

EVIDENCIA DE ASOCIACIONES FÚNGICAS EN *PHLEGMARIURUS REFLEXUS* (LYCOPODIACEAE) EVIDENCE OF FUNGAL ASSOCIATIONS IN *PHLEGMARIURUS REFLEXUS* (LYCOPODIACEAE)

ERWIN SÁNCHEZ BAIZABAL¹, ROSARIO MEDEL-ORTIZ^{2*}, DORA TREJO³

¹ Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México.

² Centro de Investigación en Micología Aplicada, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México.

³ Facultad de Agronomía, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México.

*Autor de correspondencia: romedel@uv.mx

Resumen

Antecedentes: Las asociaciones simbióticas de plantas con hongos están ampliamente distribuidas, más del 90 % de las plantas terrestres llevan a cabo algún tipo de simbiosis. En México, estas relaciones mutualistas en grupos vegetales basales han sido poco exploradas, ejemplo de esto es la familia Lycopodiaceae de la cual existen pocos trabajos relacionados con este tema en nuestro país.

Pregunta: La pregunta que sustenta este trabajo es ¿cuál es el estatus de *Phlegmariurus reflexus* (Lycopodiaceae) con respecto a la simbiosis con hongos micorrízicos arbusculares?

Sitios de estudio y fechas: El muestreo se realizó en marzo del 2019, en un fragmento de bosque mesófilo de montaña, ubicado en el municipio San Andrés Tlalnahuayocan, Veracruz. Se trazaron dos transectos de 1 × 15 m, en cada uno se recolectaron las raíces de tres individuos diferentes separados cada uno por 5 m. Las raíces se almacenaron en frascos con solución FAA (Formol-Alcohol-Ácido acético). Las muestras fueron procesadas bajo la técnica de clareo y tinción de modificada para raíces no lignificadas.

Resultados: Se analizaron 850 fragmentos de raíces, encontrando un porcentaje de micorrización del 6.8 – 17.1 %, todas las plantas muestreadas presentaron evidencia de HMA, así como estructuras (hifas septadas y micro esclerocios). Los bajos porcentajes encontrados coinciden con los que se han reportado para la familia Lycopodiaceae en otras partes.

Conclusión: Este trabajo representa una primera aproximación al estudio de las micorrizas en la familia Lycopodiaceae en México.

Palabras clave: bosque mesófilo de montaña, hongos AM, México, plantas basales.

Abstract

Background: Symbiotic associations of plants with fungi are widely distributed, more than 90 % of terrestrial plants carry out this symbiosis. In Mexico, such associations with basal plant groups have been poorly explored, an example of this being the family Lycopodiaceae of which there are few studies related to this associations in our country.

Question: The question underlying this work is what is the status of *Phlegmariurus reflexus* (Lycopodiaceae) regarding symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi?

Study site and years of study: The sampling was carried out in March 2019, in a fragment of cloud forest, located in the municipality of San Andrés Tlalnahuayocan, Veracruz.

Methods: Two transects of 1 × 15 m were traced, in each one the roots of three different individuals were collected separated each one by 5 m. The roots were stored in bottles with FAA solution (Formaldehyde-Alcohol-Acetic Acid). The samples were processed under the technique of thinning and staining modified for non-lignified roots.

Results: Eight hundred and fifty root fragments were analyzed, finding a mycorrhization percentage of 6.8 – 17.1 %; all the sampled plants presented evidence of AM associations. The low percentages found agree with those reported for the Lycopodiaceae family in other parts of the world.

Conclusion: This work represents a first approach to the study of mycorrhizae in the Lycopodiaceae in Mexico.

Keywords. AM fungi, basal plants, cloud forest, Mexico.

Los lycopodios son plantas terrestres que forman un clado monofilético diferente de los helechos y espermatofitas, por lo que se considera un grupo basal dentro de las plantas vasculares (Kenrick & Crane 1997). Comparten características similares con los isoetes, selaginelas y helechos tales como: la dispersión por medio de esporas y un ciclo de vida con gametofitos y esporofitos independientes.

Los gametofitos de los lycopodios en su mayoría son aclorófilos y mico heterótrofos, por lo que su relación simbiótica con hongos micorrízicos es indispensable para su desarrollo y supervivencia en las primeras fases de vida (Whittier 2006, Leake *et al.* 2008, Winther & Friedman 2008), el caso contrario es el esporofito, que, por ser autótrofo, no depende totalmente de esta relación para su nutrición y desarrollo. Por otra parte, las micorrizas son asociaciones simbióticas en las que la planta obtiene nutrientes minerales esenciales y el hongo obtiene carbono de su huésped. Se ha documentado que existen interacciones de grupos basales de Lycopodiaceae con hongos del orden Glomales (Glomeromycota) formando micorrizas arbusculares (MA), que están presentes en ambas fases de vida de la planta. (Read *et al.* 2000, Winther & Friedman 2008). De acuerdo con Smith & Smith (1997) existen dos tipos morfológicos de MA el tipo *Arum* en donde las hifas se sitúan en los espacios intercelulares e intracelulares y finalmente forman arbusculos terminales (típicas de herbáceas y plantas cultivadas) y el tipo *Paris* donde las hifas se sitúan solo en el espacio intracelular y se forman estructuras de intercambio llamados pelotones (características de helechos, gimnospermas y angiospermas silvestres), con arbusculos poco desarrollados o no están presentes (Smith & Smith 1997). En el caso concreto de los lycopodios se ha reportado la presencia del tipo *Paris* con arbusculos poco desarrollados o ausentes (Read *et al.* 2000).

Las asociaciones fúngicas con los lycopodios están poco o nada estudiadas en México, aunque existen trabajos sobre el tema realizados fuera de México en los que se han documentado MA y endófitos septados oscuros en lycopodios y equisetos (Fernández *et al.* 2008, Jumpponen 2001, Muthuraja *et al.* 2014, Winther & Friedman 2008).

Trabajos previos han demostrado que los lycopodios terrestres son susceptibles a la micorrización. Se han obtenido secuencias moleculares pertenecientes a hongos del género *Glomus* Tul. & C. Tul., en raíces de *Lycopodium* y *Huperzia* (Winther & Friedman 2008), así como presencia de estructuras típicas de hongos MA del tipo *Paris* en *Palhinhaea cernua* (L.) Vasc. & Franco (*Lycopodium cernuum* L., Muthuraja *et al.* 2014) que no presentan arbusculos y después de la penetración se forman pelotones intercelularmente (Read *et al.* 2000). También se ha observado colonización por hongos septados oscuros (HSO) en *Huperzia selago*, *H. serrata* (Takashima *et al.* 2014) y *Austrolycopodium paniculatum* (Fernández *et al.* 2008).

A diferencia de los hongos MA, los HSO pertenecen al filo Ascomycota y se trata de fases anamórficas de ascomicetos que poseen hifas septadas melanizadas que colonizan tejidos de la raíz sin causar un daño aparente (Jumpponen 2001). Aparentemente estas asociaciones no son del tipo micorrízico (Treu *et al.* 1995) y otros autores como Jumpponen (2001) consideran que bajo ciertas condiciones funcionan como micorrizas, sin embargo, se desconoce el papel fisiológico y ecológico que juega esta asociación en esta etapa del ciclo de vida (Jumpponen & Trappe 1998).

Estudios recientes basados en evidencia molecular, citológica, funcional y paleontológica han sugerido que los Glomeromycota y Mucoromycotina (un linaje basal o hermano de Glomeromycota), también formaron asociaciones simbióticas a la par con grupos basales como hepáticas y antoceros (Rimington *et al.* 2015).

Determinar las interacciones que tienen los hongos con plantas de grupos basales, como los lycopodios, permiten entender la importancia de estos hongos en la diversificación de las plantas vasculares (Merckx & Bidartondo 2008). Además, conocer el estatus micorrízico de los lycopodios es importante para desarrollar programas para un manejo adecuado con fines de conservación, ya que algunas especies del género *Phlegmariurus* deben encontrarse en alguna categoría de riesgo debido a la continua pérdida y fragmentación de los hábitats naturales (Armenta-Montero *et al.* 2015).

Por lo anterior el objetivo del presente trabajo es documentar la presencia de simbiontes micorrízicos en *Phlegmariurus reflexus* (Lam.) B. Øllg, especie de lycopodio neotropical, que se encuentra en el sureste mexicano, a elevaciones de 300-2,400 m snm. Se encuentra en sitios abiertos, así como bosques húmedos y encinares (Mickel & Smith 2004). Se trata de una planta erecta terrestre de 9 a 30 cm con ramificación isodictotómica y hojas lanceoladas dispuestas en espiral ([Figura 1](#)).



Figura 1. *Phlegmariurus reflexus* en el sitio de estudio.

Materiales y métodos

El muestreo de raíces se realizó en marzo del 2019, en un fragmento de bosque mesófilo de montaña ubicado en el municipio San Andrés Tlalnahuayocan, Veracruz (19° 30.700' N', 97° 00.099' W) en la parte central del estado de Veracruz, a 1,570 m snm. El sitio presenta una temperatura media anual de 19 °C y una precipitación anual 1,500 mm. Se trazaron dos transectos de 1 × 15 m, en cada uno se tomaron muestras de raíces de tres esporofitos individuales diferentes de *Phlegmariurus reflexus*, separados cada uno por 5 m, haciendo un total de seis plantas muestreadas. Las raíces se almacenaron en frascos con solución FAA (Formol-Alcohol-Ácido acético).

En el laboratorio, las raíces se lavaron con agua de la llave para remover el suelo y musgo y se procedió a cortarlas en fragmentos de 1 cm. Para el clareo y tinción se utilizó la técnica de Phillips & Hayman (1970) modificada para raíces no lignificadas, la cual consiste en colocar los fragmentos en frascos de cristal donde se agregó hidróxido de potasio (KOH) al 10 % en baño maría a 120 °C durante 20 minutos. Se removió el KOH con agua potable y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Para la tinción de hifas, arbuscúlos y vesículas se utilizó azul de tripano

al 0.05 % en baño maría a 120 °C por 20 minutos. Posteriormente se lavaron con agua y se colocaron en frascos con lacto glicerol para preservación hasta su observación al microscopio. Para evaluar y cuantificar el grado de colonización se utilizó la técnica de Giovanetti & Mosse (1980) utilizando un microscopio estereoscópico STEMI DV4 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) tanto para la revisión como para la toma de fotografías. Las muestras de raíces fueron montadas en alcohol polivinílico lacto glicerol (PVGL) para su preservación. Las fotografías se tomaron en un microscopio Primo Star Iled (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) con una cámara NIKON S100 (Tokio, Japón).

Resultados

Por muestra examinada de cada planta, se observaron estructuras típicas de micorrizas arbusculares y otras estructuras fúngicas asociadas a los fragmentos de raíz, en porcentajes variables ([Figura 2](#)). En total, se analizaron 850 segmentos de raíces, de los cuales 100 muestras (11.7 %) presentaron estructuras fúngicas. Todas las plantas muestreadas, presentaron evidencia de colonización por MA, aunque el número de fragmentos obtenidos fue variable por cada planta revisada, dichos valores se muestran en la [Tabla 1](#). Los porcentajes de colonización variaron entre 6.83 y 17.14 % con promedio de 11.7 %.

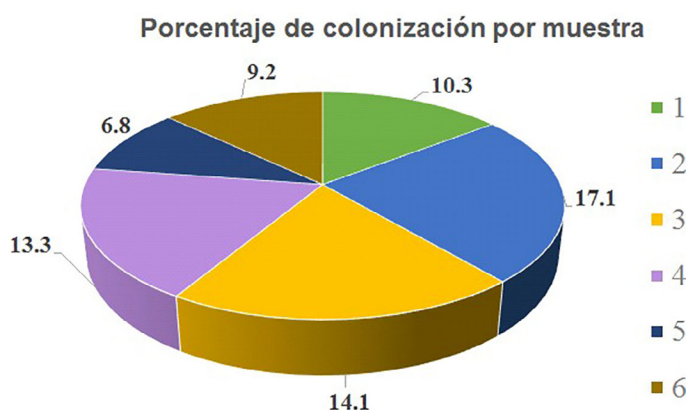


Figura 2. Porcentaje de micorrización por planta recolectada.

Tabla 1. Segmentos muestreados (1 cm largo) y porcentaje de colonización.

Muestra	Segmentos muestreados	Segmentos colonizados	Porcentaje colonización
1	145	15	10.3
2	70	12	17.1
3	177	25	14.1
4	211	28	13.2
5	117	8	6.8
6	130	12	9.2
TOTAL	850	100	11.7

Se observaron estructuras típicas de MA, en su mayoría hifas intracelulares y vesículas ([Figura 3A-B](#), vesículas con hifas intracelulares ([Figura 3C](#)), pelotones intracelulares en las primeras capas del córtex de la raíz y esporas aún adheridas a la raíz ([Figura 3D](#)), micro esclerocios ([Figura 3E](#)) e hifas intracelulares septadas ([Figura 3F](#)) éstas dos últimas estructuras características de hongos septados oscuros.

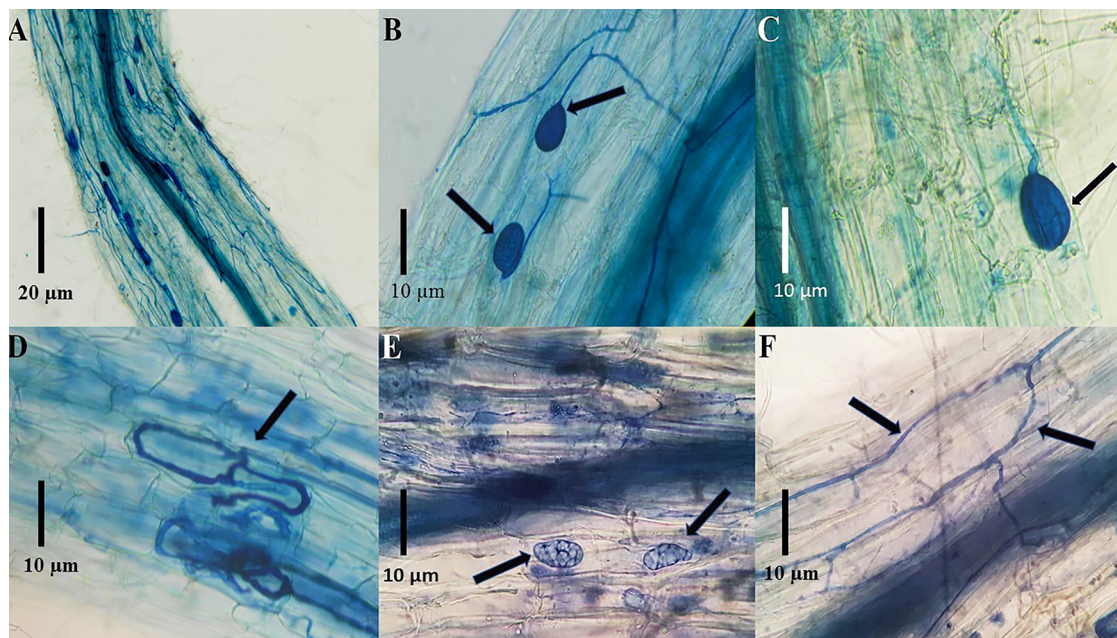


Figura 3. Estructuras simbióticas presentes en *Phlegmariurus reflexus*. A. Vista general de la raíz mostrando hifas intracelulares y vesículas. B-C. vesículas, D. pelotones intracelulares en las primeras capas del córtex y esporas aún adheridas, E. micro esclerocios, F. hifas intracelulares septadas características de endófitos septados oscuros.

Discusión

Como se mencionó anteriormente la presencia de MA y otras asociaciones fúngicas se presentaron en todas las plantas muestreadas. El tipo de colonización encontrado fue *Paris* lo cual corresponde con lo reportado previamente para licopodios (Fernández *et al.* 2008, Muthuraja *et al.* 2014, Winther & Friedman 2008), es importante mencionar la ausencia de arbuscúlos, que es característica de este tipo de colonización, aunque se ha observado que en licopodios y otros grupos de plantas basales, éstas estructuras pueden o no estar presentes, particularmente se ha observado que gametofitos mico heterótrofos y esporofitos autótrofos de licopodios comparten simbiontes fúngicos (Read *et al.* 2000), cuya función es participar en el intercambio de nutrientes a nivel intergeneracional (Leake *et al.* 2008), además de que existen tipos intermedios como un *continuum* entre *Arum-Paris* (Dickson 2004).

Se observaron hifas y micro esclerocios típicos de hongos septados oscuros. ([Figura 3E-F](#)). Estas estructuras son similares a lo reportado para *Austrolycopodium paniculatum* (Fernández *et al.* 2008). Los hongos septados oscuros también han sido reportados para el género *Huperzia* (Takashima *et al.* 2014), por lo que esta asociación podría estar más extendida en la familia Lycopodiaceae. A pesar de que esta asociación no se considera micorrízica, se ha demostrado que los hongos endófitos oscuros se relacionan con la producción de metabolitos secundarios con funciones antibióticas y antifúngicas que le permiten mantener una mayor sanidad en los tejidos de diversas plantas (Chadha *et al.* 2014).

En relación con el porcentaje de micorrización éste varió en todas las plantas muestreadas (6.8-17.1 %) con un promedio de 11.7 %. Como se puede observar en la [Tabla 2](#), este valor es parecido al reportado por Sudová *et al.*

(2011) para el grupo más cercano como es el de los isoetes (4.0-13.15 %), pero no sucede así en el caso de los helechos, cuyos porcentajes varían del 23-36 %, considerado un grupo que representa una línea evolutiva más alejada (Schneider 2012). Dentro del grupo de los licopodios los porcentajes mencionados en este trabajo son similares a los citados previamente para otros géneros de licopodios como *Huperzia* y *Lycopodium* (Takashima *et al.* 2014, Fernández *et al.* 2008).

Tabla 2. Comparación de porcentajes de colonización de *Phlegmariurus reflexus* (especie de estudio) otros licopodios y helechos.

Especie	Micorrización (%)	Cita
Licopodios		
<i>Austrolycopodium paniculatum</i> (Desv. ex Poir.)	9.5	Fernández <i>et al.</i> 2008
Holub		
<i>Huperzia selago</i> (L.) Bernh. ex Schrank & Mart.	9.77 ± 7.96	Takashima <i>et al.</i> 2014
<i>H. serrata</i> (Thunb.) Trevis.	11.7 ± 10.7	Takashima <i>et al.</i> 2014
Isoetes		
<i>Isoetes echinospora</i> Durieu	13.3 ± 1.9	Sudová <i>et al.</i> 2011
<i>I. lacustris</i> L.	4.0 ± 2.4	Sudová <i>et al.</i> 2011
Helechos		
<i>Blechnum appendiculatum</i> Willd.	23 ± 10	Lara-Pérez <i>et al.</i> 2015
<i>B. schiedeana</i> (C. Presl) Hieron.	31	Lara-Pérez <i>et al.</i> 2015
<i>Marattia</i> sp.	23	Lara-Pérez <i>et al.</i> 2015
<i>Alsophila firma</i> (Baker) D.S. Conant	23 ± 10	Lara-Pérez <i>et al.</i> 2015
<i>Cyathea bicrenata</i> Liebm.	25 ± 19	Lara-Pérez <i>et al.</i> 2015
<i>C. divergens</i> Kunze	36 ± 16	Lara-Pérez <i>et al.</i> 2015

La evidencia recabada demostró que *Phlegmariurus reflexus* se encuentra en simbiosis con hongos formadores de MA, encontrándose evidencias de estas asociaciones en las raíces de las plantas analizadas. La ausencia de arbuscúlos está documentada para este grupo de plantas, aunque sería necesario realizar muestreos más intensivos para descartar que no se trata de un *continuum* o de una ausencia temporal.

Aunque no está clara la función ecológica que realizan los hongos endófitos septados oscuros en los licopodios, se detectó la presencia de estructuras que coinciden con estos hongos, esto también ha sido citado anteriormente en otros géneros de licopodios, por lo que esta asociación podría estar más extendida en la familia Lycopodiaceae.

El porcentaje de colonización promedio fue 11.8 % el cual no difiere de manera significativa con lo que se ha encontrado en otros estudios para licopodios. Sin embargo, es deseable realizar estudios en otros géneros o especies de Lycopodiaceae, para documentar los diversos porcentajes de micorrización.

Como un primer trabajo exploratorio la evidencia de la presencia de MVA y hongos endófitos septados en raíces de *P. reflexus*, sirve de base para posteriores estudios en este tema, ya que como se mencionó en la introducción son muy pocos los trabajos realizados en grupos de plantas basales en México.

Agradecimientos

A la MC Yajaira Baeza del Laboratorio de Organismos Benéficos (Facultad de Agronomía) de la Universidad Veracruzana por su ayuda en el clareo y tinción de las raíces, a la MC Naara Palestina Villa del Centro de Investigación en Micología Aplicada, por la edición de las figuras.

Literatura citada

- Armenta-Montero S, Carvajal-Hernández CI, Ellis EA, Krömer T. 2015. Distribution and conservation status of *Phlegmariurus* (Lycopodiaceae) in the state of Veracruz, Mexico. *Tropical Conservation Science* **8**: 114-137 DOI: <https://doi.org/10.1177/194008291500800111>
- Chadha N, Mishra M, Prasad R, Varma A. 2014. Root endophytic fungi: research update. *Journal of Biology and Life Science* **5**: 135-158. DOI: <https://doi.org/10.5296/jbls.v5i2.5960>
- Dickson S. 2004. The *Arum-Paris* continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* **163**: 87-200. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01095.x>
- Fernández N, Messuti MI, Fontenla, S. 2008. Arbuscular mycorrhizas and dark septate fungi in *Lycopodium paniculatum* (Lycopodiaceae) and *Equisetum bogotense* (Equisetaceae) in a Valdivian temperate forest of Patagonia, Argentina. *American Fern Journal* **98**: 117-128. DOI: [https://doi.org/10.1640/0002-8444\(2008\)98\[117:AMADSF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1640/0002-8444(2008)98[117:AMADSF]2.0.CO;2)
- Giovanetti M, Mosse B. 1980. An evaluation of techniques for measuring infection in roots. *New Phytologist* **84**: 489-500. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x>
- Jumpponen A. 2001. Dark septate endophytes-are they mycorrhizal?. *Mycorrhiza* **11**: 207-211. DOI: <https://doi.org/10.1007/s005720100112>
- Jumpponen A, Trappe J. 1998. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist* **140**: 295-310. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1998.00265.x>
- Kenrick P, Crane PR. 1997. Origin and early diversification of land plants. *Nature* **389** :33-39. DOI: <https://doi.org/10.1038/37918>
- Lara-Pérez LA, Valdés-Baizabal MD, Noa-Carrazana, JC, Zulueta-Rodríguez R, Lara-Capistrán, L, Andrade-Torres A. 2015. Mycorrhizal associations of ferns and lycopods of central Veracruz, Mexico. *Symbiosis* **65**: 85-92. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13199-015-0320-8>
- Leake JR, Cameron DD, Beerling DJ. 2008. Fungal fidelity in the mycoheterotroph-to-autotroph life cycle of Lycopodiaceae: a case of parental nurture? *New Phytologist* **177**: 572-576. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02352.x>
- Merckx V, Bidartondo MI. 2008. Breakdown and delayed cospeciation in the arbuscular mycorrhizal mutualism. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* **275**: 1029-1035. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1622>
- Mickel JT, Smith AR. 2004. The Pteridophytes of Mexico. *Memoirs of The New York Botanical Garden* **88**: 1-1054. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm71.2005.1131>
- Muthuraja R, Muthukumar T, Sathiyadash, Uma E, Priyadharsini P. 2014. Arbuscular mycorrhizal (AM) and dark septate endophyte (DSE) fungal association in lycophytes and ferns of the Kolli Hill, Eastern Ghats, Southern India. *American Fern Journal* **104**: 67-102. DOI: <https://doi.org/10.1640/0002-8444-104.2.67>
- Phillips JM, Hayman DS. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment to infection. *Transactions of British Mycological Society*. **55**: 158-161. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3)
- Read DJ, Duckett JG, Francis R, Ligrone R, Russell A. 2000. Symbiotic fungal associations in 'lower' land plants. *Philosophical Transaction Biological Sciences* **355**: 815-831. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0617>
- Rimington WR, Pressel S, Duckett JG, Bidartondo MI. 2015. Fungal associations of basal vascular plants: reopening a close book? *New Phytologist* **205**: 1394-1398. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.13221>
- Schneider H. 2012. Evolutionary morphology of Ferns (Monilophytes). *Annual Plant Review* **45**: 115-140. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118305881.ch4>
- Smith FA, Smith E. 1997. Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal Symbioses. *New Phytologist* **137**: 373-388. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00848.x>
- Sudová R, Rydlová J, Ctvrtlíková M, Havránek P, Adamec L. 2011. The incidence of arbuscular mycorrhiza in two submerged Isoetes species. *Aquatic Botany* **94**: 183-187. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2011.02.003>
- Takashima Y, Narisawa K, Hidayat I, Rahayu, G. 2014. First report on fungal symbionts of Lycopodiaceae root from

- mount Gede Pangrango National Park Indonesia. *Journal of Developments in Sustainable Agriculture* **9**: 81-88. DOI: <https://doi.org/10.11178/jdsa.9.81>
- Treu R, Laursen GA, Stephenson SL, Landolt JC, Densmore R. 1995. Mycorrhizae from Denali National Park and Preserve, Alaska. *Mycorrhiza* **6**: 21-29. DOI: <https://doi.org/10.1007/s005720050101>
- Whittier DP. 2006. Gametophytes of four tropical, terrestrial *Huperzia* species (Lycopodiaceae). *American Fern Journal* **96**: 54-62. DOI: [https://doi.org/10.1640/0002-8444\(2006\)96\[54:GOFTH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1640/0002-8444(2006)96[54:GOFTH]2.0.CO;2)
- Winther JL, Friedman WE. 2008. Arbuscular mycorrhizal associations in Lycopodiaceae. *New Phytologist* **177**: 790-801. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02276.x>

Editor de sección: Alejandra Vasco

Author contributions: EMSB, realizó el trabajo de campo y parte del laboratorio; Segundo autor RMO propuso el tema del trabajo, analizó imágenes, escritura del trabajo; tercer autor DTA Apoyo en la técnica de clareo de raíces y reactivos. Todos los autores revisaron las diversas versiones del manuscrito.