número de especies presentes, se caracteriza por presentar diferentes estadios de vida, ya sea formando quistes, en estado de trofozoito o flagelar (Page y Siemansma, 1991). Estas condiciones les permiten permanecer en ambientes tan variables como es el caso de Zapotitlán Salinas, ya que al formar quistes pueden resistir a la desecación del suelo y el estado flagelar les permite sobrevivir en sitios donde la natación es la principal forma de obtener recursos. Por su parte el estado de trofozoito les permite reptar y deslizarse hasta los lugares donde otros depredadores no pueden llegar, siendo unos los principales depredadores bacterianos en el suelo (Darbyshire, 1994).

Los rotíferos son importantes consumidores primarios principalmente de bacterias, hongos y algas, por lo que también tienen un papel clave como mediadores en el reciclaje de los nutrientes (Anderson et al., 1984; Michael, 2011).

Se encontró un total de seis especies distribuidas en cuatro géneros y cuatro familias, todas presentes en el suelo de *P. laevigata* y sólo *Habrotrocha* sp y *Adineta ricci* se encuentra en el interespacio, lo cual puede indicar que estos organismos se ven fuertemente influenciados por el ambiente (Ricci, 2000; Song y Kim, 2000; Deveter, 2011).



Tabla 4. Estructura de la comunidad de rotíferos del suelo

Familia	Género	Especie	<i>Prosopis laevigata</i>	Interespacio
ADINETIDAE	<i>Adineta</i>	<i>A. ricci</i>	1	1
HABROTROCHIDAE	<i>Habrotrocha</i>	<i>Habrotrocha sp</i>	1	1
LECANIDAE	<i>Lecane</i>	<i>L. pyriformis</i>	1	0
		<i>L. tricocherca</i>	1	0
		<i>L. inermis</i>	1	0
PHILODINIDAE	<i>Rotaria</i>	<i>R. sordida</i>	1	0

1: presencia; 0: ausencia

El papel de los nemátodos en el suelo es muy importante ya que, excretan nutrientes biodisponibles para otros microorganismos, como producto de su metabolismo, tales como iones de amonio, que es su principal compuesto de desecho (Anderson et al., 1983; Ferris et al., 1998). Además, pueden intervenir de manera indirecta al alimentarse de otros microorganismos, ocasionando modificaciones en el tamaño, composición y la actividad de las comunidades microbianas (Bardgett, 2005). Debido a esto, los nematodos ocupan posiciones clave como consumidores secundarios e intermediarios en las redes tróficas del suelo (Bongers et al., 1998).

Tabla 5. Estructura de la comunidad de nematodos del suelo

Familia	Género	<i>Prosopis laevigata</i>	Interespacio
APHELENCHOIDIDAE	<i>Aphelenchoides</i>	1	1
BELONOLAIMIDAE	<i>Belonolaimus</i>	1	0
	<i>Tylenchorhynchus</i>	1	0
CAMPYDORIDAE	<i>Campydora</i>	1	0
CEPHALOBIDAE	<i>Acrobeles</i>	1	1
	<i>Acrobeloides</i>	0	1
	<i>Cervidellus</i>	1	0
	<i>Eucephalobus</i>	1	0
DORYLAIMIDAE	<i>Aporcelaimellus</i>	1	0
	<i>Eudorylaimus</i>	1	0
HOPLOLAIMIDAE	<i>Hoplolaimus</i>	0	1
LONGIDORIDAE	<i>Xiphinema</i>	1	0
MONHYSTERIDAE	<i>Monhystera</i>	1	1
PANAGROLAIMIDAE	<i>Panagrolaimus</i>	1	0
PRATYLENCHIDAE	<i>Pratilenchus</i>	1	0
TYLENCHOLAIMIDAE	<i>Tylencholaimus</i>	1	0

1: presencia; 0: ausencia



La presencia de una mayor cantidad de géneros en el suelo bajo *P. laevigata* se puede explicar porque estos organismos requieren de una película de agua para poder moverse, alimentarse y reproducirse, por lo que el mezquite le proporciona estas condiciones necesarias de humedad en comparación con el interespacio (Bardgett, 2005). A pesar de ello, algunos nematodos se encuentran en el interespacio ya que están adaptados para sobrevivir en condiciones desfavorables de humedad y temperatura (Bardgett et al., 1994; Bardgett, 2005).

Estos resultados se complementan con los realizados por Pen-Mouratov (2008), donde se observa que la abundancia de nematodos es mayor en el suelo bajo *P. laevigata* que en el interespacio, pero ellos no realizaron la identificación de los organismos.

El género *Acrobeles*, agrupa nematodos que poseen una estructura bucal característica llamada probolae o pseudolabio, que son extensiones parecidas a tentáculos que rodean la parte oral y les sirven para alimentarse de bacterias. Este género ha sido encontrado en suelo en todos los continentes excepto en la Antártida y es el género que se presentó tanto en el suelo bajo *P. laevigata* como en el interespacio junto con el género *Aphelenchoides* y *Monhystera*.

El género *Aphelenchoides* presenta un bulbo faríngeo tan ancho como la cavidad del cuerpo y poseen un estilete muy desarrollado para perforar los tejidos vegetales o hifas de los hongos. Su distribución es muy amplia, abarcando casi todos los continentes. Este género tiene importancia económica ya que varias especies de este género son fitopatógenas.

Por su parte, el género *Monhystera* son nematodos que presentan en la parte bucal setas o cerdas cefálicas que sirven como órganos sensoriales. Además, este género puede presentar estructuras mecanoreceptoras en forma circular, llamadas anfidios, en los costados de la parte cefálica. Estos organismos se han encontrado en suelos de altas montañas, especialmente cerca de ríos y lagos (Bastian, 1865).

Las redes tróficas que ocupan cada microambiente influyen en la riqueza de especies y en el ensamblaje de las comunidades microbianas. Encontramos que la mayoría de amebas, rotíferos y nematodos fue de hábitos alimenticios bacterívoros, sin embargo, se observan también muchos, depredadores de protozoos, de algas y de hongos. Esto se puede explicar porque los microorganismos explotan diferentes recursos (Barnes et al., 2009).



Las redes tróficas edáficas son complejas, presentan una gran riqueza de especies y su estructura es continuamente influenciada por los cambios en las condiciones biológicas, químicas y físicas (Avis et al., 2008).

De manera más general, se pudo observar una que existe una mayor cantidad de especies, géneros y familias en la mayoría de los grupos de microorganismos que se estudiaron (excepto en bacterias solubilizadoras de fósforo), en comparación con el interespacio, ya que se considera que las especies vegetales de desierto mejoran las condiciones del suelo, lo cual favorece el establecimiento de una mayor cantidad de especies de microorganismos (Fig 3).



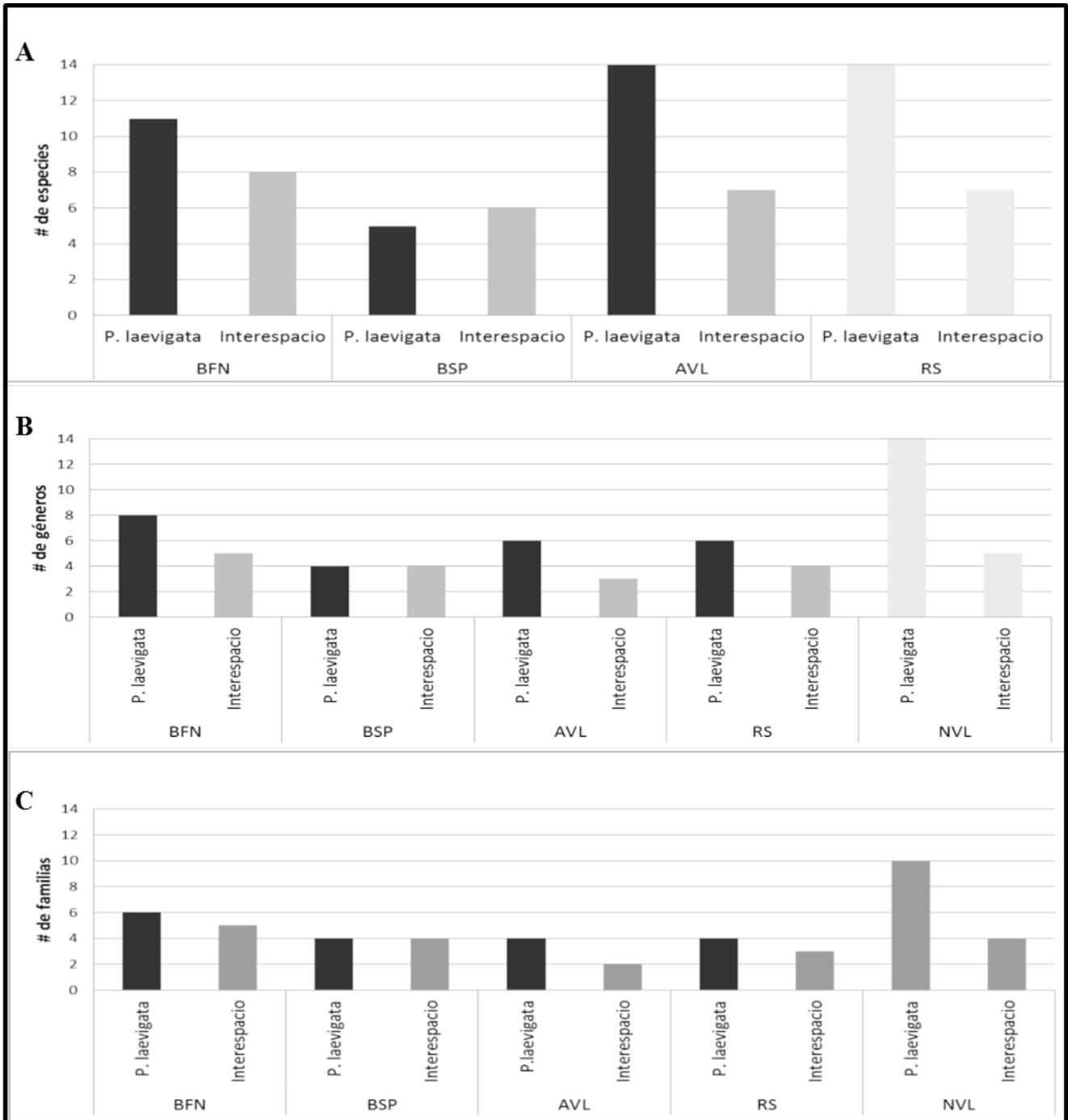


Figura 3. Variación en la riqueza de A) especies, B) géneros y C) familias de BFN, BSP, AVL, RS y NVL en el suelo bajo *P. laevigata* y en el interspacio.



Las temperaturas registradas tanto en el suelo bajo *P. laevigata* como en el interespacio no presentan diferencias significativas, siendo ligeramente superior en el interespacio (Tabla 6). Sin embargo, la humedad y la materia orgánica si son significativamente mayores en el suelo bajo *P. laevigata* (Tabla 6).

Tabla 6. Variación de las propiedades fisicoquímicas del suelo de *P. laevigata* y el interespacio

	Temperatura	Humedad	Materia orgánica
<i>Prosopis laevigata</i>	20.72 ± 1.89 ^a	7.83 ± 2.27 ^a	3.05 ± 0.75 ^a
Interspacio	20.83 ± 0.29 ^a	6.36 ± 2.28 ^b	1.66 ± 0.31 ^b

Los valores en la tabla indican la media ± la desviación estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre microambientes ($\alpha < 0.05$).

Los valores de humedad y la temperatura encontrados en los tres sitios se pueden explicar por la sombra que proporciona la cobertura vegetal, ya que el suelo cubierto por el dosel es menos susceptible a la desecación en comparación con el interespacio, pues éste último se encuentra muy expuesto a los rayos solares, lo que provoca mayor evaporación del agua en el terreno (Breshears et al., 1997; Pandey et al., 2010; Serrano-Vázquez et al., 2013). Sin embargo, nosotros no encontramos diferencias significativas en la temperatura de los dos microambientes pero si existe diferencia en la humedad. Estos datos concuerdan con Pen-Mouratov et al., en el 2008, donde la humedad del suelo fue significativamente diferente entre las plantas y el interespacio.

El porcentaje de materia orgánica que se registró puede ser explicado por el patrón de producción de hojas, el tipo de tronco, la influencia de las raíces y la actividad microbiana en *P. laevigata* ya que fue mayor que en el interespacio. Esto es importante ya que el porcentaje de materia orgánica encontrado en el interespacio es pobre, esto trae como consecuencia que los nutrientes sean limitados para la comunidad de microorganismos del suelo, por lo que se observó una menor cantidad de especies de microorganismos del suelo en la terraza aluvial degradada del valle de Tehuacán, Puebla. Éste resultado se complementa con el trabajo de Perroni-Ventura et al., en el 2006 y Serrano-Vázquez, 2013,



donde encontraron mayor cantidad de nutrientes del suelo en la zona cubierta por el dosel de *P. laevigata* en comparación con el interespacio.

En las zonas áridas, el principal recurso limitante es la humedad, de la que dependen los pulsos de actividad biológica, lo cual a su vez también tiene influencia sobre las variaciones fisicoquímicas del suelo (Whitford, 2002).

En este trabajo observamos que las comunidades microbianas (en base a su riqueza genérica) se correlacionaron positivamente con humedad y materia orgánica y negativamente con la temperatura (Tabla 7; $p < 0.05$).

Tabla 7. Análisis de Correlación de Pearson entre los parámetros fisicoquímicos del suelo y las comunidades microbianas del suelo bajo *P. laevigata* y el interespacio

	Temperatura	Humedad	Materia orgánica
Microorganismos	R= -0.402 P <0.000	R= 0.213 P<0.039	R=0.708 P< 0.000

Se sabe que todos aquellos factores en el suelo que significan tensión para los organismos, afectan la distribución de los mismos, entre ellos se encuentran la humedad, la temperatura, la materia orgánica y la disponibilidad de los recursos en el suelo, por lo que este estudio corrobora el efecto que tienen estos factores sobre las comunidades microbianas del suelo en el valle de Tehuacán (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Avis et al., 2008).

CONCLUSIONES

Se encontró que las comunidades microbianas del suelo bajo *P. laevigata* y del interespacio son diferentes y se observó mayor estructuración de las comunidades en el suelo bajo *P. laevigata*. Además, se encontraron especies de bacterias fijadoras de nitrógeno, de solubilizadoras de fósforo, de amebas, rotíferos y nematodos que sólo se encuentran, ya sea en el suelo bajo *P. laevigata* o sólo en el interespacio, lo que nos podría ayudar, en un momento dado a identificar especies clave en el funcionamiento del suelo de las zonas áridas. Se encontró también que las comunidades microbianas son influenciadas por los factores fisicoquímicos del suelo ya que la riqueza genérica de las comunidades

microbianas se correlaciona positivamente con la humedad y la materia orgánica. En general, el conocimiento generado de este estudio nos permite demostrar el efecto benéfico de *P. laevigata* sobre las redes tróficas del suelo en el desierto intertropical de Tehuacán, México. Además, hasta donde se sabe este es el primer estudio donde se muestra la composición de especies de rotíferos y nemátodos del suelo para esta región de la mixteca poblana.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por la formación recibida durante los estudios de Doctorado de Serrano-Vázquez, A. Al programa CONACyT-becas nacionales- CVU 169204 por los apoyos recibidos. Al Sr. René Pacheco, por las facilidades brindadas para el trabajo de campo en el área de estudio. Este proyecto estuvo financiado por los Proyectos de Investigación DGAPA-PAPIIT-IN217112 , PAPCA 2011-2012 y PAPCA 2012-2013.

REFERENCIAS

- Anderson, R.V.; Ingham, R.E.; Trofymow, J.A.; Coleman, D.C. 1984. Soil mesofaunal distribution in relation to habitat types in shortgrass prairie. *Pedobiol.* 26: 257-261.
- Atlas, R. 1995. *Principles of Microbiology*. 1ª Edition. Ed. Mosby-Year Book, Inc. EUA. pp. 887.
- Avis, T. J., V. Gravel, H. Antoun, and R. Tweddell. 2008. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biol. Biochem.* 40:1733Y1740.
- Bardgett R. D. 2005. *The biology of soil: A community and ecosystem approach*. Oxford University Press. USA. 242 p.
- Barnes, G., S. Rodríguez-Zaragoza, I. Shmueli, and Y. Steinberger. 2009. Vertical distribution of a soil microbial community as affected by plant ecophysiological adaptation in a desert system. *Microb. Ecol.* 57:36-49.
- Bartos, E., 1959: *Vířníci-Rotatoria. Fauna ĀSR, ĀSAV Prague*, 972 pp.



- Bastian, H. C. 1865. Monograph of the Anguillulidae, or free nematoids, marine, land, and freshwater; with descriptions of 100 new species the transactions of the Linnean Society of London. XXV: 73-183.
- Bissett, A., M. V. Brown, S. D. Siciliano and P. H. Thrall. 2013. Microbial community responses to anthropogenically induced environmental change: towards a systems approach. *Ecol. Letters*. 16:128-139.
- Bongers T. and Ferris H., 1999. Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. *TREE*. 14: 224-228.
- Badri DV, Loyola-Vargas VM, Broeckling CD, De-la-Peña C, Jasinski M, Santelia D, Martinoia E, Sumner LW, Banta LM, Stermitz F, Vivanco JM (2008) Altered Profile of Secondary Metabolites in the Root Exudates of Arabidopsis ATP-Binding Cassette Transporter Mutants. *Plant Physiol* 146:762–771.
- Braschi, I., C. Ciavatta, C. Giovanni, and C. Gessa. 2003. Combined effect of water and organic matter on phosphorus availability in calcareous soils. *Nutr. Cycl. Agroecosyst*. 67:67Y74.
- Breshears, D. D., P. M. Rich, F. J. Barnes, and K. Campbell. 1997. Overstory imposed heterogeneity in solar radiation and soil moisture in a semiarid woodland. *Ecol. Appl*. 7:1201-1215.
- Cajuste, L. J. 1986. El Fosforo Aprovechable en Los Suelos. Cuadernos de Edafologia. Vol. 6. Centro de Edafologia, Colegio de Postgraduados, Mexico.
- Chapin, F. S., P. A. Matson ND h. a. Money. 2002. Principles of terrestrial ecosystem ecology. Springer, New York.
- Darbyshire, J. F. 1994. Soil protozoa. Wallingford (U. K.). 209 p.
- Dávila, P. Arizmendi, M. Valiente-Banuet, A. Villaseñor, J.L. Casas, A. y Lira R; 2002. Biological diversity in Tehuacán-Cuicatlán Valley, México; Biodiversity and Conservation. 11: 421- 442.
- Devetter, M., 2010: A method for efficient extraction of rotifers (Rotifera) from soils. *Ped*. 53: 115–118.
- Donner, J. 1965. Ordnung Bdelloidea (Rotatoria). A-V, Berlin. 297 pp.



- Esteban, G. Clarke, K., Olmo, J. and Finlay, B. 2006. Soil Protozoa-An intensive study of population dynamics and community structure in an upland grassland. *Appl Soil Ecol.*33:137-151.
- Ferris H., R. C. Venette, H. R. van der Meulen and S. S. Lau. 1998. Nitrogen mineralization by bacteria-feeding nematodes: verification and measurement. *Plant and Soil.* 203:159-171.
- Fuentes-Dávila, G. and R. Ferrera-Cerrato (eds). *Ecología de la raíz.* Sociedad Mexicana de fitopatología. Ciudad Obregón, Sonora. p 27-46
- Fustec, J., F. Lesuffleur, S. Mahieu, and J-B. Cliquet. 2010. Nitrogen rhizodeposition of legumes. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 30:57-66.
- García-Sánchez, R., S. L. Camargo-Ricalde, E. García-Moya, M. Luna- Cavazos, A. Romero-Manzanares, and N. M. Montaña. 2012. *Prosopis laevigata* and *Mimosa biuncifera* (leguminosae), jointly influence plant diversity and soil fertility of a Mexican semiarid ecosystem. *Rev. Biol. Trop.* 60:87-103.
- Garbeva, P., van Veen, J. & van Elsas, J. 2004. Microbial diversity in soil: Selection of Microbial Populations by Plant and Soil Type and Implications for Disease Suppressiveness. *Ann Rev Phytopathol.* 42: 243-270.
- Godínez-Alvarez H, Morín C, Rivera-Aguilar V. 2012. Germination, survival and growth of three vascular plants on biological soil crusts from a Mexican tropical desert. *Plant Biol (Stuttg).* 14:157-62.
- González-Ruiz, T., S. Rodríguez-Zaragoza, R. Ferrera-Cerrato. 2008. Fertility islands around *Prosopis laevigata* and *Pachycereus hollianus* in the drylands of Zapotitlan Salinas, Mexico. *J. Arid Environ.* 72: 1202-1212.
- Hameeda, B., O. P. Rupelar, G. Reddy, K. Satyavani. 2006. Application of plant growth-promoting bacteria associated with compost and macrofauna for growth promotion of Pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.). *Biol. Fertil. Soils.* in press.
- Haukka, K., K. Lindström and J. P. W. Young. 1998. Three phylogenetic groups of nodA and nifH genes in Sinorhizobium and Mesorhizobium isolated from leguminous trees growing in África and Latin America. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 419-426.



- Jairajpuri S. and W. Ahmad. 1992. Dorylaimida: Free-living, predaceous and plant parasitic nematodes. E. J. Brill, India. 458 p.
- Kumar J., S. Surange and C. Shekhar C. 1999. Occurrence of pH and temperature-tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils. *Curr Microbiol.* 39:89-93.
- Li, C., Y. Li, and J. Ma. 2011. Spatial heterogeneity of soil chemical properties at fine scales induced by *Haloxylon ammodendron* (Chenopodiaceae) plants in a sandy desert. *Ecol. Res.* 26:385-394.
- Lloret, L. and E. Martínez-Romero. 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Rev. Lat. Microbiol.* 47: (1-2) 43.
- López, F., D. Muñoz-Iniestra, M. Hernández-Moreno, A. Soler- Aburto, M. C. Castillo-López, and I. Hernández-Arzate. 2003. Análisis integral de la toposecuencia y su influencia en la distribución de la vegetación y la degradación del suelo en la subcuenca de Zapotitlán Salinas, Puebla. *BSGM.* 56:19-41.
- Melone G. and C. Ricci. 1995. Rotatory apparatus in Bdelloids. *Hydrobiol.* 313/314: 91–98.
- Melone G., C. Ricci and H. Segers. 1998. The trophi of Bdelloidea (Rotifera): a comparative study across the class. *Can J Zool.* 76: 1755–1765.
- Michael 2011. Soil rotifer communities are extremely diverse globally but spatially autocorrelated locally. *Microbiol.* 108. 11:4406-4410.
- Montaña, N. M., R. García-Sánchez, G. Ochoa de la Rosa, and A. Monroy-Ata. 2006. Relación entre la vegetación arbustiva, el mezquite y el suelo de un ecosistema semiárido en México. *Terra Lat.* 24:193-205.
- Muñoz, D., A. Mendoza, F. López-Galindo, M. M. Hernández-Moreno, and A. Soler-Aburto. 2007. *Manual de Análisis de Suelos: México.* Universidad Nacional Autónoma de México, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, México.
- Nelson, D. W., and L. E. Sommers. 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. In: *Methods of Soil Analysis. Part 2.* Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA, Madison, WI, pp. 539-577.
- Olvera-Carrillo, Y., I. Mendez, M. E. Sanchez-Coronado, J. Marquez- Guzman, V. L. Barradas, P. Huante, and A. Orozco-Segovia. 2009. Effect of environmental



heterogeneity on field germination of *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae) seeds. *J. Arid Environ.* 73:414-420.

- Osorio, O., A. Valiente-Banuet, P. Dávila and R. Medina. 1996. Tipos de vegetación y diversidad beta en el Valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México. *BSBM.* 35-58.
- Page F. C. and F. J. Siemensma. 1991. *Nackte rhizopoda and Heliozea.* Gustav.Fisher Verlag and Stuttgart. New York. 297p.
- Pandey, V., and P. K. Pandey. 2010. Spatial and temporal variability of soil moisture. *Int. J. Geosci.* 1:87-98.
- Paul E, Clark F (1989) *Soil Microbiology and Biochemistry.* Ed Academic Press, INC San Diego, California 275p.
- Pavon, N., and O. Briones. 2001. Phenological patterns of nine perennial plants in an intertropical semi-arid Mexican scrub. *J. Arid Environ.* 49:265-277.
- Pen-Mouratov, S., S. Rodríguez-Zaragoza, and Y. Steinberger. 2008. The effect of *Cercidium praecox* and *Prosopis laevigata* on vertical distribution of soil free-living nematode communities in the Tehuacan Desert, Mexico. *Ecol. Res.* 23:973-982.
- Perroni-Ventura, Y., C. Montaña, and F. García-Oliva. 2006. Relationship between soil nutrient availability and plant species richness in a tropical semiarid environment. *J. Veg. Sci.* 17:719-728.
- Perroni-Ventura, Y., C. Montaña, and F. García-Oliva. 2010. Carbon-nitrogen interactions in fertility islands soil from a tropical semi-arid ecosystem. *Functional Ecol.* 24:233-242.
- Postgate, J. 1998. *Nitrogen fixation.* #rd Edition. Cambridge University pres-Cambridge U.K.
- Rivera-Aguilar, V., G. Montejano-Zurita, S. Rodríguez-Zaragoza and A. Durán-Díaz. 2006. Distribution and composition of cyanobacteria, mosses and lichens of the biological soil crusts of the Tehuacan valley, Puebla, México. *J. Arid Environ.* 67: 208-225.
- Rivera-Aguilar, V., H. Godínez-Álvarez, R. Moreno-Torres and S. Rodríguez-Zaragoza. 2009. Soil physicochemical properties affecting the



distribution of biological soil crusts along an environmental transect at Zapotitlan drylands, Mexico. *J. Arid Environ.* 73:1023-1028.

- Rodríguez-Zaragoza, S. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Crit. Rev. Microbiol.* 20: 225-241.
- Rodríguez-Zaragoza & González-Lozano, 2007. Response of the Amoebae Community to soil Conditions Transiting to Badlands Formation in Progress in *Environmental Research*, Irma C. Willis (Edit.). Nova Science Publishers, Inc. pp 203-230.
- Rodríguez-Zaragoza, S., T. González-Ruíz, E. González-Lozano, A. Lozada- Rojas, E. Mayzlish-Gati, and Y. Steinberger. 2008. Vertical distribution of microbial communities under the canopy of two legume bushes in the Tehuacan Desert, Mexico. *Eur. J. Soil Biol.* 44:373-380.
- Rzedowski, J; 1981; *Vegetación de México*; Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (I.P.N.); Limusa; 1° reimpresión; México; 430 pag.
- Schmid-Araya, J. M. 1998. Rotifers in interstitial sediments. *Hydrobiol.* 388:231-240.
- Shamir, I. and Y. Steinberger. 2007. Vertical distribution and activity of soil microbial population in a sandy desert ecosystem. *Microb. Ecol.* 53:340-347.
- Serrano-Vázquez A., S. Rodríguez-Zaragoza, H. Pérez-Juárez, J. Bazán-Cuenca, V. M. Rivera-Aguilar and A. Durán. 2013. Physical and chemical variations of the soil under two desert shrubs in Tehuacan, Mexico. *Soil Sci.* 178:87-103.
- Smith, J., J. Halvorson and H. Bolton. 2002. Soil properties and microbial activity across a 500 m elevation gradient in a semi-arid environment. *Soil Biol. Biochem.* 34: 1749-1757.
- Sylvain, Z. A., and D. H. Wall. 2011. Linking soil biodiversity and vegetation: Implications for a changing planet. *Am. J. Bot.* 98:517-527.
- Torri, D. and G. Rudolf. 2000. Badlands in changing environments: An introduction. *Catena* 40:119-125.
- Valiente-Banuet, A., A. Casas, A. Alcántara, P. Dávila, N. Flores-Hernández, J. L. Villaseñor, J. Ortega-Ramírez, and J. A. Soriano. 2000. La vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *BSBM.* 67:25-75.



- Velázquez, I., A. Porras, and L. Touron. 2008. Estrategia de desarrollo sustentable para generar alimento y empleo: El gusano cuchama en Zapotitlán Salinas, Puebla, México. *Argumentos (México)*. 56:119-135.
- Villaseñor, J., P. Dávila, and F. Chiang. 1990. Fitogeografía del valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 50:135-149.
- Walkley, A., and I. A. Black. 1934. An examination of the method for determining organic carbon in soils: Effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. *Soil Sci.* 63:251-263.
- Whitford, W. 2002. *Ecology of Desert Systems*. Academic Press, London, UK.
- <http://nematode.unl.edu/konzlistbutt.htm>.



CAPÍTULO VI:

RIQUEZA DE GENES

***nifH* DEL SUELO**



Debido a la gran importancia de la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) en las zonas con deficiencia de N biodisponible en el suelo, como es el caso de las zonas áridas, se requiere de una comprensión sobre la dinámica de las comunidades de diazótrofos de vida libre (DVL) del suelo para poder prever el impacto de los cambios ambientales sobre los servicios ecosistémicos que estos microorganismos proporcionan. Es por ello que nuestro estudio se basó en determinar la variación espacial y temporal de la riqueza de genes *nifH* por PCR-DGGE, de la zona de raíces de *Prosopis laevigata*, *Parkinsonia praecox* y del suelo sin cobertura vegetal (interespacio), a lo largo de un gradiente de profundidad de 0-50 cm, durante un periodo de sequía y uno de humedad en el desierto semiárido de Tehuacán, Puebla, México. El análisis del gen *nifH* reveló que la riqueza de DVL varía temporal y espacialmente, encontrando mayor riqueza durante el periodo de lluvia y en los primeros diez cm de profundidad y que algunos parámetros edáficos tienen efecto diferencial sobre la distribución de DVL. También se demuestra que *P. laevigata* permite el establecimiento de una mayor riqueza de DVL en su zona de raíces, seguido por el interespacio y finalmente por *P. praecox*. Esto nos permite hablar de un efecto específico de los diferentes arbustos de esta zona árida sobre las comunidades de DVL. También encontramos especies de DVL que soportan las variaciones temporales y espaciales de la zona, ya que se encuentran presentes en los tres microambientes en casi todas las profundidades, durante la lluvia y la sequía, por lo que es necesario enfocar esfuerzos en determinar cuáles especies son las más importantes en la entrada de N biodisponible, así como para tener un manejo adecuado de los servicios ecosistémicos que estos microorganismos proveen en las zonas áridas.

Palabras clave: Nitrogenasa, gen *nifH*, zonas áridas, propiedades fisicoquímicas, PCR-DGGE.

“VARIACIÓN DE LA COMUNIDAD DE DIAZÓTROFOS EN EL DESIERTO DE TEHUACAN, MÉXICO”

INTRODUCCION

La fijación biológica del nitrógeno (FBN) se lleva a cabo exclusivamente por microorganismos procariontes llamados diazótrofos y consiste en la reducción del nitrógeno atmosférico (N_2) a una forma biológicamente disponible, por medio de una reacción catalizada por la enzima Nitrogenasa (Postgate, 1998; Zehr et al., 2003). La Nitrogenasa es un complejo proteico compuesto por dos subunidades, la subunidad I, que está formada por la Dinitrogenasa $\alpha_2\beta_2$ (donde α = proteína NifD; β =proteína NifK) y la subunidad II, que es la Nitrogenasa reductasa (proteína NifH), la cual está codificada por el gen *nifH* (Herman et al., 1993; Zehr et al., 2003; Hernández et al., 2009).

El gen *nifH* es el principal marcador molecular que se utiliza para identificar los diazótrofos del suelo, ya que es un gen que se encuentra altamente conservado (Noda et al., 1999; Widmer et al., 1999; Poly et al., 2001; Pereira et al., 2011). Los trabajos basados en el estudio del gen *nifH*, demuestran que los diazótrofos de vida libre (DVL) están presentes en diversos ambientes, desde suelos forestales y océanos, hasta zonas polares, donde se describe un gran número de secuencias que corresponden a organismos no identificados aún (Ueda et al., 1995; Olson et al., 1998; Zehr et al., 1998; Widmer et al., 1999; Poly et al., 2001; Izquierdo and Nüsslein, 2006; Duc et al., 2009; Pereira et al., 2011; Franco et al., 2012; Pereira et al., 2013).

A pesar de que la mayoría de la FBN se lleva a cabo por diazótrofos que viven en asociación con las plantas (endosimbiontes), se ha demostrado que los DVL contribuyen de manera importante en la entrada de N a las redes tróficas del suelo en varios ecosistemas, alcanzando hasta $60 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ de N fijado (Atlas, 1995; Zehr et al., 2003).

La FBN por DVL es muy importante en los ecosistemas terrestres donde el N es un recurso limitante, como es el caso de las zonas áridas, ya que introduce el N reducido a las redes tróficas, lo que estimula la productividad primaria (Atlas, 1995; Tiwari et al., 2003). Sin embargo la FBN es un proceso energéticamente muy costoso, ya que se ha reportado que se utilizan 16 ATP y ocho electrones por cada molécula reducida, por lo que los DVL solo



llevan a cabo la FBN cuando es estrictamente necesario (Herman et al., 1993; Rudnick et al., 1997; Postgate, 1998; Poly et al., 2001).

La FBN está regulada por diversos factores ambientales, como la humedad, el oxígeno, el pH, la materia orgánica, la disponibilidad de nitrógeno y fósforo y la textura del suelo (Withford, 2000; Belnap, 2001; Poly et al., 2001; Pereira et al., 2011). La FBN así como la estructura de las comunidades de DVL, también se puede ver afectada por las plantas, ya que se ha demostrado que estas últimas pueden seleccionar las diferentes comunidades de DVL que habitan en su zona de raíces (Piceno and Lovell, 2000^a; Piceno and Lovell, 2000^b; Shrimant, 2012). Además, las variaciones temporales, afectan también la estructura de las comunidades de DVL (Shaffer et al., 2000; Yeager et al., 2012).

En México, las zonas áridas cubren más del 40 % de su territorio, donde los principales factores limitantes en el suelo son el agua y el nitrógeno (Xie and Steinberger, 2002; Pavón et al., 2005; Perroni-Ventura et al., 2006; Verbist et al., 2010). A pesar de ello, son escasos los trabajos referentes a la respuesta que tienen las comunidades de DVL ante los cambios espaciales y temporales de las condiciones ambientales de estas regiones (Yeager et al., 2012). En el desierto de Tehuacán, México, sólo existe un trabajo donde se muestra, por el análisis de reducción de acetileno (ARA), la presencia de DVL cultivables (González et al., 2008). Sin embargo, aún no se conoce la dinámica de las comunidades de DVL que incluyan, además, a los organismos no cultivables dentro de la reserva. Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar la variación espacial y temporal de la riqueza de genes *nifH*, utilizando electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE), de la zona de raíces de *Prosopis laevigata*, *Parkinsonia praecox* y del suelo sin cobertura vegetal (interespacio), a lo largo de un gradiente de profundidad de 0-50 cm, durante un periodo de sequía y uno de humedad en el desierto semiárido de Tehuacán, Puebla, México. Debido a que se sabe que en dentro del valle, estos arbustos generan mejores condiciones microambientes en el suelo de su zona de raíces (Perroni-Ventura, et al., 2006; González et al., 2008; Perroni-Ventura et al., 2010; Serrano-Vázquez, et al., 2013), la hipótesis que se pretende probar es que estas plantas favorecen, espacial y temporalmente, el establecimiento de las comunidades de DVL en comparación con la zona de interespacio.



MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio

El desierto de Tehuacán se sitúa en el centro-sur de la República Mexicana y abarca la parte sudeste del estado de Puebla, ubicado entre los 17°30' y los 18°53' N y los 96°55' y 97°44' O (Villaseñor et al., 1990). El valle de Tehuacán tiene una extensión de 10,000 km² (Dávila et al., 2002). En la parte noroccidental de este desierto se encuentra el valle de Zapotitlán Salinas (Osorio et al., 1996), que tiene una superficie aproximada de 417 km² y se ubica entre los 18°24' y 18°12' N y entre los 97°24' y 97°36' O (López et al., 2003).

El clima de Zapotitlán, está determinado por el efecto orográfico que ejerce la Sierra Madre Oriental, donde las altas serranías actúan como barrera impidiendo el paso a las corrientes húmedas. Por otra parte, la posición latitudinal sureña, determina en gran medida su régimen térmico cálido que lo diferencia de los desiertos del norte. Las lluvias en Zapotitlán son escasas, aleatorias y frecuentemente de carácter torrencial, a veces ocasionadas por las tormentas tropicales o huracanes que se presentan de septiembre a noviembre en las costas del Golfo y del Pacífico mexicano (Villaseñor et al., 1990).

La clasificación del clima del valle de Zapotitlán de acuerdo al sistema de Köppen modificado por García, 1973, corresponde a un clima seco semicálido, con lluvias en verano (BSoHw), con poca oscilación térmica entre los 5° C y 7° C y la temperatura anual es de 21 °C. El mes más caliente se presenta antes del solsticio de verano; el régimen de lluvias ocurre en el verano, hay presencia de una sequía interestival (canícula) en la mitad del periodo de lluvias, con una precipitación media anual que oscila entre 400 y 450 mm (López et al., 2003).

Sobre los márgenes del río Zapotitlán se encuentra un sistema de terrazas aluviales que presentan una superficie relativamente plana con suelos profundos (López et al., 2003).

Las terrazas aluviales, por su posición fisiográfica y su composición, se consideran como un sistema frágil y susceptible al deterioro. Estas terrazas ocupan una superficie aproximada de 3500 ha de las cuales aproximadamente 700 ha presentan una degradación extrema. Esta zona degradada se considera desde el punto de vista geomorfológico como tierras malas, con pérdida casi total de la vegetación (López et al en Arizmendi et al., 2007). Es en esta terraza degradada donde se realizó el presente estudio y se encuentra hacia la porción oriental del valle, sobre los márgenes del Río Zapotitlán. Aproximadamente el 25 % de la terraza presenta un relieve plano irregular muy



fragmentado constituido por un conjunto de formaciones (islotos) separados unos de otros por barrancos. Estos islotos presentan toda una gama de condiciones en cuanto a la vegetación se refiere, quedando parches con vegetación más o menos conservados, otros más perturbados y otros sin vegetación (Osorio-Beristain et al., 1996; López et al. en Arizmendi et al., 2007).

Obtención de muestras del suelo

Las muestras se obtuvieron del suelo bajo *Prosopis laevigata*, *Parkinsonia praecox* y en suelo sin cobertura vegetal (interspacio) durante un periodo de sequía y uno de humedad en la terraza aluvial degradada del valle de Zapotitlán Salinas, Puebla (Figura 1). Las muestras del suelo se colectaron cada 10 cm, en un gradiente de profundidad de 0 a 50 cm, con cuatro repeticiones por microambiente, se guardaron en bolsas ziploc, se rotularon y se transportaron al laboratorio de Microbiología de la FES-Iztacala en una hielera. Una vez en el laboratorio los suelos se tamizaron (con malla de 2 mm) y se guardaron a 4°C.

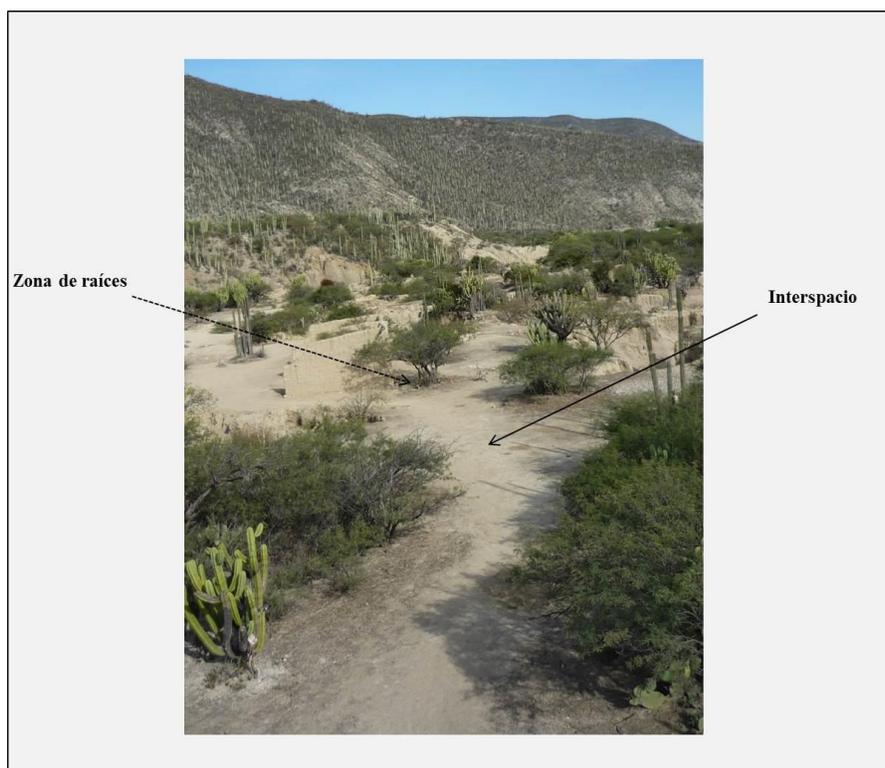


Figura 1. Terraza aluvial degradada donde se muestra los criterios que fueron tomados como interspacio y zona de raíces (suelo bajo el dosel de *P. laevigata* y *P. praecox*) para la obtención de las muestras de suelo.

Extracción de DNA total del suelo

El DNA total se extrajo a partir de 0.25 g de las muestras del suelo utilizando el PowerLyzer™ Power Soil® DNA Isolation Kit Sample (MoBio), siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del DNA fue observada por electroforesis en geles de agarosa al 1% (110 V durante 30 min), teñido con GelRed y se tomaron las imágenes correspondientes con un fotodocumentador de imágenes (software ID KODAK 3.5). Tanto la pureza como la concentración de DNA se obtuvo utilizando un NanoDrop© como lector a partir de 2µl de DNA extraído de cada muestra.

Amplificación por PCR anidado del gen *nifH*

Cada reacción consistió de 1µl de cada cebador FPGH19 (5'-TACGGCAARGGTGGNATHG-3' Simonet et al., 1991) y PolR (5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3'; Poly et al., 1991^b), 50ng de DNA templado, y perlas de reacción para PCR puRe Taq™ Ready-To-Go™. Cada reacción se llevó a un volumen final de 25 µl con Agua milli Q estéril. El programa utilizado para la primer PCR consistió en una desnaturalización inicial de 94° C durante 2 min por un ciclo; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min y 72 °C 2 min durante 30 ciclos; un ciclo final de 72 °C 5 min y se mantuvo a 4°C. Posteriormente se tomaron 2 µl de los productos de la primer PCR y se utilizaron como templado para la segunda reacción. Se utilizaron los cebadores PolF (5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3'; Pereira et al., 2011), con una secuencia ancladora de GC y AQER (5'-GACGATGTAGATYTCCTG-3'; Pereira et al., 2011). El cebador con secuencia ancladora se sometió a un shock térmico previo a la reacción para evitar estructuras secundarias. El programa utilizado para la segunda PCR consistió en una desnaturalización inicial de 94° C durante 2 min por un ciclo; 94 °C 1 min, 57 °C 1 min y 72 °C 2 min durante 30 ciclos; un ciclo final de 72 °C 5 min y se mantuvo a 4°C.

Se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1 % (110 V durante 30 min), para verificar la presencia de una sola banda y el tamaño de los productos amplificados (aproximadamente 360 pb), se tiñeron con GelRed y se tomaron las imágenes correspondientes con un fotodocumentador de imágenes (software ID KODAK 3.5).

Separación de bandas por DGGE para la detección del gen *nifH*

Las diferentes secuencias del gen *nifH* fueron separadas por DGGE a partir de 250 ng de cada producto de la segunda PCR con un volumen igual de 2 X gel loading dye (Biorad).



La separación se realizó en geles de poliacrilamida de 1mm de espesor, 21.5 cm de alto y 25 cm de ancho en buffer TAE al 0.5 X con un gradiente de desnaturalización de 26% a 58% de urea/formamida donde el 100 % contiene 7M urea y 40% (v/v) de formamida deionizada (Kit para DGGE DCode Electrophoresis Reagent Kit for DGGE, Biorad). Se utilizó GelBond®Film para permitir la manipulación de los geles. La electroforesis se realizó en un Ettan™ DALTsix Electrophoresis System GE Healthcare, con un voltaje constante de 220 y una temperatura de 40 °C durante 6 h.

Los geles fueron teñidos con nitrato de plata y los perfiles fueron observados con transiluminador de luz blanca y posteriormente se tomaron las imágenes con un fotodocumentador ID KODAK 3.5.

Análisis del perfil de DGGE

Se contaron las bandas de cada microambiente por profundidad y por temporada húmeda o seca para determinar la riqueza de genes *nifH*. La similitud entre los patrones de bandas de los diferentes microambientes fue calculada con base en la presencia y ausencia de bandas, expresadas en coeficiente de similitud y representadas en análisis de conglomerados, con el Software MINITAB® 16 (Minitab, Inc., State College, PA, USA).

Además, se realizó una correlación de Pearson con parámetros físicos y químicos del suelo reportados por Serrano-Vázquez et al., 2013, utilizando el Software MINITAB® 16 (Minitab, Inc., State College, PA, USA).

Parámetros fisicoquímicos

Los datos de los parámetros fisicoquímicos se obtuvieron de dos muestreos del trabajo publicado por Serrano-Vázquez et al., 2013 seleccionando los periodos de canícula: sequía (Tabla 1) y lluvias finales: humedad (Tabla 2) como contrastantes, en base a la diferencia en la humedad del suelo.

Tabla 1. Datos de los parámetros fisicoquímicos de la zona de raíces de *P. laevigata*, *P. praecox* y el interespacio a lo largo de un gradiente de profundidad durante un periodo de sequía (tomados de Serrano-Vázquez et al., 2013).

Microambiente	Profundidad (cm)	T (°C)	H (%)	CRA (mL g ⁻¹)	CE (millimhos cm ⁻¹)	pH	A (%)	L (%)	Ar (%)	MO (%)	OP (mg kg ⁻¹)
<i>P. laevigata</i>	0-10	28.44	7.22	0.62	1.15	7.92	34.9	40	24.6	3.87	6.76
	10-20	27.06	6.8	0.58	1.88	7.91	32.3	40.6	27.1	2.47	5.31
	20-30	ND	8.57	0.5	1.9	7.97	33.2	34.6	32.2	2.3	5.64
	30-40	ND	8.96	0.58	2.2	7.85	27.7	33.9	38.4	2.29	4.69
	40-50	ND	10.06	0.56	2.23	7.98	27.1	33.7	39.2	2.15	4.41
<i>P. praecox</i>	0-10	24.31	2.3	0.61	0.75	7.94	37.1	42.5	20.4	2.74	6.16
	10-20	21.38	4.01	0.52	2.3	7.87	33.1	44.5	22.4	2.78	4.36
	20-30	ND	4.94	0.52	2.08	7.85	31.2	44.4	24.4	2.31	3.84
	30-40	ND	8.47	0.47	2.38	7.82	29	47.6	23.4	1.91	3.83
	40-50	ND	8.05	0.52	2.68	7.93	34.4	44.3	21.3	1.56	3.74
Interespacio	0-10	29.75	1.43	0.47	1.13	7.96	34.6	42.4	23	1.87	3.81
	10-20	29.63	2.2	0.45	1.5	7.89	33.1	31	24.6	1.78	3.83
	20-30	ND	3.51	0.47	1.71	7.76	32.6	37.2	30.2	1.91	3.83
	30-40	ND	8.61	0.5	1.75	7.83	24.7	40.2	35.1	2.24	4.36
	40-50	ND	6.72	0.52	1.85	7.73	25.3	36.6	38.1	1.87	4.18

T: temperatura, H: humedad, CRA: capacidad de retención de agua, CE: conductividad eléctrica, A: arenas, L: limos, Ar: arcillas, MO: materia orgánica, OP: ortofosfatos, ND: no determinado.

Tabla 2. Datos de los parámetros fisicoquímicos de la zona de raíces de *P. laevigata*, *P. praecox* y el interespacio a lo largo de un gradiente de profundidad durante un periodo de humedad (tomados de Serrano Vázquez et al., 2013).

Microambiente	Profundidad (cm)	T (°C)	H (%)	CRA (mL g ⁻¹)	CE (millimhos cm ⁻¹)	pH	A (%)	L (%)	Ar (%)	MO (%)	OP (mg kg ⁻¹)
<i>P. laevigata</i>	0-10	28.44	8.3	0.66	0.34	7.89	40.9	37.1	22	4.43	4.62
	10-20	27.06	11.8	0.58	1	8.08	33.7	37	29.3	2.57	3.98
	20-30	ND	11.61	0.57	1.65	7.84	33	36.3	30.7	2.14	3.73
	30-40	ND	11.08	0.56	1.98	7.99	37	33.5	29.5	2.07	4
	40-50	ND	10.07	0.52	1.75	7.95	32.1	38.6	29.3	2.02	4.2
<i>P. praecox</i>	0-10	20.38	9.66	0.6	0.4	7.91	41.8	36.6	21.6	3.85	5.96
	10-20	20.63	11.11	0.58	0.75	7.82	35.4	41.1	23.5	2.98	4.45
	20-30	ND	10	0.55	0.77	7.76	32.8	40.1	27.1	2.13	3.67
	30-40	ND	11.94	0.55	1.11	8.14	26.9	38.1	35	2.27	4.18
	40-50	ND	15.72	0.57	2.18	7.78	26.7	31.8	41.5	2.37	4.77
Interespacio	0-10	27.5	6.61	0.53	1.15	7.77	31.3	44.3	24.4	2.16	3.76
	10-20	26.31	8.24	0.45	3.88	7.54	28.2	39.8	32	1.94	4.13
	20-30	ND	7.61	0.48	3	7.62	33.4	35.7	30.9	2.14	4.1
	30-40	ND	10.65	0.54	3.2	7.69	30.7	39.9	29.4	2.2	3.98
	40-50	ND	9.88	0.56	2.13	7.74	33.8	37.8	28.4	1.98	4.31

T: temperatura, H: humedad, CRA: capacidad de retención de agua, CE: conductividad eléctrica, A: arenas, L: limos, Ar: arcillas, MO: materia orgánica, OP: ortofosfatos, ND: no determinado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las comunidades de DVL son componentes fundamentales en los ecosistemas áridos, ya que tienen una función clave en la entrada del N en el suelo (Atlas y Bartha, 1998; Zehr et al., 1998; Belnap, 2001). Es por esto que se requiere de la comprensión de la dinámica de estas comunidades para poder prever el impacto de los cambios ambientales sobre los servicios ecosistémicos que estos microorganismos proporcionan (George et al., 1992; Peoples and Crasswell, 1992; Yeager et al., 2012; Pereira et al., 2013).

En este estudio, el análisis del gen *nifH* por medio de PCR-DGGE reveló que las comunidades de DVL presentaron diferencias entre los diferentes microambientes tanto espacial como temporalmente (Fig. 2).

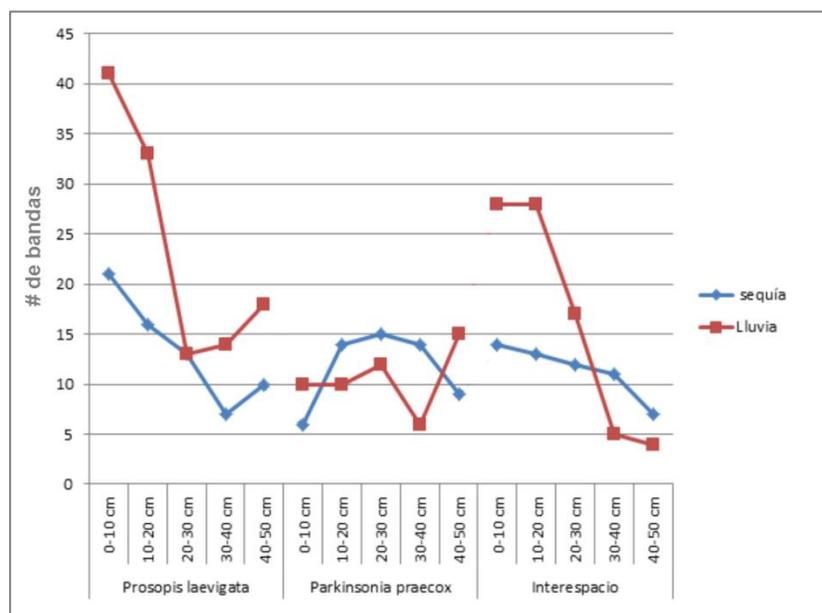


Figura 2. Variación de la riqueza de genes *nifH* en base al perfil de bandeos por PCR-DGGE de las muestras de suelo de *P. laevigata*, *P. praecox* y el interespacio en el gradiente de profundidad de 0-50 cm durante un periodo de sequía y uno de lluvia.

Diferentes autores en otras regiones también han encontrado que la estructura de estas comunidades se ve afectada espacial y temporalmente por las condiciones ambientales, lo cual coincide con los datos obtenidos en la presente investigación (Shaffer et al., 2000; Poly et al., 2001; Orr et al., 2012; Pereira et al., 2011; Yeager et al., 2012). Además, se encontró una mayor riqueza en el suelo de la zona de raíces de *P. laevigata* durante la temporada húmeda, seguida del interespacio en la misma época (Fig. 2).

También se observó que en estos dos microambientes la riqueza disminuyó durante el periodo de sequía así como con el aumento de la profundidad, encontrándose la mayor riqueza en los primeros 10 cm del suelo. Sin embargo, en el suelo de la zona de raíces de *P. praecox*, la comunidad de DVL presenta menor variación entre las estaciones y siguiendo un patrón irregular con respecto a las profundidades a diferencia de los otros dos microambientes (Fig. 2).

Se sabe que algunas plantas proveen de condiciones favorables para el establecimiento de una mayor riqueza de DVL en su zona de raíces, (Piceno and Lovell, 2000^a; Shrimant, 2012; Ravikumar et al., 2012). Este conocimiento es consistente con nuestros resultados, donde se muestra una mayor riqueza de genes *nifH* en el suelo bajo *P. laevigata*. Pero, aparentemente, *P. praecox* no está permitiendo el establecimiento de algunas especies de DVL que podrían ser importantes en su zona de raíces, lo cual podría explicar la diferencia en las abundancias de ambas especies vegetales, en una misma terraza (Serrano-Vázquez et al., 2013).

Los datos muestran también, que cuatro diferentes DVL, están presentes en el suelo de la zona de raíces de *P. laevigata*, *P. praecox* y en el interespacio en todas la profundidades (Tabla 3 y 4).

Tabla 3. Presencia/ausencia de bandas correspondientes a diferentes *nifH* del suelo de la zona de raíces de *P. laevigata*, *P. praecox* y el interespacio a lo largo de un gradiente de profundidad durante un periodo de sequía.

Banda	<i>P. laevigata</i>					<i>P. praecox</i>					Interspacio				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
II	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
III	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1
IV	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0
V	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
VI	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
VII	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
VIII	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0
IX	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
X	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
XI	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
XII	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0
XIII	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
XIV	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
XV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0



XVI	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
XVII	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
XVIII	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
XIX	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XX	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XXI	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XXII	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XXIII	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
XXIV	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
XXV	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
XXVI	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
XXVII	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0
XXVIII	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0

Profundidades: A) 0-10 cm, B) 10-20 cm, C) 20-30, D) 30-40 cm y E) 40-50 cm. 1: presencia, 0: ausencia. El color amarillo indica que las bandas están presentes en los tres microambientes en todas las profundidades. El color verde indica que las bandas sólo están presentes en uno de los tres microambientes.

También se encontró que hay DVL exclusivos de determinado microambiente, ya que sólo se encuentran en uno de ellos durante las dos estaciones, principalmente en *P. laevigata* durante la lluvia, seguido del interespacio en la sequía (Tabla 3 y 4). En *P. praecox* sólo se presenta un organismo exclusivo de ese microambiente durante el periodo de sequía de 10 a 30 cm de profundidad (Tabla 3). Esto puede indicar que las plantas seleccionan las especies de DVL que se encuentran en su zona de raíces (Bardgett et al., 1999; Piceno and Lovell, 2000^a; Piceno and Lovell, 2000^b; Tiwari et al., 2003).

En el trabajo realizado por González-Ruíz et al., 2008, se determinó la dinámica poblacional de los DVL de la zona de raíces de *P. laevigata*, *Pachycerus hollianus* y suelo libre de vegetación en dos terrazas aluviales de Zapotitlán, Puebla. En este trabajo se aislaron bacterias en medio de cultivo libre de nitrógeno reducido y se les determinó su capacidad para reducir acetileno. En total se aislaron 18 cepas bacterianas, sin embargo, solo se logró amplificar un fragmento del gene *nifH* de *Microbacterium*. Este resultado es contrastante con los datos obtenidos en el presente estudio basado en el análisis del gen *nifH* a partir de DNA total del suelo ya que podemos observar una gran diferencia en la riqueza de DVL, llegando a obtener más de 40 bandas diferentes en el suelo bajo *P. laevigata* durante la lluvia (Tabla 3 y 4). Pero con otros estudios donde utilizaron los

mismos métodos moleculares que en el que nosotros presentamos, los datos son concordantes (Ueda et al., 1995; Zehr et al., 1998; Poly et al., 2001; Pereira et al., 2011).

Tabla 4. Presencia/ausencia de bandas correspondientes a diferentes *nifH* del suelo de la zona de raíces de *P. laevigata*, *P. praecox* y el interespacio a lo largo de un gradiente de profundidad durante un periodo de lluvia.

Banda	<i>P. laevigata</i>					<i>P. praecox</i>					Interspacio				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
III	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
IV	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
V	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
VI	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
VII	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1
VIII	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
IX	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
X	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0
XI	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0
XII	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
XIII	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
XIV	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
XV	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
XVI	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
XVII	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
XVIII	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0
XIX	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0
XX	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
XXI	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
XXII	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
XXIII	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
XXIV	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0
XXV	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0



XXVI	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
XXVII	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0
XXVIII	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0
XXIX	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
XXX	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
XXXI	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
XXXII	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XXXIII	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XXXIV	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XXXV	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XXXVI	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XXXVII	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XXXVIII	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XXXIX	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XL	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XLI	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XLII	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XLIII	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Profundidades: A) 0-10 cm, B) 10-20 cm, C) 20-30, D) 30-40 cm y E) 40-50 cm. 1: presencia, 0: ausencia. El color amarillo indica que las bandas están presentes en los tres microambientes en todas las profundidades. El color verde indica que las bandas sólo están presentes en uno de los tres microambientes.

El análisis de agrupación de las comunidades de DVL de los tres microambientes reveló que su estructura es dinámica a través del espacio y del tiempo debido a que los patrones de precipitación afectan la distribución de las comunidades de DVL a lo largo del gradiente de profundidad (Fig. 3 y 4) y estos resultados son consistentes con los publicados por varios autores (González et al., 2008; Pereira et al., 2011; Yeager et al., 2012).

Las comunidades de DVL de los mismos microambientes, por lo general, muestran mayor similitud durante la sequía, principalmente en *P. laevigata* (Fig. 3).

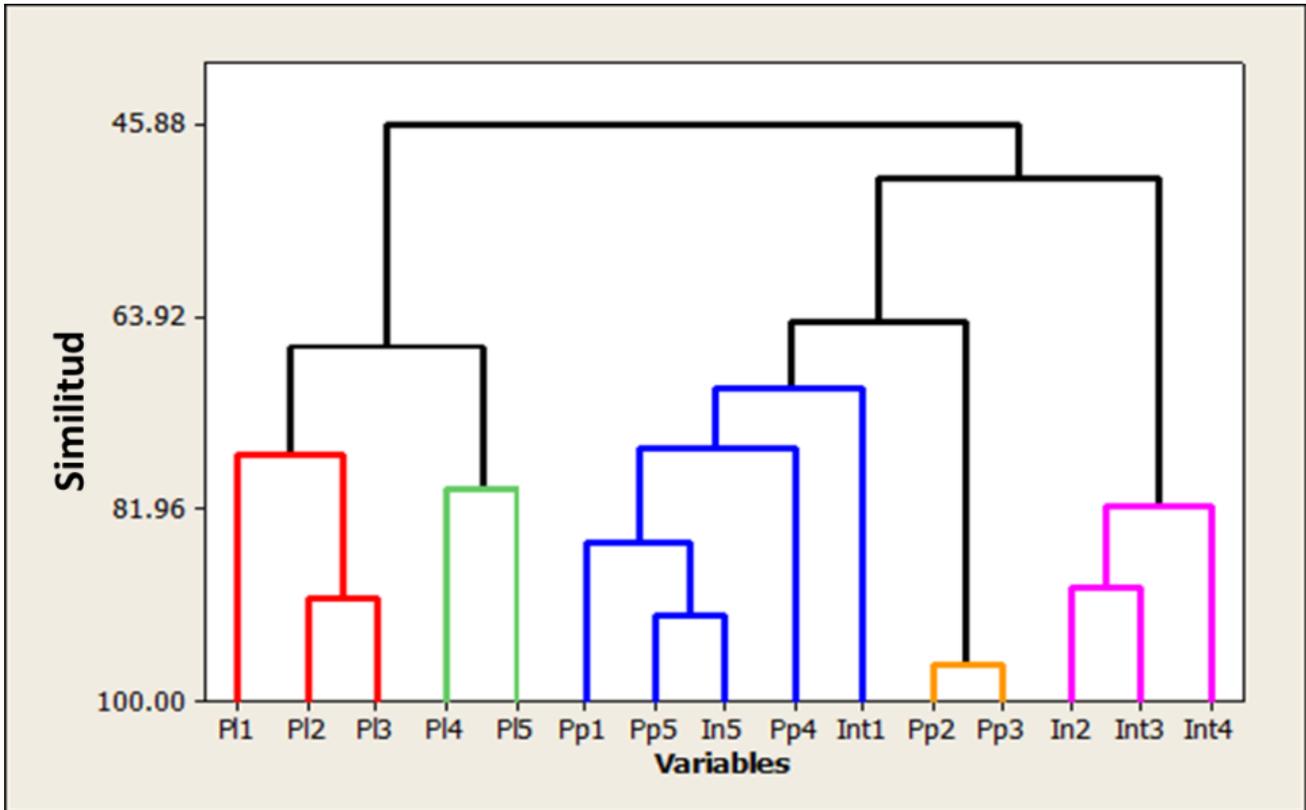


Figura 3. Dendrograma de los microambientes en las diferentes profundidades durante un periodo de ausencia de lluvias por el índice de similitud de Sørensen basado en la presencia/ausencia de bandas diferentes del gen *nifH* en el perfil de DGGE. Microambientes: Pl) *P. laevigata*, Pp) *P. praecox*, In) Interespacio; Profundidades: 1) 0-10 cm, 2) 10-20 cm, 3) 20-30 cm, 4) 30-40 cm y 5) 40-50 cm.

También se encontró que hay comunidades de los tres microambientes que se agrupan y se observa que en *P. praecox* y el interespacio durante las lluvias en la profundidad de 30-40 cm las comunidades son idénticas (Fig. 4).

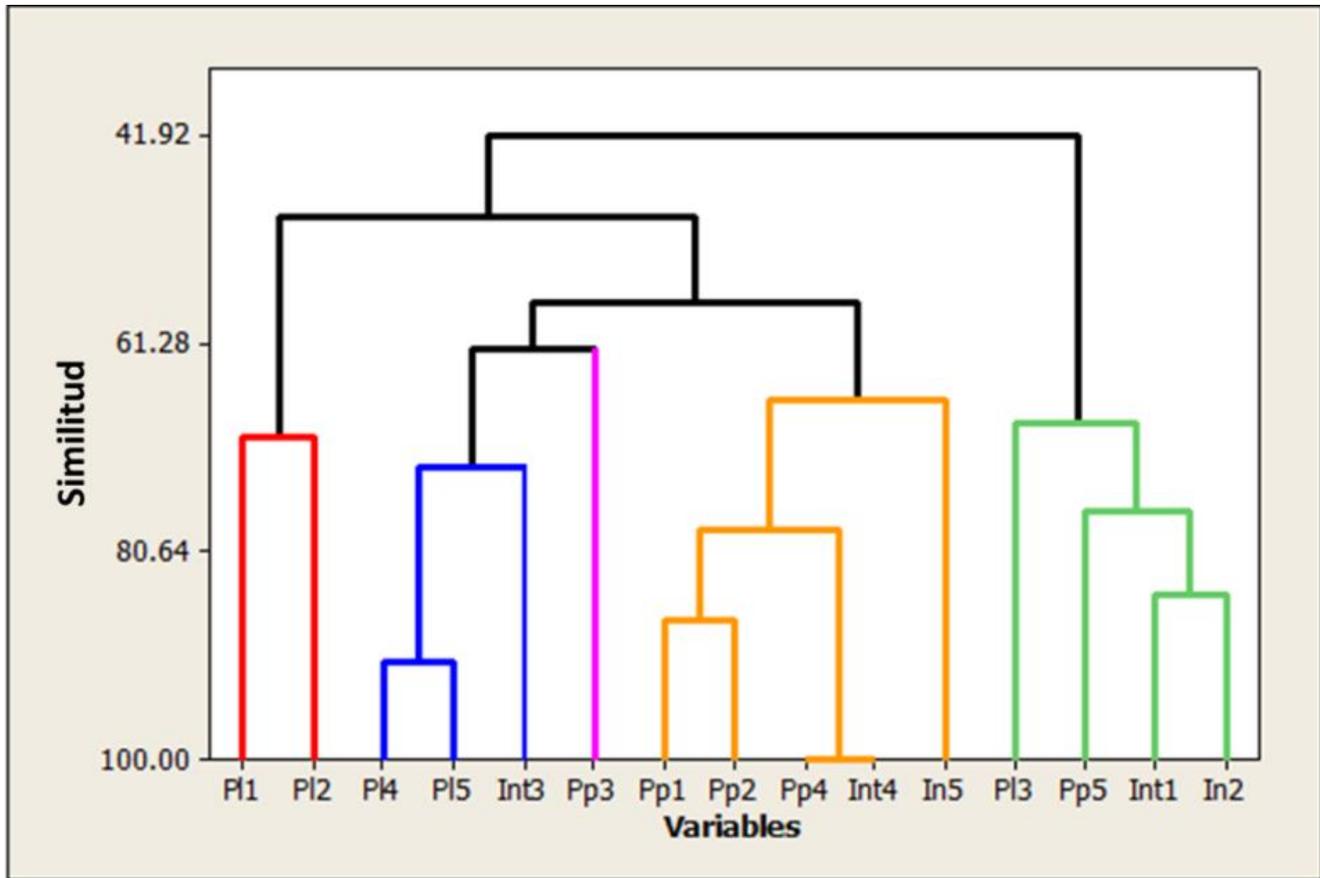


Figura 4. Dendrograma de los microambientes en las diferentes profundidades durante un periodo de lluvia por el índice de similitud de Sørensen basado en la presencia/ausencia de bandas diferentes del gen *nifH* en el perfil de DGGE. Microambientes: PI) *P. laevigata*, Pp) *P. praecox*, In) Interespacio; Profundidades: 1) 0-10 cm, 2) 10-20 cm, 3) 20-30 cm, 4) 30-40 cm y 5) 40-50 cm.

El análisis de correlación (Tabla 5) muestra que durante la sequía, la riqueza de genes *nifH* del suelo de *P. laevigata* tiene correlación negativa con conductividad eléctrica y las arcillas, pero se correlaciona positivamente con las arenas y los ortofosfatos ($p \leq 0.05$).

Por su parte, en *P. praecox*, se observa correlación negativa con el pH, las arenas y los ortofosfatos y se correlaciona positivamente con las arcillas ($p \leq 0.05$). El interespacio se correlacionó negativamente con la capacidad de retención de agua y con las arcillas y no mostró correlaciones positivas estadísticamente significativas con ningún parámetro ($p \leq 0.05$).

Tabla 5. Análisis de correlación por el coeficiente de Pearson entre la riqueza de genes *nifH* y los parámetros fisicoquímicos de los tres microambientes del suelo.

Propiedades fisicoquímicas	Riqueza del gen <i>nifH</i>						
		Sequía			Lluvia		
		Pl	Pp	In	Pl	Pp	In
Humedad	R	-0.782	0.495	-0.715	-0.571	0.494	-0.854
	P	0.118	0.318	0.175	0.315	0.398	0.065
Capacidad de retención de agua	R	0.426	-0.855	-0.880	0.791	0.143	-0.675
	P	0.475	0.318	0.049	0.111	0.818	0.211
Conductividad eléctrica	R	-0.933	0.737	-0.801	-0.965	0.542	-0.046
	P	0.021	0.094	0.103	0.008	0.345	0.942
pH	R	0.175	-0.920	0.819	0.207	-0.875	-0.339
	P	0.778	0.008	0.090	0.738	0.052	0.577
Arenas	R	0.888	-0.909	0.816	0.598	-0.080	-0.572
	P	0.044	0.012	0.092	0.287	0.898	0.314
Limos	R	0.862	0.741	0.108	0.365	-0.538	0.502
	P	0.068	0.092	0.863	0.545	0.350	0.388
Arcillas	R	-0.950	0.947	-0.915	-0.816	0.296	-0.105
	P	0.013	0.004	0.029	0.092	0.628	0.867
Materia orgánica	R	0.842	-0.237	-0.140	0.875	-0.121	-0.126
	P	0.073	0.652	0.823	0.052	0.846	0.841
Ortofosfatos	R	0.899	-0.812	-0.660	0.736	0.058	-0.524
	P	0.038	0.050	0.225	0.157	0.926	0.365

Se tomó en cuenta una correlación significativa $P \leq 0.05$; Pl: *P. laevigata*, Pp: *P. praecox*, In: interespacio. En negritas se encuentran los datos correspondientes a correlaciones significativas.

Para la temporada de lluvia en el interespacio los resultados indican que el gen *nifH* tiene correlación negativa con la conductividad eléctrica y las arcillas ($p \leq 0.05$). *P. praecox* presenta una correlación negativa con el pH únicamente ($p \leq 0.05$).

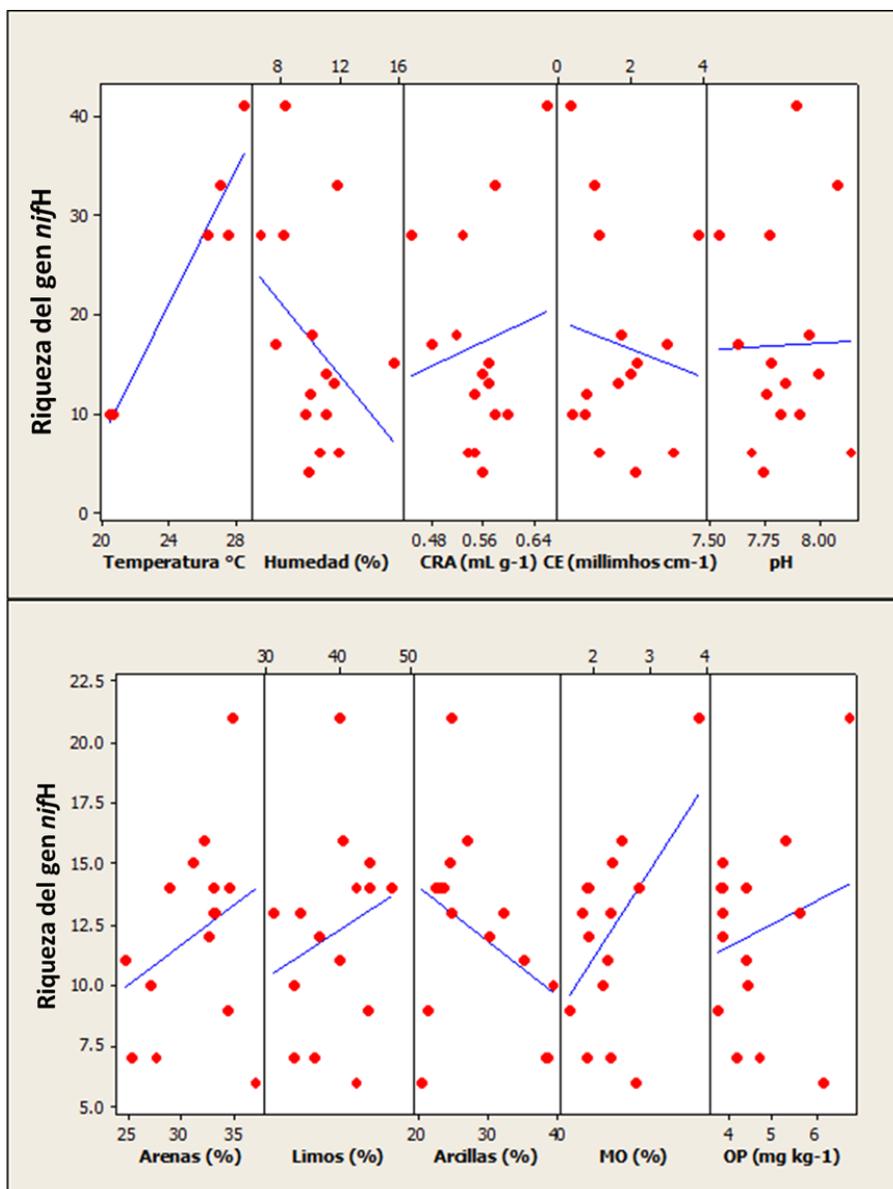


Figura 5. Gráfica de correlación por el coeficiente de Pearson entre la riqueza de genes *nifH* y los parámetros físicos y químicos del suelo durante el periodo de sequía.

En cuanto a la correlación general de los parámetros físicos y químicos con la riqueza del gen *nifH* entre las estaciones, observamos que durante la estación seca, ninguno de los parámetros físicos y químicos presentan una correlación estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) (Fig. 5).

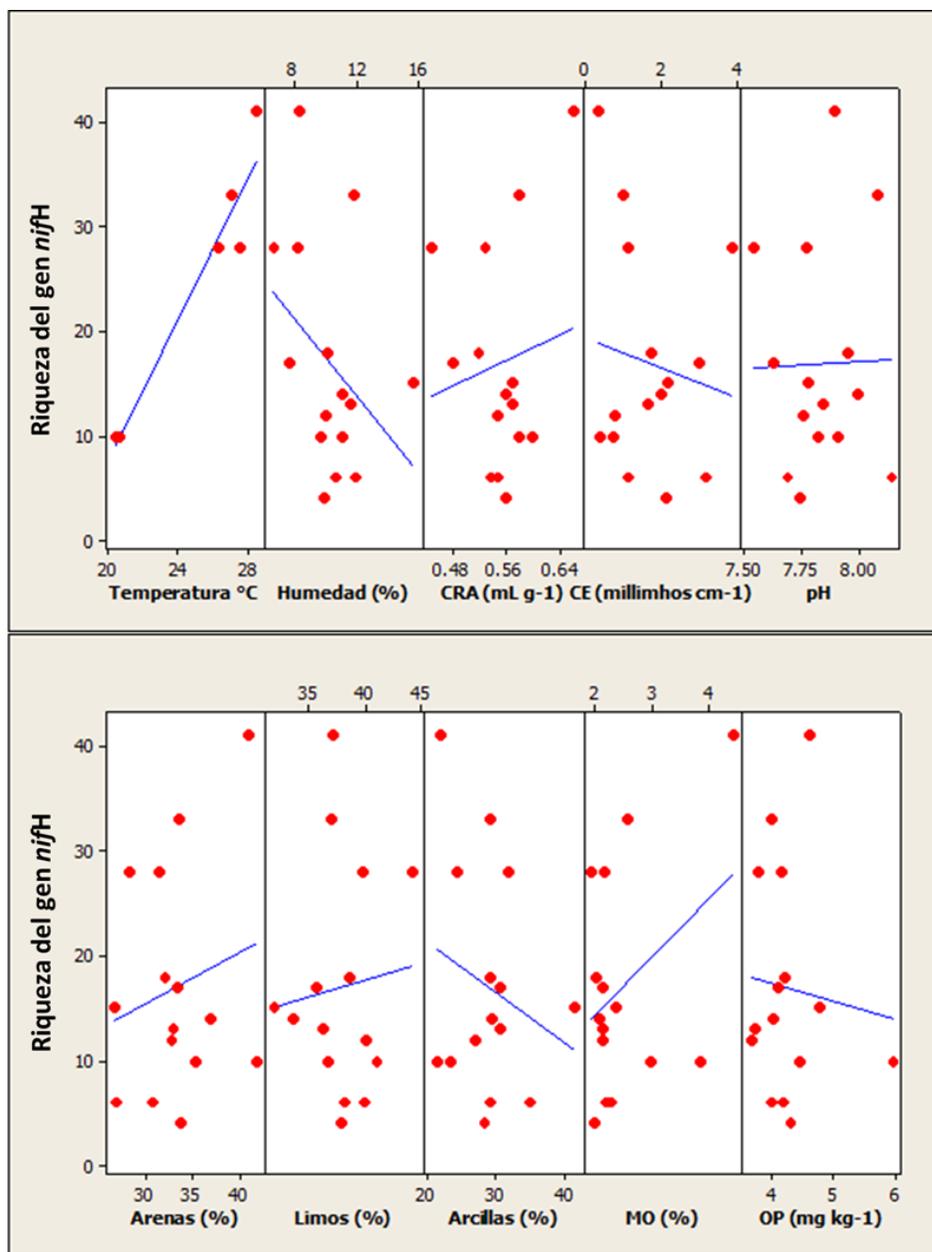


Figura 6. Gráfica de correlación por el coeficiente de Pearson entre la riqueza de genes *nifH* y los parámetros físicos y químicos del suelo durante el periodo de lluvia.

Pero encontramos que la temperatura tiene correlación positiva alta (0.966) con la riqueza del gen *nifH* durante la estación de lluvias ($p \leq 0.05$; Fig. 6).

Estos resultados del análisis de correlación apoyan la idea de que las propiedades fisicoquímicas afectan la composición de la comunidad de DVL del suelo principalmente la conductividad eléctrica, el pH, el porcentaje de arenas, de arcillas y los ortofosfatos,

durante la sequía, pero en la lluvia el interespacio no muestra ninguna correlación significativa entre la riqueza de genes *nifH* y las propiedades fisicoquímicas del suelo, lo que nos indica que son factores diferentes los que afectan las comunidades de DVL estas dos estaciones contrastantes de sequía y humedad (Herman et al., 1993; Riffkin et al., 1999; Belnap, 2001; Poly et al., 2001; Richardson et al., 2009; Pereira et al., 2011).

Estos resultados nos permiten concluir que la riqueza de DVL varía temporal y espacialmente, encontrando mayor riqueza durante el periodo de lluvia y en los primeros diez cm de profundidad y que algunos parámetros edáficos tienen efecto diferencial sobre la distribución de DVL. También se demuestra que *P. laevigata* permite el establecimiento de una mayor riqueza de DVL en su zona de raíces. Esto nos permite hablar de un efecto específico de los diferentes arbustos de esta zona árida sobre las comunidades de DVL.

También encontramos especies de DVL que soportan las variaciones temporales y espaciales de la zona, ya que se encuentran presentes en los tres microambientes en casi todas las profundidades, durante la lluvia y la sequía, por lo que es necesario enfocar esfuerzos en determinar cuáles son estas especies y el potencial que tienen en la entrada de N biodisponible, todo esto para poder implementar a corto, mediano y largo plazo, estrategias que nos permitan un manejo adecuado de los servicios ecosistémicos que estos microorganismos proveen a las zonas áridas.

REFERENCIAS

- Atlas, R. M., and R. Bartha. 1981. Microbial ecology. Fundamentals and applications. Addison-Wesley Publishing Co., Reading, Mass.
- Atlas, R. 1995. Principles of Microbiology. 1^a Edition. Ed. Mosby-Year Book, Inc. EUA. Pags. 887.
- Bardgett, R. D., J. L. Mawdsley, S. Edwards, P. J. Hobbs, J. S. Rodwell, and W. J. Davies. 1999. Plant species and nitrogen effects on soil biological properties of template upland grasslands. *Funct. Ecol.* 13:650–660.
- Belnap, J. 2001. Factor influencing nitrogen fixation and nitrogen release in biological soil crusts In Belnap, J and Lange, O. L. (eds). *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*. Ecological Studies, Vol. 150. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.



- Dávila, P., Arizmendi, M., Valiente-Banuet, A., Villaseñor, J. L., Casas, A. y Lira R.; 2002. Biological diversity in Tehuacán-Cuicatlán Valley, México; Biodiversity and Conservation. 11: 421- 442.
- Duc, M., Noll, M., Meier, B., Bürgmann, H. and Zeyer, J. 2009. High diversity of diazotrophs in the fore field of a receding alpine glacier. Microbial Ecol. 57: 179-190.
- Franco, A. C., Pereira, M. C., Raposo, S., Dini-Andreote, F., Spares, F., Falcao, J., Azevedo, J., van Elsas, J. D. and Dini, F. 2012. Abundance and genetic diversity of *nifH* gene sequences in anthropogenically affected Brazilian mangrove sediments. Appl. Environ. Microbiol. 78 (22): 7960-7967.
- González, T., Rodríguez, S. and Ferrera, R. 2008. Fertility islands around *Prosopis laevigata* and *Pachycereus hollianus* in the drylands of Zapotitlán Salinas, México. J. Arid Environ. 32: 1202-1212.
- George, T., Ladha, J. K., Buresh, R. J. and D. P. Garrily. 1992. Managing native and legume-fixed nitrogen in lowland rice-based cropping systems, p 69–92. In J. K. Ladha, T. George, and B. B. Bohlool (ed.), Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Hernández, J., George, S. and Rubio, L. 2009. Molybdenum trafficking for nitrogen fixation. Biochemistry. 48:9711-9721.
- Herman, R., Provencio, K., Torrez, R. and Seager, G. 1993. Effect of water and nitrogen additions on free-living nitrogen fixer populations in desert grass root zones. Appl. Environ. Microbiol. 59:3021-3026.
- Izquierdo, J. A. and Nüsslein, K. 2006. Distribution of extensive *nifH* gene diversity across physical soil microenvironments. Microbial Ecol. 51: 441-452.
- López, F., D. Muñoz-Iniestra, M. Hernández-Moreno, A. Soler-Aburto, M. C. Castillo-López, and I. Hernández-Arzate. 2003. Análisis integral de la toposecuencia y su influencia en la distribución de la vegetación y la degradación del suelo en la subcuenca de Zapotitlán Salinas, Puebla. BSGM. 56:19-41.
- López, F., D. Muñoz, M. M. Hernández, A. Soler y G. Horta. Evaluación del ambiente físico de las terrazas fluviales y Valle de Zapotitlán. En Arizmendi, M. C., G. Ávila, F. López, M. Murguía, S. Rodríguez and S. Solórzano (eds). 2007.



Deterioro ambiental en zonas áridas. Una década de experiencia multidisciplinaria del proyecto UBIPRO. FES Iztacala, UNAM. México. ISBN: 978-970-32-4828-5.

- Noda, S., M. Ohkuma, R. Usami, K. Horikoshi, and T. Kudo. 1999. Culture-independent characterization of gene responsible for nitrogen fixation in the symbiotic microbial community in the gut of the termite *Neotermes koshunensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4935–4942.
- Olson, J. B., Steppe, T. F., Litaker, R. W. and Paerl, H. W. 1998. N₂-fixing microbial consortia associated with the ice cover of lake Bonney, Atarctica. *Microb. Ecol.* 36 (3): 231-238.
- Orr, C. H., Leifert, C and Cooper J. M. 2012. Impacts of organic and conventional crop management on diversity and activity of free living nitrogen fixing bacteria and total bacteria are subsidiary to temporal effects. *PloS One.* 7 (12): e52891.
- Osorio-Beristain, O., A. Valiente-Banuet, P. Dávila and R. Medina. 1996. Tipos de vegetación y diversidad beta en el Valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México. *BSBM.* 35-58.
- Pavón, N., Briones, O. and Flores-Rivas, J. 2005. Litterfall production and nitrogen content in an intertropical semiarid Mexican scrub. *J. Arid Environ.* 60:1-13.
- Peoples, M. B., and E. T. Crasswell. 1992. Biological nitrogen fixation: investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant Soil* 141:13–39.
- Pereira, M. C. Semenov, A. V., van Elsas, J. D. and Falcao, J. 2011. SEasonal variations in the diversity and abundance of diazotrophic communities across soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 77: 57-68.
- Pereira, M. C., Schloter-Hai, B., Schloter, M., van Elsas, J. D. and Salles, J. F. 2013. Temporal dynamics of abundance and composition of nitrogen-fixing communities across agricultural soils. *PloS One.* 8 (9): e74500.
- Perroni-Ventura, Y., C. Montaña, and F. García-Oliva. 2006. Relationship between soil nutrient availability and plant species richness in a tropical semiarid environment. *J. Veg. Sci.* 17:719-728.



- Perroni-Ventura, Y., C. Montaña, and F. García-Oliva. 2010. Carbon-nitrogen interactions in fertility islands soil from a tropical semi-arid ecosystem. *Functional Ecol.* 24:233-242.
- Piceno, Y. M., and C. R. Lovell. 2000. Stability in natural bacterial communities. I. Nutrient addition effects on rhizosphere diazotroph assemblage composition. *Microbial. Ecol.* 39:32–40.
- Piceno, Y. M., and C. R. Lovell. 2000. Stability in natural bacterial communities. II. Plant resource allocation effects on rhizosphere diazotroph assemblage composition. *Microb. Ecol.* 39:41–48.
- Poly, F., L. Jocteur Monrozier, and R. Bally. 2001. Improvement in RFLP procedure to study the community of nitrogen fixers in soil through the diversity of *nifH* gene. *Res. Microbiol.* 152:95–103.
- Postgate, J. 1998. Nitrogen fixation. 3^a edición. Cambridge University Press. Great Britain.
- Ravicumar, S., Gnanadesigan, M., Ignatiammal S. T. and Sumaya, S. 2012. Population dynamics of free living, nitrogen fixing bacteria *Azospirillum* in Manakkudi mangrove ecosystem, India. *J. Environ. Biol.* 33(3): 597-602.
- Richardson, A., Barea, J. M., McNeill, A. and Prigent-Combaret, P. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil.* 321:305-339.
- Riffkin, P. A., Quigley, P. E., Kearney, G. A., Cameron, F. J., Gault, R. R., Peoples, M. B. and Thies, J. E. 1999. Factors associated with biological nitrogen fixation in dairy pastures in south-western Victoria. *Aust. J. Agric. Res.* 50: 261–272.
- Rudnick, P., D. Meletzus, A. Green, L. He, and C. Kennedy. 1997. Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria. *Soil Biol. Biochem.* 29:831–841.
- Serrano-Vázquez A., Rodríguez-Zaragoza S., Pérez-Juárez H., Bazán-Cuenca J., Rivera-Aguilar V. M., and Durán A. 2013. Physical and chemical variation of soil under two desert shrubs in Tehuacan, Mexico. *Soil Sci.* 178(2): 87-103.



- Shaffer, B. T., Widmer, F., Porteous, L. A. and Seidler, R. J. 2000. Temporal and spatial distribution of the nifH gene of N₂-fixing bacteria in forests and clearcuts in western Oregon. *Microbial. Ecol.* 39: 12–21.
- Shrimant, B. 2012. Review: Nitrogen Fixing Microorganisms. *International Journal of Microbiol. Res.* 3 (1): 46-52.
- Simonet, P., Grosjean, M., Arvind, K. M., Nazaret, S., Cournoyer, B. and Normand, P. 1991. Frankia genus-specific characterization by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microb* 57: 3278–3286.
- Tiwari, M., Paroda, S., Dadarwal, K. R. 2003. Associative diazotrophs of pearl millet (*Pennisetum graucum*) from semiarid region--isolation and characterization. *Indian J. Exp. Biol.* 41 (4): 341-345.
- Ueda, T., Y. Suga, N. Yahiro, and T. Matsuguchi. 1995. Remarkable N₂- fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of nifH gene sequences. *J. Bacteriol.* 177:1414–1417.
- Verbist K., Santibañez F., Gabriels D. y G. Soto. 2010. Atlas de Zonas Áridas de América Latina y El Caribe. CAZALAC. Documentos Técnicos del PHI-LAC.
- Villaseñor, J., P. Dávila, and F. Chiang. 1990. Fitogeografía del valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México.* 50:135-149.
- Widmer, F., B. T. Shaffer, L. A. Porteous, and R. J. Seidler. 1999. Analysis of nifH gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascade mountain range. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:374–380.
- Whitford, W. 2002. *Ecology of Desert Systems.* Academic Press, London, UK.
- Xie, G. and Steinberg, Y. 2002. Dynamics of the nitrogen-efficient guild and its relationship to nitrogen and carbon patterns in two desert soil ecosystems. *Arid Land Research and Management.* 16: 69-81.
- Yeager, C. M., Kuske, C. R., Carney, T. D., Johnson , S. L., Ticknor, L. O. and Belnap, J. 2012. Response of biological soil crust diazotrophs to season, altered summer precipitation, and year-round increased temperature in an arid grassland of the Colorado Plateau, US. *Front. Microbiol.* 3: 358.



- Zehr, J. P., Mellon, M. T. and Zani, S. 1998. New nitrogen-fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by amplification of nitrogenase (*nifH*) genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3444–3450.
- Zehr, J. P., Jnkns, B. D., Short, S. M and Steward, G. F. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial structure: a cross-system comparison. *Environ. Microbiol.* 5 (7): 539-554.



CAPÍTULO VII:

DISCUSIÓN GENERAL Y

CONCLUSIONES



DISCUSIÓN

GENERAL

El sistema complejo que constituye el suelo, característicamente heterogéneo espacial y temporalmente, alberga una gran riqueza de especies vegetales, animales y microbianas, las cuales se relacionan estrechamente entre sí (Atlas, 1995). Las plantas además, propician ciertas condiciones al suelo generando microambientes y permiten el establecimiento de diferentes especies, las cuales interactúan entre sí y a su vez, facilitan el aprovechamiento de los nutrimentos por las plantas (Bueé et al., 2009). En estos microambientes, las bacterias juegan un papel importante en numerosas funciones del suelo, como la FBN, lo que puede beneficiar la permanencia y el crecimiento de las plantas (Cheng, 2009; Basan y de-Basan, 2010).

Los DVL, son capaces de fijar nitrógeno cuando este no se encuentra disponible en el suelo (Orr et al., 2012), por lo que son de gran importancia en el sostenimiento de ecosistemas donde la disponibilidad de nutrientes es limitada, como en el caso de los ecosistemas áridos y semiáridos, particularmente en Zapotitlán Salinas, Puebla (González , 2008).

Se realizó la caracterización de los microambientes edáficos donde se identificaron las variaciones en las propiedades físicas y químicas del suelo bajo *P. laevigata*, *P. praecox* y del interespacio. Los datos obtenidos (cuales) demuestran que estas plantas forman diferentes microambientes en el suelo, con aumentos en la cantidad de materia orgánica y disminución en la temperatura, conservando la humedad y generando una mejor estructura del suelo en comparación con el interespacio. Además observamos que estas variaciones van a depender de los cambios estacionales que sufre la planta a lo largo de un ciclo anual, como es la pérdida de hojas. En general, las principales modificaciones generadas por las plantas se dieron en los primeros 10 cm de profundidad y en el caso del interespacio.

También se compararon diferentes métodos para la extracción de DNA de bacterias del género *Streptomyces*, ya que en la zona se reportó que estos organismos son, probablemente, el grupo más diverso de DVL del suelo. Sin embargo, estas bacterias



poseen características particulares que dificultan su análisis por métodos moleculares. Es por ello que se determinó la eficiencia de un método capaz de lisar las células de estos microorganismos y se encontró que al utilizar el kit MoBio, se puede obtener DNA de bacterias del género *Streptomyces* de buena calidad y, aun cuando la cantidad es baja, es suficiente para poder realizar análisis moleculares como la amplificación por PCR, la secuenciación, análisis filogenético y DGGE. Además del kit MoBio, se logró obtener DNA de buena calidad con los métodos reportados por Carrig et al. (2006) y Atashpaz et al. (2010), sin embargo el tiempo que se toma es mucho mayor en comparación con el kit y además, se requiere de hacer un paso de purificación de DNA para poder utilizar el material genético en estudios posteriores.

Con el kit MoBio se obtuvo DNA de organismos que fueron aislados del suelo de la zona de raíces de *P. laevigata* y del interespacio como posibles fijadores de nitrógeno, por cultivos en medio Rennie. A estos microorganismos se les identificó por medio del análisis del gen rDNA 16S, encontrando organismos pertenecientes a los géneros *Sinorhizobium*, *Rizhobium*, *Streptomyces*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Cupriavidus* y *Microbacterium* de los cuales *Burkholderia*, *Sinorhizobium*, *Rizobium* y *Streptomyces* presentaron también la capacidad de solubilizar fósforo. También se encontraron microorganismos que se sabe controlan las poblaciones bacterianas como amibas, rotíferos y nemátodos compartiendo el mismo hábitat. Esto nos permite pensar que podrían estar depredando a los DVL permitiendo así el reciclaje del N en las redes tróficas del suelo de los diferentes microambientes.

Por su parte, al utilizar el kit MoBio en muestras del suelo de la zona de raíces de *P. laevigata*, *P. praecox* y el interespacio de un ciclo estacional, a lo largo de un gradiente de profundidad, se logró obtener extractos de DNA total integro que sirvió como templado para amplificar el gen *nifH* de los DVL y su posterior separación por DGGE. Esto nos permitió determinar la riqueza de genes *nifH* presentes en los tres microambientes y también determinar su variación espacial y temporal. Encontramos que la mayor riqueza se observó en el suelo bajo *P. laevigata* y el interespacio en los primeros centímetros de profundidad y que la menor riqueza se observó en el suelo de la zona de raíces de *P. praecox*. Además encontramos que la riqueza de especies se incrementa durante las lluvias, pero no encontramos ni durante la sequía, ni durante la lluvia alguna correlación



significativa entre la riqueza de genes *nifH* y la humedad. Los parámetros que si mostraron una alta correlación significativa fueron arcillas, pH y conductividad eléctrica.

Se observó también que a lo largo del gradiente de profundidad, algunas comunidades son idénticas entre dos microambientes, ya sea entre los primeros centímetros de *P. laevigata* ó *P. praecox* y las últimas profundidades del interespacio. También se observó que, en base a la riqueza del gen *nifH*, cada microambiente se agrupaban entre sí con sus diferentes profundidades. Esta aproximación molecular muestra una mayor cantidad de DVL del suelo en comparación con los organismos cultivados de la misma zona. Sin embargo, falta determinar la composición de esta comunidad a partir de la secuenciación de las bandas obtenidas por DGGE.

Nuestra hipótesis fue comprobada parcialmente, ya que si se encontró que *P. laevigata* y *P. praecox* mejoran las propiedades físicas y químicas del suelo bajo su dosel sobre todo en los primeros 10 cm de profundidad en comparación con el interespacio. Estos datos refuerzan los resultados que obtuvimos con las bacterias cultivables con posible capacidad fijadora de nitrógeno, ya que la mayor riqueza se encontró en los primeros centímetros del suelo de la zona de raíces de las dos especies vegetales. Sin embargo, con el análisis molecular independiente de cultivo encontramos que *P. praecox* presenta la menor riqueza de genes *nifH* de los tres microambientes a lo largo del tiempo y entre profundidades. Esto podría traer como resultado una menor abundancia de esta especie vegetal en la terraza aluvial degradada de Zapotitlán Salinas, Puebla.

Los métodos que utilizamos para analizar la diversidad de DVL (tanto dependientes como independientes de cultivo) nos arrojaron datos contrastantes en cuanto a la riqueza de DVL en los microambientes del suelo, sin embargo, ambos tipos de datos nos ayudan a comprender diferentes propiedades de los DVL del suelo, por lo que no son excluyentes uno del otro, sino complementarios.

CONCLUSIONES

En general, estos resultados nos permiten concluir que *P. laevigata* y *P. praecox* modifican las propiedades físicas y químicas del suelo bajo su dosel, sobre todo en los primeros 10 cm de profundidad en comparación con el interespacio.

Algunos parámetros edáficos tienen efecto diferencial sobre la distribución de DVL y sobre algunos posibles depredadores y otros microorganismos que se encuentran compartiendo el mismo hábitat como bacterias solubilizadoras de fósforo, amebas, rotíferos y nemátodos del suelo.

Tanto *P. laevigata* como *P. praecox* y el interespacio tienen un efecto específico diferente sobre las propiedades edáficas del suelo y sobre las comunidades de DVL las cuales varían espacial y temporalmente en esta zona árida.

P. laevigata permite el establecimiento de una mayor riqueza de DVL tanto cultivable como no cultivable en su zona de raíces en comparación con los otros microambientes estudiados.

Se encontraron especies de DVL que soportan las variaciones temporales y espaciales de la zona, por lo que es necesario enfocar esfuerzos en determinar cuáles son estas especies y el potencial que tienen en la entrada de N biodisponible, todo esto para poder implementar a corto, mediano y largo plazo, estrategias que nos permitan un manejo adecuado de los servicios ecosistémicos que estos microorganismos proveen a las zonas áridas.



REFERENCIAS

- Alesso, S. P., Araujo, P. y Tapias, R. 2003. Aprovechamiento de la goma brea (*Cercidium praecox*) en bosques secundarios del Parque Chaqueño Seco. Influencia del tamaño de las heridas sobre la producción Quebracho. Revista de Ciencias Forestales. 10: 60-70.
- Atlas, R. 1995. Principles of Microbiology. 1ª Edition. Ed. Mosby-Year Book, Inc. EUA. Pags. 887.
- Bashan, Y. and de-Bashan, L. E. 2010. Microbial populations of arid lands and their potential for restoration of deserts. In P. Dion (ed). Soil Biology and Agriculture in the tropics, Soil Biology 21. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Doi: 10.1007/978-3-642-05076-3_3.
- Belnap, J. 2001. Factor influencing nitrogen fixation and nitrogen release in biological soil crusts In Belnap, J. and Lange, O. L. (eds). Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management. Ecological Studies, Vol. 150. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Buée, M., De Boer, W., Martin, F., van Overbeek, L. and Jurkevitch, E. 2009. The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. Plant Soil. 321:189-212.
- Burquez, A. and Quintana, M. A. 1994 Islands of diversity: ironwood ecology and the richness of perennials in a Sonoran Desert biological preserve. In Nabhan GP, Carr JL (eds) Ironwood: An Ecological and Cultural Keystone on the Sonoran Desert. Conservation International, Washington, DC. pp 9–27.
- Carrillo, A., Mayer, Koch, G. and Hapla, F. 2008. Wood anatomical characteristics and chemical composition of *Prosopis laevigata* grown in the northeast of Mexico. IAWA Journal. 29(1):25-34.
- Cervantes, M. C. 2005. Plantas de importancia económica en zonas áridas y semiáridas de México. En Anais do X Encontro de Geógrafos de América Latina.



- Chapin, S., Matson, P and Mooney, H. 2002. Principles of terrestrial ecosystem ecology. Springer-Verlag. New York. 436 p.
- Cheng, W. 2009. Rhizosphere priming effect: Its functional relationships with microbial turnover, evapotranspiration, and C-N budgets. *Soil Biol. Biochem.* 41:1795-1801.
- Comisión Nacional de las Zonas Áridas (CONAZA). 1993. Plan Nacional para Combatir la Desertificación.
- Fani, R., Gallo, R. and Lió, P. 2000. Molecular evolution of nitrogen fixation: the evolutionary history of the *nifD*, *nifK*, *nifE*, and *nifN* genes. *J. Mol. Evol.* 51: 1-11.
- FAO. 2003. Evaluación de la degradación de la tierra en zonas áridas. Land Degradation Assessment in Drylands, LADA. LADALIN. Roma. pp42.
- Figueroa, S. B., Amante, O. A., Cortes, T. H. G., Pimentel, L. J., Osuna, C. E. S., Rodríguez, O. J. M. y Morales, F. F. 1991. Manual de predicción de pérdidas de suelo por erosión. SARH. Colegio de Postgraduados. Centro Regional para Estudios de Zonas Áridas y Semiáridas. 159 p.
- Franche, C., Lindström, K. and Elmerich, C. 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil.* 321:35-59.
- Fronth, H. y Turk, L. 1975. Fundamentos de la Ciencia del Suelo. Ed. Continental, S. A. México, D. F. 527 p.
- Fuentes-Dávila, G. y Ferrera-Cerrato, R. 2007. Ecología de la raíz. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. México. 2ª edición. ISBN: 968-5284-08-3. 153 p.
- García, M. C. 2003. Análisis fitoquímico y actividad insecticida de *Cercidium praecox*. Tesis de Biología Experimental, UAM.
- GEO México. 2004. Estado del Medio Ambiente: Suelo. p. 120-140.
- González, T., Rodríguez, S. and Ferrera, R. 2008. Fertility islands around *Prosopis laevigata* and *Pachycereus hollianus* in the drylands of Zapotitlán Salinas, México. *J. Arid Environ.* 32: 1202-1212.
- González, T. 2008. Dinámica poblacional de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre en suelo de dos terrazas aluviales con diferente nivel de deterioro del



suelo en el valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Tesis doctoral. Posgrado en Ciencias Biológicas. Facultad de Estudios Superiores, Iztacala. UNAM.

- Haukka, K., Lindström, K. and Young, J. 1998. Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(2):419-426.
- Henson, B., Watson, L. and Barnum, S. 2004. The evolutionary history of nitrogen fixation, as assessed by *NifD*. *J. Mol. Evol.* 58:390-399.
- Herman, R. P., K. R. Provencio, R. J. Torrez, and G. M. Seager. 1993. Effect of water and nitrogen fixer populations in desert grass root zones. *Applied and Environmental Microbiology.* 59 (9): 3021-3026.
- Hernández, E. G. 2009. Aislamiento e identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en la rizósfera de plantas tolerantes a metales pesados. Tesis de Maestría, IPN. México, D. F.
- INE-SEMARNAP. 1997. Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México.
- Juárez de Varela, F. y Novara, L. J. 2005. Flora de Lerma. Aportes Botánicos de salta. Ser. Flora. Vol. 7 No. 10. Buenos Aires, Argentina. ISSN 0327-506X.
- Killham, B. 1994. *Soil ecology.* Cambridge: Cambridge University Press. 242 pags.
- Kirkby, M. J. y Morgan, R. P. C. 1984. *Erosión del suelo.* John Wiley & Sons. Ltd. 286 p.
- Lara, O. 1996. *Plantas medicinales de México: composición, usos y actividad biológica.* Universidad Autónoma de México. México, D.F. 1996. p.p 14-15.
- Little, A., Robinson, C., Peterson, S., Raffa, K. and Handelsman, J. 2008. Rules of engagement: interspecies that regulate interactions microbial communities. *Ann. Rev. Microbiol.* 62:375-401.
- Lloret, L and Martínez-Romero, E. 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 47(1-2):43-60.



- Loredó, C. 1986. Efecto de la aplicación de estiércol caprino sobre la estabilidad de agregados del suelo. Reporte Final de Problema Especial. Física de Suelos. 19 p.
- Loredó-Osti, C. 2005. Prácticas para la conservación del suelo y agua en las zonas áridas y semiáridas. INIFAP-CIRNE-Campo Exp. San Luis. Libro Técnico número 1. San Luis Potosí, S. L. P. México. 187 p.
- Maldonado-Aguirre, L. J. y de la Garza, F. E. 2000. El mezquite en México: rasgos de importancia productiva y necesidades de desarrollo. En: El mezquite, árbol de usos múltiples: Estado actual del conocimiento en México. Frías-Hernández J. T., Olalde-Portugal, V., Vernon-Carter E. J., eds. Universidad de Guanajuato, México. 37-50.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X. and Batut, J. 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trend in Microbiol.* 17(10):450-466.
- Orr, C. H., Leifert, C and Cooper J. M. 2012. Impacts of organic and conventional crop management on diversity and activity of free living nitrogen fixing bacteria and total bacteria are subsidiary to temporal effects. *PloS One.* 7 (12): e52891.
- Ortiz, M., Anaya, M. and Estrada, W. 1994. Evaluación, cartografía y políticas preventivas de la degradación de la tierra. Publicación Técnica. Colegio de Postgraduados. México. 49 p.
- Páez, E., Aguilar, S., Terrazas, T., Huidobro, M. E. y Aguirre, E. 2005. Cambios anatómicos en la corteza de *Parkinsonia praecox* (Ruiz et Pavón) Hawkins causados por la epífita *Tillandsia recurvata* L. (Bromeliaceae). *Bol. Soc. Bot. Méx.* 77: 59-64.
- Perroni-Ventura, Y., C. Montaña, and F. García-Oliva. 2006. Relationship between soil nutrient availability and plant species richness in a tropical semiarid environment. *J. Veg. Sci.* 17:719-728.
- Perroni-Ventura, Y. 2007. Islas de fertilidad en un ecosistema semiárido: nutrientes en el suelo y su relación con la diversidad vegetal. Tesis de



Doctorado en Ciencias en Ecología y Manejo de Recursos Naturales. Instituto de Ecología, A. C. Xalapa Veracruz, México.

- Peter, V. M., K. Cassman, C. Cleveland, T. Crews, B. F. Christopher, B. N. Grimm, W. R. Howarth, R. Marinov, L. Martinelli, B. Rastetter and I. J. Sprent. 2002. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry*, 57: 1-45.
- Poly, F., L. Jocteur M. and R. Bally. 2001. Improvement in RFLP procedure to study the community of nitrogen fixers in soil through the diversity of *nifH* gene. *Res. Microbiol.* 152:95–103.
- Postgate, J. 1998. Nitrogen fixation. 3ª edición. Cambridge University Press. Great Britain.
- Puignare, F. I., Haase, P., Puidefábregas, J., Cueto, M., Clark, S. C. & Incoll, L. D. 1996. Facilitation and succession under the canopy of a leguminous shrub, *Retama sphaerocarpa*, in semi-arid environment in south-east Spain. *Oikos*. 76:455-464.
- Ramírez, A. 1996. Conocimiento de la Flora Medicinal de Zapotitlán de las Salinas Puebla. Universidad Autónoma de México. Facultad de Ciencias. Tesis Licenciatura. México. pp 42.
- Rango, A., Tartowski, S. J., Laliberte, A., Wainwright, J. and Parsons, A. 2006. Islands of hydrologically enhanced biotic productivity in natural and managed arid ecosystems. *J. Arid Environ.* 65: 235-252.
- Richards, B. 1987. The microbiology of terrestrial ecosystems. Longman Scientific and Technical. Estados Unidos. 393 pp.
- Richardson, A., Barea, JM., McNeill, A. and Prigent-Combaret, P. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil.* 321:305-339.
- Ríos, B. 1987. Efecto de la cobertura vegetal en el proceso erosivo. Tesis de Maestría. Centro de Edafología. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.
- Rodicio, M. and Mendoza, M. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22(4):238-245.



- Rodríguez-Zaragoza, S., González-Ruíz, T., González-Lozano, E., Lozada-Rojas, A., Mayzlish-Gati, E. and Steinberger, Y. 2008. Vertical distribution of microbial communities under the canopy of two legume bushes in the Tehuacán desert, Mexico. *Eur. J. Soil Biol.* 44:373-380.
- Rosado, A., Duarte, G., Seldin, L. and Dirk, J. 1998. Genetic diversity of nifH gene sequences in Paenibacillus azotofixans strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(8):2770-2779.
- Rzedowski. 1978. La vegetación de México. Ed. Limusa, México.
- Salas, 2009. Aislamiento e identificación de polifenoles presents en exudados de raíz de Prosopis laevigata (Humb. Et Bonpl. Ex Willd) M. C. Johnston (mesquite), bajo condiciones de deficiencia en el suministro de nitrógeno. Tesis de licenciatura, FES-Iztacala, UNAM.
- Santi, C., D. Bogusz and C. Franche. 2013. Invited Review: Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany.* 111: 743-767.
- Schade, J. D. and Hobbie, S. E. 2005. Spatial and temporal variation in islands of fertility in the Sonoran Desert. *Biogeochem.* 73:541–553.
- Shamir, I. and Y. Steinberger. 2007. Vertical distribution and activity of soil microbial population in a sandy desert ecosystem. *Microb. Ecol.* 53:340-347.
- Sellsted, A. and Richau, K. H. 2013. Aspects of nitrogen-fixing *Actinobacteria*, in particular free-living and symbiotic Frankia. *FEMS Microbiol. Lett.* 342: 179-186.
- SEMARNAT y Colegio de Postgraduados. Memoria Nacional 2001-2002. México, 2003.
- Shrimant, B. 2012. Review: Nitrogen Fixing Microorganisms. *International J. Microbiol. Res.* 3 (1): 46-52.
- Smith, J., J. Halvorson and H. Bolton. 2002. Soil properties and microbial activity across a 500 m elevation gradient in a semi-arid environment. *Soil Biol. Biochem.* 34: 1749-1757.
- Titus, J. H., Nowak, R. S. and Smith, S. D. 2002. Soil resource heterogeneity in the Mojave Desert. *J. Arid Environ.* 52:269–292.



- Vásquez-Méndez, R., Ventura-Ramos, E., Oleschko, K., Hernández-Sandoval, L., Parrot, J-F. and Nearing, M. A. 2010. Soil erosion and runoff in different vegetations patches from semiarid Central Mexico. *Catena*. 80:162-169.
- Velázquez, I., A. Porras, and L. Touron. 2008. Estrategia de desarrollo sustentable para generar alimento y empleo: El gusano cuchama en Zapotitlán Salinas, Puebla, México. *Argumentos (México)*. 56:119-135.
- Verbist K., Santibañez F., Gabriels D. y G. Soto. 2010. Atlas de Zonas Áridas de América Latina y El Caribe. CAZALAC. Documentos Técnicos del PHI-LAC.
- Walker, L. R., Thompson, D. B., Landau, F. H. 2001. Experimental manipulations of fertile islands and nurse plant effects in the Mojave Desert, USA. *West N Am Nat*. 61:25–35.
- West, P., Nabhan, G. P., Suzan, H. and Monti, L. 2000. Ironwood diversity study. In Nabhan GP, Behan M (eds) *Desert ironwood primer*. Arizona–Sonora Desert Museum, Tucson, AZ, pp 46–61.
- Whitford, W. 2002. *Ecology of Desert Systems*. Academic Press, London, UK.
- Xie, G. and Steinberg, Y. 2002. Dynamics of the nitrogen-efficient guild and its relationship to nitrogen and carbon patterns in two desert soil ecosystems. *Arid Land Res. Manag.* 16: 69-81.
- Zavala, H. 1982. Estudios ecológicos en el valle semiárido de Zapotitlán, Puebla. Clasificación numérica de la vegetación basada en atributos binarios de presencia o ausencia de las especies. *Biotica*, Vol. 7.

