CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE MICORRIZA ARBUSCULAR ASOCIADA A Agave potatorum Zucc. CON POTENCIAL DE USO AGRONÓMICO

[MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL ASSOCIATED TO Agave potatorum Zucc. WITH AGRONOMIC POTENTIAL]

José Luis Hernández-Morales^{1§}, Claudia López-Sánchez², Felipe de Jesús Palma-Cruz³

¹Estudiante de Posgrado, Instituto Tecnológico de Oaxaca (ITO), Oaxaca, Oax., México. ²Profesora-Investigadora, Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca (ITVO). Oaxaca, Oax., México. ³Profesor-Investigador, ITO, Oaxaca, Oax., México. [§]Autor para correspondencia: (joseluishmorales@gmail.com, claudina1963@gmail.com, felipepalmacruz@gmail.com)

RESUMEN

Los hongos formadores de micorriza arbuscular (HMA) juegan un papel significativo en la nutrición de las plantas hospederas, pero solo algunas especies se han utilizado como inoculantes para diversos cultivos agrícolas. El objetivo de este trabajo fue caracterizar morfológicamente los géneros de HMA del maguey papalomé (*Agave potatorum* Zucc.) con potencial de uso agrícola y como una alternativa en la práctica de la agricultura sostenible. En 2013, se realizaron colectas de suelo micorrizado en San Juan Tamazola, Nochixtlán (M1) y Villa de Tamazulapam, Teposcolula (M2), pertenecientes a la Mixteca Oaxaqueña. Las esporas se aislaron del suelo y fueron separadas de acuerdo a su tamaño, forma, color y la ornamentación de la hifa de sostén, posteriormente se fijaron en laminillas. Los resultados fueron cotejados con los géneros reportados en la página del INVAM. Para el sitio M1 se identificaron cinco especies del género *Glomus* y dos especies de *Gigaspora*, en contraste el sitio M2 solo presentó dos especies del género *Glomus*. Este trabajo reporta dos géneros para la Mixteca, sin embargo hace falta identificar con mayor precisión a las especies; en esta región no hay reportes de HMA en *Agave potatorum*, siendo estos los primeros registros.

Palabras clave: Agave potatorum, Gigaspora, Glomus, HMA, Mixteca.

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) play a significant nutritional role of host plants, but only some species have been used as inoculants for various agricultural crops. The aim of this study was to morphologically characterize AMF genera in papalome maguey (*Agave potatorum* Zucc.) with potential for agricultural use and as an alternative to the practice of sustainable agriculture. In 2013, collections of soil mycorrhiza from San Juan Tamazola, Nochixtlán (M1) and Villa Tamazulapam, Teposcolula (M2), belonging to the Oaxacan Mixteca were sampled. Spores were isolated from the soil and were separated according to their size, shape, color and hyphal ornamentation supporting, then they were fixed on slides. The results were collated with genera reported in INVAM Web page. For the M1 site five species of the genus *Glomus* and two species of *Gigaspora* were identified, unlike the M2 site presented only two species of *Glomus*. These

Recibido: 30 de octubre de 2014. Aceptado: 30 de enero de 2015.

paper reports two genera to the Mixteca, however it is important identify precisely the species; in this region there are no reports of AMF in *Agave potatorum*, which are the first records.

Index words: Agave potatorum, Gigaspora, Glomus, AMF, Mixteca.

INTRODUCCIÓN

Los Hongos Formadores de Micorriza Arbuscular (HMA) son organismos eucariotas haploides recientemente reubicados al Phylum Glomeromycota (Schüßler *et al.* 2001), poseen hifas cenocíticas dentro como fuera de la raíz, las esporas son la principal estructura de propagación que utilizan. Pérez (2001) considera que los HMA son simbiontes biótrofos obligados, que sólo pueden completar su ciclo de vida cuando colonizan las raíces de la planta hospedera. Estos biótrofos establecen asociaciones mutualistas con aproximadamente el 80% de las plantas terrestres susceptibles a esta simbiosis (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007).

Azcón y Barea (1980), reconocen que los HMA estimulan el crecimiento, desarrollo y nutrición de las plantas, especialmente en suelos de moderada y baja fertilidad, principalmente por que las hifas externas incrementan la superficie de adsorción, más allá de la zona de agotamiento que rodea a la raíz. Se conocen además otros beneficios de los HMA como la protección contra organismos patógenos de la raíz especialmente contra nematodos (*Meloidogyne*) y hongos (*Phytophthora infestans* y *P. capsici*), ya que desencadenan mecanismos de defensa en los que intervienen proteínas relacionadas con la patogénesis.

Más específicamente, se ha observado que los HMA contribuyen con el crecimiento y nutrición de especies del género *Agave* con las que se asocian de manera natural. Pimienta-Barrios *et al.* (2009), observaron que plantas de *Agave tequilana* inoculadas con especies nativas de Hongos Formadores de Micorriza Arbuscular aumentaron significativamente la fotosíntesis (asimilación diaria de CO₂) respecto al testigo. Otro efecto similar fue reportado por Quintos-Escalante *et al.* (2008) en *A. victoriae-reginae*, donde las pantas inoculadas con esporas de cepas nativas y comerciales de HMA, dieron mejores resultados respecto al testigo en las variables ancho de hoja, dosel de la planta, número de hojas, peso fresco de la raíz y peso seco del tallo. Por su parte, Robles-Martínez *et al.* (2013), reconocieron que plantas de *A. angustifolia* inoculadas con HMA, mostraron un incremento en el número y longitud de las raíces.

La identificación de los HMA se ha realizado convencionalmente mediante la caracterización morfológica de sus esporas, considerando su tamaño, número de capas por espora, número de capas por lámina, ornamentación de la hifa de sostén, forma y tamaño del arbúsculo, entre otras. Las primeras familias y géneros de este grupo de hongos, fueron diferenciados fundamentalmente por la unión de la hifa y el modo de formación de la espora, en tanto que las subestructuras de las paredes de las esporas han servido para la identificación de las especies (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2000). Cabe señalar que el uso exclusivo de estas características morfológicas para su taxonomía, no permite la identificación precisa de las especies y por ende de la verdadera diversidad de los HMA, ya que incluso a nivel de una sola especie vegetal, la ausencia de esporulación al momento del muestreo, imposibilita la determinación real del total de especies de biotrófos, ya que no es seguro contar con las estructuras requeridas para tal propósito.

Recientemente se utilizan técnicas de Biología Molecular que permiten reconocer una mayor diversidad en el número de especies y permiten reconocer de mejor manera la distribución de los biótrofos en el suelo (Redecker, 2006). Así mismo, se han generado técnicas moleculares para determinar con mayor veracidad la identidad taxonómica específica e infra-específica de los HMA.

Es importante resaltar que la información que se tiene respecto a las especies de HMA en Oaxaca, es relativamente escasa, y por lo tanto se busca contribuir con información sobre la riqueza de hongos micorrízicos arbusculares presentes en la rizosfera de *Agave potatorum* Zucc. mediante la determinación taxonómica de los géneros y especies de HMA en la región Mixteca, utilizando básicamente el tamaño y la morfología de sus esporas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo el año 2013, en el laboratorio de suelos del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca (ITVO). Las muestras de suelo de la rizosfera de *Agave potatorum* se obtuvieron en los Municipios de San Juan Tamazola, Distrito de Nochixtlán y Villa Tamazulápam del Progreso, Distrito de Teposcolula. El primero de ellos se localiza en las coordenadas 17° 09' de latitud norte y 97° 13' de longitud oeste, a 2,080 msnm. Presenta un rango de temperatura promedio oscila entre los 16 y los 22 °C. La precipitación anual es de 800–1,500 mm, predominando el clima semicálido subhúmedo con lluvias en verano (en el 73.08% del territorio), templado subhúmedo con lluvias en verano, más húmedo (en el 25.98%) y templado subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media (únicamente en el 0.94% del territorio). En tanto que el segundo de los municipios está localizado en las coordenadas 17° 40' de latitud norte y 97° 34' de longitud oeste, a una altitud de 2,200 m. La temperatura media anual es de 16 °C y la temperatura mínima es de 6 °C y la máxima de 24 °C; el promedio anual de precipitación oscila entre los 400 y 600 mm, el clima predominante es templado-seco (INEGI, 2014).

El muestreo fue completamente al azar y se realizó en cinco individuos jóvenes de aproximadamente 3 años de edad en cada sitio. De cada individuo, se tomaron a su vez dos submuestras de 250 gramos, a una profundidad aproximada de 20 cm. Las submuestras se mezclaron para obtener una muestra compuesta de la rizosfera de cada individuo, posteriormente se mezclaron hasta contar con un kilogramo de suelo como muestra representativa para cada uno de los sitios muestreados, la cual se dejó secar a la sombra, se depositó en bolsas de papel y fueron mantenidas en refrigeración a 4 °C hasta su análisis (Modificado de Carballar, 2009).

Para la extracción de las esporas de los HMA asociados con *Agave potatorum* Zucc., se utilizó el método de centrifugación con flotación en azúcar de Jenkins (1964). También, se hicieron preparaciones permanentes con esporas montadas en Alcohol Polivinílico-Glicerol (PVLG) y PVLG + reactivo de Melzer. Una vez aisladas y separadas, las esporas se prepararon las laminillas de acuerdo con la técnica propuesta por Schenck y Pérez (1990). Posteriormente se observaron al microscopio para su identificación.

Las características que se utilizaron para determinar el género al que pertenecían los HMA, fueron: el tamaño de la espora, la ornamentación de la hifa de sostén, el color presentando cuando se observaron con el microscopio estereoscópico, la forma de la espora, y la coloración de las capas y de las láminas de la espora, al reaccionar con el reactivo de Melzer. Los resultados fueron

cotejados con las descripciones que aparecen en la página electrónica del INVAM (INVAM, 2014) (Figura 1).

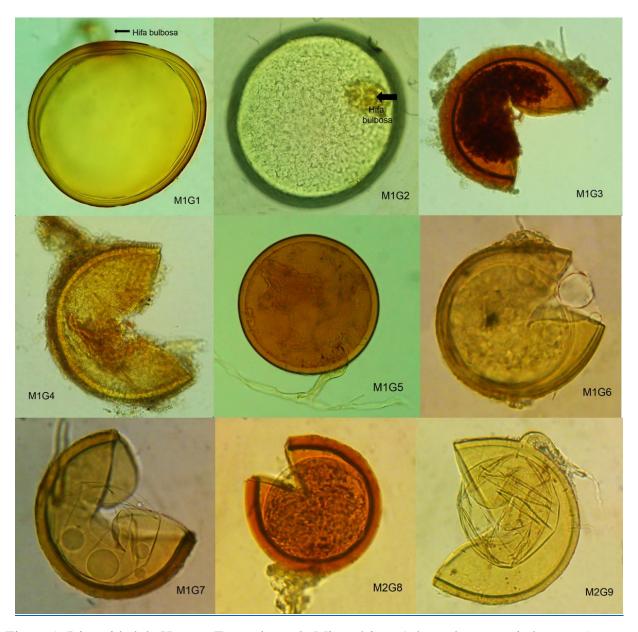


Figura 1. Diversidad de Hongos Formadores de Micorrícicos Arbusculares asociados con *Agave potatorum* en la Mixteca Oaxaqueña.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante la caracterización morfológica de las esporas de los HMA en estudio, se determinó que pertenecen a los géneros *Glomus* y *Gigaspora*, con nueve posibles especies, correspondientes a las familias *Glomeraceae* y *Gigasporaceae*, respectivamente (Cuadro 1).

Como se observa el Cuadro 1, en el sitio de Muestreo 1 (M1), se encontraron dos géneros y siete posibles especies, en comparación con el sitio de Muestreo 2 (M2) en el cual solo se encontró un género y dos posibles especies.

Cuadro 1. Familias y Géneros de Hongos Micorrícicos Arbusculares presentes en la rizosfera de *Agave potatorum*.

Clave	Familia	Género
M1G1	Gigasporaceae	Gigaspora sp. 1
M1G2		Gigaspora sp. 2
M1G3		Glomus sp. 1
M1G4		Glomus sp. 2
M1G5	Glomeraceae	Glomus sp. 3
M1G6		Glomus sp. 4
M1G7		Glomus sp. 5
M2G8	Glomeraceae	Glomus sp. 6
M2G9	Giomeraceae	Glomus sp. 7

M1 y M2 se refieren a los sitios de muestreo; G1 y G2 corresponden a esporas del género *Gigaspora*, en tanto que G3 a G9 a esporas del género *Glomus*.

Características morfológicas de los HMA encontrados

M1G1 (*Gigaspora* sp.1) posee esporas redondas a ovoides, de color blanco-cremoso a hialinas (Figura 2-A) mayores a 250 μm; la hifa de sostén es bulbosa curvada y presenta un espacio, mostrado en el detalle de la figura 2-B, que atraviesa la primera capa de la espora. Presenta dos capas (Figura 2-C; 1C y 2C), la primera capa está formada de tres laminas (Figura 2-C; L1, L2 y L3), la primera lámina es gruesa y rígida, en tanto que la segunda es delgada y hialina; la tercera lámina reaccionó con el reactivo de Melzer (Figura 2-C); la segunda de las capas referidas, está formada a su vez por dos laminas hialinas, las cuales también reaccionaron con el reactivo de Melzer (Figuras 2-C; L4 y L5).

M1G2 (*Gigaspora* sp. 2) posee esporas redondo-ovoides (Figura 3-A), mayores a 250 μm, de color blanco, con hifas de sostén bulboso-curvadas (Figuras 3-B) que atraviesa la primera capa de la espora. Las esporas están formadas por dos capas (Figura 3-C; 1C y 2C), las cuales reaccionan con el reactivo de Melzer (Figura 3-B), la primera capa consta de dos laminas, mismas que se tiñen con el reactivo de Melzer (Figura 3-C; L1 y L2); la segunda capa, consta de una lámina gruesa que también se tiñe con el reactivo de Melzer.

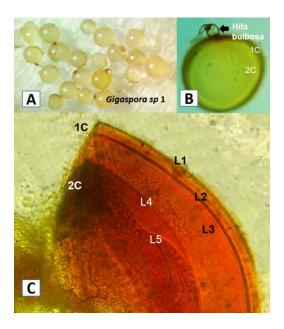


Figura 2. Detalles de las esporas del HMA correspondiente al género Gigaspora sp.1.

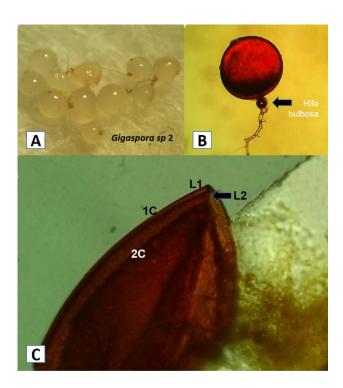


Figura 3. Detalles de las esporas del HMA correspondiente al género Gigaspora sp. 2.

M1G3 (*Glomus* sp.1) cuenta con esporas individuales, esféricas, de color café, mayores a 150µm (Figuras 4-A), con hifa de sostén curva (Figura 4-B). Las esporas presentan tres capas (Figuras 4-C; 1C, 2C y 3C), las cuales se unen con la hifa de sostén, la primera es una capa mucilaginosa que se degrada con forme la espora madura (Figura 4-B y 4-C); la segunda capa está formada por dos láminas compactadas y solo la segunda lámina de esta capa es la que se tiñe débilmente con el reactivo de Melzer (Figura 4-C; L2), la tercera capa consta de una sola lámina y no se tiñe con el reactivo de Melzer.

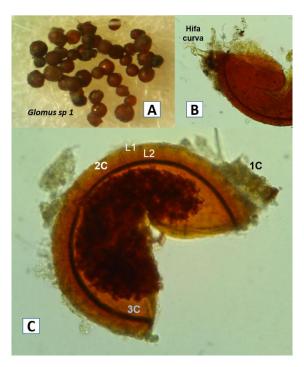


Figura 4. Detalles de las esporas del HMA correspondiente al género Glomus sp.1.

M1G4 (*Glomus* sp.2) posee esporas esféricas de color ámbar-café, mayores a 150 μm (Figura 5-A), presenta hifa de sostén (Figura 5-B). Consta de tres capas (Figura 5-C), ninguna de las cuales tiñó con el reactivo de Melzer; la primera es una capa mucilaginosa que se desprende (Figura 5-D); mientras que la segunda capa está formada de dos láminas compactas (Figura 5-E); la segunda de dichas láminas es rígida, mientras que la tercera lámina es hialina y delgada (Figura 5-F).

M1G5 (*Glomus* sp.3) tiene esporas redondo-subovoides de color café, mayores a 90 μm (Figura 6-A), con formación de esporas intercalares (Figura 6-B). Consta de cuatro capas, todas las cuales se unen con la hifa sustentora (Figura 6-B), la primera es una capa mucilaginosa que se desprende al madurar la espora (Figura 6-C; 1C); la segunda capa está constituida única lámina gruesa (Figura 6-C; 2C); la tercer capa consta de dos laminas que no se tiñen con el reactivo de Melzer (Figura 6-C; L1 y L2); la cuarta capa es hialina delgada.

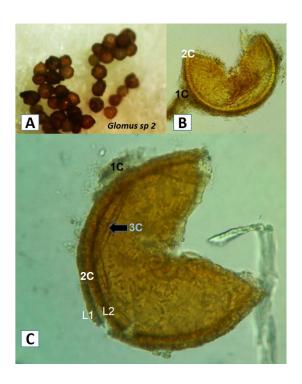


Figura 5. Detalles de las esporas del HMA correspondiente al género Glomus sp. 2.

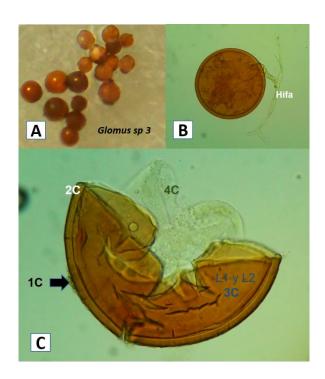


Figura 6. Detalles de las esporas del HMA correspondiente al género Glomus sp. 3.

M1G6 (*Glomus* sp.4) cuenta con esporas redondo-subovoides, mayores a 90 µm de color café claro (Figura 7-A), con hifas de sostén. Las esporas están cubiertas por tres capas (Figura 7-B), la primera de las cuales es mucilaginosa; la segunda está constituida por un arreglo de cuatro láminas hialinas (Figura 7-C; L1, L2, L3 y L4); por su parte la tercera capa está formada por tres láminas hialina delgadas, ninguna reacciona con el reactivo de Melzer (Figura 7-C; L5, L6 y L7).

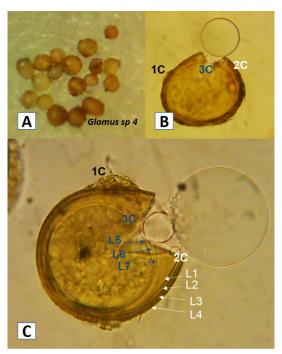


Figura 7. Detalles de las esporas del HMA correspondiente al género Glomus sp. 4.

M1G7 (*Glomus* sp.5) tiene esporas redondo-ovoides, de color blanco-amarillo, mayor a 45 μm (Figura 8-A), formadas en esporocarpos laxos. Las esporas cuentan con tres capas (Figuras 8-B y 8-C), las cuales se unen con la hifa de sostén, la primera de las capas es mucilaginosa y se deprende al madurar (Figura 8-B; 1C), es la única que reacciona con el reactivo de Melzer; la segunda de las capas es rígida y consta de dos láminas (Figura 8-B; L1 y L2), la primera es hialina y delgada en tanto que la segunda es gruesa y rígida; la tercera de las capas es hialina y flexible (Figura 8-B; 3C).

M2G1 (*Glomus* sp.6) cuenta con esporas redondo-ovoides (Figuras 9-A, izquierda), de color ámbar, mayores a 90 μm, las cuales se originan en un esporacapo laxo. Las esporas están constituidas por tres capas, las cuales se unen con la hifa de sostén (Figura 9-B). La primera, es una capa mucilaginosa que se desprende al madurar la espora y reacciona con el reactivo de Melzer (Figura 9-B; 1C); la segunda es una capa rígida, gruesa (Figura 9-C; 2C); mientras que la tercera de las capas es hialina (Figura 9-C; 3C).

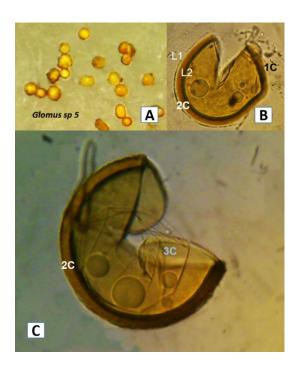


Figura 8. Detalles de las esporas del HMA correspondiente al género *Glomus* sp. 5.

M2G2 (Glomus sp.7) tiene esporas redondas-ovoides, de color amarillo claro, mayores a 90 μm (Figura 10-A), mismas que se originan en esporocarpos compactos. Las esporas están constituidas por tres capas (Figura 1-C), las cuales se unen con la hifa de sostén; la primera de las capas es mucilaginosa y se tiñe con el reactivo de Melzer (Figura 2-C; 1C); la segunda capa es gruesa (Figura 3-C; 2C); y la tercera es una capa delgada y hialina (Figura 4-B y 7-C).

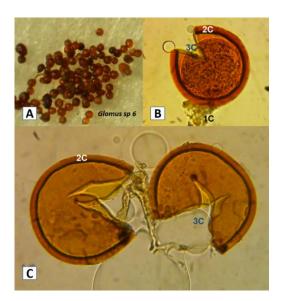
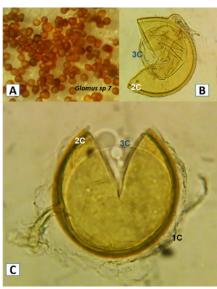


Figura 9. Detalles de las esporas del HMA Figura 10. Detalles de las esporas del HMA correspondiente al género Glomus sp. 6 y 7.



correspondiente al género Glomus sp. 7.

De los estudios reportados para Oaxaca sobre Hongos Micorrizas Arbusculares en especies de *Agave*, López-Guerra (2006) reportó la presencia de 19 especies de HMA pertenecientes a siete géneros correspondientes a tres familias, en cultivos de *Agave angustifolia* Haw., en Tlacolula, San Baltazar Guelavila y Matatlán. Por su parte, Guadarrama-Chávez *et al.* (2007), reportaron 25 especies pertenecientes a siete géneros y seis familias de HMA, en la región de Nizanda.

Carballar (2009), identificó 25 especies de HMA pertenecientes a siete géneros y cinco familias, en *Agave potatorum*, *A. karwinski* y *A. marmorata* en el distrito de Tlacolula, mientras que Bautista-Martínez (2012), reportó cinco especies correspondientes a tres géneros, y tres familias de HMA, en *Agave potatorum*, en la comunidad de San Lucas Quiaviní, Tlacolula.

La diversidad de Hongos Micorrícicos Arbusculares observados en este estudio (Figura 1), sugieren que *A. potatorum* establece simbiosis con más de una especie de HMA, y este hecho no afecta al desarrollo de la planta hospedera. Y ya que la diversidad y abundancia de los HMA está regida principalmente por los factores edáficos y climáticos más que por la planta huésped, el suelo calizo de M2 explica por qué la diversidad es menor que en M1. También es importante destacar que las especies de HMA cuyas esporas se originan en esporocarpos, laxos como en M2G8 y compactos como en M2G9 (Figura 1), indican que pueden ser el resultado de la estrategia de protección que adoptan los HMA ante la naturaleza química del suelo.

No hay que olvidar que *Agave potatorum* es una planta de ecosistemas áridos y semiáridos, que habita sitios rocosos con condiciones de estrés hídrico y nutrimental, en donde es imprescindible contar con estrategias, como la simbiosis con HMA, para lograr el éxito durante las etapas de crecimiento y reproducción, ya que el micelio extra-radical alcanza a explorar grandes volúmenes de suelo a mayores profundidades de las que alcanzarían las simples raíces de las plantas del maguey. Si bien cada especie de HMA no tiene las mismas capacidades para transportar nutrientes ni los mismos hábitos de crecimiento, esto explica porque existe una amplia diversidad de especies dentro de la simbiosis con la misma planta, ya que son diferentes los beneficios que ofrece cada especie de hongo.

CONCLUSIONES

En la Mixteca Oaxaqueña no existen reportes sobre los Hongos Micorrícicos Arbusculares asociados a *Agave potatorum* Zucc. Se determinaron dos géneros y siete posibles especies para San Juan Tamazola, Nochixtlán y un género con dos posibles especies para Villa Tamazulapam del Progreso, Teposcolula. Las nueve especies encontradas, tienen potencial de uso para cultivos de importancia agronómica, como una alternativa sustentable para favorecer la productividad de los cultivos, principalmente en suelos de moderada y baja fertilidad.

LITERATURA CITADA

Alarcón, A y R. Ferrera-Cerrato. 2000. Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular, Mundi Prensa, Colegio de Postgraduados, Montecillos, Texcoco, México. pp. 5-10.

Azcón G., C. y J.M. Barea. 1980. Micorrizas. Investigación y Ciencia 47: 8–16.

- Bautista-Martínez, Y. 2012. Efectividad de hongos micorrízicos arbusculares aislados de la rizosfera de *Agave potatorum* Zucc. en el crecimiento de *Carica papaya* L. Oaxaca, México. pp. 32-44.
- Carballar, H. S. 2009. Variación temporal de la diversidad de hongos de micorriza arbuscular y el potencial micorrícico en especies silvestres de *Agave* en Oaxaca. Tesis de Maestría, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Regional Unidad-Oaxaca. pp 26-45.
- Ferrera-Cerrato, R. y A. Alarcón. 2007. Microbiología agrícola. Editorial Trillas. México, D. F. pp. 90-114.
- Guadarrama-Chávez, P., S. L. Camargo-Ricalde, L. Hernández-Cuevas y S. Castillo-Argüero. 2007. Los hongos micorrizógenos arbusculares de la región de Nizanda, Oaxaca, México. Bol. Soc. Bot. Méx. 81: 131-137.
- INEGI. 2014. http://www.inegi.org.mx/. (Consultado: 4/12/2014).
- INVAM. 2014. http://invam.wvu.edu/. International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi). (Consultado: 4/12/2014).
- Jenkins, W. R. 1964. A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter 48(9): 662–665.
- López-Guerra, I. F. 2006. Hongos de micorriza arbuscular en diferentes sistemas de producción de maguey mezcalero (*Agave angustifolia* Haw) en CIIDIR IPN Unidad OAXACA. pp 82-83.
- Pérez S., S. 2001. Prospección y aplicación de micorrizas en especies vegetales autóctonas del matorral, para favorecer la revegetación de ecosistemas mediterráneos degradados. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España. pp. 27.
- Pimienta-Barrios, E., J. Zañudo-Hernández, y E. López-Alcocer. 2009. Efecto de las micorrizas arbusculares en el crecimiento, fotosíntesis y anatomía foliar de plantas jóvenes de *Agave tequilana*. Acta Botánica Mexicana 89: 63-78.
- Quintos-Escalante, M., H. Montaño-Rodríguez y A. Jaramillo-Santos. 2008. Efecto de formación endomicorrizica vesiculo arbuscular en el crecimiento de plántulas de *Agave victoriae-reginae* T. Moore. CIIDIR IPN Unidad DURANGO. pp. 5.
- Redecker, D. 2006. Molecular diversity of arbuscular mycorrizal fungal communities. Monte Verita. Ascona, Switzerland. 51 p.
- Robles-Martínez, M. de L., C. Robles, F. Rivera-Becerril, Ma. del P. Ortega-Larrocea y L. Pliego-Marín. 2013. Inoculación con consorcios nativos de hongos de micorriza arbuscular en *Agave angustifolia* Haw. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 6: 1231-1240.
- Schenck, N.C. e Y. Pérez. 1990. Manual for the identification of mycorrhizal fungi. 3th ed. Synergistic Publications, Gainesville.
- Schüßler, A., D. Schwarzott and C. Walker. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. Mycological Research 105(12): 1413-1421.