

Utilización del ADN ribosomal 18S para la identificación de Hongos Micorrízicos Arbusculares que colonizan plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.)

Núria Gómez Dorantes, Miguel Martínez Trujillo, Yazmín Carreón Abud✉

Laboratorio de Genética y Microbiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.

Resumen

En el presente trabajo se establecieron condiciones para identificar especies de Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) asociados a raíces de plantas de aguacate, mediante el análisis de las secuencias de ADN ribosomal y correlacionarlos con los HMA presentes en un suelo como esporas. La extracción y purificación de ADN genómico se realizó mediante el protocolo indicado por el Mini Kit DNeasy (Qiagen). Para la evaluación del ADN obtenido a partir de raíces se usó la técnica de PCR utilizando los primers universales para eucariontes (NS1-ITS4) que permitan inicialmente la amplificación del gen de la subunidad ribosomal 18S (ADNr 18S), y posteriormente mediante oligonucleótidos específicos (VAGIGA, VAGLO, VAACAU en combinación con NS31, amplificar secuencias específicas de HMA (PCR anidada), de los diferentes géneros y posibles especies de HMA, que colonizan la raíz. Los productos amplificados de la PCR anidada se purificaron y fueron verificadas por secuenciación. Las secuencias generadas en este trabajo fueron comparadas con las especies registradas en el BEG (La Banque Européenne des Glomales) y en el National Center of Biotechnology Information (NCBI). Se encontraron índices elevados de colonización micorrízica (80-100%). Las secuencias amplificadas permitieron determinar que *Glomus geosporum* se encuentra colonizando plantas de aguacate.

Palabras clave: *Micorrizas, aguacate, identificación molecular.*

Abstract

In this work, conditions were established to identify species of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) associated with avocado plant roots by analysis of ribosomal DNA sequences and correlate with HMA present in the soil as spores. Extraction and purification of genomic DNA was performed using the protocol indicated by the DNeasy Mini Kit (Qiagen). For evaluation of DNA obtained from the roots was used PCR using universal primers for eukaryotes (NS1-ITS4) initially allowing the amplification of the gene for ribosomal subunit 18S (18S rDNA), and subsequently through specific oligonucleotides (VAGIGA, VAGLO, VAACAU in combination with NS31, HMA amplify specific sequences (nested PCR), of different genera and species of HMA that colonize the root. Amplified nested PCR products were purified and verified by sequencing. The sequences generated in this study were compared with the species recorded in the BEG (La Banque Européenne des Glomales) and the National Center of Biotechnology Information (NCBI). There were found elevated rates of mycorrhizal colonization (80-100%). Sequences amplified have revealed that avocado plants are colonized by *Glomus geosporum*.

Keywords: *Mycorrhiza, avocado, molecular identification.*

Introducción

La micorriza arbuscular (MA) es una asociación benéfica establecida entre la mayoría de las plantas superiores descritas (>85%) con hongos del Phylum Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001). De manera natural, la micorriza se encuentra asociada en los hábitats donde el aguacate es nativo. Por los beneficios propios de esta asociación simbiótica mutualista (hongo-planta) en los últimos años se han realizado investigaciones para determinar el efecto de aislamientos de hongos MA sobre sistemas de producción agrícola, con el fin de lograr sistemas de producción sostenibles y competitivos (Azcón-Aguilar *et al.*, 1992).

El estudio de la diversidad de los HMA se ha visto limitado principalmente por su biotrofia obligada y por la imposibilidad de reproducirlos y estudiarlos en ausencia de la planta (Souza *et al.*, 2004). Aún cuando los HMA no son hospederos específicos

se ha visto que muestran afinidades con ciertas familias de plantas, esto debido a que son organismos muy diversos. Morton y Benny (1990) mencionan que se conocen poco más de 150 especies pertenecientes a seis géneros del orden Glomerales que forman asociación micorrízica con las plantas. Estudios recientes basados en el análisis de ADNr 18S, han demostrado la naturaleza monofilética de este grupo de hongos, lo que ha permitido incluirlos en un nuevo Phylum denominado Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001).

La identificación de las especies de HMA se basa en las características morfológicas de esporas asexuales remanentes en el suelo, siendo el tamaño, color, hifa de sostén, ornamentación y estructuras de la pared los principales criterios usados para la delimitación de especies (Bago *et al.*, 2000). Sin embargo, numerosas especies llegan a estar presentes en el suelo sin esporular, o bien presentan periodos erráticos de esporulación, por lo que no se pueden detectar mediante esporas.

La biología molecular ofrece varias herramientas para complementar los inconvenientes que genera el estudio morfológico-descriptivo de los HMA, entre éstas destaca la

✉ **Autor de correspondencia:** Yazmín Carreón Abud. Laboratorio de Genética y Microbiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. Email: ycabud@gmail.com.

técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) que permite identificar estos microorganismos (Rodríguez *et al.*, 2004).

Los genes ribosomales se han convertido en los materiales más ampliamente utilizados para la determinación de la diversidad de los HMA en los ecosistemas (Souza *et al.*, 2004). Para el caso particular de los HMA, Simón y colaboradores (1993) aplicaron técnicas de PCR al estudio de genes nucleares codificantes de la subunidad ADNr 18S, diseñando el primer oligonucleótido “específico” de los Glomerales, capaz de amplificar ADN fúngico en raíces colonizadas por este tipo de hongos. El gen ribosomal 18S es la región del genoma de los Glomeromycota (hongos formadores de MA) más secuenciada para estudios de filogenia (Simón *et al.*, 1993). Los datos filogenéticos obtenidos de las secuencias del ADNr 18S de diferentes hongos se han usado para fechar su origen entre 353 a 462 millones de años (Simón *et al.*, 1993), lo que corresponde al periodo en que las plantas primitivas colonizaron los continentes.

González (2005), realizó un análisis de la diversidad de los HMA presentes en el suelo de un agroecosistema de aguacate, mediante criterios morfológico-descriptivos para determinar cada una de las especies. Sin embargo, es un estudio que no refleja con precisión a las especies que colonizan las raíces de aguacate.

El presente trabajo tuvo como objetivo probar que los hongos micorrízicos arbusculares asociados a las raíces de aguacate pueden identificarse mediante el análisis de ADN ribosomal y que existe una correlación con los identificados en el suelo en etapa de esporas.

Materiales y métodos

Área de estudio

El área de estudio corresponde a una huerta de aguacate denominada “Las Parrillas”, localizada en la localidad de Jujucato en el municipio de Salvador Escalante Michoacán (101° 49' 5.0" W, 19° 24' 52.6" N) (INEGI, 1999).

Muestreo

Se estableció un área de 0.5 ha, se seleccionaron al azar 5 árboles de aguacate de los cuales se tomaron de manera directa tres muestras de raíces a una profundidad de 15-20 cm. Se seleccionaron todas aquellas raíces de apariencia sana y se lavaron con agua destilada estéril para remover los residuos contaminantes.

Colonización de raíces por HMA

Para la evaluación de la colonización micorrízica se utilizó la metodología de Phillips y Hayman (1970) con modificaciones de Sieverding (1983), empleando como colorante azul de Tripiano. Se utilizó el método de determinación del porcentaje de infección en lámina basado en los trabajos de Aristizábal (2004), empleando un total de diez raíces teñidas tomadas al azar por muestra. La colonización se evaluó teniendo en cuenta la presencia de vesículas, arbusculos y/o hifas cenocíticas (hifas) típicas de los HMA. Se calculó el porcentaje de colonización con base en la siguiente fórmula:

Porcentaje de colonización (%) = No. de campos con presencia de estructuras X 100 / No. total de campos observados.

Extracción de ADN genómico e iniciadores para amplificar ADNr 18S

La extracción y purificación de ADN genómico se realizó usando el protocolo indicado por el Mini Kit DNeasy (Qiagen). Para la amplificación del ADN se realizó una primera amplificación con el par de iniciadores NS1-ITS4 (Clapp, *et al.*, 1995; Simon *et al.*, 1993). Los iniciadores específicos para género (VAGIGA, VAGLO, VAACAU) se usaron en combinación con NS31 (Simon *et al.*, 1993). En la **Figura 1** se ilustra la posición del conjunto de iniciadores que han sido usados para discriminar entre los distintos géneros.

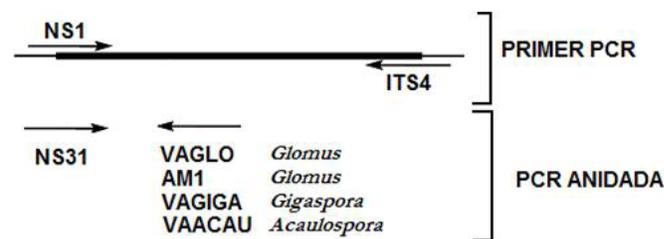


Figura 1. Diagrama de la localización de los primers usados y sus respectivas secuencias en el ADN ribosomal 18S (modificado de Simon *et al.*, 1993).

Condiciones de amplificación por PCR

Las diferentes reacciones para PCR se optimizaron utilizando un Termociclador programable, Mastercycler personal 5332 Eppendorf®. Se utilizó el Kit Taq DNA polymerase de la empresa Fermentas siguiendo las recomendaciones del fabricante, en un volumen final de 25 µl. Cada reacción contó con todos los componentes, con una concentración final en 25 µl de 1 µl de Taq DNA polimerasa, 2.5 µl de Taq buffer + (NH₄)₂SO₄, -MgCl₂, 3.5 µl MgCl₂, 2 µl de dNTP, 2 µl de cada iniciador y 2 µl de ADN. Para todas las reacciones se utilizó un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos y un paso final de extensión a 72°C durante 15 minutos y 35 ciclos. Los resultados de la amplificación fueron examinados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en Buffer TAE 1X, utilizando el marcador de peso molecular Gene Ruler DNA Ladder® (Fermentas), la cámara de electroforesis Owl® y la fuente de poder programable BRL/Life Technologies® Mod. 250, a 80 voltios por aproximadamente 45 minutos. Los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (UVP Transiluminator®).

Análisis de las secuencias

Todas las amplificaciones fueron secuenciadas usando los oligonucleótidos específicos de la amplificación anidada. Para la secuenciación se utilizó el método de terminación de cadenas (Sanger *et al.*, 1977), usando dideoxinucleótidos fluorescentes (ABI) y un secuenciador de DNA ABI PRISM™ 374. Se solicitaron los servicios del CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato. Las secuencias generadas en este trabajo se alinearon con aquellas de las especies registradas en el BEG (La Banque Européenne des Glomales) y en el NCBI, utilizando el algoritmo BLAST.

Resultados y discusión

Evaluación de la colonización micorrízica

Debido a lo difícil que es obtener ADN fúngico a partir de raíces, se realizó la evaluación del estado de colonización micorrízica, con la finalidad de garantizar la presencia de las estructuras fúngicas al interior de éstas. Se encontró una alta actividad micorrízica (>94% de colonización) de acuerdo con los valores representados en la **figura 2**, sin observarse diferencias significativas entre los 5 árboles, lo cual puede ser el resultado del establecimiento de poblaciones fúngicas bien adaptadas a las condiciones prevalecientes en el suelo de la huerta de aguacate, lo cual puede explicar la uniformidad en la colonización. La observación de la alta colonización micorrízica de raíces de aguacate, muestra en esta especie un alto grado de micotrofia debido a la afinidad por la asociación simbiótica del tipo arbuscular. Esta aseveración es demostrable por la ocurrencia de arbusculos, vesículas y principalmente hifas al interior de las células corticales de las raíces (**Figura 3**), los que son determinantes en este diagnóstico. La información existente que describe a esta especie como altamente micotrófica debido a que carece de pelos radicales (Bárceñas y Aguirre, 2005), se ratifica en este trabajo. Se registró un mayor número de vesículas que de arbusculos (**Fig. 3**), y dado a que se trata de estructuras de reserva, se puede sugerir la alta dependencia del aguacate con los HMA que lo colonizan.

Con la condición favorable de alta colonización, se realizaron pruebas moleculares a partir de raíces colonizadas usando condiciones de amplificación similares a las empleadas anteriormente en trabajos de esta naturaleza, con la finalidad de establecer una metodología que permitan identificar el o los géneros presentes en el suelo y que al ser detectados en la raíz indican que se encuentran en simbiosis activa. Algunos autores señalan que un 30% de colonización al interior de la raíz permite obtener suficiente ADN fúngico para amplificar por PCR. El grosor de la corteza dificultó en parte el proceso de tinción por lo que se realizaron algunas modificaciones en el proceso de clareo, así como en la extracción del ADN.

Extracción de ADN genómico a partir de raíces de aguacate

Con el propósito de conseguir la identificación de los HMA presentes en las raíces de aguacate, se realizaron diversas pruebas de extracción de ADN utilizando el Mini Kit DNA easy para plantas, consiguiendo la estandarización

de la técnica. El material genético se obtuvo a partir de 100 mg de tejido macerado, resuspendido en 2 eluciones finales de 100 µl. De los 5 árboles se aisló ADN en cantidad suficiente para realizar las reacciones de amplificación (**Figura 4**). Pese a que la cantidad de ADN obtenida en cada extracción fue poca, se consideró

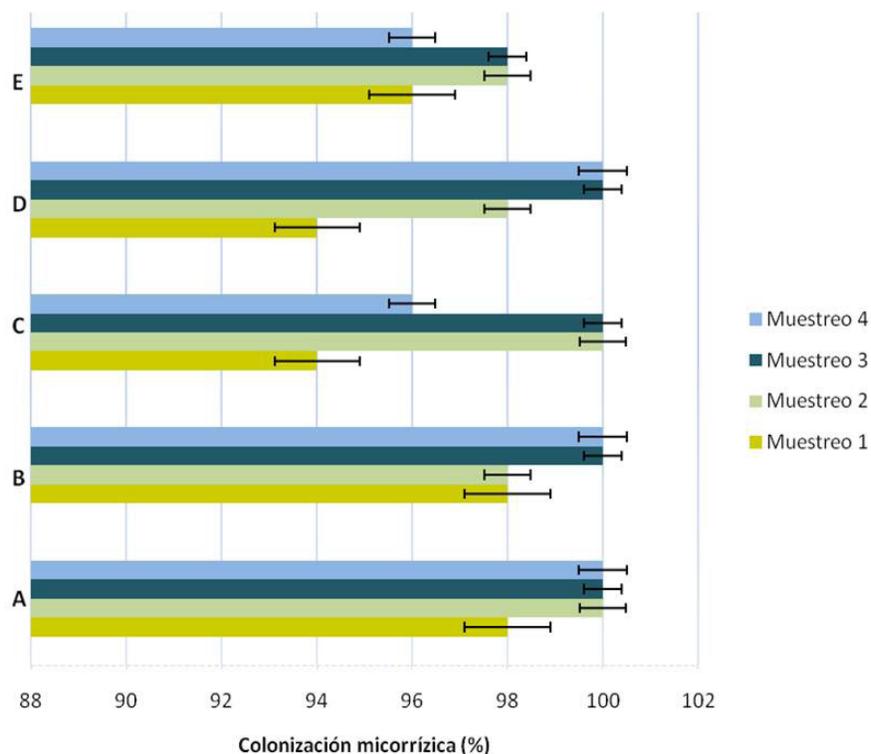


Figura 2. Porcentajes de colonización encontrados en los árboles en los diferentes muestreos. Los árboles fueron etiquetados como A, B, C, D, y E. Los muestreos 1 y 2 corresponden a la época de lluvias mientras que los muestreos 3 y 4 fueron realizados en la época de secas.

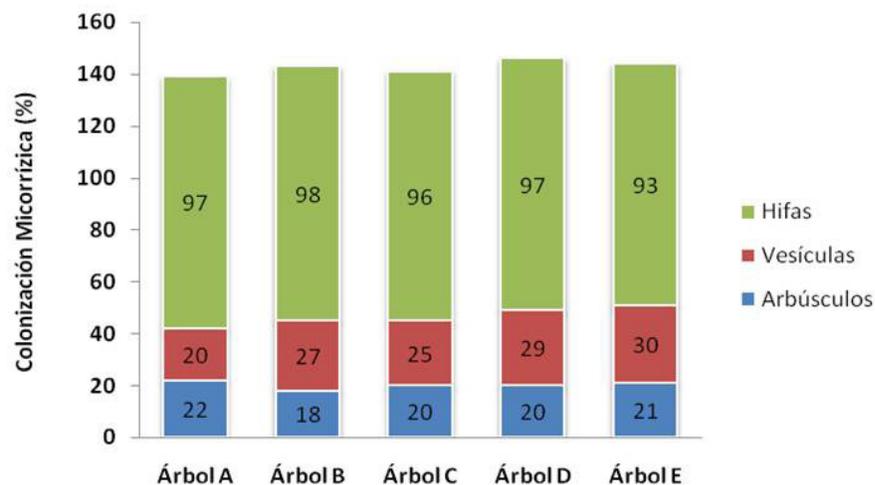


Figura 3. Evaluación de la colonización micorrízica por estructuras. Los valores de colonización total así como por estructuras muestran un patrón uniforme, el árbol A destaca por tener el mayor porcentaje de arbusculos, estructuras determinantes en el proceso de flujo de nutrientes.

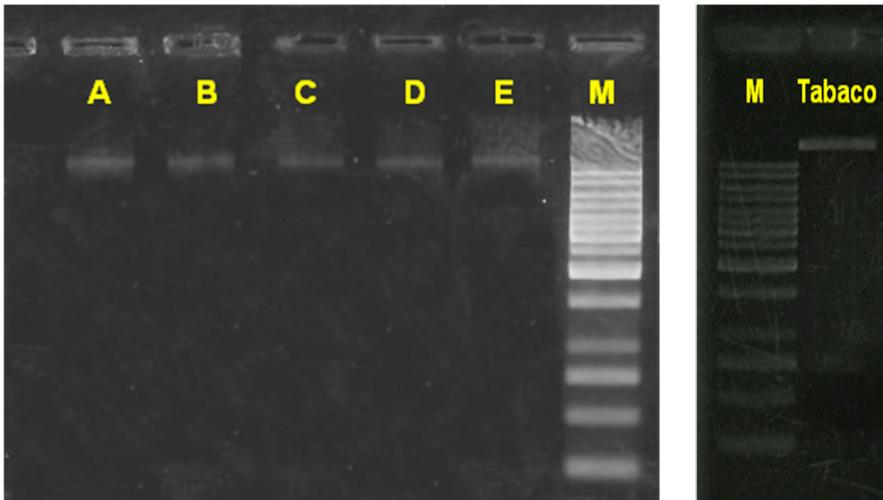


Figura 4. Estandarización de la extracción de ADN genómico en los árboles de aguacate. A, B, C, D y E representan las muestras de árboles de aguacate. El tabaco se utilizó como un control de extracción. El marcador de peso molecular (M) corresponde a 1 Kb, con la banda de mayor tamaño de 10000 pb.

suficiente para realizar las reacciones de amplificación por PCR, utilizando 2 µl de ADN en cada reacción.

Primera amplificación del ADNr 18S

Debido a la dificultad que representa el obtener ADN fúngico en suficiente cantidad y con el grado de pureza requerido, la técnica de PCR representa una gran alternativa para la identificación y estudio de la diversidad de HMA. Inicialmente y de acuerdo al protocolo sugerido por Clapp, *et al.* (1995) se realizó una primera amplificación con los oligonucleótidos universales para eucariontes, NS31 e ITS4, con el objeto de separar el gen ribosomal 18S y parte de

uno de los espacios intergénicos. Se amplificó una banda de aproximadamente 1800 pb para los árboles A, B, C y D únicamente (**Figura 5**).

A partir de los productos obtenidos en la amplificación con NS31-ITS4 se realizaron amplificaciones anidadas con los oligonucleótidos VAGLO, VAGIGA y VAACAU, específicos para los diferentes géneros, así como AM1 específico para el Phylum Glomeromycota.

Amplificaciones anidadas del ADNr 18S

La región NS31-AM1 del gen ADNr 18S, permite la discriminación de los HMA a nivel de género (Helgason *et al.*, 1998;

Schubler *et al.*, 2001, Ferrol *et al.*, 2004) y fue utilizada en este estudio para intentar caracterizar algunos de los HMA presentes en las raíces de aguacate. En los 4 árboles la amplificación mostró una única banda de aproximadamente 600 pb (**Figura 6**), lo que coincide con los resultados de Cornejo (2006) quien reporta una amplificación por PCR de ADN de esporas utilizando esta pareja de cebadores en esporas del género *Glomus* y obtuvo una única banda de 550 pb. Además, Souza *et al.* (2004) reportan un fragmento de 600 pb empleando los mismos oligos para esporas del género *Gigaspora*. NS31 es un primer universal para eucariontes mientras que AM1 es considerado universal para HMA y VAGLO es específico del género *Glomus*.

Con los oligonucleótidos NS31-VAGLO se logró obtener amplificaciones polimórficas para tres de los cuatro árboles (**Figura 6**), obteniendo una banda de aproximadamente 700 pb para el árbol A y una de 600 pb para los árboles B y D. Numerosos reportes para amplificaciones de la región 18S en el género *Glomus*, indican secuencias de 507 pb a 509 pb (NCBI, 2009), así como 1690 pb para *Glomus geosporum* y 1324 pb para *Glomus mosseae* (BEG, 2009). Simon *et al.* (1993), quienes obtuvieron fragmentos de 188 pb para tres especies de *Glomus* (*G. mosseae*, *G. intraradices* y *G. vesiculiferum*).

La amplificación con el oligo específico para el género *Acaulospora* registró una única banda de aproximadamente 250 pb para los árboles A, C y D; una doble banda para el árbol B de aproximadamente 400 pb y 600 pb (**Figura 7**). Sin embargo, Simon *et al.* (1993), registraron un producto de 198 pb para el género *Acaulospora*. Por otro lado el BEG (2009) alberga secuencias de 511 pb para *Acaulospora laevis* que corresponden a la región ADNr 18S. En la NCBI se encuentran secuencias cortas (aproximadamente 210 pb) y de más de 500 pb para el género *Acaulospora*.

Se obtuvieron productos de un tamaño aproximado a 250 pb para los árboles A, C, D y uno de aproximadamente 400 pb para el árbol B. (**Figura 7**). Para esporas de *Gigaspora* se han reportado productos de 198 pb y 392 pb aproximadamente (Clapp *et al.*, 1995). En el BEG se registran 558 pb para *Gigaspora rosea* y 545 pb para *Gigaspora* sp en la NCBI.

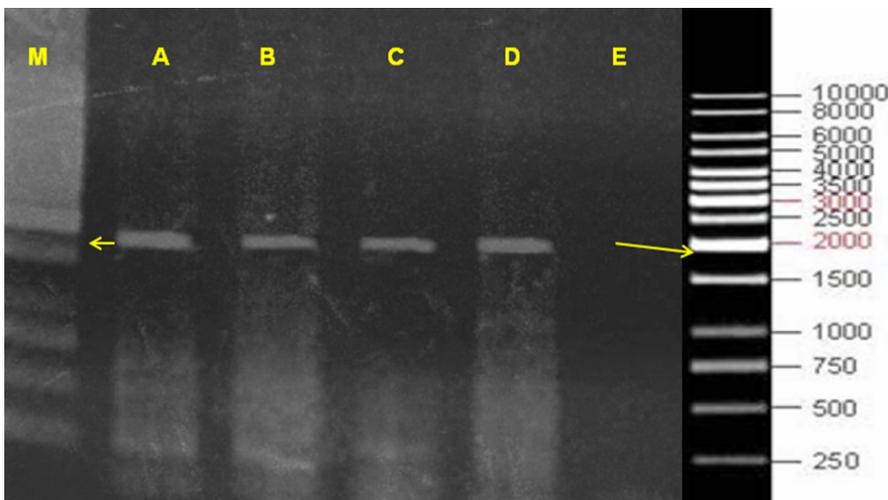


Figura 5. Amplificación por PCR realizada con la pareja de oligonucleótidos NS31-ITS4. A, B, C, D y E representan las amplificaciones obtenidas de los árboles de aguacate.

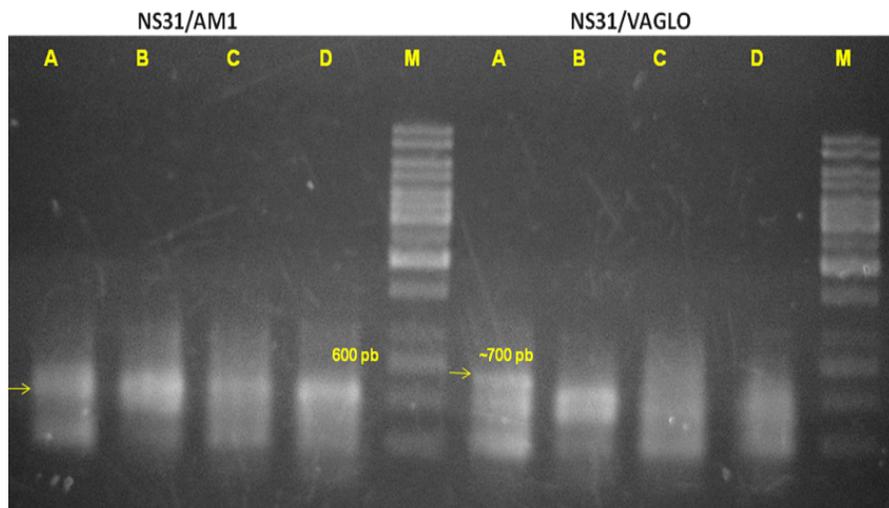


Figura 6. Productos obtenidos en PCR anidada utilizando las parejas de oligonucleótidos NS31-VAGLO (izquierda) y NS31-AM1 (derecha). A, B, C y D representan las amplificaciones obtenidas de los diferentes árboles de aguacate.

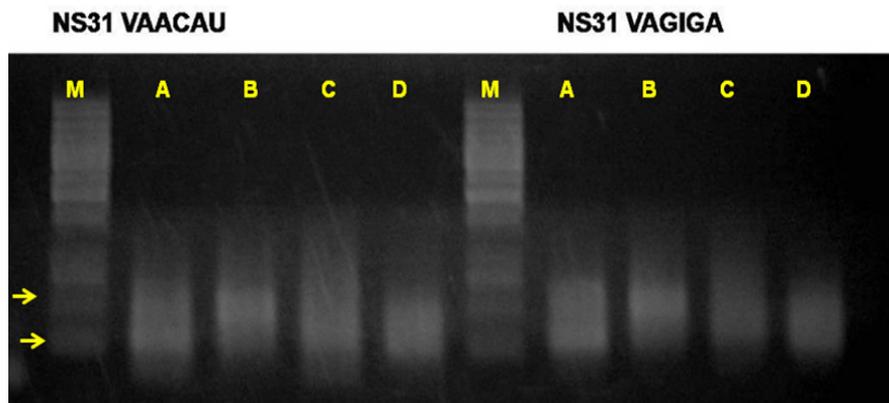


Figura 7. Productos obtenidos en PCR anidada utilizando las parejas de oligonucleótidos NS31-VAGIGA (izquierda) y NS31-VAACAU (derecha). A, B, C y D representan las amplificaciones obtenidas de los diferentes árboles de aguacate.

Obtención de secuencias

Se obtuvieron 2 secuencias para las amplificaciones realizadas en el árbol B. Una con el par de oligonucleótidos NS31/AM1 y otra para el par NS31/VAGLO.

NS31/AM1

AGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGT-TAAAGCTCGCAGTTGCAATTTCCGGATCAATATTTCCGGTCATGC-CGTTGGTATGNTACTGATATTAATGATTTCTCACCTTCTAAANAAC-CGTAATGCCAGGAATTTKGTGTACAGGGGAAGGACTGTTACCTT-GAAAAAATTCAGAGTGTTTAAAGCAGGCTCACCTTGAANNCATTAG-CATGGAATAATGAAATAGKACATCCGAT TCTATTTTGT

NS31/VAGLO

CCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTA-AAGCTCGCAGTTGCAATTCGGATCAATATTTCCGGTCATGCCGTTGGTAT-GNTACTGATATTAATTTGATTTCTCACCTTCTAAANAACCGTAATGCCAG-GAATTTKGTGTACAGGGGAAGGACTGTTACCTTGAAAAAAATTCAGAGT-GTTTAAAGCAGGCTCACCTTGAANCATTAGCATGNAATAATGAAATAG-CACA

De acuerdo a la comparación con el banco de datos de la NCBI, ambas secuencias corresponden a la especie *Glomus geosporum*. Este resultado se acerca a lo reportado por Serralde y Ramírez (2004), quienes encontraron un producto de amplificación de aproximadamente 190 pb para el género *Glomus*, también se aproxima a lo encontrado por Simon, *et al.* (1993), quienes obtuvieron fragmentos de 188 pb para tres especies de *Glomus* (*G. mosseae*, *G. intraradices* y *G. vesiculiferum*). Lo anterior permite sugerir que la alta abundancia de esporas en el suelo está directamente relacionada con la colonización al interior de las raíces de aguacate. Siendo entonces *G. geosporum* una especie importante para el desarrollo de las plantas de aguacate.

Hasta el momento y de acuerdo a la identificación morfológica se ha logrado identificar a los géneros *Glomus* y *Acaulospora* como los más abundantes en el suelo. Esto coincide con los reportes previos (González, 2005) de la presencia de estas especies en suelos de cultivo de aguacate.

Conclusiones

a) Las plantas de aguacate presentan elevados porcentajes de colonización por hongos formadores de MA; la ausencia de pelos radicales puede explicar el que esta planta sea altamente micotrófica.

b) Se estandarizó la extracción del ADN genómico a partir de raíces de aguacate y la amplificación de ADNr 18S.

Referencias

Aristizábal C, Rivera EL, Janos DP (2004) Arbuscular Mycorrhizal Fungi Colonize Decomposing Leaves of *Myrica parvifolia*, *M. pubescens* and *Paepalanthus sp.* *Mycorrhiza* 14(4):221-228.

Azcón Aguilar C, Barceló A, Vidal MT, de la Viña G (1992) Further studies on the influence of mycorrhizae on growth and development of micropropagated avocado plants. *Agronomie* 12: 837-840.

Bago B, Philip E, Shachar-Hill Y (2000) Carbon Metabolism and Transport in Arbuscular Mycorrhizas. *Plant Physiology* 124:949-957.

Bárceñas OA, Aguirre PS (2005) *Pasado, presente y futuro del aguacate en Michoacán*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Editorial Morevallado. 61 pp.

- Clapp J, Young J, Merryweather J, Fitter A** (1995) Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from natural community. *New Phytologist* 130: 259-265.
- Cornejo RP** (2006) *Influencia de la cobertura vegetal sobre la diversidad de y estructura de las comunidades de hongos micorrízicos y sus efectos en la estabilización de suelos degradados*. Facultad de Ciencias. Granada, España. 288 p.
- Ferrol N, Caliente R, Cano C, Barea JM, Azcón-Aguilar C** (2004) Analysing arbuscular mycorrhizal fungal diversity in shrub-associated resource-islands from a desertification-threatened semiarid mediterranean ecosystem. *Applied Soil Ecology* 25:123-133.
- González CJ** (2005) *Diversidad de Hongos Micorrízicos Arbusculares en un agroecosistema de aguacate (Persea americana Mill.) comparado con un bosque natural*. Tesis de Maestría. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.
- Helgason T, Daniell T, Husband R, Fitter AH, Young JP** (1998) Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 394: 431.
- Morton JB, Benny GL** (1990) Revised classification of arbuscular Mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order Glomales: two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37:471-491.
- Phillips JM, Hayman DS** (1970) Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular fungi for rapid assessment of infection. *Transactions British Mycological Society* 55: 158-161.
- Rodríguez A, Xoconostle B, Váldez M** (2004) Ecología Molecular de Hongos Ectomicorrízicos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 3:267-278.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 74:5463-5468.
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C** (2001) A new fungal Phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105:1413-1421.
- Serralde OA, Ramirez GM** (2004) Análisis de poblaciones de micorrizas en maíz (*Zea mays*) cultivado en suelos ácidos bajo diferentes tratamientos agronómicos. *Revista Corpoica* 5(1)
- Sieverding E** (1983) *Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo-arbuscular en el laboratorio*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Proyecto Micorriza. Cali.
- Simón L, Bousquet J, Levesque RC, Lalonde M** (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363:67-69.
- Souza de F, Kowalchuk GA, Leeftang P, Van Veen JA, Smith E** (2004) PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis profiling of inter- and intraspecies 18S rRNA gene sequence heterogeneity is an accurate and sensitive method to assess species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Gigaspora*. *Applied Environmental Microbiology* 70: 413-424.