

- Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

Protocolo para Proyecto de Investigación 2014

Titulo del proyecto

Evaluación estacional de la biodiversidad de micorrizas arbusculares en los diferentes ecosistemas de la Reserva Ecológica Municipal Sierra y Cañón de Jimulco. Mpio. Torreón, Coahuila, México.

Introducción

Los conductores del cambio ambiental, como la pérdida de hábitats naturales, la contaminación, las especies invasoras, las emisiones antropogénicas y el calentamiento global están considerados como las principales causas de pérdida de biodiversidad global. Las comunidades de Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) no están exentos de tales amenazas, y en los últimos 20 años, ha habido muchos informes de una reducción de la diversidad de hongos AM en sitios que experimentan diversos tipos de perturbaciones antropogénicas, en comparación con los hábitats naturales (1).

Los proyectos de conservación deben tener en cuenta las estrategias diferentes para preservar los HMA para las generaciones futuras, por ejemplo, el establecimiento y mantenimiento de las colecciones ex situ y la evaluación de la ocurrencia HMA en los espacios protegidos, con el objetivo de promover la creación de las reservas de germoplasma in situ siendo las área protegidas son el lugar idóneo para ello (2).

La Reserva Ecológica Municipal "Sierra y Cañón de Jimulco" (REM-SCJ), establecida por Acuerdo de Cabildo del Republicano Ayuntamiento de Torreón el 27 de junio del 2003, ocupa la región sureste del citado municipio y comprende alrededor del 44 por ciento del territorio del mismo, convirtiéndose así en un ejemplo a nivel nacional en cuanto a la proporción de territorio protegido para la conservación y manejo sustentable de recursos naturales.

La REM-SCJ, se estableció con el objeto de proteger y conservar los ecosistemas, especies y procesos de una biodiversidad privilegiada en un entorno árido, donde un río intermitente (el Aguanaval) y una montaña de considerable elevación han permitido la existencia de ecosistemas particulares, un bosque ripario y un bosque templado poco comunes en la zona, así como también para proteger especies como la noa (*Agave victoriae-reginae*), importante especie endémica que se encuentra en peligro de extinción; a la biznaga-palmilla de San Pedro (*Leuchtenbergia principis*), especie de densidades importantes, endémica y amenazada; el maguey de parras (*Agave parrasana*), endémica y sujeta a protección especial; la reina de la noche (*Peniocereus greggii*), también con protección especial, que son algunas de las especies con estatus identificadas (3)

En México, los HMA estudios han evaluado las respuestas ecofisiológicas y ecológicas de las plantas, sin embargo, la taxonomía e *in situ* los aspectos ecofisiológicos(4), así como su papel en los ciclos biogeoquímicos o en relación con la fertilidad del suelo, la productividad, el secuestro de carbono / depósitos, la diversidad vegetal y provisión de alimentos, han recibido menos atención (4, 5).

Objetivos

Objetivo General

Determinar la diversidad biológica de micorrizas arbusculares en los Zonas Núcleo de la Reserva Ecológica Municipal Sierra y Cañón de Jimulco. Mpio. Torreón, Coahuila, México.

Objetivos particulares

- Determinar la diversidad biológica de micorrizas arbusculares en la zona núcleo A
- Determinar la diversidad biológica de micorrizas arbusculares en la zona núcleo B
- Determinar la diversidad biológica de micorrizas arbusculares en la zona núcleo C

Hipótesis

Existe una diversidad alta de micorrizas arbusculares en las Zonas Núcleo de la Reserva Ecológica Municipal Sierra y Cañón de Jimulco. Mpio. Torreón, Coahuila, México.

Revisión de Literatura

La Reserva Ecológica Municipal "Sierra y Cañón de Jimulco" (REM-SCJ), establecida por Acuerdo de Cabildo del Republicano Ayuntamiento de Torreón el 27 de junio del 2003, ocupa la región sureste del citado municipio y comprende alrededor del 44 por ciento del territorio del mismo, convirtiéndose así en un ejemplo a nivel nacional en cuanto a la proporción de territorio protegido para la conservación y manejo sustentable de recursos naturales.

La REM-SCJ, se estableció con el objeto de proteger y conservar los ecosistemas, especies y procesos de una biodiversidad privilegiada en un entorno árido, donde un río intermitente (el Aguanaval) y una montaña de considerable elevación han permitido la existencia de ecosistemas particulares, un bosque ripario y un bosque templado poco comunes en la zona, así como también para proteger especies como la noa (*Agave victoriae-reginae*), importante especie endémica que se encuentra en peligro de extinción; a la biznaga-palmilla de San Pedro (*Leuchtenbergia principis*), especie de densidades importantes, endémica y amenazada; el maguey de parras (*Agave parrasana*), endémica y sujeta a protección especial; la reina de la noche (*Peniocereus greggii*), también con protección especial, que son algunas de las especies con estatus identificadas.

La reserva se dividió en: Zonas Núcleos, Zona de amortiguamiento, zona de uso público, zona de Aprovechamiento sustentable de Agrosistemas, Zona de aprovechamiento de sustentable de los recursos naturales, Zona de recuperación, zona de Asentamientos humanos y zona de aprovechamiento especial.

Zonas Núcleo

Comprenden aquellas áreas que por su diversidad, grado de conservación o por la presencia de especies bajo protección especial, deben ser consideradas como prioritarias para su protección.

Zona A

Comprende los terrenos de la Sierra que se elevan por encima de los 2200 m.s.n.m., con una superficie de 4590.2 hectáreas la cual constituye un Ecosistema Relictual Regional.

Dicho ecosistema representa una riqueza excepcional para una región caracterizada por los matorrales xerófilos. Entre las especies por conservar en esta zona se encuentra el *Agave parrasana* que está reportado en la NOM-059-ECOL 2001 como amenazada. Las asociaciones o unidades de vegetación que se localizan en esta zona se pueden describir como sigue:

Bosque de pinos. Ocurre en espacios irregulares y dispersos, con diferentes exposiciones, llegando a ser casi puro en algunos casos entre los 2400 y 3100 msnm. Constituido por *Pinus cembroides*, el pino piñonero que alcanza alturas desde 1 a 4 m en promedio y en algunas áreas menos expuestas hasta 6 o 7 m.

Bosque de encino-pino. Son áreas irregulares, aunque más abundantes que las anteriores, con mezclas en las que se combinan diferentes especies de encinos, pino piñonero, táscale y algunos elementos del matorral xerófilo como *Agave montana* y *Yucca carnerosana*.

Pastizales subalpinos. Cubre una superficie importante considerando las áreas en que se mezcla con la asociaciones anteriores y el matorral xerófilo, a los 2400 m.s.n.m. está constituido principalmente por *Bouteloua hirsuta* y entre los 2800 y 3100 m.s.n.m., por *Aristida divaricata*. Ambos en asociación con especies de *Quercus* sp., *Pinus cembroides*, *Juniperus flaccida*, *Agave montana*, *Ferocactus pringley*, *Echinocactus pectinatus*, *Opuntia rastrera*, etc.

Matorral xerófilo (crasirosulifolios espinosos). Dependiendo de la exposición, se encuentran especies propias de zonas áridas como magueyes, yucas y cactáceas. En general, se intercalan con la mayoría de las asociaciones descritas y existen áreas dominadas por este tipo de cubierta vegetal, tal vez por ello se ha considerado en las cartas geográficas a toda el área como una unidad de crasirosulifolios espinosos, con diferentes asociaciones.

Zona B

Con fundamento en la población de *Agave victoriae-reginae* T.Moore (noa) especie reportada en la NOM-095-ECOL 2001 como endémica y en peligro de extinción, el Cañón de la Cabeza, principalmente sus acantilados del lado

oriental, conforman esta zona núcleo de la REM-SCJ. La cubierta es típica de matorral xerófilo, dominando nuevamente los crasirosulfolios con los géneros *Hechita* y *Agave*, acompañados por cactáceas y otros elementos del matorral micrófilo.

Esta población de noas es posiblemente la más importante en la región, ya que las paredes del cañón ofrecen el hábitat específico para esta especie y por su altura y extensión se considera que estas condiciones no se presentan en otras áreas de la Comarca Lagunera. El área comprende 78.7 hectáreas de pared vertical y la distribución de plantas es casi uniforme en los resquicios y hoquedades.

Zona C

Esta es la zona núcleo más pequeña, pero también la más delicada para su establecimiento y operación, se localiza a escaso un kilómetro del Ejido La Flor de Jimulco, por encima del sitio conocido como "Jimulquillo". Su importancia radica en la considerable población de *Leuchtenbergia principis*, (palmilla de San Pedro, biznaga) especie endémica y amenazada de acuerdo a la NOM-059-ECOL 2001. Comprende unas 30 hectáreas de terrenos poco utilizados como agostadero (3).

La conservación de sus ecosistemas y por ende de su diversidad de especies y procesos, son el principal valuarde de la región, primordialmente el ecosistema relictado del bosque templado en la parte alta de la sierra, que es resultado de un proceso de aislamiento ancestral cuyas adaptaciones aún están por ser descritas. Se han recibido en dicho punto las visitas de nacionales y extranjeros según los registros existentes.

Los conductores del cambio ambiental, como la pérdida de hábitats naturales, la contaminación, las especies invasoras, las emisiones antropogénicas y el calentamiento global están consideradas como las principales causas de pérdida de biodiversidad global. Las comunidades de HMA no están exentas de tales amenazas, y en los últimos 20 años, ha habido muchos informes de una reducción de la diversidad de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en sitios que experimentan diversos tipos de perturbaciones antropogénicas, en comparación con los hábitats naturales (1).

Los proyectos de conservación deben tener en cuenta las estrategias diferentes para preservar los HMA para las generaciones futuras, por ejemplo, el establecimiento y mantenimiento de las colecciones ex situ y la evaluación de la ocurrencia AMF en los espacios protegidos, con el objetivo de promover la creación de las reservas de germoplasma in situ(2).

Los HMA; phylum Glomeromycota, son omnipresentes y una antigua asociación simbiótica (~ 460 años millón). Ellos forman una simbiosis mutualista con alrededor del 80% de las plantas terrestres y constituyen una parte significativa de la biomasa microbiana del suelo y el carbono orgánico en muchos ecosistemas (4).

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) representan un monofilético linaje de hongos (Glomeromycota) que beneficia a los ecosistemas terrestres en todo el mundo mediante el establecimiento de una asociación íntima con las raíces de la mayoría de las plantas terrestres: la simbiosis micorriza. esta relación resulta en una mejora de la adquisición de nutrientes (por ejemplo, fosfato y nitratos) en el suelo por los socios de la planta y, en cambio, permite que el AMF para obtener el carbono fijo fotosintéticamente fuentes (por ejemplo, azúcares) necesarios para su supervivencia y propagación (6-8).

En México, los HMA estudios han evaluado las respuestas ecofisiológicas y ecológicas de las plantas, sin embargo, la taxonomía e *in situ* los aspectos ecofisiológicos(4), así como su papel en los ciclos biogeoquímicos o en relación con la fertilidad del suelo, la productividad, el secuestro de carbono / depósitos, la diversidad vegetal y provisión de alimentos, han recibido menos atención (4, 5).

Procedimiento Experimental

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización del área

El estudio se llevara a cabo en la Reserva Ecológica Cañón y Sierra de Jimulco, municipio de Torreón, Coahuila, México, que se localiza entre las coordenadas geográficas 25.0069444 de latitud Norte y 103.2525 Oeste y con una altitud de 1365 msnm. (Figura 1). El clima presente en la zona pertenece a la clasificación Bwhw(e) que se refiere a clima seco, con temperatura media anual de 18 °C, cuya estación más seca es en invierno, y el mayor porcentaje de lluvia es en verano, con una precipitación media anual que no rebasa los 200mm al año según CONAGUA (2003) en (9).

Muestreo

Muestras de suelo (0-30 cm) se obtendrán con un barreno de 5 cm de diámetro. Estas se toman de la rizósfera de las especies seleccionadas de tamaño de tallo similares se recogieron en cada sitio (Cuadro 1). De cada planta, se recogió aproximadamente 100 g de suelo a una profundidad de 0-30 cm. Los cuales serán transportados a una temperatura a 4 °C. Una porción de suelo se secara al aire y se tamizará tamizada (2 mm de malla) para la caracterización físico-química. Las raíces se obtendrán de la raíz principal de la plantas. Estas serán depositadas en un recipiente de vidrio conteniendo KOH al 10% hasta su análisis en el laboratorio.

Cuadro 1.- Familia, especie y nombre común de las plantas a muestreare por área núcleo.

Familia	Especie	Nombre común
Zona A		
Cactaceae	<i>Opuntia imbricata</i>	Cardenche
Verbenaceae	<i>Lippia graveolens</i>	Orégano
Zygophyllaceae	<i>Larrea tridentata</i>	Gobernadora
Zona B		
Bromeliaceae	<i>Hechtia glomerata</i>	Guapilla
Fabaceae	<i>Acacia berlandieri</i>	Frijolillo
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia antisyphilitica</i>	Candelilla
Zona C		
Agavaceae	<i>Agave lechuguilla</i>	Lechuguilla
Boraginaceae	<i>Cordia parvifolia</i>	Vara prieta, Sanjuanita
Euphorbiaceae	<i>Jatropha dioica</i>	Sangre de grado

Aislamiento de las esporas e identificación de HMA

Para extraer las esporas del suelo se utilizó el protocolo de tamizado húmedo y decantación (10), seguido de centrifugación en sacarosa. Las esporas obtenidas del tamizado se decantaron en papel filtro, de donde se tomaron para montarlas en preparaciones usando alcohol polivinílico glicerol con y sin reactivo de Melzer (1:1 v/v). El conteo e identificación se efectuaron en un microscopio compuesto colocando una base cuadrículada en las preparaciones. identificación taxonómica se realizó con base en la forma, tamaño y color de las esporas; grosor, número y ornamentación de las capas de la pared y forma y acoplamiento de la hifa de sostén; se tomaron como base a las descripciones originales y la descripción propuesta por la International Collection of Vesicular and Arbuscular Mycorrhizal Fungy y vesiculares-arbusculares, <http://invam.caf.wvu.edu> ; Blaszkowski AMF sitio www.agro.ar.szczecin.pl/jblaszkowski) (11).

Porcentaje de colonización en raíz.

Se determinara mediante el método de Brundrett et al. (1996). En el laboratorio las raíces se lavan para quitarles los residuos de suelo y aclararlas en una solución de KOH al 10 % a temperatura ambiente durante 24 hrs., posteriormente las raíces se lavaron nuevamente con agua corriente y se cortaron en segmentos de 0.5 a 1.0 cm de longitud, serán teñidas con azul de tripano al 0.05 % y se enjuagará con ácido láctico al 50% para eliminar el exceso de colorante, posteriormente para la determinación del porcentaje de colonización se montaran las minillas con 20 raíces, las cuales serán observadas bajo un microscopio compuesto para cuantificar el número de raíces colonizadas y tras formarlo a % de colonización mediante la siguiente fórmula:

% de colonización = número de raíces colonizadas / número total de raíces revisadas x 100.

Caracterización física y química del suelo

Se realizará análisis de parámetros físicos y químicos: pH, textura, conductividad eléctrica, materia orgánica, fósforo extraíble, nitrógeno inorgánico y agregados hidroestables.

En el análisis de las especies y las comunidades de HMA

Se base a los datos, se calculará número total de esporas que se encuentran en 100 g de peso seco de suelo; la riqueza de especies, número total de diferentes taxones de HMA registrados en 100 g de peso en seco de suelo, la frecuencia de ocurrencia (FC) porcentaje de muestras de las que se aisló un taxón de HMA en particular, y el índice de diversidad de Shannon es la abundancia relativa de la especie i en comparación con todas las especies identificadas por muestra.

Análisis estadístico

El número de esporas de cada familia de Glomeromycota en los tipos de vegetación se transforma en $[\log_{10}(\text{número de esporas}) + 1]$ valores. Para determinar la correlación de los números de esporas de especies de las tres áreas núcleo, el factor edáfico, un análisis de correspondencia canónica (CCA), un modelo unimodal para el análisis no lineal multivariado de gradiente, se empleará. El análisis de los datos de la comunidad, sobre la base de los valores de esporas de números para todos los taxones de HMA. CCA se realizó con el paquete estadístico multivariante (MVSP 3.1) y TWINSpan con PC-ORD 4.25. La riqueza de especies, índice de diversidad y de las variables fisicoquímicas del suelo se analizarán mediante el análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Las medias serán compuestas, utilizando la diferencia menos significativa de Fisher (LSD) (5% y 1%). Un modelo ANOVA mixto se realizará para evaluar las diferencias en el número de esporas en las tres áreas núcleo y las estaciones.

Cronograma de actividades.

Actividad a realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Colecta de muestras primavera			x									
Extracción, conteo e identificación de esporas					x	X						
Colecta de muestras verano							x					
Extracción, conteo e identificación de esporas								x	X			
Colecta de muestras otoño										X		
Extracción, conteo e identificación de esporas											X	x
Colecta de muestras invierno	X											
Extracción, conteo e identificación de esporas		x	x									
Caracterización física y química del suelo	x			x			x			x		
Integración de resultados 2014	x	x	x	x	x							

5.-Productos esperados

Una tesis de doctorado
Dos tesis de licenciatura
Colección de micorrizas
Artículo científico

6.-Literatura citada

1. Turrini A, Giovannetti M. Arbuscular mycorrhizal fungi in national parks, nature reserves and protected areas worldwide: a strategic perspective for their in situ conservation. *Mycorrhiza*. 2012 Feb;22(2):81-97.
2. Evelin H, Kapoor R, Giri B. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Ann Bot (Lond)*. 2009 Oct 8.
3. Blanco-Contreras E., Valencia-Castro CM, Orona-Pereyra A, Morales-Hernández JA. Plan de manejo de la Reserva Ecológica Cañón y Sierra de Jimulco. 2003:127.
4. Montaña N, Alarcón A, Camargo-Ricalde S, Hernández-Cuevas L, Álvarez-Sánchez J, González-Chávez M, et al. Research on arbuscular mycorrhizae in Mexico: an historical synthesis and future prospects. *Symbiosis*. 2012;57(3):111-26.
5. Smith SE, Smith FA. Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. *Mycologia*. 2012 Jan-Feb;104(1):1-13.
6. Corradi N, Bonfante P. The arbuscular mycorrhizal symbiosis: origin and evolution of a beneficial plant infection. *PLoS Pathog*. 2012 Apr;8(4):e1002600.
7. Gianinazzi S, Gollotte A, Binet MN, an Tuinen D, Redecker D, Wipf D. Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*. 2010 Nov;20(8):519-30.
8. Cangahuala-Inocente GC, Da Silva MF, Johnson JM, Manga A, van Tuinen D, Henry C, et al. Arbuscular mycorrhizal symbiosis elicits proteome responses opposite of P-starvation in SO4 grapevine rootstock upon root colonisation with two *Glomus* species. *Mycorrhiza*. 2011 Aug;21(6):473-93.
9. MORALES LD. "FENOLOGÍA Y EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DE LOS ACEITES EN PLANTAS DE ORÉGANO (*Lippia graveolens* H.B.K.)". EN LA COMARCA LAGUNERA. TORREÓN, COAHUILA: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO; 2005.
10. Gerdemann JW, Nicolson TH. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycolical Society*. 1963;45:235-44.
11. INVAM. Internacional Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungy2011.