

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE



"ANÁLISIS MICROBIÓMICO DE HONGOS MICORRÍDICOS
ARBUSCULARES ASOCIADOS A *Persea americana* var. *drymifolia* EN
EL MUNICIPIO DE TEPEYANCO, TLAXCALA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

PRESENTA

KARINA ROJAS PÉREZ

REALIZADO BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DR. CUAUHTÉMOC MORALES CRUZ

DR. HÉCTOR SANTOS LUNA ZENDEJAS

TUTORES

DR. IGNACIO EDUARDO MALDONADO MENDOZA

DRA. LIBERTAD JUÁREZ SANTACRUZ



IXTACUIXTLA, TLAX., NOVIEMBRE, 2024



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Código: 505-RGE-04
Publicación: Diciembre 2020
Revisión: 9001 2015 04

C. KARINA ROJAS PÉREZ

PRESENTE

En cumplimiento al artículo 52 fracción "d" del Reglamento General de Evaluación Académica, el comité de evaluación de examen de grado ha revisado el trabajo de investigación titulado: "Análisis microbiómico de hongos micorrizicos arbusculares asociado a *Persea americana* var. *drymifolia* en el municipio de Tepeyanco, Tlaxcala.", realizado bajo la dirección del Dr. Héctor Santos Luna Zendejas y el Dr. Cuauhtémoc Morales Cruz. No habiendo encontrado objeción alguna, se autoriza su impresión:

Dra. Elizabeth García Gallegos

Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza

Dra. María Myrna Solís Oba

Dr. Héctor Santos Luna Zendejas

Dra. Libertad Juárez Santacruz

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

"POR LA CULTURA Y LA JUSTICIA SOCIAL"
Ixtacuixtla, Tlax., 21 de septiembre de 2024.



DR. HÉCTOR SANTOS LUNA ZENDEJAS
COORDINADOR GENERAL DE CUESTA Y POSGRADO
EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

c.c.p. Expediente



Documento exclusivo para uso de la dependencia responsable o autoridad correspondiente

Agradecimientos

A Dios por permitirme alcanzar una de mis metas.

Agradezco a CONAHCYT por la beca No. 822106 para hacer posible esta investigación.

A mi familia, mis hermanos y padres por compartir conmigo mi amor por la ciencia y el ambiente.

Al laboratorio de Toxicología y Química Ambiental del Centro de Investigación en Genética y Ambiente de la Universidad Autónoma de Tlaxcala por darme la oportunidad de realizar parte de mi trabajo en sus instalaciones.

Al municipio de Tepeyanco, Tlaxcala, por permitirme analizar cada sitio, en especial al señor Moi por el respaldo durante los muestreos y la confianza brindada.

Al laboratorio de Ecología Molecular de la Rizosfera del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional del Instituto Politécnico Nacional Unidad Sinaloa por la oportunidad de desarrollar la parte molecular de este trabajo en sus instalaciones.

A mi comité tutorial, al Dr. Héctor y a la Dra. Libertad por sus consejos y el material facilitado, principalmente al Dr. Cuauhtémoc por ayudarme a buscar respuesta a todas mis dudas, por el apoyo incondicional brindado durante todo el desarrollo de este proyecto y al Dr. Ignacio del CIIDIR IPN Sinaloa por su gran colaboración, apoyo, enseñanza y todas las aportaciones que me ayudaron a fortalecer este bello trabajo.

A mis sinodales, la Dra. Myrna y la Dra. Elizabeth por sus observaciones y comentarios para complementar este proyecto.

A Paúl y a Alicia del CIIDIR IPN Sinaloa por ayudarme en el reto de la parte molecular y mantenerme alentada en el proceso.

A la Dra. Miriam por sus consejos, el tiempo y espacio brindado en el laboratorio de TyQA durante mis análisis.

A Sofi Pérez por ayudarme en el muestreo de suelo y que este fuera más rápido y ameno.

A las joyitas, Esmeralda y Rubí gracias por su amistad y ayuda durante su estancia en el TyQA.

A mis compañeras y amigas de generación Janete y Esthefania por todos los consejos, observaciones e ideas que aportaron en cada presentación de mi tema.

A todos los integrantes del laboratorio de TyQA por su aportación de ideas y hacerme sentir cobijada en esta etapa, en especial a la Dra. Edelmira.

“Aprendí que puedo con todo, pero no con todo a la vez”

Índice

Resumen	9
Abstract.....	10
I Introducción.....	11
I.1 Marco teórico	14
I.1.1 <i>Persea americana</i> Mill	14
I.1.2 Características físicas de <i>P. americana</i>	15
I.1.3 Variedades de <i>P. americana</i>	15
I.1.4 Producción de <i>P. americana</i> a nivel nacional e internacional	16
I.1.5 <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> (aguacate criollo)	16
I.1.6 Hongos Micorrícicos Arbusculares (HMA)	17
I.1.7 Estructuras de los hongos micorrícicos arbusculares	21
I.1.8 Señalización en la simbiosis y ciclo de vida de los HMA	22
I.1.9 Beneficios de los hongos micorrícicos en la agricultura	25
I.2 Antecedentes	30
I.3 Preguntas de investigación	34
I.4 Hipótesis	35
I.5 Justificación	35
I.6 Objetivos	36
I.6.1 General	36
I.6.2 Específicos	36
I.7 Metodología	36
I.7.1 Área de estudio	36
I.7.2 Sitios muestreados	38
I.7.3 Muestreo	45

I.7.4 Análisis de muestras	48
I.7.4.1 Análisis de pH (acidez) y sales totales (ST) ppm	48
I.7.4.2 Contenido de humedad	49
I.7.4.3 Determinación de materia orgánica	50
I.7.4.4 Determinación de nitrógeno total	51
I.7.4.5 Determinación de la clase textural	54
I.7.4.6 Determinación de fósforo aprovechable	56
I.7.4.7 Determinación de densidad aparente	58
I.7.4.8 Porcentaje de colonización micorrícica en raíces	59
I.7.4.9 Observación de las estructuras de colonización	62
I.7.4.10 Análisis del porcentaje de colonización	63
I.7.4.11 Extracción de ADN genómico de suelo	64
I.7.4.12 Extracción de ADN genómico de raíces con DNAzol	64
I.7.4.13 Purificación de ADN de raíces	65
I.7.4.14 Almacenamiento de ADN genómico de raíces por sitio	66
I.7.4.15 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) anidadas	67
I.7.4.16 PCR anidadas para muestras de ADN genómico de raíces y suelo	68
I.7.4.17 Observación y purificación de los productos de PCR anidadas	71
I.7.4.18 Preparación de la concentración de las muestras	72
I.7.4.19 Secuenciación masiva y análisis bioinformático	73
I.7.5 Análisis estadístico	74
II Resultados	74
II.1 Resultados objetivo 1	74
II.2 Resultados objetivo 2	76
II.3 Resultados objetivo 3	80

III. Discusión	93
IV. Conclusiones	99
V. Perspectivas.....	100
VI. Anexos	101
VI.1 Constancia de participación en 7ma feria científica	101
VI Referencias.....	102

Índice de Figuras

Figura 1. Clasificación de los HMA.	19
Figura 2. Ciclo de vida un Hongo Micorrízico Arbuscular y su desarrollo durante la asociación.....	24
Figura 3. Mapa de sitio de muestreo.	37
Figura 4. Diseño metodológico	38
Figura 5. Sitio 1 de muestreo del municipio de Tepeyanco, Tlaxcala.	39
Figura 6. Sitio 2 de muestreo del municipio de Tepeyanco, Tlaxcala.	40
Figura 7. Sitio 3 de muestreo del municipio de Tepeyanco, Tlaxcala.	41
Figura 8. Sitio 4 de muestreo del municipio de Tepeyanco, Tlaxcala.	42
Figura 9. Sitio 5 de muestreo del municipio de Tepeyanco, Tlaxcala.	43
Figura 10. Sitio 6 de muestreo del municipio de Tepeyanco, Tlaxcala.	44
Figura 11. Sitio 7 de muestreo del municipio de Tepeyanco, Tlaxcala.	45
Figura 12. Almacenamiento de muestras de suelo rizosférico.....	46
Figura 13. Preparación de tubos Eppendorf con DNazol.....	47
Figura 14. Pretratamiento de muestras de suelo.....	48
Figura 15. Determinación de materia orgánica.....	50
Figura 16. Fase de digestión de nitrógeno total.	53
Figura 17. Destilación de nitrógeno total.	53

Figura 18. Titulación de nitrógeno total.....	54
Figura 19. Determinación de Textura.	56
Figura 20. Determinación de fósforo aprovechable.....	58
Figura 21. Determinación de densidad aparente.....	59
Figura 22. Tinción de raíces de árbol de aguacate criollo.	61
Figura 23. Selección de campos observados de raíces en microscopio.....	62
Figura 24. Observación de estructuras de colonización de HMA.....	63
Figura 25. Estructuras microscópicas de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en raíces de <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> procedentes del municipio de Tepeyanco, Tlaxcala. M = micelio; V = vesículas; Ar = arbúsculos; Ap = apresorio.....	76
Figura 26. Porcentaje (%) de colonización de HMA en raíces de árboles de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> en Tepeyanco, Tlaxcala.	77
Figura 27. Porcentaje (%) de colonización de HMA de suelo rizosférico asociado a árboles de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> en Tepeyanco, Tlaxcala.	78
Figura 28. Análisis de correlación de porcentaje de colonización respecto de las características edáficas de suelo rizosférico de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>	79
Figura 29. Productos de PCR anidada y purificados.....	80
Figura 30. Abundancia relativa de filos de hongos encontrados en muestras de suelo rizosférico en época de secas (SS) y lluvias (SL), así como en raíz en secas (RS) y lluvias (RL) asociado a árboles de <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> de Tepeyanco, Tlaxcala. Glomeromycota señalado en el recuadro rojo.	81
Figura 31. Número de taxa virtuales encontradas del filo Glomeromycota.....	82
Figura 32. Presencia y ausencia de especies de HMA en muestras de suelo y raíz de cada sitio en épocas de secas y lluvias.	85
Figura 34. Análisis de Componentes Principales (ACP).	89
Figura 35. Número de taxa virtuales definidas a nivel de especie encontradas en muestras de suelo y raíz de manera global.	90

Figura 36. Número de taxa virtuales definidas a nivel de especie encontradas en suelo y raíz en época de secas y época de lluvia.	90
Figura 37. Abundancia relativa (%) de las taxa dominantes de HMA	92
Figura 38. Número de especies de HMA encontradas en Michoacán y taxa virtuales de HMA encontradas en Tepeyanco, Tlaxcala.	93

Índice de Tablas

Tabla 1. Características principales de los tipos de micorrizas.....	20
Tabla 2. Especies de HMA encontradas en suelo rizosférico de <i>P. americana</i> var. Hass empleando técnicas morfológicas.....	31
Tabla 3. Datos de cálculos de volumen (µL) de cada reactivo para formar la mezcla de PCR y condiciones de termociclador para cada PCR anidada	70
Tabla 4. Mezcla de secuencias para primers.	71
Tabla 5. Propiedades físicas y químicas de suelo rizosférico circundante a árboles de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> de Tepeyanco, Tlaxcala.	75
Tabla 6. Resultados de clasificación de análisis moleculares para la identificación de HMA del filo Glomeromycota.	84
Tabla 7. Especies dominantes de taxa virtuales de HMA	91

Índice de Ecuaciones

Ecuación 1. Contenido de humedad gravimétrica.....	49
Ecuación 2. Porcentaje (%) de materia orgánica.	51
Ecuación 3. Porcentaje (%) de nitrógeno total.	52
Ecuación 4. Cálculos de textura.....	55
Ecuación 5. Fósforo aprovechable.	57
Ecuación 6. Densidad aparente.....	59

Ecuación 7. Cálculo para porcentaje de colonización.	63
---	----

Ecuación 8. Cálculo de volumen-volumen.	66
--	----

Resumen

El aguacate (*Persea americana*) es un producto de alto valor económico, México es el principal productor y exportador cubriendo el 43% de producción mundial, siendo Michoacán el principal estado productor a nivel nacional. Debido a su importancia se han realizado diversos estudios para identificar las especies de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) presentes en el suelo rizosférico, así como para determinar el porcentaje de colonización en la raíz del aguacate var. Hass procedente de Michoacán. Además del Hass existe la variedad criolla (var. *drymifolia*) cuyo fruto no tiene un valor económico significativo. Sin embargo, en Tlaxcala a nivel local se ha utilizado como portainjerto debido a su adaptabilidad edafoclimática y su resistencia a *Phytophthora cinnamomi*. El objetivo de este trabajo fue determinar la riqueza de HMA asociado al aguacate criollo utilizando técnicas moleculares, y explorar si existe una correlación con las condiciones edáficas del municipio de Tepeyanco, Tlaxcala. Las muestras se recolectaron en siete puntos diferentes del municipio durante la época de secas y de lluvias, se realizaron análisis fisicoquímicos a muestras de suelo incluyendo pH, sales totales, contenido de humedad, materia orgánica, nitrógeno total, textura, fósforo aprovechable y densidad aparente. Además, se calculó el porcentaje de colonización y se analizó la riqueza de HMA en suelo y raíz mediante secuenciación masiva. Los resultados mostraron que las variables con diferencias significativas fueron las sales totales y el pH. Sin embargo, no se encontró correlación entre el porcentaje de colonización y las características edáficas. Se identificaron un total de 38 especies definidas como taxa virtuales, de las cuales 24 se encontraron únicamente en el suelo y 14 en suelo y raíz, considerando ambas épocas. Siete taxa virtuales se encontraron en común en suelo y raíz en época de secas y lluvia: *Dominikia bernensis*, *D. disticha*, *D. duoreactiva*, *Funneliformis coronatum*, *Glomus compressum*, *G. indicum* y *Rhizophagus diaphanus*. Las especies dominantes fueron *D. duoreactiva* con un 82.14% y *G. compressum* con un 78.57% en abundancia relativa. Estos resultados aportan nuevos registros de HMA que no se habían reportado en asociación con *P. americana* además

de proveer información novedosa de una zona donde el aguacate criollo crece de forma nativa.

Palabras clave: HMA, Glomeromycota, *P. americana* var. *drymifolia*, época de secas, época de lluvias.

Abstract

Avocado (*Persea americana*) is a product of high economic value, with Mexico being the leading producer and exporter, covering 43% of global production, and Michoacán being the main producing state nationally. Due to its importance, various studies have been conducted to identify the species of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) present in the rhizospheric soil, as well as to determine the colonization percentage in the roots of the Hass avocado variety from Michoacán. In addition to Hass, there is the Criollo variety (var. *drymifolia*), whose fruit does not have significant economic value. However, in Tlaxcala, it has been used locally as a rootstock due to its edaphoclimatic adaptability and resistance to *Phytophthora cinnamomi*. The objective of this work was to determine the AMF richness associated with the Criollo avocado using molecular techniques and to explore whether there is a correlation with the edaphic conditions of the Tepeyanco municipality, Tlaxcala. Samples were collected from seven different points in the municipality during the dry and rainy seasons, and physical and chemical analyses were performed on soil samples, including pH, total salts, moisture content, organic matter, total nitrogen, texture, available phosphorus, and bulk density. Additionally, the colonization percentage was calculated, and AMF richness in soil and roots was analyzed through massive sequencing.

The results showed that the variables with significant differences were total salts and pH. However, no correlation was found between the colonization percentage and the edaphic characteristics. A total of 38 species were identified as virtual taxa, of which 24 were found only in the soil and 14 in both soil and roots, considering both seasons. Seven virtual taxa were commonly found in soil and roots during both dry and rainy seasons: *Dominikia bernensis*, *D. disticha*, *D. duoreactiva*, *Funneliformis coronatum*, *Glomus compressum*, *G. indicum*, and *Rhizophagus diaphanus*. The dominant species were *D. duoreactiva* with 82.14% and *G. compressum* with 78.57% relative abundance. These

results contribute new AMF records that had not been previously reported in association with *P. americana*, in addition to providing novel information on a region where the Criollo avocado grows natively.

Keywords: AMF, Glomeromycota, *P. americana* var. *drymifolia*, dry season, rainy season.

I Introducción

El microbioma o microbiota del suelo está conformado por la diversidad de microorganismos que ahí se pueden encontrar, como bacterias, arqueas, virus, protozoos y hongos, varía con base en la ubicación geográfica, vegetación, así como con las variables edáficas del sitio (Djukic *et al.*, 2010). Es difícil saber qué porcentaje de suelos de diversas regiones ha sido analizado a nivel mundial, se puede afirmar que solo una pequeña parte ha sido examinada a detalle hasta el momento. A pesar de que los trabajos de investigación han aumentado, la labor de mapear completamente la biodiversidad del suelo a nivel mundial sigue siendo un desafío significativo y una meta a largo plazo.

Un estudio reciente recopiló datos de análisis metagenómicos de 1,451 muestras de suelos de varias regiones del mundo, abarcando solo un número limitado de muestras comparado con la vasta extensión de suelo global, donde se muestra que las Deltaproteobacterias son una taxa bacteriana principal de fijación de nitrógeno en el suelo presente principalmente en ambientes anaeróbicos (Masuda *et al.*, 2024).

Otro estudio, se centró en los genes de resistencia a los antibióticos de microorganismos que se encuentran en el suelo, se recolectaron muestras de 1012 sitios de 35 países, lo cual es un esfuerzo significativo, pero todavía representa solo una fracción de los diferentes ecosistemas terrestres (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2022). Estos estudios subrayan la complejidad y amplitud de los esfuerzos necesarios para obtener una comprensión completa del microbioma del suelo a nivel global.

Sin embargo, el desarrollo a nivel mundial en cuanto a la superficie de suelo que se requiere para cultivos agrícolas y ganaderos así como los cambios de uso de suelo por diversas razones (i.e. vivienda, industrias, carreteras) ha avanzado por lo que se han perdido espacios que nunca fueron analizados, con ello se ha perdido la información del microbioma que ahí habitaba y de la que ya no se podrá conocer incluidos los microorganismos que podrían ser patógenos para el ser humano, así como para las plantas y otros organismos.

Parte del extenso microbioma del suelo está conformado por microorganismos benéficos, entre ellos, los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) que se asocian con las raíces de las plantas, generando un beneficio tanto para el hongo como para la planta que será la hospedera del hongo. La simbiosis mutualista fue denominada *mycorrhiza* (que en griego significa hongo-raíz) por el patólogo forestal Albert Bernhard Frank a inicios de 1880, cuando describió por primera vez las estructuras y funcionamiento de la asociación (Andrade-Torres, 2010). Con respecto a la taxonomía de los HMA, estos microorganismos pertenecen al filo Glomeromycota (*Catalogue of Life*, 2024).

Los HMA establecen relaciones simbióticas mutualistas con aproximadamente el 90% de las plantas terrestres (Barrer, 2009). Los beneficios que las plantas reciben a través de esta asociación incluyen una mayor facilidad de absorber nutrimentos como el nitrógeno y fósforo que se encuentran en el suelo y que pueden llegar a ser de difícil alcance para la raíz, así como a la obtención de agua, además de brindarle resistencia por estrés hídrico en época de secas; y resistencia ante hongos patógenos y a bajas temperaturas. Para los HMA el asociarse con las raíces de las plantas es vital ya que son endosimbiontes obligados, esta asociación les permite obtener hidratos de carbono provenientes de la planta para completar su ciclo de vida (Camarena-Gutiérrez, 2012).

Entre las plantas en las que se ha reportado colonización con HMA se encuentra las raíces de *Persea americana* Mill. comúnmente conocido como aguacate (Raya Montaña *et al.*, 2019) o palta (Galindo Tovar *et al.*, 2013). A nivel mundial existen más de 100

variedades de este género y pueden diferenciarse por sus características particulares como forma, textura, color, sabor y olor (Rodríguez y Sánchez, 2005; Pérez-Álvarez *et al.*, 2015; SINICS-FSSC-CICTAMEX, 2017), estos dependen de las condiciones edafoclimáticas donde son cultivados, siendo la variedad Hass el más consumido a nivel mundial (Baíza-Avelar, 2003).

Michoacán es el estado con mayor porcentaje de producción (70.6%) de aguacate en México (AGRICULTURA y SIAP, 2022). México es el principal productor de *P. americana*, su presencia comercial representa más del 30% de la cosecha mundial, en 2022 tuvo una producción de 2 millones 529 mil toneladas (STATISTA, producción de aguacate, 2022). Los principales países que exportan *P. americana* a nivel mundial son México, Países Bajos, España, Chile, Sudáfrica, Estados Unidos, Alemania, Australia, Brasil y Tanzania, en 2023 México alcanzó una ganancia de 2,835 millones de dólares (STATISTA, exportadores de aguacate, 2023).

Dentro de las variedades de *P. americana* Mill, se encuentra la var. *drymifolia* o aguacate criollo, como se conoce comúnmente en México. Esta variedad no es muy comercial por sus características físicas menos percederas que la variedad Hass. Sin embargo, ha sido considerada como la variedad más antigua en relación a consumo (Barrientos-Priego y López-López, 1998), mientras que la variedad Hass, surgió en 1935 desarrollada por Rudolph Hass (BBC News, 2023), y en 1963 se establecieron los primeros viveros para su comercialización (Sánchez-Colín *et al.*, 1998). En México, la variedad criolla se encuentra distribuida en diferentes estados, entre ellos Tlaxcala y Puebla. En estas regiones es utilizado como portainjerto de la variedad Hass debido a su alta resistencia a fitopatógenos, fácil adaptación y desarrollo ante adversidades de estrés bióticos como altas o bajas temperaturas (Álvarez Ojeda *et al.*, 2018).

El análisis del microbioma de la rizósfera de *P. americana* Mill var. *drymifolia* en el municipio de Tepeyanco, Tlaxcala brindará información de las especies de HMA asociadas a las raíces y suelo de esta especie vegetal. De igual manera, conocer el porcentaje de colonización es importante puesto que la elevada resistencia que

caracteriza a esta variedad de *P. americana* en el municipio puede deberse, en parte, a los beneficios brindados por la asociación micorrícica.

I.1 Marco teórico

I.1.1 *Persea americana* Mill

México es poseedor de 26 especies del género *Persea*, siendo Chiapas el estado con mayor diversidad y distribución, seguido de Oaxaca y Veracruz (Martínez-Villagómez *et al.*, 2016). *Persea americana* Mill. conocido comúnmente como aguacate, pertenece a la familia Lauraceae, es una especie originaria de México y Centro América de importancia comercial y económica. Este fruto ha sido muy conocido por el hombre desde hace milenios, esto ha sido demostrado con base en evidencias arqueológicas de semillas de *Persea* en Perú enterrados con momias incas en el año 750 a.C., asimismo, en México se encontraron evidencias de su cultivo temprano que datan del año 1,500 a.C. Por otro lado, la especie se dispersó a otros lugares del mundo, después de la llegada de los españoles y de la conquista de América. También se encontraron evidencias de su consumo en México en una cueva en Coxcatlán, región de Tehuacán, Puebla, con una antigüedad de entre 7,000 a 8,000 años a.C. (Pérez-Álvarez *et al.*, 2015).

Se cultiva desde el nivel del mar hasta los 2,500 m s.n.m. No obstante, se recomienda hacerlo en altitudes entre 800 y 2500 m s.n.m. para prevenir enfermedades particularmente en las raíces. A pesar de ser originaria de América Central, actualmente se encuentra en gran parte de países tropicales y subtropicales del mundo. El fruto tiene un alto valor nutrimental, además es bajo en contenido de lípidos, aunado a esto, las hojas y otras partes del árbol se usan en la medicina tradicional en muchos países. Existe evidencia descrita de sus diferentes beneficios cardio metabólicos, como antioxidante, anticancerígeno, antiparasitario y antibacteriano (Vivero *et al.*, 2019).

I.1.2 Características físicas de *P. americana*

El árbol de esta especie tiene una copa muy densa, redondeada o alargada, con ramas jóvenes glabras o pilosas, se han registrado árboles de hasta 20 m de altura, considerándolo mediano o grande con respecto a otros árboles frutales como la guanábana que mide de 3 a 10 m de alto (REVIVEMEX, 2021). El fruto es una drupa en forma de pera, de color verde claro a verde oscuro y de violeta a negro, algunas cáscaras son rugosas, su pulpa es verde amarillenta con una semilla grande al centro (Pérez-Álvarez *et al.*, 2015). Posee un bajo contenido en azúcares, elevado en cuanto a proteínas, y se destaca por su riqueza en sales minerales, ácidos orgánicos y vitaminas liposolubles (Chil *et al.*, 2019). Dentro de la especie se encuentran diferentes variedades, distribuidas en México con base en las características edafoclimáticas (Martínez-Villagómez *et al.*, 2016).

I.1.3 Variedades de *P. americana*

Persea americana se clasifica en cuatro razas o grupos principales que hacen referencia a sus características específicas:

- Guatemalteca (*P. americana* var. *guatemalensis*)
- Antillana (*P. americana* var. *americana*)
- Costarricense (*P. americana* var. *costaricensis*)
- Mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*)

El término raza se utiliza debido a las características propias que posee *P. americana* como el color de brotes y hojas, forma y longitud del pedúnculo, tamaño y cáscara del fruto, (Baíza-Avelar, 2003). Las variedades más comercializadas internacionalmente son Fuerte, Nabal y Hass (Pérez-Álvarez *et al.*, 2015), este último con características del 95% de la Guatemalteca y 5% de la Mexicana siendo una variedad introducida y mejorada con base en las características que exige el mercado por lo que se considera la principal variedad comercial a nivel mundial (Baíza-Avelar, 2003).

I.1.4 Producción de *P. americana* a nivel nacional e internacional

El consumo per cápita anual de la variedad Hass en México en el año 2022 fue de 8.75 kg. México es considerado el principal productor y exportador de *P. americana* a nivel mundial (Cruz-López *et al.*, 2022), en 2021 se alcanzaron los 2.44 millones de t que representa el 43% de la producción mundial, esto fue resultado de la cosecha de huertas ubicadas en una extensión de 226,000 hectáreas en el país (FAOSTAT, 2021). Los principales países importadores son: Estados Unidos de América, Israel, Francia, Inglaterra, Canadá y Japón. A lo largo del ciclo de julio de 2019 a junio de 2020, México exportó alrededor de 964,000 t a USA, valoradas en más de 2,400 millones de dólares (Cruz-López *et al.*, 2022).

I.1.5 *Persea americana* var. *drymifolia* (aguacate criollo)

La mayoría de las variedades comerciales de *P. americana* son el resultado de híbridos desarrollados a partir del intercambio genético entre variedades. La var. Hass en particular se obtuvo de la cruce entre las razas mexicana y guatemalteca, originarias de las zonas montañosas del centro y este de México y zonas altas de Guatemala. Además, entre la variedad mexicana se encuentran las variedades criollas que son utilizadas como portainjerto para cultivar aquellas variantes altamente comerciales (Acosta Díaz *et al.*, 2012)

La variedad mexicana puede encontrarse en climas subtropicales y templados, en alturas de 1,500 a 2,000 m s.n.m., su fruto contiene un alto porcentaje de aceite, tiene una semilla grande y poca pulpa, con pedúnculo cilíndrico de grosor medio, tiene un sabor ligeramente a picante y sus hojas un aroma característico a anís (Baíza-Avelar, 2003). Las variedades criollas, más allá de representar una alta demanda comercial, son de consumo local y se ha buscado mantener su variabilidad genética, para ello en Nuevo León se han implementado sistemas de cultivo tradicionales que funcionan como reservorios de la diversidad de esta variedad.

La variedad criolla de aguacate ha sido poco estudiada a nivel genético, pese a que presenta una alta resistencia al ataque por plagas y enfermedades, asimismo, se ha demostrado que presenta una adaptabilidad a diferentes condiciones edafoclimáticas

(Álvarez Ojeda *et al.*, 2018). Además, no ha logrado ser comercializada a nivel internacional a causa de sus características físico-mecánicas y ser un producto altamente perecedero. Adicionalmente, su consumo a nivel local se ha visto disminuido por causa de la introducción de nuevas variedades como el Hass y Fuerte (Méndez-Zúñiga y Corrales-García, 2020).

I.1.6 Hongos Micorrícicos Arbusculares (HMA)

La rizósfera hace referencia a la sección del suelo que está muy cercana alrededor de la raíz de las plantas e incluye la superficie de la epidermis (rizoplaneo) y la endorizósfera, como en el caso de las asociaciones endosimbióticas con hongos micorrícicos arbusculares (HMA). La ectorizósfera, comprende un espacio entre 1 y 2 milímetros desde la epidermis radical hacia el suelo, y se puede distinguir de otras secciones del suelo debido a la riqueza de la actividad microbiana que se puede encontrar en la rizósfera; donde participan las raíces de las plantas y diferentes exudados -no solamente los provenientes de las plantas-, sino también la parte correspondiente al suelo, agua, nutrimentos, macroorganismos como cochinillas, ciempiés, hormigas, larvas, caracoles, meso organismos; tardígrados, colémbolos, ácaros y microorganismos; como otros hongos, bacterias, amebas, levaduras entre otros seres que se encuentran interactuando (Hartmann *et al.*, 2008). Uno de los microorganismos que se encuentran en la rizósfera son los HMA que se asocian a las raíces de las plantas.

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA), son organismos asexuales, simbioses obligados (Schüßler *et al.*, 2001), que han desarrollado la capacidad de formar una asociación simbiótica mutualista con las raíces de diversas especies de plantas. Esta asociación cumple una función muy importante en el sentido del aprovechamiento de los recursos minerales del suelo en beneficio mutuo (Camarena-Gutiérrez, 2012).

Los HMA mediante estructuras que desarrolla fuera y dentro de la raíz, translocan nutrimentos que se encuentran en el suelo y que son de difícil acceso para la planta, principalmente fósforo, nitrógeno, potasio y otros elementos poco móviles en la rizósfera del suelo (Cruz *et al.*, 2014). Por su parte, mediante la fotosíntesis la planta obtiene

hidratos de carbono de los cuales entre un 15 y 30% son transferidos hacia el micelio de estos microorganismos (Chapin *et al.*, 2011), elementos que son esenciales para su desarrollo durante su ciclo de vida, lo cual permite a la planta mantener la simbiosis con un menor gasto de carbono en comparación con la generación de raíces (Koide, 1991).

Debido a este intercambio de nutrientes es como las plantas hospederas consiguen mejorar su estado nutricional, los HMA de manera indirecta ayudan a que las plantas tengan una mayor tolerancia ante condiciones adversas bióticas: plagas y enfermedades y abióticas: acidez y sequías, salinidad (Chávez-Hernández *et al.*, 2021). Además de mejorar la nutrición que los HMA brindan a las plantas, ayudan a que el suelo tenga una mejor estructura en cuanto a la formación de agregados y a su estabilidad, asimismo, mediante la extensión del micelio extrarradical previene procesos de erosión (Lozano Sánchez *et al.*, 2015), esto lo logra a través de la secreción de glomalinas, glicoproteínas que funcionan como un material adherente de las partículas del suelo (Smith *et al.*, 2010).

En la Figura 1 se representa el arreglo taxonómico del filo Glomeromycota al que pertenecen los HMA que se han encontrado en suelo rizosférico de diversas especies de plantas (*Catalogue of Life*, 2024). Se han reportado 360 especies, 5 órdenes, y 14 familias, en las cuales están distribuidas las especies que se han identificado a la fecha.

Phylum	Orden (5)	Familia (13)	Número de especies reportadas (360)
Glomeromycota	Archaeosporales	Geosiphonaceae	1
		Polonosporaceae	1
		Archaeosporaceae	8
		Ambisporaceae	10
	Diversisporales	Scutellosporaceae	1
		Pacisporaceae	6
		Diversisporaceae	30
		Gigasporaceae	60
		Acaulosporaceae	65
		*Intraomatospora	1
	Entrophosporales	Entrophosporaceae	12
	Glomerales	Glomeraceae	148
		*Claroideoglomeraceae	1
		*Palaeoglomus	2
	Paraglomerales	Paraglomeraceae	11
	Otros	Pervertustaceae	1
		*Desconocidos	2

Figura 1. Clasificación de los HMA. Información extraída de Catalogue of Life, consultada en abril 2024.
*No identificados en algún grupo ya establecido.

Generalmente en las comunidades vegetales predomina la asociación micorrícica (Brundrett y Tedersoo, 2018), la cual es una asociación cosmopolita que está distribuida prácticamente en todos los biomas del planeta (Aguilera-Gómez *et al.*, 2007). De acuerdo con Brundrett y Tedersoo (2018) se definen cuatro tipos principales de micorrizas, de acuerdo con los criterios de diferenciación morfológica de los tejidos radicales y de las plantas hospederas: 1) micorrizas arbusculares (MA), 2) ectomicorrizas (ECM), 3) micorrizas ericoides (MEr) y 4) micorrizas orquidioides (MOr).

En la Tabla 1 se describen los principales tipos de micorrizas, la descripción es con base en sus características morfológicas, su dependencia hacia la raíz, por los beneficios que ambos simbiosntes reciben, y por los grupos filogenéticos de su asociación con diversos

grupos filogenéticos de plantas. La MA coloniza la corteza de la raíz mediante estructuras especializadas denominadas hifas, y posteriormente en el cortex interno de la raíz se desarrollan arbuscúlos y vesículas (Aguilera-Gómez *et al.*, 2007). En las ECM las hifas no penetran la raíz hasta el tejido cortical sino que se concentran en la epidermis principalmente (Brundrett, 2004), las Mer se distinguen por formar asociaciones con plantas de la familia Ericaceae (Carrillo *et al.*, 2015) y las MOr se asocian con plantas de la familia Orchidaceae (Rivas *et al.*, 1998).

Tabla 1. Características principales de los tipos de micorrizas (Brundrett y Tedersoo, 2018).

Característica	Arbuscular	Ectomicorriza	Ericoide	Orquidiode
Caracteres morfológicos	Con arbuscúlos y vesículas (presentes o ausentes); colonización de micelio de la superficie radicular hasta el córtex interno de la raíz.	Presenta una red de Hartig o manto hifal: no hay una colonización intracelular profunda (solo epidermis y las capas más externas del córtex).	Enrollamiento hifal en las células presentes; cada célula se coloniza por separado de la superficie de la raíz; no hay un manto hifal.	Pelotones hifales presentes en las células de la raíz: colonización de micelios de la superficie radicular o de células vecinas.
Dependencia de la planta	Obligatorio (supervivencia con competencia reducida)	Obligatorio (supervivencia con competencia reducida)	Obligatorio	Obligatorio para el desarrollo de plántulas y nutrición adulta.
Beneficios suministrados a las plantas	Nutrición (nutrientes mineralizados), protección a estreses bióticos y abióticos.	Nutrición (mineralizada, nutrientes orgánicos simples), protección a factores bióticos y abióticos.	Nutrición (mineralizada, nutrientes orgánicos simples), se desconoce si existe protección a factores bióticos y abióticos.	Nutrición (mineralizada, nutrientes orgánicos, energía de carbono), protección limitada a factores bióticos y abióticos.
Beneficios al hongo	Energía en forma de carbono, hábitat.	Energía en forma de carbono, hábitat.	Hábitat en las raíces y el suelo a través de la alelopatía.	No se ha reportado
Presencia de asociaciones	Plantas (grupos múltiples).	En plantas (Monotropoideae, Pyroleae), condicionalmente hongos.	No se conoce	Plántulas en germinación y plantas adultas (al menos parcialmente).
Asociaciones vegetales: grupos filogenéticos	Plantas vasculares, briófitas taloides; múltiples cambios entre MA, ECM y no micorrización.	Dos órdenes de gimnospermas, 28 órdenes de angiospermas.	Ericaceae, Diapensiaceae (Ericales)	Orchidaceae
Asociaciones fúngicas: grupos filogenéticos	Glomeromycota	Endogonomycetes, Pezizomycetes y Agaricomycetes	Helotiales, Chaetothyriales, Serendipitaceae, Pekloderma	Agaricomycetes y Pezizomycetes, especialmente Tulasnellaceae, Ceratobasidiaceae y Serendipitaceae (Sebacinales)

I.1.7 Estructuras de los hongos micorrícicos arbusculares

Las hifas de estos hongos forman el micelio, el cual coloniza el apoplasto y las células corticales de la raíz, a la vez, se propagan en el suelo formando una extensa red que servirá para llevar a cabo la traslocación de nutrimentos (Camargo-Ricalde *et al.*, 2012). La red que se forma en el suelo está conformada por las hifas extrarradicales o hifas externas. Estas hifas se diferencian en tres tipos según su morfología y función:

- Hifas colonizadoras: forman apresorios o hifopodios que por presión mecánica y enzimática debilitan la pared celular vegetal e inician los puntos de colonización en una o varias raíces.
- Hifas absorbentes: exploran el suelo para la extracción de nutrimentos.
- Hifas fértiles: se encargan de formar esporas (Barrer, 2009).

Las asociaciones micorrícicas comienzan cuando las hifas extracelulares de los HMA responden a la presencia de los factores de señalización de la raíz dirigiéndose hacia ella, de esta manera van estableciendo el primer contacto y crecen a lo largo de su superficie, posteriormente, las hifas producen hinchazones o protuberancias denominadas apresorios o hifopodios las cuales funcionan como estructuras de fijación para la fase de comunicación presimbiótica. Posteriormente el micelio se va adhiriendo a la pared celular de las raíces de la planta y por medio de acción enzimática y mecánica una hifa logra colonizar la célula vegetal, en el interior ésta se invagina a través de la epidermis vegetal, posteriormente invade a través de aparatos de pre-penetración inter- e intra- radicalmente, y comienza a propagarse en las células de la corteza hasta llegar a la corteza interna donde forma estructuras especializadas en el intercambio de nutrientes denominados arbuscúlos (Brundrett, 2008, Bonfante y Genre, 2010).

Los arbuscúlos son estructuras de las hifas formadas en las células del córtex interno altamente ramificadas (Vigneron *et al.*, 2018). Estos comienzan a formarse aproximadamente dos días después de la penetración de la raíz. Se encuentran rigurosamente envueltos por una membrana vegetal y una membrana periarbuscular (MPA) la cual es envuelta por pared vegetal modificada, con el fin de que se mantenga en un apartado apoplástico dentro de la célula, el apoplasto es estrecho y la MPA es

expansiva; estas características le confieren una interfaz con condiciones favorables para el intercambio bidireccional de nutrientes (Roeder *et al.*, 2022). Además, presentan periodos de vida cortos, de aproximadamente 15 días (Barrer, 2009), por otro lado las hifas y vesículas pueden permanecer en las raíces durante meses o años (Brundrett, 2008).

Las vesículas son hinchazones de las hifas que se desarrollan entre las células corticales de la raíz cuya función es ser el reservorio de lípidos y citoplasma, que se presume sea utilizado para el ciclo reproductivo en la formación de esporas. Estas estructuras se forman poco después de los primeros arbusculos, y continúan desarrollándose aun cuando estos envejecen. Las vesículas desarrollan paredes gruesas dentro de las raíces más longevas y funcionan como estructuras de propagación (Brundrett, 2008). En algunos géneros como en *Gigaspora* y *Scutellospora* no se producen vesículas, sin embargo, se presentan otras estructuras denominadas células auxiliares (Barrer, 2009).

Las esporas son estructuras que se forman como protuberancias de las hifas que se encuentran en el suelo como en la raíz, se producen cuando los nutrientes de intercambio se remueven de las raíces donde las estructuras de asociación están envejeciendo hacia otras estructuras funcionales, asimismo, las esporas funcionan como propágulos, desarrollan paredes gruesas con más de una capa, contienen un almacenamiento de lípidos (Brundrett, 2008) en forma de triacilglicerol que ayudan a su germinación (Choi *et al.*, 2018). Además, son estructuras multinucleadas que tienen entre 130 y hasta 350,000 núcleos individuales lo cual depende de la especie de HMA, de su estado fisiológico e incluso de su tamaño (Kokkoris *et al.*, 2020).

I.1.8 Señalización en la simbiosis y ciclo de vida de los HMA

Las plantas sintetizan moléculas orgánicas llamadas hormonas vegetales o fitohormonas que utilizan en bajas concentraciones, estas ayudan a la regulación de todos los procesos fisiológicos y bioquímicos que las plantas requieren, desde la división celular, crecimiento, germinación y hasta llegar a la senescencia, incluyendo la respuesta ante la presencia de patógenos (Porta y Jiménez-Nopala, 2020). Cada tipo de fitohormona

tiene una función diferente; las auxinas regulan la iniciación y distinción de células de intercambio en los tejidos vasculares y están involucradas en la definición de la morfología y arquitectura del tejido radical, mientras que las citoquininas controlan la división celular, asimismo, los brasinoesteroides incrementan la tasa de elongación de las células del tallo y el aumento en la expansión de las hojas mientras que las giberelinas se ven involucradas en la expansión del xilema y la diferenciación de fibras xilemáticas (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

En la identificación del factor de ramificación hifal se han buscado en los exudados en las plantas hospederas de HMA, como lo mencionó Steinkellner *et al.* (2007), quienes encontraron a las estrigolactonas, como posibles factores de ramificación del micelio, estos compuestos pertenecen al grupo de las lactonas terpénicas que son sintetizadas mediante la ruta de los carotenoides. Además, su contenido aumenta en respuesta a la deficiencia de fósforo y nitrógeno, ayudando las estrigolactonas en la adaptabilidad de la planta a través del aumento del desarrollo de raíces primarias y adventicias (Alcantara-Cortes *et al.*, 2019). También pueden promover la simbiosis micorrícica ya que fungen como factores de señalización reconocidos por los HMA e inducen la ramificación hifal (Alcantara-Cortes *et al.*, 2019 ; Asier-Mota *et al.*, 2020).

Los HMA al ser simbiosis obligados, requieren de una planta hospedera para completar su ciclo de vida, y propagarse por medio de esporas, hifas y por la colonización de las raíces (Wilches Ortiz *et al.*, 2019). En la Figura 2 se ejemplifica el ciclo de vida de los HMA. Las esporas tienen la capacidad de germinar aún sin la presencia de un hospedero (Buckling *et al.*, 2012). En caso de que no haya un hospedero presente en el ambiente; el crecimiento hifal se ve limitado y se detiene antes de que se termine el reservorio energético total de esporas, debido a que no tendría el alimento requerido para sobrevivir (Akiyama y Hayashi, 2006).

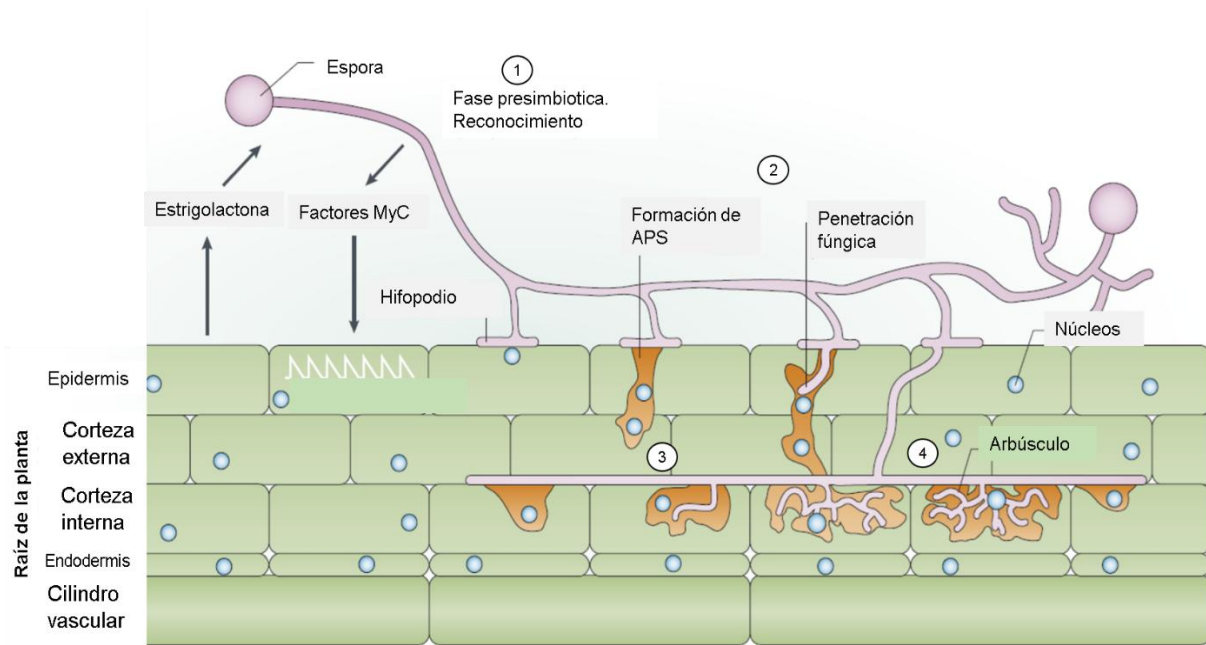


Figura 2. Ciclo de vida un Hongo Micorrízico Arbuscular y su desarrollo durante la asociación. Imagen tomada y modificada de Parniske (2008).

El desarrollo de la simbiosis (Figura 2) puede dividirse en etapas: (1) comunicación pre simbiótica donde la raíz de la planta en condiciones limitantes de fósforo libera estrigolactonas que son los factores de señalización reconocidos por los Factores MyC -aún no caracterizados- provenientes de esporas de HMA para formar la pre-simbiosis, (2) contacto y penetración, que se lleva a cabo en la superficie de la raíz hospedera, los HMA forman un apresorio específico denominado hifopodio debajo del sitio de contacto de las células subyacentes que forman un aparato conocido como aparato de pre-penetración que consiste en formar un canal en las células corticales por el cual ingresa la hifa y crece de manera intracelular hasta llegar a las capas de las células corticales internas, (3) propagación sobre la corteza externa que realiza la hifa proveniente del hifopodio y penetra a la raíz colonizando los espacios inter- e intracelulares del apoplasto, creciendo de manera lateral a lo largo del eje de la raíz, (4) formación del arbúsculo y de vesículas (Choi *et al.*, 2018). A pesar de la naturaleza cenocítica del micelio fúngico, hay una diferencia morfológica y funcional entre el micelio que se forma dentro de la raíz (micelio intrarradical) y el que crece en el suelo (micelio extrarradical). El micelio extrarradical absorbe los nutrientes que se encuentran en el suelo y los transfiere hacia la raíz hospedera. Mientras que el micelio intrarradical libera los

nutrimentos en el apoplasto interfacial e intercambia estos por carbono del hospedero. Finalmente, el hongo utiliza esa fuente de carbono para crecer y preservar el micelio extrarradical con el fin de mantener su metabolismo celular, y desarrollar esporas nuevamente (Bucking *et al.*, 2012).

Las esporas de estos hongos son multinucleadas y durante su germinación algunos núcleos migran hacia nuevas hifas, esta acción permite que se lleven a cabo diferentes re-germinaciones en caso de que la hifa no encuentre un hospedero o que la hifa se dañe físicamente. Si eso ocurre los HMA tienen la capacidad de regresar el citoplasma y los núcleos hacia la espora y conservarlos, sin embargo, si eso ocurre quedan huecos en las hifas provocando una separación entre las hifas viables por tabiques de retención (septos), es así que las hifas viables son consideradas hifas cenocíticas (hifas no septadas) (Kokkoris *et al.*, 2020). Por tanto la reproducción asexual de las esporas multinucleadas de HMA mediante la división mitótica, así como de la dinámica nuclear son un modelo de la contribución para la longevidad evolutiva del filo Glomeromycota (Jany y Pawlowska, 2010).

I.1.9 Beneficios de los hongos micorrícicos en la agricultura

Los fertilizantes son utilizados para cubrir las deficiencias nutrimentales del suelo, indispensables y necesarios para un crecimiento y desarrollo óptimo de las plantas y cultivos agrícolas. Su aplicación surgió a causa del incremento poblacional, y por ende por la necesidad de incrementar la producción lo que llevo a considerar como la mejor estrategia la aplicación de estas sustancias con el fin de suplir la demanda de alimentos (Gutiérrez, 2020). Esta aplicación se vio acrecentada en algunos países de América Latina y el Caribe (LAyC) durante el periodo de 2006 a 2012, sin embargo, en Trinidad y Tobago no se presentó dicho incremento, a pesar de que es uno de los países de LAyC que más utiliza fertilizantes. En el caso de México, en el mismo periodo se aplicaron de 15.1 a 15.6 kg de fertilizante por hectárea cultivada (Reyes y Cortés, 2017). Es así que se ha visto el alza del uso de los fertilizantes químicos, pues tan solo en el periodo de 2019 a 2021, aumentó la cantidad aplicada de 426.3 a 496.8 kg de fertilizante por

hectárea cultivable, correspondiendo a un 14.19% en LAYC (The World Bank Group, 2021).

El uso desmedido de fertilizantes en la agricultura representa consecuencias para la salud ambiental y de los seres vivos del planeta, los elementos que forman parte de la composición química de este tipo de agroquímicos pueden acumularse en el suelo, se han encontrado metales pesados como As, Cu, Hg, Mn, Ni y Pb acumulados y biodisponibles en el suelo, asimismo, estos por medio de la transferencia trófica son acumulados por organismos de un nivel trófico determinado, bioacumulándose en sus tejidos ya que se trata de sustancias persistentes de difícil excreción, como consecuencia, los organismos de eslabones superiores acumulan en mayor proporción estos contaminantes a través de una exposición a la contaminación ambiental, los niveles de contaminantes se van magnificando a lo largo de la cadena trófica, dándose como resultado el fenómeno de biomagnificación consistente del incremento de estos elementos químicos. Además, los elementos y residuos de fertilizantes acumulados en los suelos pueden transportarse por medio de la escorrentía y lixiviación hacia cuerpos de agua como ríos, lagos, y aguas subterráneas. Kawo y Karuppannan (2018) evidenciaron la presencia de cationes como el Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ y aniones HCO_3^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , F^- , Cl^- en aguas subterráneas. Es importante mencionar que en diferentes lugares del mundo este tipo de agua es una de las principales fuentes para abastecer a zonas urbanas. La calidad de agua en cada zona puede variar dependiendo de qué haya alrededor o cerca del punto de estudio, además de los fertilizantes, las zonas industriales también contribuyen a contaminar los cuerpos de agua.

Otras consecuencias ambientales de la fertilización química en el suelo son la variación del pH, deterioro de su estructura y de la microbiota, el impacto negativo al aire se debe por la toxicidad directa generada por el amoníaco y dióxido de nitrógeno. Asimismo, por medio de la advección a través del viento, la lixiviación y escorrentía desde el suelo, los fertilizantes pueden transportarse a diversas áreas, acumularse con el paso del tiempo y depositarse hacia cuerpos de agua. No obstante, la aplicación de fertilizantes orgánicos o también llamados abonos orgánicos representan y tienen grandes ventajas para los

cultivos y agricultores, razón por la que se han empleado desde el inicio de la agricultura hace más de 8,000 años (Fitonutrient, 2020).

En este contexto podemos decir que los abonos o enmiendas orgánicas son aquellos que son elaborados con estiércol vacuno, ovino, porcino y avícola para producir composta, también se utilizan otros desechos de origen animal o vegetal como los residuos de cultivos y domésticos. La lombricomposta y bocashi también forman parte de este grupo de fertilizantes orgánicos que contribuyen a mantener y aumentar la fertilidad del suelo, así como a mejorar su productividad y la de los cultivos sin la necesidad de usar químicos (Universidad Veracruzana, 2017).

Para lograr un aumento de la productividad de las plantas al usar fertilizantes orgánicos es importante tener en cuenta el tipo de suelo, así como el cultivo al que será adicionado ya que no todos estos tendrán la misma efectividad debido a su diferencia de contenido nutrimental y de esta manera se aprovechan mejor sus beneficios. Sin embargo, no hay investigaciones en todos los cultivos de interés socioeconómico para establecer las concentraciones idóneas de aplicación para un mejor desarrollo de los cultivos. En algunas ocasiones la mejor opción será hacer una combinación de ellos con las proporciones ideales (Aguilar *et al.*, 2016), incluso con la combinación de sustratos para que la planta tenga un mejor desarrollo estructural.

Del mismo modo que se han implementado otras alternativas con el paso del tiempo, comenzaron a emplearse los biofertilizantes para evitar el aumento de la contaminación que se generó a partir del exceso de aplicación de fertilizantes a base de químicos. Los biofertilizantes, al tener el prefijo bio (vida) nos indica que contiene microorganismos, entre los cuales pueden formar parte las bacterias y los hongos (Santillan, 2016).

Entre los microorganismos que han sido utilizados como biofertilizantes, de acuerdo con su función se encuentran los fijadores de nitrógeno de vida libre como *Azotobacter* spp. y *Clostridium* spp., de vida asociativa *Azospirillum* spp., o simbiótica *Rhizobium* spp. y *Trichodesmium* spp. Por otro lado, están los microorganismos movilizadores de fosfato

Bacillus circulans, *B. subtilis*, solubilizadores de zinc *Bacillus* spp., y *Pseudomonas* spp., movilizadores de potasio *Aspergillus brasilensis* y *Bacillus* spp., oxidantes de azufre *Thiobacillus* spp., promotores de crecimiento de plantas *Bacillus*, *Erwinia*, *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas* y *Xanthomonas* y para procesamiento de micro nutrientes *Thiobacillus* spp., *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. (Kumar *et al.*, 2022).

También se han empleado a los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) dentro de la gama de los biofertilizantes por todos los beneficios que aportan al formar la asociación mutualista con las raíces de las plantas. Han sido utilizados en leguminosas, cítricos, papaya, aguacate, manzana, mango, fresa, durazno entre otros. Además, la micorriza arbuscular crea asociaciones con diferentes especies de briofitas (musgos), pteridofitas (helechos), gimnospermas (*Pinaceas*, *Cycadaceas*), y muchas otras angiospermas (plantas con flor) (Andrade-Torres, 2010). Su aplicación genera una reducción de costos de producción, obtención de cultivos más saludables, cosechas tempranas debido a una mejor nutrición, el uso de HMA es completamente orgánico y el rendimiento de los cultivos aumenta hasta en un 30 %, además de mejorar la salud del suelo, aminora el consumo de agua mejorando su aprovechamiento hasta en un 30%, enriquece a la planta desde la raíz, promueven la absorción y traslocación de nutrientes esenciales que se encuentran en el suelo como el nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), y estimula la producción de hormonas que ayudan a crear un sistema radicular de mayor tamaño (Méndez-Gálvez, 2021; López-Morales *et al.*, 2022).

Las plantas están expuestas día con día a diferentes situaciones que afectan su supervivencia. Se han realizado estudios como el de Saparrat *et al.*, (2020) donde se comprobó que la asociación entre la raíz y el hongo aporta diversos beneficios durante el desarrollo de ella, como mejorar la traslocación y absorción de nutrientes, facilita la captación de agua mejorando la eficiencia de su uso en condiciones de sequía, también activa el sistema de defensa antioxidante, además favorece la acumulación de osmolitos e incrementa la traslocación de fotoasimilados, la estabilización de lípidos de la membrana y la síntesis de clorofila. Aunado a esto, la asociación micorrícica hace más eficiente el uso de los fertilizantes químicos y de esta manera reduce su uso excesivo,

por otro lado, las plantas micorrizadas tienen la capacidad de utilizar de mejor manera los fertilizantes orgánicos reduciendo el uso de agroquímicos en los cultivos (Cuenca *et al.*, 2007).

Se han aplicado HMA en suelos agrícolas, para discernir de una mejor manera con que combinación y en qué proporciones se obtienen mejores resultados en cuanto a los nutrimentos que el cultivo requiere. En cultivos de tomate se efectuaron dos experimentos con HMA y humus de lombriz, solos y combinados, determinando que aun utilizando solo HMA se mejoró significativamente el rendimiento total y la calidad bromatológica del fruto en parámetros como sólidos solubles totales y vitamina C. Incluso en comparación con el uso neto de fertilizantes químicos en cosechas pasadas, los HMA mostraron mejores resultados (Charles y Alonso, 2015).

Otros beneficios de los HMA incluyen la capacidad de fomentar un mecanismo de defensa para las raíces de las plantas hospederas ante fitopatógenos (Reyes Tena *et al.*, 2016). Aunque no todas las especies tendrán la misma efectividad ante los mismos patógenos, depende mucho de las condiciones edáficas y climáticas a las que los HMA estén adaptados y del cultivo al que se asocien (Ortega, 2015). Actualmente ya se comercializan HMA como biofertilizante, algunas de las especies que se pueden encontrar son: *Glomus intraradices* (PRO-MIX, s/f), un consorcio de 12 especies de HMA que han ido trabajando desde 1993 en la Universidad Veracruzana (Agropunto, s/f) y *Glomus hoi* like que es de origen cubano (Endomic, s/f). Sin embargo, no todas las especies de HMA tendrán los mismos efectos sobre diferentes cultivos en el que se forme la asociación.

Esto se ha comprobado en algunas investigaciones donde se ha utilizado papaya como cultivo modelo debido a que es una planta altamente micótrofa (Jaizme-Vega *et al.*, 2006; Khade y Rodrigues, 2009) o muy dependiente de la asociación con los HMA para favorecer su crecimiento y desarrollo. Para lograr una buena efectividad y aprovechar al máximo los beneficios de los HMA, es necesario utilizar biofertilizantes con HMA aislados de la zona/región cercanos a donde se pretende aplicar, dado que por la adaptación a

las condiciones edáficas y climáticas que tienen a la región de origen pueden obtenerse resultados diferentes (Quiñones Aguilar *et al.*, 2019).

I.2 Antecedentes

Poco a poco se ha ido corroborando y afirmando que aunque se necesite más tiempo para observar los beneficios de detener la aplicación de fertilizantes químicos sustituyéndolos por abonos orgánicos, esto vale la pena, ya que posterior a su aplicación la fertilidad del suelo mejora y los nutrimentos estarán disponibles para la siguiente temporada (Campos-Mariscal *et al.*, 2020). Es así que se ha ido implementando la aplicación de HMA para aprovechar todos sus beneficios, la inoculación de estos microorganismos en *P. americana* se ha llevado a cabo principalmente en la variedad Hass, sin embargo no todas las especies aisladas tendrán la misma efectividad y/o respuesta al ser aplicadas en diferentes zonas del mismo cultivo o a diferentes variedades, es por ello que la aplicación de especies previamente aisladas es fundamental ya que cada una brindará diferentes beneficios en diferentes etapas a los cultivos (Carreón Abud *et al.*, 2014).

Montañez Orozco *et al.* (2010), llevaron a cabo un estudio en plantas de *P. americana* en vivero, con el fin de evaluar la colonización micorrícica, para ello utilizaron tres suelos diferentes provenientes de huertos ubicados en Meta, en los llanos orientales de Colombia, emplearon dos cepas nativas pertenecientes a los géneros *Glomus* y *Acaulospora*, e inocularon tres variedades de *P. americana*: Lorena, Santana y Común. El mayor porcentaje de colonización se obtuvo en la variedad Común con un 58%, seguido por Lorena 54% y por último Santana 51%, la especie de HMA que tuvo un alto porcentaje de colonización fue *Acaulospora* con 82%, seguida de *Glomus* con un 77%. La diferencia de la colonización de poblaciones de HMA pueden deberse a que estas están compuestas por esporas de diferentes edades, así como en diferentes estados de latencia. Respecto a los suelos que fueron utilizados de La Libertad, Taluma, y Puerto Colombia, éstos tuvieron textura Arcillosa, Arenoso Franco y Arenoso Franco, respectivamente. El pH se mantuvo equilibrado en 5.9 con cal dolomita con el fin de

estandarizar las condiciones, se presentó un mayor porcentaje de colonización de 63% en el suelo de La Libertad, seguido por Taluma con 55% y Puerto Colombia con un 45%; los resultados se correlacionan con el contenido de fósforo en cada tipo de suelo donde los análisis químicos mostraron que en Puerto Colombia se encontró un alto contenido de fósforo y se presentó el menor porcentaje de colonización en comparación con los dos restantes donde el contenido de fósforo era deficiente, mientras que el porcentaje de colonización fue mayor confirmando observaciones previas que sugieren que una elevada disponibilidad de fósforo puede inhibir la colonización por HMA.

Se concluyó que la colonización puede ser regulada por la compatibilidad de los HMA hacia cada variedad vegetal, así como la estimulación en la germinación de las esporas. Además, la diferencia en el porcentaje de colonización también puede ser determinada con base en las características particulares de cada variedad de *P. americana*, dado que se sabe que la variedad Común presenta una alta adaptabilidad en diferentes condiciones ambientales lo que se correlaciona con el alto porcentaje de colonización. En la Tabla 2 se presenta el listado de las especies de HMA asociadas a la rizósfera de *P. americana* variedad Hass, producto de investigaciones realizadas con muestras provenientes del estado de Michoacán, México. Asimismo, se citan las especies registradas por Aranguren-Aroca *et al.* (2015) provenientes de Colombia.

Tabla 2. Especies de HMA encontradas en suelo rizosférico de *P. americana* var. Hass empleando técnicas morfológicas.

Autor	No. especies	Género	Especie
Aguirre <i>et al.</i> (2007)	10	<i>Acaulospora</i>	<i>spinosa</i> , <i>scrobiculata</i>
		<i>Gigaspora</i>	sp. 1, sp. 2
		<i>Funneliformis</i>	<i>geosporus</i> , <i>constrictus</i>
		<i>Sieverdingia</i>	<i>tortuosa</i>
		<i>Scutellospora</i>	<i>verrucosa</i> , <i>coralloidea</i> ,
		<i>Sclerocistis</i>	<i>pachycaulis</i>
Bárcenas-Ortega <i>et al.</i> (2011)		<i>Acaulospora</i>	<i>cavernata</i> , <i>delicata</i> , <i>denticulata</i> , <i>excavata</i> , <i>laevis</i> , <i>mellea</i> , <i>remhii</i> , <i>scrobiculata</i> , <i>spinosa</i> , sp. 1, sp. 2, sp. 3, sp. 4, sp. 5
		<i>Archaeospora</i>	sp. 1
		<i>Ambispora</i>	<i>jimgerderdemannii</i> , <i>gerdermanni</i>
		<i>Cetraspora</i>	<i>pellucida</i>

	49	<i>Dentiscutata</i>	<i>erythropus, heterogama, reticulata</i>
		<i>Diversispora</i>	aurantia
		<i>Entrophospora</i>	<i>infrequens</i>
		<i>Glomus</i>	<i>spinuliferum, liquidambaris, rubiforme, sinuosum, taiwanense, fuegianum, sp. 1</i>
		<i>Funneliformis</i>	geosporus, constrictus, mosseae
		<i>Sieverdingia</i>	tortuosa
		<i>Gigaspora</i>	<i>gigantea, decipiens, sp. 1</i>
		<i>Halonatospora</i>	pansihalos
		<i>Pacispora</i>	<i>sp. 1</i>
		<i>Rhizophagus</i>	<i>clarus</i>
		<i>Scutellospora</i>	<i>castanea, calospora, dipapillosa, scutata, verrucosa, gregaria sp. 1, sp. 2</i>
Carreón-Abud et al. (2013)	12	<i>Acaulospora</i>	delicata, mellea
		<i>Ambispora</i>	<i>leptoticha</i>
		<i>Funnelliformis</i>	geosporus
		<i>Glomus</i>	rubiforme, sp. 1, sp. 2, sp. 3
		<i>Gigaspora</i>	decipiens
		<i>Pacispora</i>	<i>sp. 1</i>
		<i>Rhizophagus</i>	<i>intraradices</i>
		<i>Scutellospora</i>	gregaria
		Morfotipo	<i>1(naranja lisa), 2 (café oscura rugosa), 3 (amarillo cremosa)</i>
Aranguren-Aroca et al. (2015)	8	<i>Acaulospora</i>	rehmii
		<i>Funneliformis</i>	geosporus, mosseae
		<i>Rhizoglomus</i>	<i>microaggregatum</i>
		<i>Glomus</i>	<i>microarpum, macroarpum, sp. 1, sp. 2</i>
Carreón-Abud et al. (2016)	16	<i>Acaulospora</i>	<i>laevis, spinosa, scrobiculata, mellea, sp. 1</i>
		<i>Cetraspora</i>	pellucida
		<i>Funnelliformis</i>	geosporus
		<i>Gigaspora</i>	<i>decipiens</i>
		<i>Glomus</i>	rubiforme, sp. 1
		<i>Pacispora</i>	<i>sp. 1</i>
		<i>Scutellospora</i>	<i>cerradensis, gregaria, hawaiiensis, calospora, scutata</i>
Raya Montaña et al. (2019)	14	<i>Acaulospora</i>	scrobiculata
		<i>Diversispora</i>	<i>spurca, aurantia</i>
		<i>Entrophospora</i>	<i>infrequens, clarioidea, etunicata</i>
		<i>Funnelliformis</i>	geosporus, mosseae, badius, constrictus
		<i>Glomus</i>	macrocarpum, sinuosum sp. 1
		<i>Tricispora</i>	<i>nevadensis</i>

En negritas se indican las especies en común encontradas en diferentes investigaciones.

Andrade-Hoyos *et al.* (2015) identificaron la presencia de micelio de *Phytophthora cinnamomi* en xilema de las raíces de *P. americana*, igualmente, describieron algunos de los mecanismos de resistencia-tolerancia de cinco variedades de portainjertos de *P. americana*. Los portainjertos de variedad mexicana del municipio de Tepeyanco y Atlixco son genotipos resistentes y sólo presentan síntomas de marchitez a 28 °C y no llegan al grado de estar enfermos a causa de *P. cinnamomi*. Se observó, que el contenido de tilosas o tílides (estructura que obstruye la cavidad de los elementos conductores del xilema) en estos dos genotipos fue suficiente para impedir el desarrollo de este fitopatógeno, además mostraron mayor porcentaje de plantas asintomáticas macroscópicamente aún con presencia de micelio en el xilema. Los ejemplares de la raza mexicana de los municipios de Tepeyanco, Atlixco y Tepetl muestran resistencia debido a que probablemente activan sus mecanismos de defensa histológica estructural y química previo a la infección por *P. cinnamomi*. Esta información ilustra la importancia de analizar las variedades criollas del aguacate.

La identificación de especies de HMA mediante técnicas morfológicas puede representar dificultades en cuestión de tiempo para familiarizarse con las características de cada una de las esporas de los diferentes taxa, así como requieren mucha labor para obtener un buen número de esporas que se deben observar y caracterizar para asegurar que se trata de dicha especie. Las técnicas moleculares nos brindan la posibilidad de conocer las especies que se encuentran en el suelo rizosférico además de las que están colonizando a raíces de manera relativamente fácil.

Debido a esto se ha recurrido a técnicas moleculares como lo hizo (Gómez Dorantes *et al.*, 2012) investigación en la que se realizó extracción de ADN de raíces de aguacate con el propósito de identificar que especies de HMA estaban asociadas, para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizó primers universales para eucariontes que son específicos para el gen del 18S ADNr, asimismo, empleó PCR anidada utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar secuencias de HMA de manera específica, sin embargo, solo pudo identificarse una especie en raíces con un alto porcentaje de colonización (>94%).

Cuando se trata de utilizar técnicas moleculares, en la mayoría de los casos se utiliza como marcador molecular la región de los Espaciadores Transcritos Internos (ITS por sus siglas en inglés) del ADN ribosomal (rDNA), no obstante, debido a que estos marcadores no son específicos para HMA, se pueden amplificar todas las secuencias de hongos y por lo tanto del total de los resultados obtenidos un mínimo porcentaje corresponde a secuencias de HMA. Es por ello que Krüger *et al.* (2009) se encargaron de diseñar cuatro mezclas de *oligonucleótidos* específicos dirigidos a enriquecer los taxa perteneciente a los HMA (Glomeromycota) ubicados en las regiones de subunidad corta y larga del ADN ribosomal que ayuden a aumentar la cantidad de amplificaciones específicas de HMA que se encuentren en la muestra a analizar. Este procedimiento emplea un método conocido como PCR anidada, el cual consiste en una amplificación, empleando las mezclas de primers dirigidos a HMA, de un fragmento de 1.8 Kb y posteriormente una segunda amplificación en el interior de ese fragmento con otro grupo de primers específicos de HMA para obtener un fragmento de 1.5 Kb. Este se emplea a su vez como template para amplificar una región interna que incluye el ITS y permite etiquetar cada biblioteca que se genere para su secuenciación. Con las mezclas de *primers* se ha logrado obtener hasta un 90% de secuencias de HMA e identificar a nivel de especie.

I.3 Preguntas de investigación

- a) ¿Existe diferencia en el porcentaje de colonización y número de *taxa* virtuales de HMA en suelo rizosférico y raíces de *P. americana* var. *drymifolia* en época de secas con respecto a la de lluvias, y con relación a las características edáficas de los sitios analizados?
- b) ¿Existen diferencias entre las especies de HMA asociadas a *P. americana* var. Hass reportadas en Michoacán con respecto a las asociadas a *P. americana* var. *drymifolia* de Tepeyanco Tlaxcala?

I.4 Hipótesis

- a) El porcentaje de colonización y el número de taxa virtuales de HMA en raíces y suelo rizosférico de *P. americana* var. *drymifolia* varía con respecto a las épocas de secas y lluvia, así como al estado físico y químico del suelo.
- b) Las especies de HMA asociadas a *P. americana* var. *drymifolia* del municipio de Tepeyanco, Tlaxcala, variarán respecto a las reportadas de Michoacán asociadas a *P. americana* var. Hass.

I.5 Justificación

Persea americana var. *drymifolia* es una variedad de aguacate mexicana nativa del municipio de Tepeyanco, Tlaxcala. Sin embargo, el fruto no tiene una importancia a nivel económico, a causa de su corto tiempo de vida de anaquel y por su fragilidad se ha comenzado a introducir otras variedades como el Hass y Forte en lugares donde se encuentra la variedad *drymifolia* de manera nativa como en el municipio de estudio en esta investigación. Por otro lado, la var. *drymifolia* tiene como principal característica la resistencia a bajas temperaturas y a la sequía, además, cuenta con genes que le confieren resistencia al ataque de ciertas plagas y enfermedades (Sánchez-Pérez *et al.*, 2009; López-Rivera *et al.*, 2017). Debido a esto se ha considerado una variedad candidata para utilizar como porta-injerto además de su alta resistencia a *Phytophthora cinnamomi*, oomiceto causante de la pudrición de la raíz del aguacate.

En Tlaxcala solo se han reportado oficialmente 24 especies de HMA (Estrada-Torres *et al.*, 1992; Jiménez Martínez *et al.*, 2019) de las 360 reportados en el Catalogue of Life (<https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/4M>). Por lo tanto, el llevar a cabo un análisis microbiómico aplicando técnicas moleculares que ayudan a eficientizar la obtención de resultados con respecto a tiempo y ampliar el alcance en cuanto a conocer que especies se encuentran en suelo y también en las raíces llevando a cabo la simbiosis con plantas de aguacate criollo, estos resultados permitirán conocer el estado de la asociación planta-HMA, además de aportar información significativa para la conservación de HMA,

y al mismo tiempo promover la importancia que el cultivo de *P. americana* var. *drymifolia* tiene en Tepeyanco.

I.6 Objetivos

I.6.1 General

Determinar la riqueza del microbioma de HMA asociados a *P. americana* var. *drymifolia* mediante la técnica de secuenciación masiva, así como su relación con las condiciones edáficas en época de secas y lluvias del municipio de Tepeyanco, Tlaxcala, y conocer el estado actual de esta relación simbiótica.

I.6.2 Específicos

1. Evaluar las condiciones edáficas de cada sitio de muestreo en época de secas y lluvia mediante análisis fisicoquímicos del suelo con base en la NOM-021-RECNAT-2000.
2. Determinar mediante la técnica de tinción de Philips y Hayman (1970) el porcentaje de colonización de las raíces de *P. americana* var. *drymifolia* y analizar las diferencias entre las épocas de secas y lluvias.
3. Analizar mediante la técnica de secuenciación masiva la diversidad de hongos micorrícicos arbusculares en suelo rizosférico y asociadas a las raíces de *P. americana* var. *drymifolia* en época de secas y lluvia.

I.7 Metodología

I.7.1 Área de estudio

El área de estudio se ubica en el municipio de Tepeyanco, Tlaxcala al suroeste del estado, situado entre los 19°14'41" latitud Norte, 98°14'00" longitud Oeste, a una altitud entre los 2,246 y 2,330 m s.n.m. ocupando una extensión superficial de 16.58 km² (Figura 3a). Tepeyanco tiene un clima semiseco templado, con lluvias de mayo a octubre con una precipitación promedio mínima registrada de 1.8 mm y 249.6 mm máxima. Durante el año se observan temperaturas mínimas desde los 2.8°C hasta los 27.6°C como

máxima, en promedio anual la temperatura registrada es de 23.9°C (H. Ayuntamiento de Tepeyanco, 2017).

En la Figura 3b. se representan los tipos de suelos dominantes en el municipio, donde el tipo cambisol es el que predomina en el área (INEGI, 2010), asimismo, se destacan con números del 1 al 7 los sitios seleccionados donde se llevó a cabo el muestreo en árboles de *P. americana* var. *drymifolia* de no más de 100 años.

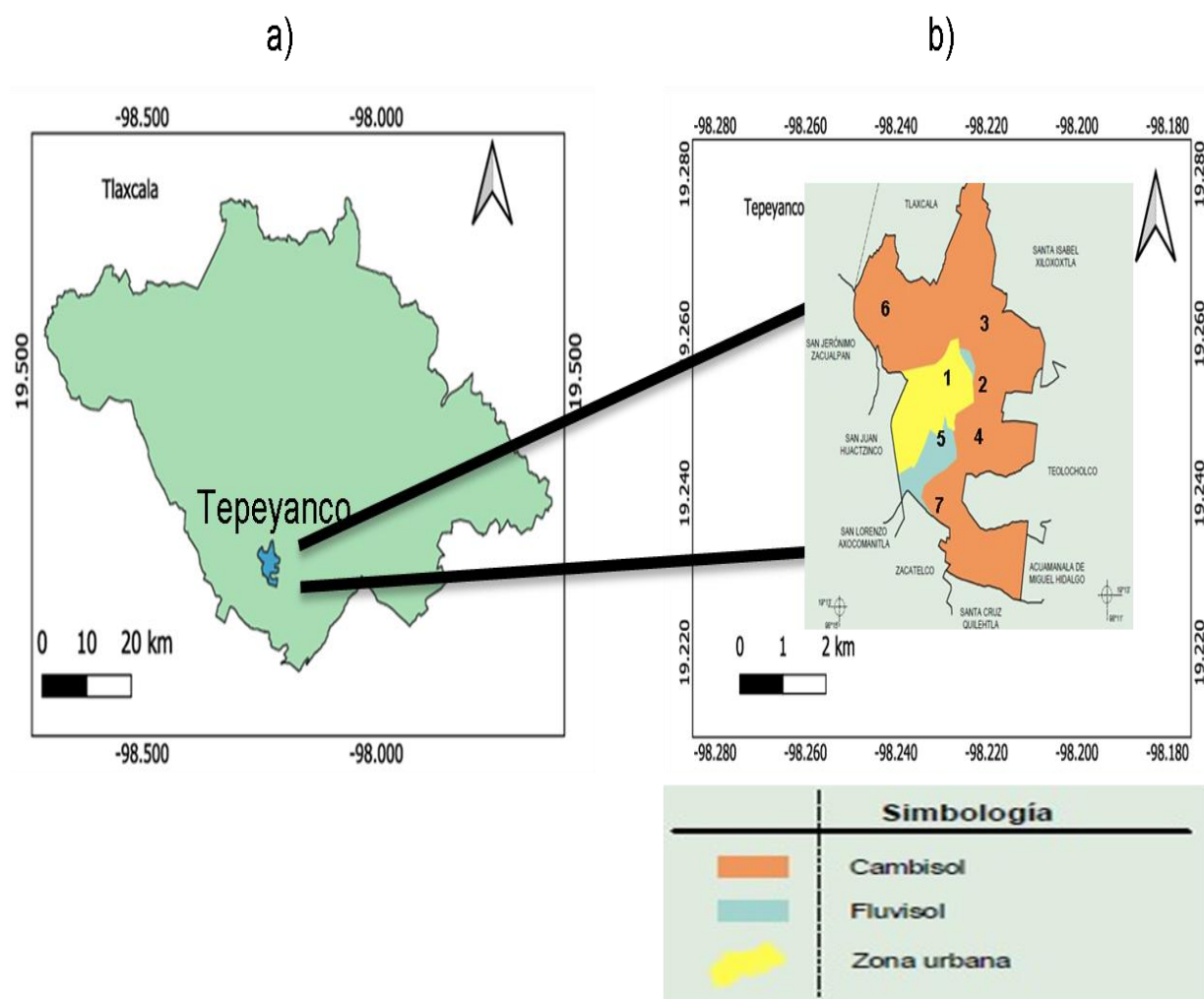


Figura 3. Mapa de sitio de muestreo. a) Tlaxcala, estado del área de estudio y b) Tepeyanco, con números del 1 al 7 se muestran los sitios de muestreo.

En la Figura 4 se observa el diseño metodológico realizado posterior al muestreo, 4a) análisis fisicoquímicos de suelo rizosférico de *P. americana*, 4b) determinación del porcentaje de colonización en raíces y 4c) análisis moleculares, finalmente se procedió a realizar los análisis estadísticos correspondientes.

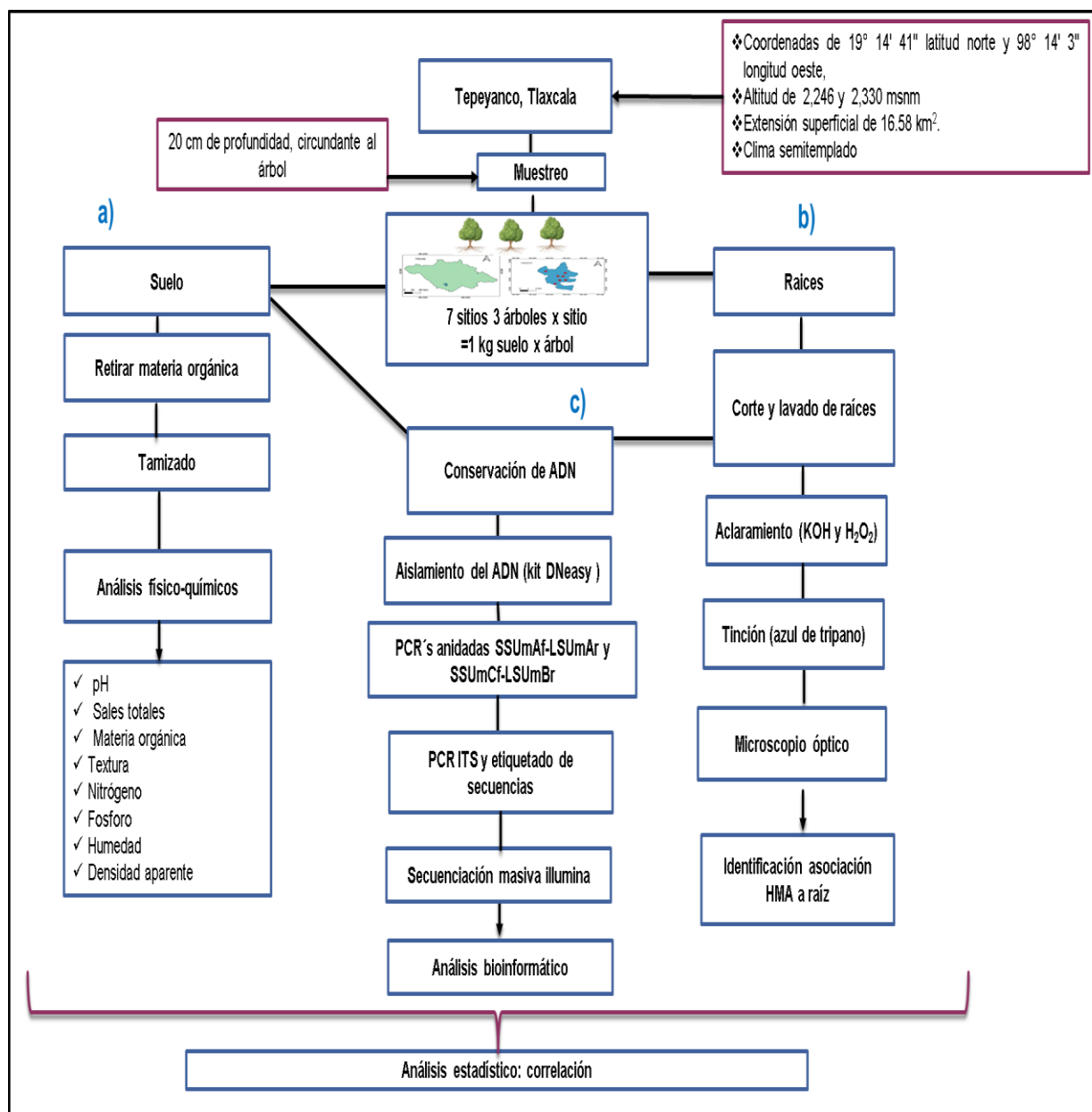


Figura 4. Diseño metodológico a) análisis físico-químicos de suelo rizosférico, b) determinación de porcentaje de colonización y c) análisis molecular.

I.7.2 Sitios muestreados

El sitio 1, se encuentra ubicado en las coordenadas; latitud N 19°14'43.10232'' y longitud W 98°14'0.40623'', corresponde a un huerto familiar en el centro del municipio, en el hay árboles de *P. americana* var. *Hass*, y *drymifolia*. No agregan fertilizante de ningún tipo, realizan mantenimiento al lugar retirando la maleza circundante a los árboles, el

riego lo llevan a cabo con agua potable. En el huerto habitan libremente animales de traspatio como gallinas (Figura 5).



Figura 5. Sitio 1 de muestreo del municipio de Tepeyanco, Tlaxcala.

El sitio 2, se encuentra ubicado en las coordenadas; latitud N19°14'48.78636'' y longitud W 98°13'46.8966''. Es un huerto comunitario del municipio, en toda la zona hay césped, ahí se encuentran árboles de *P. americana* principalmente de var. *drymifolia* y algunos de var. Forte a todos les aplican fertilizante orgánico elaborado por las personas encargadas del huerto, el riego se lleva a cabo con el sistema de la comunidad. A un costado hay un invernadero de jitomate al cual agregan fertilizante químico y el agua con la que riegan se transporta hacia el suelo del huerto (Figura 6).



Figura 6. Sitio 2 de muestreo del municipio de Tepeyanco, Tlaxcala.

El sitio 3, localizado en las coordenadas; latitud $N19^{\circ}15'19.26324''$, longitud $W 98^{\circ}13'16.14576''$. Está ubicado entre parcelas cultivadas con maíz, el agua que reciben los cultivos es solo en la temporada de lluvias, los árboles que se encuentran ahí en su mayoría son árboles de *P. americana* var. *drymifolia*, estos fueron sembrados como método de *metepantle* (utilizado como una barrera viva para marcar los límites de cada terreno del propietario correspondiente), en este lugar agregan fertilizante solo a los cultivos de maíz. A ~ 300 metros fluía agua en un pequeño arroyo tiempo atrás, por lo que la humedad en la zona ayudaba a los cultivos cercanos, pero actualmente ese río se ha secado (Figura 7).



Figura 7. Sitio 3 de muestreo del municipio de Tepeyanco, Tlaxcala.

El sitio 4, localizado en las coordenadas; latitud N19°14'49.12152'' y longitud W 98°13'24.55356''. Este sitio de muestreo se encuentra en una zona de cultivo de maíz principalmente, los árboles de *P. americana* encontrados ahí son var. *drymifolia* que fueron sembrados para delimitar y marcar las tierras de cada propietario con el método del *metepantle*. En la zona cuentan con un grifo de agua del municipio para el riego de los cultivos, el fertilizante que agregan en la zona de los cultivos es abono de ganado y químico. En este sitio de muestreo se dificultó el encontrar raíces del árbol, así como las raíces finas que son las de interés en esta investigación, debido a que estaban a una mayor profundidad ya que al estar los árboles a la misma altura que los cultivos y al arar el suelo lo que está alrededor de cada árbol se encontraba cubriendo el tronco y las raíces de los árboles (Figura 8).



Figura 8. Sitio 4 de muestreo del municipio de Tepeyanco, Tlaxcala.

Sitio 5, localizado en las coordenadas; latitud N $19^{\circ}14'20.53212''$ y longitud W $98^{\circ}13'38.56836''$. Este sitio corresponde a la zona rural del municipio, los individuos se encuentran ubicados dentro de un domicilio donde aplican composta y fertilizante que el propietario prepara, además se encuentra una pequeña área cercana a los árboles donde se siembra fresa y jitomate para consumo personal, el riego de estas plantas lo realizan con agua de su domicilio. En el muestreo de cada época no fue difícil localizar la raíz, así como la selección de raíces finas (Figura 9).



Figura 9. Sitio 5 de muestreo del municipio de Tepeyanco, Tlaxcala.

Sitio 6, localizado en las coordenadas; latitud N19°15'1.53324'' y longitud W 98°13'37.34184, este corresponde a una zona donde predomina el tepetate (tipo de sustrato no fértil conformado por un horizonte endurecido producido por procesos geológicos (Velázquez-Rodríguez *et al.*, 2022), está ubicado en un huerto que inicialmente solo tenía *P. americana* var. *drymifolia*, en ese momento se cultivaba alfalfa entre los espacios de un árbol a otro. Hoy en día, estos espacios se han ocupado para plantar *P. americana* var. Hass que llevan 2 ó 3 años dando fruto. En la Figura 12, los árboles grandes (flechas rojas) corresponden a la var. *drymifolia* mientras que los árboles pequeños (flechas blancas) corresponden a la var. Hass. Actualmente hay un área de este huerto donde tienen árboles de durazno, arbustos de zarzamora, gallinas y en toda la zona hay césped. Algunos arbustos de zarzamora y árboles de otros frutos se encontraban entre los árboles de *P. americana* para lo que solamente fue necesario limpiar el área de muestreo asegurando que no hubiera un cruce de material. El encargado del lugar mencionó que él ha notado que los árboles de var. *drymifolia* son más resistentes y requieren un menor cuidado que aquellos de var. Hass. En los árboles

muestreados de este sitio se encontraron raíces blancas o no tan pigmentadas en comparación con individuos de otros sitios (Figura 10).



Figura 10. Sitio 6 de muestreo del municipio de Tepeyanco, Tlaxcala. Árboles de *P. americana* var. *drymifolia* (flechas rojas), árboles de la var. Hass (flechas blancas).

Sitio 7, localizado en las coordenadas; latitud N 19°13'49.39212'' y longitud W 98°13'59.26188''. Los individuos de este sitio de muestreo se encuentran en una zona de cultivos fungiendo como método de *metepantle*. Los cultivos que acostumbran a sembrar en los alrededores de estos árboles de *P. americana* var. *drymifolia* son maíz, alfalfa y haba, suelen fertilizar con abono orgánico (de ganado), y químico (urea), el riego es con agua del pozo de riego agrícola de la comunidad y con la lluvia de temporada. En el muestreo de época de secas había alfalfa como cultivo y en la de lluvias había maíz y alfalfa (Figura 11).



Figura 11. Sitio 7 de muestreo del municipio de Tepeyanco, Tlaxcala.

I.7.3 Muestreo

El muestreo se llevó a cabo del 26 de abril al 01 de mayo de 2023 para época de secas y del 04 al 08 de septiembre de 2023 para el de lluvias, se limpió previamente el área para retirar rocas, pasto y maleza se tomaron 5 muestras de suelo rizosférico circundante a cada tronco de tres árboles de esta variedad. La recolección de suelo se inició del tronco hacía la periferia en forma ascendente y en espiral, con el fin de abarcar la mayor área circundante, las muestras se tomaron a no más de 20 cm de profundidad de tal manera que se recolectaron raíces y suelo.

Para las muestras designadas para los análisis físicos y químicos del suelo se tomaron alrededor de 300 a 400 g de este por cada submuestra (5 submuestras por árbol), de tal manera que por individuo se tuviera una muestra compuesta de 1 kg, se etiquetó cada bolsa de cada submuestra anotando: fecha y número de sitio. Se seleccionaron las raíces para el análisis de porcentaje de colonización y se almacenaron en bolsas de plástico etiquetándose debidamente. Todas las muestras se colocaron en hielera para

ser transportadas y depositadas en el laboratorio de Toxicología y Química Ambiental (TyQA) del Centro de Investigación en Genética y Ambiente (CIGyA) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx) manteniéndose bajo refrigeración (4 °C) hasta su posterior procesamiento.

Las muestras recolectadas para los análisis moleculares se obtuvieron de los mismos puntos de muestreo descritos en el párrafo anterior, se tomaron submuestras de aproximadamente 5 g de suelo lo más cercano a las raíces, se almacenaron en bolsas plásticas Ziploc, recolectando un total de 15 submuestras (5 por individuo), posteriormente se transportaron en hielera hasta el laboratorio de TyQA donde se hizo una muestra compuesta. Con cada muestra compuesta por sitio se llenaron tubos Eppendorf de 1.5 mL, teniendo un total de 7 tubos, se tomaron 4 réplicas por sitio (Figura 12), con un total de 28 tubos por cada época y se almacenó en un ultracongelador ThermoScientific a -80°C hasta su posterior procesamiento.

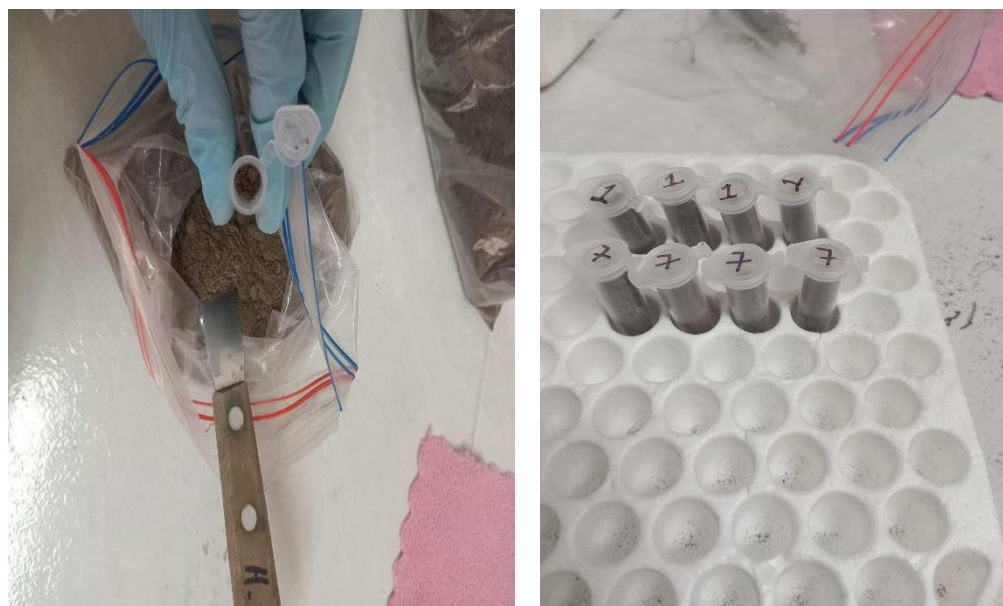


Figura 12. Almacenamiento de muestras de suelo rizosférico de *P. americana* var. *drymifolia* para análisis moleculares.

Para la conservación del ADN de las muestras de raíces para los análisis moleculares; se prepararon previamente tubos Eppendorf de 1.5 mL con 0.5 mL de reactivo DNAzol

(ThermoFisher Scientific Genomic DNA Isolation Reagent, No. Cat. 10503- 027) (Figura 13).

De cada hoyo de excavación de donde se recolectaron las raíces principales circundante al tronco, se seleccionaron las raíces secundarias o terciarias más finas, recolectando 4 fragmentos de raíz de aproximadamente 1 cm de largo y se depositaron en los tubos Eppendorf con DNAzol. Se obtuvo una muestra compuesta conformada por un total de 20 raíces por tubo, se tomaron 4 réplicas por individuo. Se colocaron en hielera hasta su transporte en el laboratorio de TyQA para ser almacenadas en un ultracongelador ThermoScientific a -80°C hasta su posterior procesamiento.

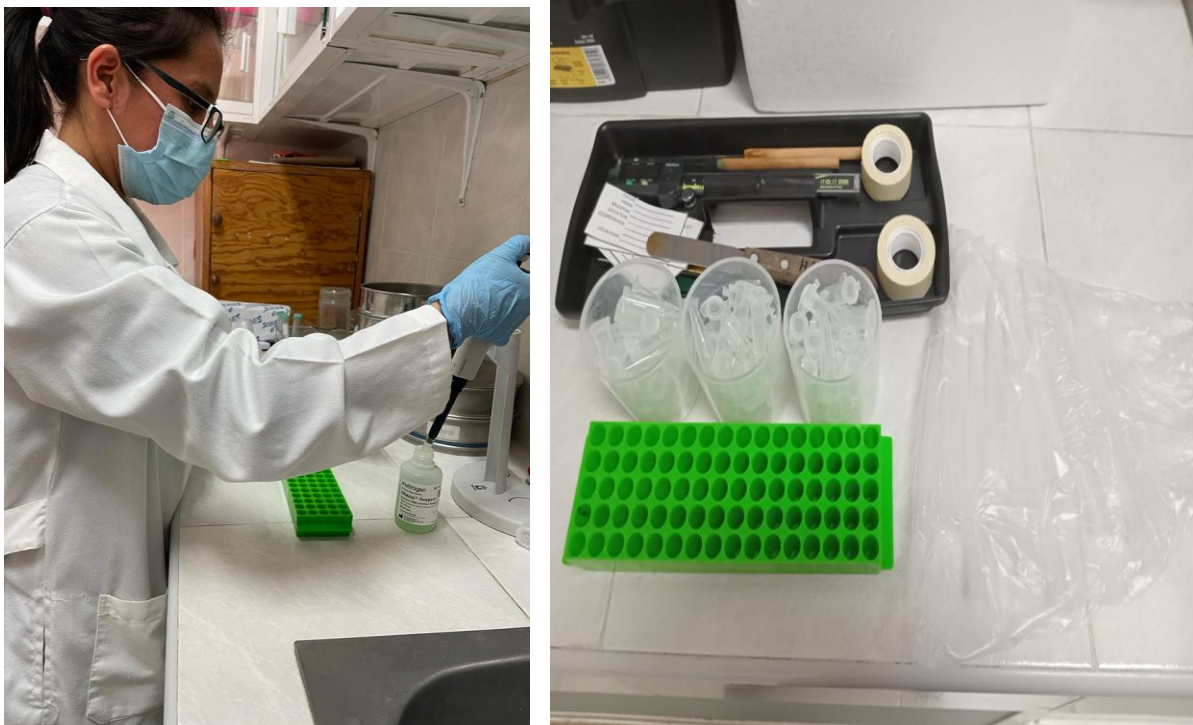


Figura 13. Preparación de tubos Eppendorf con DNAzol para la conservación de muestras de raíces de árbol de aguacate criollo destinados a análisis moleculares.

I.7.4 Análisis de muestras

En el laboratorio de TyQA de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, se realizó el pretratamiento de las muestras de suelo con base en la NOM-021-RECNAT-200 (SEMARNAT, 2002) para posteriormente determinar parámetros como pH, sales totales (ST), contenido de humedad (%H), materia orgánica (%MO), nitrógeno total (%N), textura, contenido de fósforo aprovechable en mg/kg y densidad aparente (Da) eng/cm^3 . De cada muestra compuesta por sitio/individuo se tomó ~600 g para colocarlo sobre charolas cubiertas con papel Kraft, se dejaron secar a temperatura ambiente en un lugar cerrado, después se molió con ayuda de un pistilo y mortero, y se tamizó a través de un tamiz de 2 mm de diámetro, malla 10 (Figura 14).

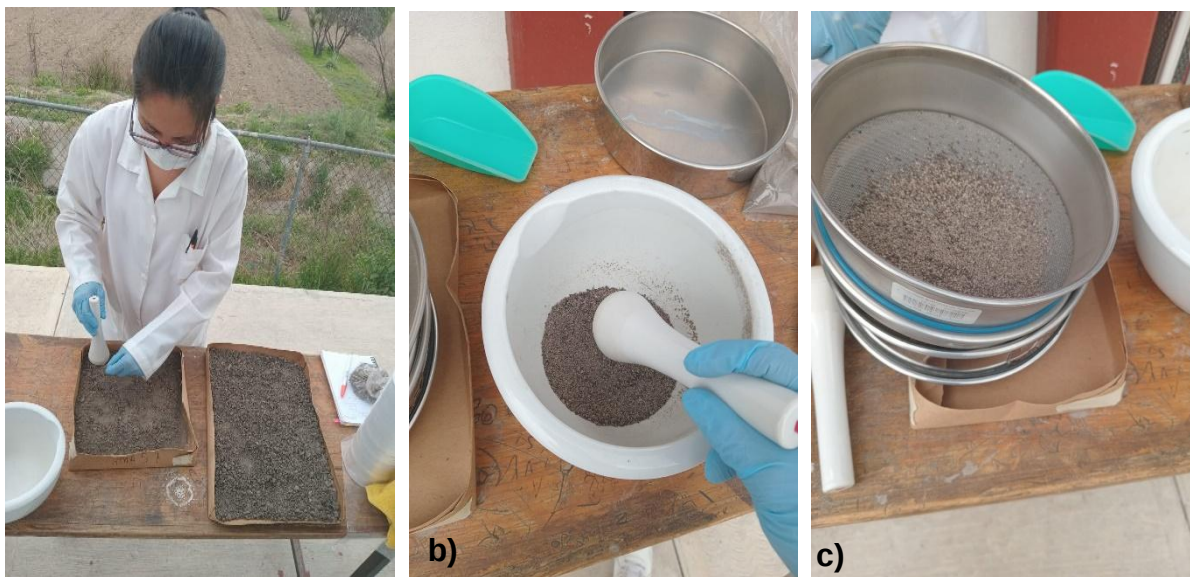


Figura 14. Pretratamiento de muestras de suelo. a) Preparación de suelo, b) molienda y c) tamizaje.

I.7.4.1 Análisis de pH (acidez) y sales totales (ST) ppm

El pH se determinó mediante el método AS-02 de la NOM-021 RECNAT-2000 (SEMARNAT, 2002) con algunas modificaciones, las ST ppm (partes por millón) se determinó mediante el extracto que se utilizó para el pH. Se pesaron 10 g de suelo en un recipiente de plástico. A esta muestra se le añadieron 20 mL de agua desmineralizada. La mezcla resultante se agitó con una varilla de vidrio a intervalos de 5 minutos durante un total de 30 minutos, asegurando una homogenización adecuada.

Después de la agitación, se dejó reposar la mezcla durante 15 minutos. Posteriormente, se midió el pH y las ST ppm con un medidor de pH 3 en 1 de la marca Vivosun.

I.7.4.2 Contenido de humedad

El contenido de humedad se determinó por el método AS-05 de la NOM-021 RECNAT-2000 (SEMARNAT, 2002), se utilizaron contenedores de vidrio que fueron previamente llevados a un peso constante. Se pesaron 30 g de suelo, las muestras fueron colocadas en una mufla marca Felisa, a una temperatura de 105 °C durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, los contenedores se trasladaron a un desecador de vacío hasta que se enfriaron por completo. Posteriormente, se pesaron nuevamente, el proceso de calentamiento, enfriamiento y pesaje se repitió hasta que se alcanzó un peso constante.

Para realizar los cálculos se aplicó la ecuación 1:

$$g = \frac{(P B + P s h) - (P B + P s s)}{(P B + P s s) - P B} \times 100$$

Ecuación 1. Contenido de humedad gravimétrica, expresado en porcentaje (%).

Donde:

g =Contenido de humedad gravimétrica expresado en porcentaje (%).

PB =Peso del recipiente (g).

Psh =Peso del suelo húmedo (g).

PB+Psh =Peso del recipiente más peso del suelo húmedo (g).

PB+Pss =Peso del recipiente más peso del suelo seco (g).

I.7.4.3 Determinación de materia orgánica

El porcentaje de materia orgánica se calculó mediante el método AS-07 de la *NOM-021-REC NAT-2000*, 2002 (Figura 15). Se pesaron 0.5 g de suelo, los cuales se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, además, se procesó un blanco con los mismos reactivos y se analizaron las muestras por triplicado. A cada matraz se le añadieron 10 mL de $K_2Cr_2O_7$ 1N, girando el matraz cuidadosamente para asegurar que el reactivo estuviera en contacto con todo el suelo (Figura 15a). Después se agregaron 20 mL de H_2SO_4 concentrado, mezclando la solución mediante el giro del matraz durante un minuto (Figura 15b). La mezcla se dejó reposar durante 30 minutos. Posteriormente, se añadieron 20 mL de agua desmineralizada y se mezcló nuevamente (Figura 15c). A continuación, se añadieron 5 mL de H_3PO_4 concentrado, seguidos de 5 gotas de indicador de difenilamina. Finalmente, se tituló la solución con disolución de sulfato ferroso, añadiéndolo gota a gota hasta que se produjo un viraje a color verde claro (Figura 15d).

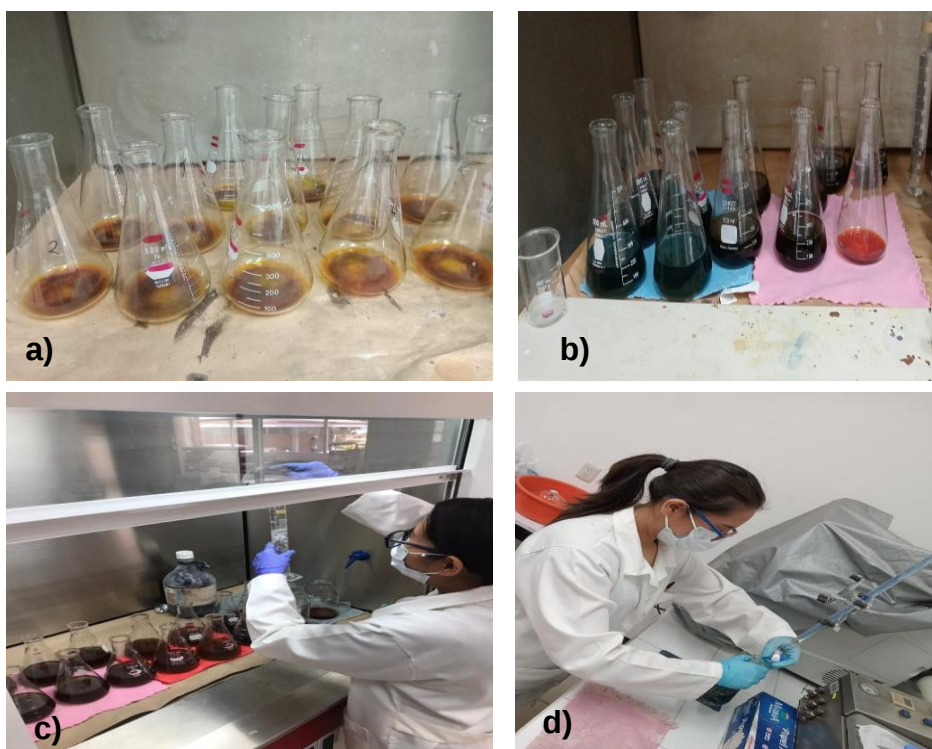


Figura 15. Determinación de materia orgánica. a) Muestra y adición de $K_2Cr_2O_7$. b) adición de H_2SO_4 y tiempo de reposo. c) Adición de agua destilada, H_3PO_4 concentrado y difenilamina. d) Titulación.

Los cálculos se realizaron con la ecuación 2:

$$\% \text{ C Orgánico} = \left(\frac{B - T}{g} \right) (N) (0.39) \text{ mcf}$$

$$\% \text{ Materia orgánica} = \% \text{ C Orgánico} \times 1.724$$

Ecuación 2. Porcentaje (%) de materia orgánica.

Donde:

B =Volumen de sulfato ferroso gastado para valorar el blanco de reactivos (mL).

T =Volumen de sulfato ferroso gastado para valorar la muestra (mL).

N =Normalidad exacta de sulfato ferroso.

g =Peso de la muestra empleada (g).

mcf =factor de corrección de humedad.

I.7.4.4 Determinación de nitrógeno total

Se llevó a cabo mediante el método AS-25 de la NOM-021 RECNAT-2000 (SEMARNAT, 2002), con algunas modificaciones. La digestión se llevó a cabo utilizando matraces de bola de fondo plano con boquilla esmerilada (Figura 16). Para preparar los catalizadores, se mezclaron 90% de K_2SO_4 y 10% de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, pesando 60 y 10 g, respectivamente, se agregaron en un recipiente de plástico. Se pesó 1 g de esta mezcla de catalizadores y se depositó en el matraz. Posteriormente, se pesaron 0.5 g de muestra y se añadieron al matraz, se mezcló para homogenizar la muestra con los catalizadores.

A la mezcla se le agregaron 10 mL de H_2SO_4 y se homogenizó. En la boquilla del matraz se colocó una tapa de aluminio con tres orificios hechos con un alfiler, y el matraz se colocó en una parrilla de Soxhlet marca Electrothermal. El calentamiento se inició a una temperatura de $\sim 135^\circ C$ durante 60 min. Después, se aumentó la temperatura a $\sim 180^\circ C$, incrementándola $\sim 45^\circ C$ cada 30 minutos hasta llegar a $\sim 360^\circ C$.

Cuando la muestra se tornó a un color verde, se mantuvo en ebullición durante 30 a 40 minutos adicionales antes de apagar la parrilla. Durante el calentamiento, se agitó la mezcla para mejorar la reacción. Desde el inicio del calentamiento hasta la finalización de la digestión, el proceso tomó alrededor de 4 horas.

Para la etapa de neutralización, los matraces se dejaron enfriar a temperatura ambiente, posteriormente, se añadieron 20 mL de agua desmineralizada, se agitó la mezcla y se dejó reposar durante 15 minutos. Luego, el matraz se colocó en baño frío mientras se añadían lentamente 20 mL de NaOH 10N. Una vez agregado el NaOH, se retiró el matraz del baño frío.

La destilación se realizó utilizando un equipo de Soxhlet, ensamblando el sistema con el matraz que contenía la mezcla, el extractor de Soxhlet y el refrigerante de serpentín, al cual se le conectaron las mangueras de entrada y salida de agua fría. Este proceso se llevó a cabo a ~225 °C durante 50 min, se recuperó alrededor de 30 mL de amoníaco (Figura 17).

En el proceso de titulación, se utilizó como adsorbente 10 mL de HCl 0.1N, contenidos en un matraz Erlenmeyer de 250 mL (Figura 18). Los 30 mL recuperados se añadieron al matraz que contenía el HCl 0.1N. Se adicionaron 10 gotas de fenolftaleína y se mezcló la solución. Finalmente, se tituló la mezcla con NaOH 0.1N hasta obtener un viraje rosa tenue.

Los cálculos de nitrógeno total se realizaron con la ecuación 3:

$$\% N \text{ Total} = (Vm - Vb) * N * \frac{14}{p} * 10$$

Ecuación 3. Porcentaje (%) de nitrógeno total.

Donde:

Vm =Volumen de ácido sulfúrico empleado en titular la muestra.

Vb =Volumen de ácido sulfúrico empleado en titular el blanco.

N =Normalidad exacta del ácido sulfúrico.

14 =Peso equivalente del nitrógeno.

10 =Factor de conversión a porcentaje.

P =Peso de la muestra de suelo (g).

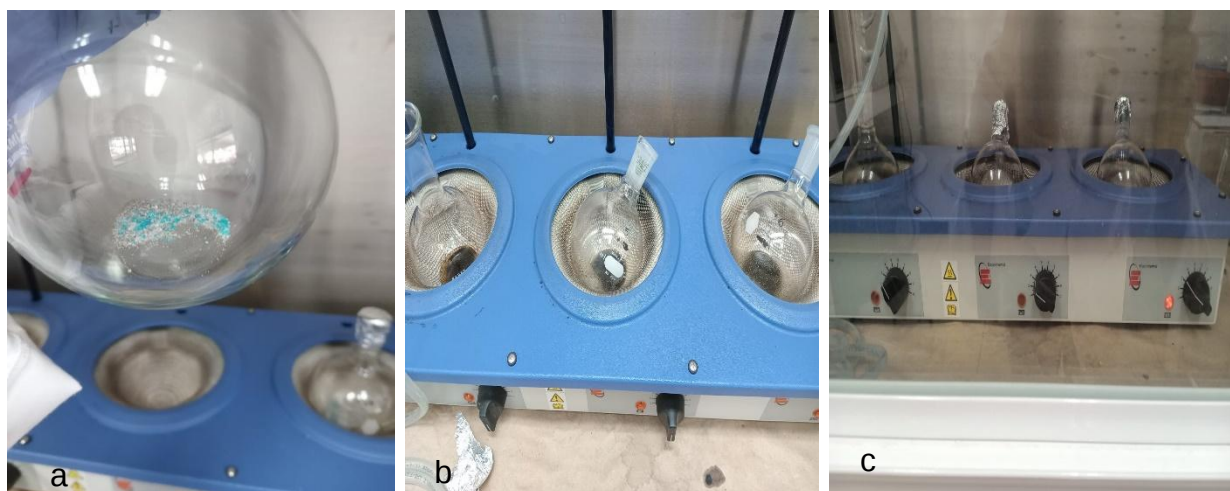


Figura 16. Fase de digestión de nitrógeno total. a) Mezcla de catalizadores. b) Adición de muestra y H_2SO_4 . c) Calentamiento.



Figura 17. Destilación de nitrógeno total. a) Inicio de la destilación. b) Destilado recuperado.

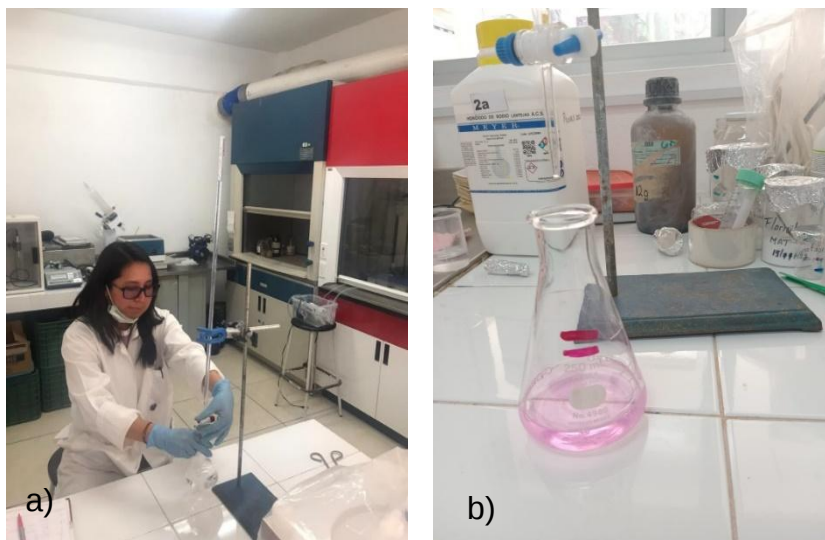


Figura 18. Titulación de nitrógeno total. a) Titulación. b) Viraje.

I.7.4.5 Determinación de la clase textural

La textura se determinó mediante el método AS-09 de la NOM-021 RECNAT-2000 (SEMARNAT, 2002) (Figura 19). Se pesaron 60 g de suelo y se agregaron a recipientes de vidrio de 500 mL, se añadieron 40 mL de H_2O_2 , asegurándose de que todo el suelo estuviera bien humedecido. Los recipientes se dejaron en reposo hasta que ya no presentaron efervescencia, luego, se colocaron en una estufa a 50°C durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, adicionó nuevamente 40 mL de H_2O_2 hasta que ya no se observó efervescencia, indicando que la materia orgánica se había eliminado. Posteriormente, los recipientes se llevaron a secar nuevamente en la estufa a 50°C durante 24 h.

Se pesaron 50 g de suelo y se colocaron en vasos de precipitado de 250 mL, se añadió agua desmineralizada hasta cubrir el suelo, luego se adicionaron 5 mL de oxalato de sodio y 5 mL de metasilicato de sodio. La mezcla se dejó reposar durante 15 min, posteriormente cada muestra se transfirió a un vaso de agitación mecánica y se agitó durante 5 min, el contenido se pasó a probetas de 1000 mL se agregó agua desmineralizada hasta un volumen de 600 mL, se colocó el hidrómetro dentro de la probeta y se añadió más agua hasta alcanzar un volumen total de 1000 mL. Se retiró el hidrómetro y se agitó el contenido de la probeta manualmente con una varilla de manera

constante durante 1 minuto para homogeneizar la muestra. A los 40 s después de agitar, se introdujo el hidrómetro para tomar y registrar la lectura. También se registraron el pH y la temperatura utilizando un medidor de pH 3 en 1 de la marca Vivosun, la muestra se dejó reposar durante 2 h. por último y cuidando de alterar lo menos posible la suspensión se introdujo el hidrómetro para hacer la lectura, así como el pH y la temperatura.

Los cálculos para el porcentaje de partículas se realizaron con el conjunto de fórmulas de la ecuación 4:

$$\text{Arcilla} + \text{Limo} = L1 * 2$$

$$\% \text{Arena} = 100 - (\text{Arcilla} + \text{Limo})$$

$$\% \text{Arcilla} = L2 * 2$$

$$\% \text{Limo} = \text{Arena} - \text{Arcilla}$$

Ecuación 4. Cálculos de textura.

Donde:

L1: Lectura tomada a los 40 s

L2: Lectura tomada a las 2 h.

Para determinar la clase textural se utilizó el triángulo de textura del suelo (FAO, 2024).



Figura 19. Determinación de Textura. a) Destrucción de materia orgánica. b) Agitación mecánica. c) Aforo de mezcla en probeta de 1000 mL. con hidrómetro dentro. d) Suspensión de mezcla con agitador manual. e) Toma de lectura con hidrómetro. f) Toma de pH y temperatura. g) Tiempo de reposo y segunda toma con el hidrómetro, pH y temperatura.

I.7.4.6 Determinación de fósforo aprovechable

Se determinó con el método AS-10 de la *NOM-021-RECNAT-2000*, 2002 (Figura 20). Se prepararon blancos de reactivos para la curva de calibración con concentraciones de 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/L de fósforo extraído de KH_2PO_4 . Estas soluciones se colocaron en tubos Falcon de 50 mL, a los cuales se les agregó un volumen de solución extractora de NaHCO_3 . Luego, se añadieron 5 mL de solución reductora de ácido ascórbico y se aforaron a 50 mL. Las mezclas se agitaron y las lecturas se realizaron después de 30 min, pero antes de 1 h, utilizando un espectrofotómetro UV-VIS marca Jasco V-730.

Para las muestras de suelo, se pesaron 2.5 g de suelo tamizado en malla de 2 mm y se colocaron en tubos Falcon de 50 mL. Se adicionaron 50 mL de NaHCO_3 , se agitaron constantemente durante 30 minutos en agitadora rotatoria marca Barnstead Lab-Line, donde luego, se filtraron las muestras utilizando papel filtro Whatman Cat. No. 1001-125.

Se tomó una alícuota de 5 mL del filtrado y se colocó en tubos Falcon de 50 mL. A estas alícuotas se les añadieron 5 mL de ácido ascórbico, se agitaron y se aforaron a 50 mL. La mezcla se agitó nuevamente y se realizó la lectura después de 30 minutos, pero antes de 1 hora, en el espectrofotómetro UV-VIS marca Jasco V-730.

El fósforo aprovechable se calculó con la ecuación 5:

$$P \text{ (mg Kg}^{-1} \text{ de suelo)} = CC \times V_i/p \times V_f/a$$

Ecuación 5. Fósforo aprovechable.

Donde:

CC =mg*L de P en la solución. Se obtiene graficando la curva de calibración (absorbancia contra mg*L) e interpolando en la misma los valores de absorbancia de las muestras analizada aplicando una regresión simple.

V_i =Volumen de la solución extractora adicionada.

p =Peso de la muestra de suelo.

V_f = Volumen final de la solución colorimétrica a leer.

a = Alícuota de la muestra empleada para la cuantificación.

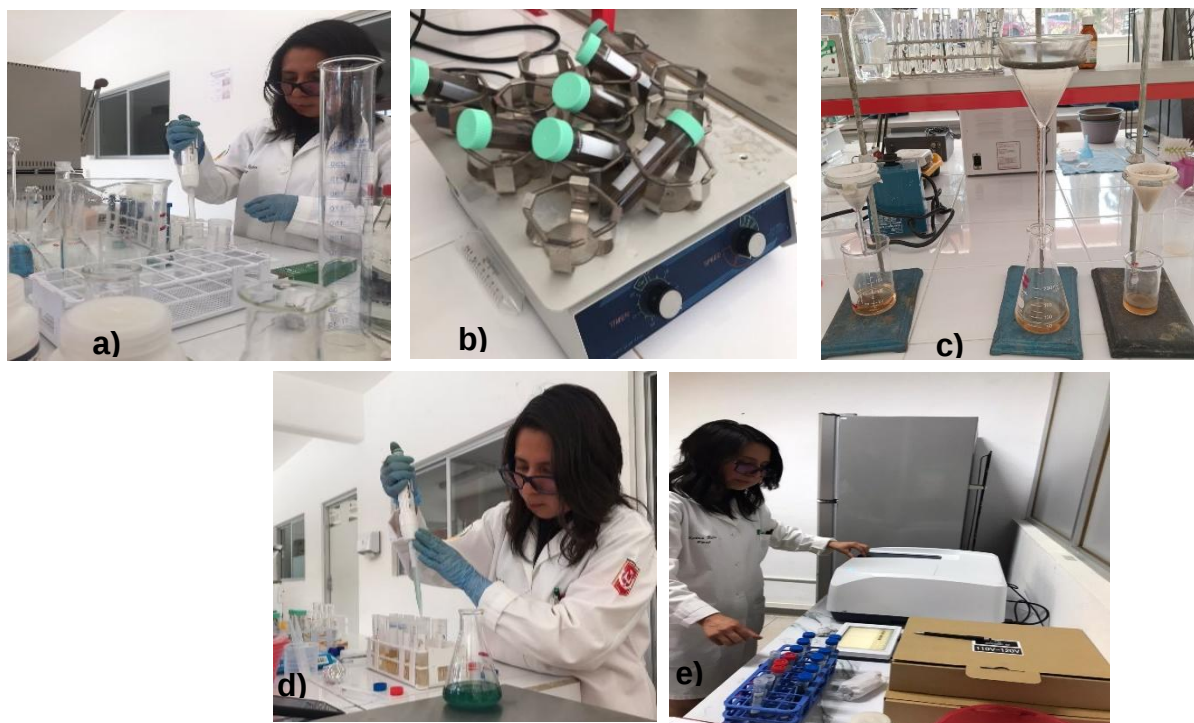


Figura 20. Determinación de fósforo aprovechable. a) Preparación de reactivos y curva de calibración. b) Agitación de muestra con solución extractora. c) Filtración de muestras. d) Adición de solución reductora. e) Lectura en UV-Vis a 882 nm.

I.7.4.7 Determinación de densidad aparente

Se utilizó el método del cilindro mencionado por Ortiz-Solorio (2019), (Figura 21). Primeramente, se determinó el volumen del cilindro a utilizar. A continuación, se llenó el cilindro con la muestra de suelo sin tamizar hasta rasarlo. La muestra se transfirió a charolas de aluminio, las cuales habían sido previamente llevadas a peso constante, las charolas con las muestras de suelo se colocaron en mufla marca Felisa a 105 °C durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, las charolas se retiraron de la mufla y se dejaron enfriar en un desecador al vacío y finalmente se pesaron las muestras.

La densidad aparente (D_a) se calculó mediante la ecuación 6:

$$D_a = \frac{(P_{ss} - P_{ch})}{V_c}$$

Ecuación 6. Densidad aparente.

Donde:

D_a = Densidad aparente

$P_{ss} - P_{ch}$ = Peso suelo seco menos peso de la charola

V_c = Volumen del cilindro

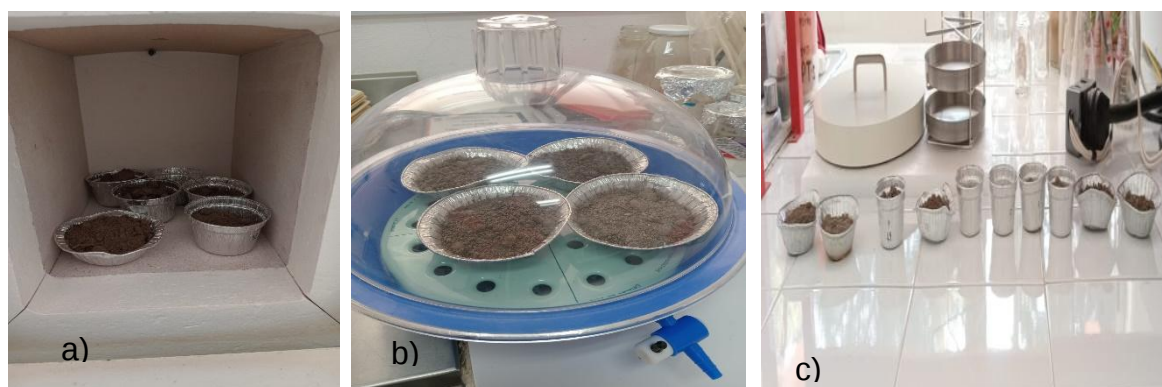


Figura 21. Determinación de densidad aparente. a) Calentamiento de las muestras. b) Muestras enfriamiento en desecador al vacío. c) Muestras después de pesaje.

I.7.4.8 Porcentaje de colonización micorrícica en raíces

La colonización se determinó mediante el procedimiento modificado de Phillips y Hayman (1970), para raíces pigmentadas aplicando modificaciones propias (Figura 22). De cada árbol se cortaron 20 segmentos de raíces finas de 2 cm de largo, posteriormente se enjuagaron con agua para eliminar restos de suelo y luego se depositaron en un vaso de precipitado de 100 mL que contenía 60 mL de KOH al 10%. Se calentó en una parrilla a 90°C durante 90 minutos. Antes de retirar el vaso de la parrilla, se verificó que las raíces ya no estuvieran rígidas; al tomarlas del centro con las pinzas, debían colgar como un espagueti. Posteriormente, las raíces se enjuagaron con KOH fresco al 10%.

Debido a que las raíces de *P. americana* var. *drymifolia* son muy pigmentadas, se llevó a cabo un proceso de aclaramiento. Después de enjuagarlas con KOH al 10% fresco,

las raíces no se enjuagaron con agua, estas se depositaron en otro vaso de precipitado y se añadió la cantidad suficiente de H_2O_2 al 2.3 – 3.5% (grado farmacéutico) hasta cubrirlas completamente donde se dejaron aclarar por aproximadamente 24 horas y posteriormente se enjuagaron con agua.

Enseguida se depositaron en vasos de precipitado de 100 mL, conteniendo la cantidad suficiente de HCl al 10% para cubrirlas, se dejaron reposar durante 15 minutos para acidificarlas. Posteriormente, se traspasaron a un vaso de precipitado que contenía azul de tripano al 0.05%, cubriéndolas completamente. Las raíces se dejaron teñir por 15 min, pasado este tiempo, las raíces se tamizaron y para eliminar el excedente del colorante se colocaron en pequeñas cajas Petri y se cubrieron con ácido láctico al 50%.



Figura 22. Tinción de raíces de árbol de aguacate criollo. a) Selección y corte de raíces. b) Lavado de raíces con agua. c) Calentamiento de raíces en KOH al 10%. d) Verificación de la consistencia de las raíces. e) Enjuague de raíces con KOH al 10% limpio. f) Raíces en H_2O_2 . g) Raíces en HCl al 10%. h) Tinción con azul de tripano al 0.05% y eliminación de exceso de colorante.

I.7.4.9 Observación de las estructuras de colonización

Se realizaron dos preparaciones fijas utilizando 10 segmentos de raíces teñidas de cada árbol muestreado. Los fragmentos se dispusieron de manera paralela lo ancho del portaobjetos, a continuación, se cubrieron con alcohol polivinílico (PVLG), se dejaron reposar por 2 min, posteriormente se colocó el cubreobjetos sobre las muestras, se aplicó una presión suave con la goma de un lápiz en cada raíz para distenderlas. Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 días.

Para la observación de las estructuras internas de HMA, se utilizó un microscopio óptico de campo claro marca *Leica* con aumentos de 10 y 40X, para ellos se examinaron tres campos equidistantes recorriendo la laminilla de forma horizontal iniciando por el extremo de una raíz en la orilla del portaobjetos, se continuó de manera horizontal hasta la última raíz, y luego se avanzó verticalmente hasta la parte media, posteriormente, se continuó horizontalmente a lo largo de cada raíz, repitiendo el proceso hasta observar el otro extremo del resto de las raíces en la laminilla (Figura 23).

En total, se observaron 60 campos por individuo. Se registraron los campos colonizados con las estructuras encontradas, así como aquellos donde no se observaron estructuras (Figura 24). Finalmente, se capturaron imágenes con la cámara del microscopio Leica.

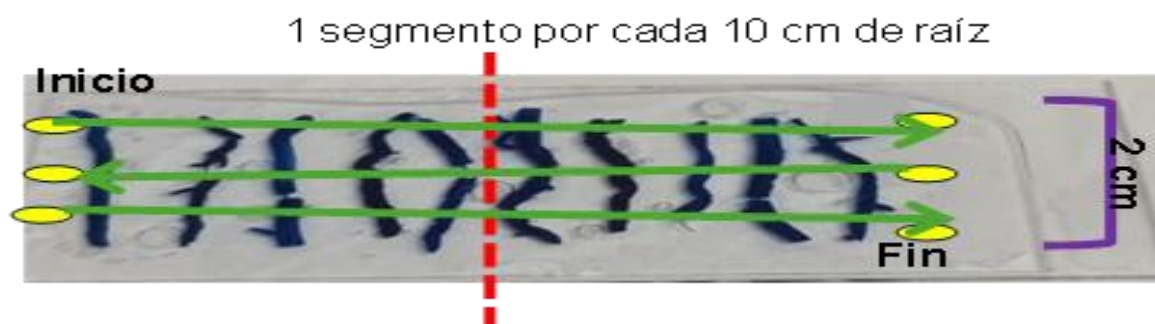


Figura 23. Selección de campos observados de raíces en microscopio. Los círculos amarillos indican los campos observados, las flechas verdes indican el movimiento de la platina en el microscopio.

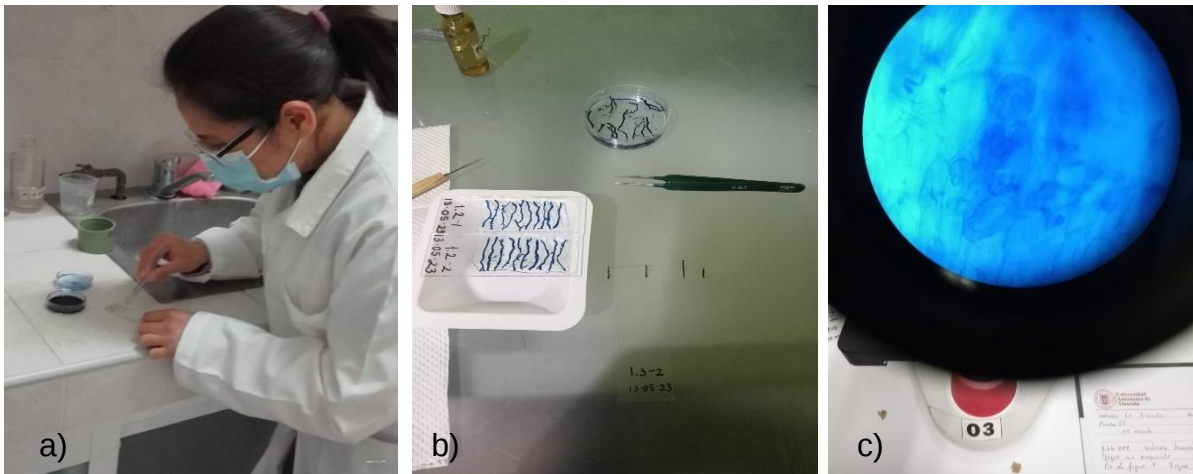


Figura 24. Observación de estructuras de colonización de HMA. a) Montaje de raíces en portaobjetos. b) Adición de PVLG y cubreobjetos. c) Observación de estructuras.

I.7.4.10 Análisis del porcentaje de colonización

Para cada individuo se montaron dos laminillas con 10 fragmentos de raíces cada una, de aproximadamente 2 cm. El porcentaje de colonización se realizó mediante la técnica de McGonigle *et al.* (1990) con algunas modificaciones implementadas. Por cada 10 cm de raíz que se observó se tomó como un segmento para generar un dato de porcentaje de colonización, por lo tanto, al tener 20 raíces de 2 cm de longitud por individuo se observaron 40 cm lo que corresponde a la generación de 4 datos por individuo. Para no despreciar ningún campo observado se consideraron las 3 observaciones por raíz, teniendo un total de 15 campos observados por cada 10 cm o bien por cada segmento de raíz.

Con base en la ecuación 7 se calculó el porcentaje de colonización:

$$\text{Porcentaje de colonización} = \frac{\text{Campos colonizados}}{\text{Campos observados}} \times 100$$

Ecuación 7. Cálculo para porcentaje de colonización.

I.7.4.11 Extracción de ADN genómico de suelo

La extracción de ADN en suelos de la época de secas y de lluvias se llevó a cabo con el kit DNeasy PowerLyzer PowerSoil kit 100 Cat. No. 12855-100 marca *QIAGEN* siguiendo el protocolo del proveedor. Posteriormente se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1% a 90 voltios por 40 min para verificar la integridad del ADN y se cuantificó el ADN en un NanoDrop 2000c de ThermoScientific.

I.7.4.12 Extracción de ADN genómico de raíces con DNAzol

La extracción de ADN en raíces de época de secas y lluvias se llevó a cabo con 500 µL DNAzol marca ThermoFisher Scientific (Genomic DNA Isolation Reagent, No. Cat. 10503- 027), reactivo con el cual se mantenían las muestras a -80 °C en el ultracongelador en tubos Eppendorf por individuo de cada sitio. Al retirar las muestras del ultracongelador se mantuvieron en una bandeja con hielo hasta empezar con la maceración.

Para la homogeneización del tejido, cada muestra se maceró utilizando pistilos de plástico hasta obtener una muestra homogénea. La muestra se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Luego, se pesaron los tubos y se colocaron de manera equilibrada en la centrifuga. El homogeneizado se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, se transfirieron aproximadamente 400 µL de sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1.7 mL.

Para la precipitación del ADN, se añadieron 500 µL de alcohol absoluto frío al sobrenadante, se mezcló 4 veces por inversión y se incubó en hielo durante 10 min. Después, se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min, y el sobrenadante se decantó. El precipitado se lavó con 1000 µL de etanol frío al 75%, se mezcló 4 veces por inversión, se dejó incubar durante 5 min a temperatura ambiente, y luego se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 min (el lavado se repitió dos veces).

Se retiró el exceso de etanol y para evaporar cualquier resto de este los tubos se colocaron en un bloque de calentamiento marca Felisa a 40°C durante 5 minutos. Se

resuspendió el ADN con 1000 µL de agua ultrapura (AUP), previamente calentada a 45°C. Posteriormente, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1% a 90 voltios durante 40 minutos y se cuantificó el ADN utilizando un espectrofotómetro de microvolumen NanoDrop 2000c, marca ThermoScientific. Finalmente, el ADN se almacenó en congelación hasta su procesamiento. Las muestras se conservaron en congelación hasta su posterior procesamiento.

I.7.4.13 Purificación de ADN de raíces

Al finalizar la extracción de ADN de raíces con DNAzol se obtiene una muestra sucia, por ello se realizó una purificación con el *kit DNeasy Plant Mini Kit* Cat No. 69106 marca QIAGEN. Para comenzar la etapa de purificación, las muestras se retiraron del congelador y se colocaron en una bandeja con hielo para evitar un choque de temperaturas y mantenerlas frías mientras se descongelaban.

A los tubos Eppendorf que contenían las muestras se añadieron 400 µL de buffer AP1 y 1.5 µL de RNasa A. La mezcla se agitó con vórtex, posteriormente se incubó en un bloque de calentamiento a 37°C durante 10 min agitando los tubos por inversión 3 veces cada 2 a 3 min. Pasado el tiempo de incubación, se añadieron 130 µL de buffer P3, se homogeneizó con vórtex. La mezcla se incubó en hielo durante 5 min, después se transfirió a una columna QIAshredder colocada en un tubo colector de 2 mL, se centrifugó a 20,000 g durante 2 min y se desechó la columna.

El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf, se agregaron 750 µL de amortiguador AW1 y se mezcló por pipeteo, de esta mezcla se transfirieron 650 µL a una columna DNeasy Mini Spin colocada en un tubo colector de 2 mL, y se centrifugó a 6,000 g durante un minuto, el sobrenadante se desechó y el proceso se repitió con la mezcla restante. Sobre la columna se añadieron 500 µL de solución AW2 y se centrifugó a 6,000 g durante 1 min y posteriormente se desechó el sobrenadante, se agregaron nuevamente 500 µL de solución AW2, centrifugando a 20,000 g durante 2 min. La columna se removió y se transfirió a un tubo nuevo Eppendorf de 1.6 mL, cuidando que se depositara en el centro de la columna y sin tocar las paredes se añadieron 50 µL de

AUP, la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, posteriormente se centrifugó a 6,000 g durante 1 min, se agregó nuevamente 50 µL de AUP y se centrifugó a 6,000 g durante 1 min para obtener un total de 100 µL de solución.

Al finalizar se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% a 90 voltios durante 40 minutos, y se cuantificó el ADN utilizando un NanoDrop 2000c ThermoScientific. La muestra de ADN genómico se mantuvo en congelación hasta su procesamiento.

I.7.4.14 Almacenamiento de ADN genómico de raíces por sitio

Antes de llevar a cabo las Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidadas para el caso de las raíces, y debido a que se realizó una extracción y purificación de ADN genómico por individuo de cada uno de los sitios, se realizaron los cálculos correspondientes para tener una muestra compuesta por sitio de ADN genómico con una concentración de 10 ng/µL en un volumen de 100 µL.

Se utilizó la ecuación 8:

$$C1V1 = C2V2$$

Ecuación 8. Cálculo de volumen-volumen.

C1: concentración de ADN genómico conocido arrojado por el NanoDrop (ng/µL)

V1: volumen que se requiere calcular para conocer cantos µL tomar de cada muestra

C2: concentración a la que requerimos cada muestra para obtener una muestra compuesta (ng/µL)

V2: volumen final de la muestra (µL)

Se requiere que la muestra compuesta que será la muestra final con la que se trabajó para las PCR estuviera a una concentración de 10 ng/µL, tomando en cuenta que se tienen 3 individuos por sitio $10 \text{ ng/µL} \div 3 = 3.33 \text{ ng/µL}$

Se realizó el despeje y sustitución para calcular el volumen 1 (V1) de la Ecuación 8.

$$V1 = C2 \cdot V2 / C1 \quad \rightarrow \quad V1 = 3.33 \text{ ng/µL} \cdot 100 \text{ µL} \div \text{ng/µL} \quad \rightarrow \quad V1 = 333 \text{ ng} \div \text{ng/µL}$$

Para la manipulación de las muestras de ADN genómico de raíces, primero se retiraron del congelador y se colocaron en una bandeja con hielo para su descongelamiento gradual y evitar un choque térmico. Antes de tomar los μL requeridos de cada muestra, se homogeneizó en un vórtex por unos segundos. En un nuevo tubo Eppendorf, se agregaron los μL calculados de ADN de cada individuo (tres) por sitio, para obtener una muestra compuesta de ADN genómico de cada sitio de raíces, esto se realizó con las muestras de cada época. Las muestras se etiquetaron como RS1 a RS7 para Raíces de Secas sitio 1 al 7, y RL1 a RL7 para Raíces de Lluvias sitios 1 al 7. Finalmente, para obtener un volumen final de 100 μL se añadieron los μL necesarios de AUP.

I.7.4.15 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) anidadas

Para la preparación de la mezcla de reactivos para cada PCR, primero se realizaron los cálculos necesarios basados en dos grupos; grupo 1 conformado por las 14 muestras de suelo por ambas épocas más el control positivo y el control negativo, el segundo grupo conformado por las 14 muestras de raíz por ambas épocas más el control positivo y el control negativo, sumando un total de 16 muestras por grupo. La mezcla de reactivos se calculó para un volumen final específico para cada grupo y se multiplicaron los μL de cada reactivo por las 16 muestras respectivas de cada grupo, los resultados de los cálculos se muestran en la Tabla 3.

Las muestras de ADN genómico, previamente congeladas, se retiraron del congelador y se colocaron en una bandeja con hielo para evitar un choque térmico, lo mismo se realizó con los reactivos para PCR, se verificó que todas las muestras y reactivos estuvieran descongelados antes de su uso, manteniéndose en hielo durante toda la preparación de la mezcla. Cada reactivo y muestra se homogeneizó en vórtex por unos segundos antes de ser utilizado. Se preparó la mezcla de reactivos para cada PCR en un tubo Eppendorf de 1.7 mL, omitiendo el templado ya que se refería a la muestra, al finalizar la preparación la mezcla, se homogeneizó en vórtex y se centrifugó por dos segundos.

I.7.4.16 PCR anidadas para muestras de ADN genómico de raíces y suelo

Para llevar a cabo el proceso de PCR, primero se prepararon las mezclas de reactivos y las muestras indicado en el apartado I.7.3.15. Considerando que para cada PCR se debe usar un control positivo al que se debe agregar un volumen de mezcla de reactivos más el control positivo y un control negativo al que solo se agregó 1 volumen de mezcla de reactivos solamente.

Para la PCR 1, se utilizó la mezcla mostrada en la Tabla 3 apartado a), la mezcla de primers para esta PCR se muestra en la Tabla 4 sección a). Se colocaron 9 μL de mezcla y 1 μL de muestra en microtubos para termociclador marca Multigene, resultando en un volumen final de 10 μL por microtubo, posteriormente cada microtubo se homogenizó y se centrifugó durante 2 s, enseguida se colocaron en los pozos del termociclador bajo las condiciones especificadas en la Tabla 3 sección a). Una vez finalizados los ciclos en el termociclador, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% a 90 voltios durante 40 min. Posteriormente, se observó el gel en un fotodocumentador BIO-RAD para verificar la presencia de bandas de 1800 pb.

Para la PCR 2, se preparó la mezcla de reactivos indicada en la Tabla 3 apartado b), la mezcla de primers para esta PCR está indicada en la Tabla 4 apartado b). En microtubos se agregaron 22.5 μL de mezcla de reactivos y 2.5 μL de templado de la PCR 1, obteniendo un volumen final de 25 μL por microtubo -para las muestras de suelo, el templado que se utilizó para la PCR 2 fue una dilución 2:18 de la PCR 1 (2 μL de templado y 18 μL de AUP)- posteriormente cada microtubo se homogenizó en vórtex y se centrifugó durante 2 s y se colocaron en los pozos del termociclador bajo las condiciones mencionadas en la Tabla 3 apartado b). Al finalizar los ciclos en el termociclador, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% a 90 voltios durante 40 min, el gel se observó en un fotodocumentador BIO-RAD para verificar la presencia de bandas de 1500 pb.

Para llevar a cabo la PCR 3, se preparó la mezcla de reactivos indicada en la Tabla 3 sección c) por duplicado, la mezcla de primers para esta PCR está indicada en la Tabla

4 apartado c). En microtubos se agregaron 63.75 μL de mezcla de reactivos y 11.25 μL de templado de la PCR 2, obteniendo un volumen final de 75 μL por microtubo - para las muestras de suelo, el templado que se utilizó para está PCR fue una dilución 3:27 de la PCR 2 (3 μL de templado y 27 μL de AUP)- posteriormente cada microtubo se homogenizó en vórtex y se centrifugó durante 2 s, después se colocaron en los pozos del termociclador bajo las condiciones mencionadas en la Tabla 3 sección c). Al concluir los ciclos en el termociclador, se realizó nuevamente una electroforesis en gel de agarosa al 1% a 90 voltios durante 40 min, el gel se observó en un fotodocumentador BIO-RAD para verificar la amplificación de bandas de ~ 600 pb.

Mezcla de reactivos para 10 μL		* 16 muestras	Condiciones de termociclador			
a) PCR 1		μL	μL	Temperatura °C	Tiempo	Etapas
	H ₂ O UP	5.8	92.8	94	2 min	Desnaturalización
	Buffer 5x	2	32	94	30 s	
	MgCl ₂ mM	0.5	8	50	30 s 35 ciclos	Alineamiento
	dNTP's 10mM	0.2	3.2	72	2 min	
	SSU mAf 10 μM	0.2	3.2	72	10 min	Amplificación
	LSUmAr 10 μM	0.2	3.2			
	GoTaq 5 μ/ml	0.1	1.6			
	Muestra	1				
b) PCR 2	Mezcla de reactivos para 25 μL		*16 muestras	Condiciones de termociclador		
		μL	μL	Temperatura °C	Tiempo	Etapas
	H ₂ O UP	14.5	232	94	2 min	Desnaturalización
	Buffer 5x	5	80	94	30 s	
	MgCl ₂ mM	1.25	20	48	30 s 35 ciclos	Alineamiento
	dNTP's 10mM	0.5	8	72	2 min	
	SSU mCf 10 μM	0.5	8	72	10 min	Amplificación
	LSUmBr 10 μM	0.5	8			
	GoTaq 5 U/ μL	0.25	4			
Templado	2.5					
c) PCR 3	Mezcla de reactivos para 75 μL		*16 muestras	Condiciones de termociclador		
		μL	μL	Temperatura °C	Tiempo	Etapas
	H ₂ O UP	39.75	636	94	5 min	Desnaturalización
	Buffer 5x	15	240	94	30 s	
	MgCl ₂ mM	3.75	60	60	30 s 35 ciclos	Alineamiento
	dNTP's 10mM	1.5	24	72	1 min	
	Forward 10 μM	1.5	24	75	5 min	Amplificación
	Reverse 10 μM	1.5	24			
	GoTaq 5 U/μL	0.75	12			
Templado	11.25					

Tabla 3. Datos de cálculos de volumen (μ L) de cada reactivo para formar la mezcla de PCR y condiciones de termociclador para cada PCR anidada. a) PCR 1. b) PCR 2. c) PCR 3. H₂O UP=Agua ultrapura. Buffer =Solución amortiguadora. MgCl₂=Cofactor cloruro de magnesio.dNTP's =Desoxirribonucleósidos trifosfato. SSUmAr, SSUmCf =Conjunto de *primers* de la subunidad corta. LSUmAr, LSUmBr =Conjunto de *primers* de la subunidad larga. Forward, Reverse =Conjunto de *primers* con etiqueta para Illumina. Go Taq =Taq ADN polimerasa. Templado = Cadena molde. Nota: la secuencia de los *primers* se muestra en la tabla 5.

a)	Subunidad	Secuencia
	SSUmAf2	TGG GTA ATC TTR TGA AAC TTC A
	SSUmAf1	TGG GTA ATC 3TT GAA ACT TYA
	LSUmAr4	GCT CTT ACT CAA ACC TAT CGA
	LSUmAr3	TGC TCT TAC TCA AAT CTA TCA AA
	LSUmAr2	GCT CTA ACT CAA TTC TAT CGA T
	LSUmAr1	GCT CAC ACT CAA ATC TAT CAA A
b)	Subunidad	Secuencia
	LSUmBr5	AAC ACT CGC ATA TAT GCT AGA
	LSUmBr4	3AC ACT CGC ACA TAT GTT AG
	LSUmBr3	AAC ACT CGC ATA CAT GTT AGA
	LSUmBr2	AAC ACT CGC ACA CAT GTT AGA
	LSUmBr1	DAA CAC TCG CAT ATA TGT TAG A
	SSUmCf3	TAT TGC TCT TNA ACG AGG AAT C
	SSUmCf2	TAT TGT TCT TCA ACG AGG AAT C
	SSUmCf1	TGC CTC TTC AAC GAG GAA TC
c)	Subunidad	Secuencia
	ITS 1. Forward PCR3-HMA's	TCG TCG GCA GCG GAT GTG TAT AAG AGA CAG TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
	ITS 4. Reverse PCR3-HMA's	GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAC AGT CCT CCG CTT ATT GAT ATG C

Tabla 4. Mezcla de secuencias para primers. a) Primers SSU: subunidad corta y LSU: Subunidad larga PCR 1. b) Primers SSU: subunidad corta y LSU: Subunidad larga para PCR 2. c) **Primers de ITS:** Espaciador transcrito interno para PCR 3 incluyendo etiqueta para secuenciación masiva en Illumina.

I.7.4.17 Observación y purificación de los productos de PCR anidadas

Al final de las PCR anidadas se tenían 2 microtubos por sitio de cada época con ~ 72 µL cada microtubo, posteriormente las muestras se depositaron en pozos de un gel de agarosa al 1.5% para realizar electroforesis a 90 voltios durante 90 minutos. Con la ayuda de la luz ultravioleta (UV) emitida por el transiluminador Bio-Rad, se visualizaron las bandas de ADN y se cortaron con un bisturí. Cada fragmento se depositó en un tubo Eppendorf de 1.7 mL y se pesó, considerando el peso del tubo vacío.

Para la purificación de las bandas de gel de agarosa, se siguieron las indicaciones del kit QIAquick PCR purification, con algunos cambios adicionales. Se agregaron tres volúmenes (μL) de buffer QG por cada 100 mg de gel, posteriormente los tubos se incubaron en un bloque de calentamiento a 50 °C durante aproximadamente 10 min, mezclando en vórtex cada 2 min durante el tiempo de incubación, antes de retirar se verificó que el gel estuviera completamente disuelto; de lo contrario, se incubó por más tiempo.

Se añadió un volumen (μL) de isopropanol por cada 100 mg de gel, la mezcla se depositó dividiendo la muestra en dos columnas (incluidas en el kit) por sitio, estas se colocaron en tubo colector, enseguida se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 min y se desechó el líquido. Cada columna se lavó agregando 750 μL de buffer PE, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 3 min, se centrifugó a 13,000 rpm durante un minuto y se desechó el líquido colectado, este paso se repitió una segunda vez. Después de desechar el líquido de la segunda ronda, se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm durante 1 min para eliminar residuos de etanol.

Se desechó el tubo colector y la columna se colocó en un nuevo tubo Eppendorf de 1.7 mL. Para eluir el ADN en el centro de la columna y sin tocar las paredes se agregaron 30 μL de AUP, se dejó reposar a temperatura ambiente durante un minuto y se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm durante 1 min, este paso se repitió una segunda vez. Posteriormente, se cuantificó el ADN en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c ThermoScientific, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% a 90 voltios durante 40 min, el material genético obtenido fue de ~600 pb.

I.7.4.18 Preparación de la concentración de las muestras

Para la secuenciación masiva en Illumina se prepararon 350 nanogramos (ng) de cada muestra en una concentración >20 ng/ μL , para ello las muestras se cuantificaron en Nano Drop 2000c Thermo Scientific, teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm, con respecto a la evaluación de calidad y pureza de

las muestras se tomaron en cuenta los parámetros de relación de absorbancias 260/280 y 260/230 verificando que los resultados estuvieran dentro del intervalo de 1.6-2.0.

Después de obtener la concentración de cada muestra se realizaron los cálculos necesarios para tomar los microlitros necesarios de cada una y obtener una cantidad de 350 ng por sitio. Esto se logró dividiendo 350 ng entre la concentración de cada muestra leída en el espectrofotómetro NanoDrop 2000c Thermo Scientific. Posteriormente los tubos se colocaron destapados en un bloque de calentamiento a 45°C hasta que la muestra estuviera completamente seca.

A la muestra ya seca se le agregaron 17.5 µL de AUP, calculado utilizando la fórmula $C1 \times V1 = C2 \times V2$ con el objetivo de tener una concentración de 20 ng/µL en cada tubo. Finalmente, las muestras se almacenaron en refrigeración a 4°C hasta su envío al laboratorio de LANGEBIO.

1.7.4.19 Secuenciación masiva y análisis bioinformático

Los productos purificados de la última PCR anidada se enviaron a LANGEVIO-CINVESTAV Irapuato, para etiquetar las bibliotecas de manera individual por medio de la adición de índices (barcodes), posteriormente se realizó la secuenciación en ambas direcciones (paired-end), se utilizó la plataforma MySeq de Illumina en formato 2 x 300 (lo cual permite obtener secuencia de aproximadamente 500-600 pb).

Cada amplicón se analizó con la base de datos RDP (Ribosomal Database Project, <https://rdp.cme.msu.edu/>); utilizando herramientas bioinformáticas de clasificación jerárquica para cada muestra. El clasificador RDP y la base de datos de los dominios ITS se usaron para generar tablas de clasificación jerárquica (“filo”, “clase”, “orden”, “familia”, “género” y “especie”) para ITS. Ya obtenidos los datos de especie putativa, las taxa virtuales se clasificaron de acuerdo con el Catalogue of Life (<http://www.catalogueoflife.org/> consultado en mayo del 2024).

I.7.5 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron estadísticamente por épocas con el programa RStudio, para la normalidad ($p \geq 0.05$) se aplicó Shapiro Wilk, posteriormente para los datos normales se verificó la homocedasticidad ($p \geq 0.05$) con el fin de contrastar la igualdad de varianzas, para conocer si hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$) para datos normales se realizó una comparación de medias mediante la prueba paramétrica t de Student y para datos no normales se aplicó la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Para datos normales con varianzas desiguales (homocedasticidad < 0.05) se utilizó la prueba de t de Welch.

II Resultados

II.1 Resultados objetivo 1

Los resultados de los análisis fisicoquímicos de suelo rizosférico de cada uno de los siete sitios muestreados en época de secas y lluvias se observan en la Tabla 5, considerando las clasificaciones descritas para suelos volcánicos en la NOM-021-RECNAT-200 (SEMARNAT, 2002) . El pH en secas se encontró en un intervalo de 6.45 a 7.40 clasificado como moderadamente ácido y medianamente alcalino, mientras que en lluvias se obtuvieron valores de 6.34 a 6.93 clasificado como moderadamente ácido y neutro.

Las sales totales (ST) obtenidas en partes por millón (ppm) fueron despreciables para ambas épocas, en un intervalo de 97.00 a 228.67 ppm en secas y de 54.67 a 134.33 ppm en lluvias observando una clara disminución. En cuestión del porcentaje de materia orgánica (%MO) fue mayor en secas con un intervalo de 2.01 a 5.37% clasificado como un contenido bajo mientras que en lluvias se obtuvo una clasificación baja y muy baja con un intervalo de 2.55 a 4.83%. El porcentaje de nitrógeno total (%N) en secas se encontró en un intervalo de 0.01 a 1.04 lo que corresponde a una clasificación baja y alta siendo que en lluvias se encontró una similitud en la clasificación con intervalos de 0.07 a 1.05%. El contenido de fosforo (P) aprovechable en mg por kg (mg/kg) fue bajo para secas con intervalos de 0.3 a 4.2 mg/kg en secas y de 0.2 a 6.7 mg/kg con una

clasificación baja y media. Con respecto al porcentaje de humedad (%H) en secas se encontró un intervalo de 26 a 37% y en lluvias 51.8 a 84.2%. La clase texturales que predomina es la franco arenosa en 6 de los 7 puntos de análisis del municipio de estudio y sólo en el punto 5 la clase textural fue arenoso franco. En cuanto a la densidad aparente (Da) se obtuvieron valores similares en ambas épocas con intervalos de 1.01 a 1.28 g/cm³.

Época de secas								
Sitio	pH	ST (ppm)	%MO	%N	P (mg/kg)	%H	Clase textural	Da (g/cm ³)
*Intervalos	<5.0 >8.5	<500 >8,000	<4.0 >16.1	<0.30 >0.80	<5.5 >11			<1.60
1	7.40	117.00	3.42	0.46	0.4	37	Franco arenosa	1.10
2	7.27	97.00	2.15	0.92	0.2	32	Franco arenosa	1.22
3	6.36	160.67	5.10	1.04	4.2	30	Franco arenosa	1.04
4	7.29	114.67	2.01	0.48	2.0	26	Franco arenosa	1.20
5	7.01	228.67	2.01	0.03	1.1	28	Arenoso franco	1.19
6	6.65	102.00	5.37	0.01	2.0	31	Franco arenosa	1.01
7	6.45	121.00	5.37	0.01	0.3	29	Franco arenosa	1.23
Época de lluvias								
Sitio	pH	ST (ppm)	%MO	%N	P (mg/kg)	%H	Clase textural	Da (g/cm ³)
*Intervalos	<5.0 >8.5	<500 >8,000	<4.0 >16.1	<0.30 >0.80	<5.5 >11			<1.60
1	6.93	115.67	3.89	1.05	1.1	84.2	Franco arenosa	1.11
2	6.63	54.67	4.16	0.07	0.8	73.9	Franco arenosa	0.99
3	6.41	134.33	4.49	0.31	2.9	51.8	Franco arenosa	1.12
4	6.55	119.33	2.88	0.41	6.7	75.0	Franco arenosa	1.27
5	6.66	67.33	2.55	0.20	1.2	67.9	Arenoso franco	1.28
6	6.37	89.00	4.83	0.22	0.2	56.2	Franco arenosa	1.07
7	6.34	71.33	2.75	0.32	4.3	72.4	Franco arenosa	1.25

Tabla 5. Propiedades físicas y químicas de suelo rizosferico circundante a árboles de *P. americana* var. *drymifolia* de Tepeyanco, Tlaxcala. a) Época de secas y b) época de lluvia. %Col.= Porcentaje de colonización. pH= Potencial de hidrogeno. ST= Sales totales (ppm). %MO= Porcentaje de Materia orgánica. %N= Porcentaje de Nitrógeno. P= Contenido de Fósforo (mg/kg). %H= Porcentaje de Humedad g de agua en 100 g de suelo. Da= Densidad aparente (g/cm³). *Intervalos tomados de la NOM-021-RECNAT-2000.

Al analizar la normalidad se obtuvieron los siguientes resultados pH (p=0.3057), ST ppm (p=0.0300), %MO (0.0343), %N (0.0226), contenido de P mg/kg (p=0.1822), %H (p=0.7179) y Da (p=0.2492) posteriormente para valores p≥0.05 se verificó la homocedasticidad pH (p=0.1059), el contenido de P (p=0.2677) y la Da (p=0.6097) por lo tanto estos parámetros son normales, en el caso del %H se obtuvo una homocedasticidad p=1.9X10⁻⁸. Posteriormente se llevó a cabo la comparación de las medias con t de Student, para %H se utilizó t de Welch, en el caso de datos no normales

se aplicó la prueba de Wilcoxon, se obtuvieron los siguientes resultados para las características edáficas con diferencias no significativas pH ($p=0.0765$), %MO ($p=0.9375$), %N ($p=1.0$), contenido de P ($p=0.3526$), y Da ($p=0.8341$), por otro lado las características con diferencias significativas fueron ST ($p=0.0468$) y %H ($p=4.6 \times 10^{-6}$).

II.2 Resultados objetivo 2

En raíces de *P. americana* var. *drymifolia* se encontró las diferentes estructuras de los HMA: Micelio, vesículas, arbúsculos y apresorios que demuestran la presencia y colonización de estos hongos (Figura 25).

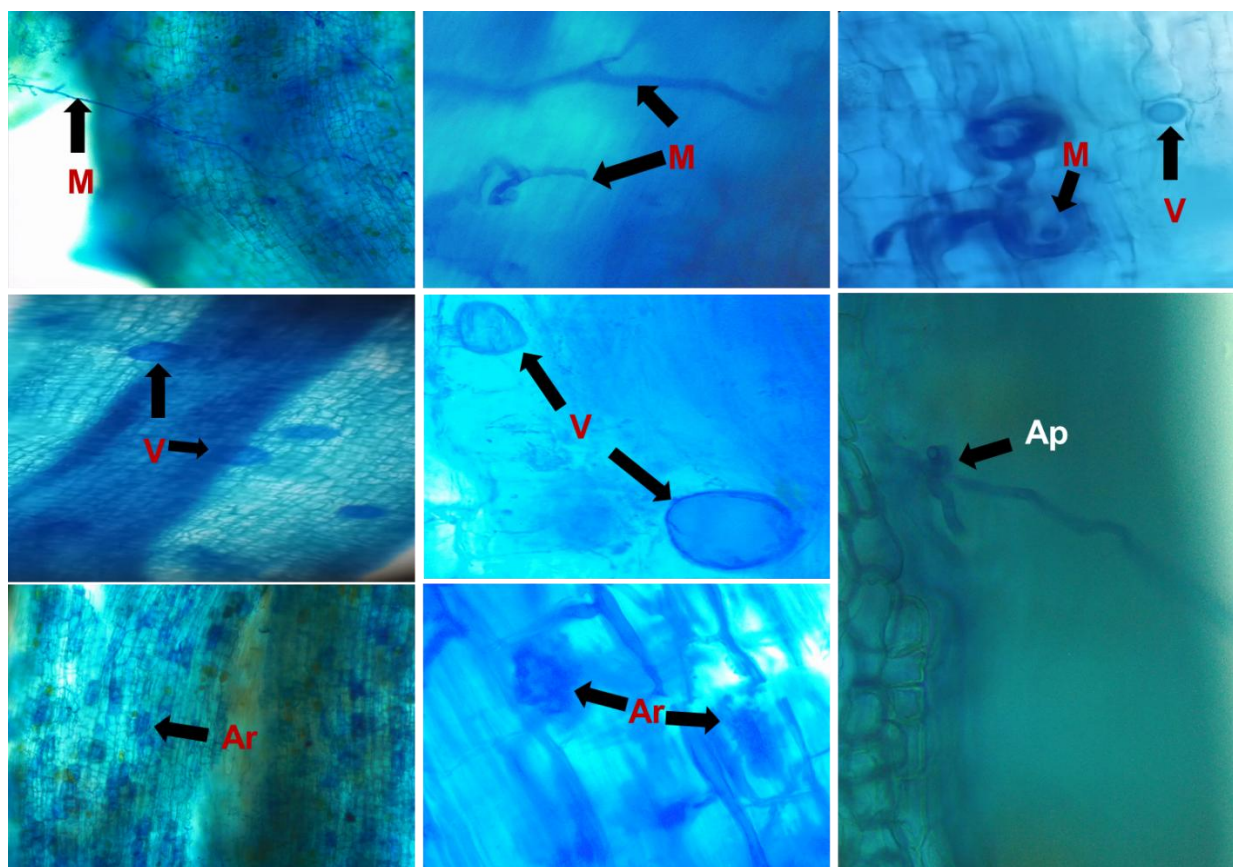


Figura 25. Estructuras microscópicas de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en raíces de *Persea americana* var. *drymifolia* procedentes del municipio de Tepeyanco, Tlaxcala. M = micelio; V = vesículas; Ar = arbúsculos; Ap = apresorio.

El porcentaje de colonización (Figura 26) de las raíces del aguacate procedentes de los sitios seleccionados y correspondientes de cada época de muestreo se obtuvo por la técnica de McGonigle *et al.* (1990), se logró observar que en época de lluvias (Figura 26

A) la mayor colonización se presentó en el sitio 7 con un valor de 91.7%, el cual presenta diferencias significativas con el sitio 6 y 2 donde este último fue el sitio con una menor colonización de 67.2%. En cuanto a la época de secas (Figura 26B) el sitio con menor colonización fue el 4 con 60% el cual presentó diferencias significativas con el sitio 2 (82.2%), sitio 5 (89.4%), sitio 6 (79.4%) y el 7 que además fue el sitio con una mayor colonización de 90.6%.

Con respecto a los análisis estadísticos se llevó a cabo la prueba de Shapiro Wilk donde se obtuvo un valor de $p=0.7364$ con una homocedasticidad de $p=0.846$ determinando que los datos son normales, por lo que se realizó una prueba paramétrica de t de Student para la comparación de media, se obtuvo $p=0.4216$ verificando que el porcentaje de colonización tiene diferencias no significativas entre épocas.

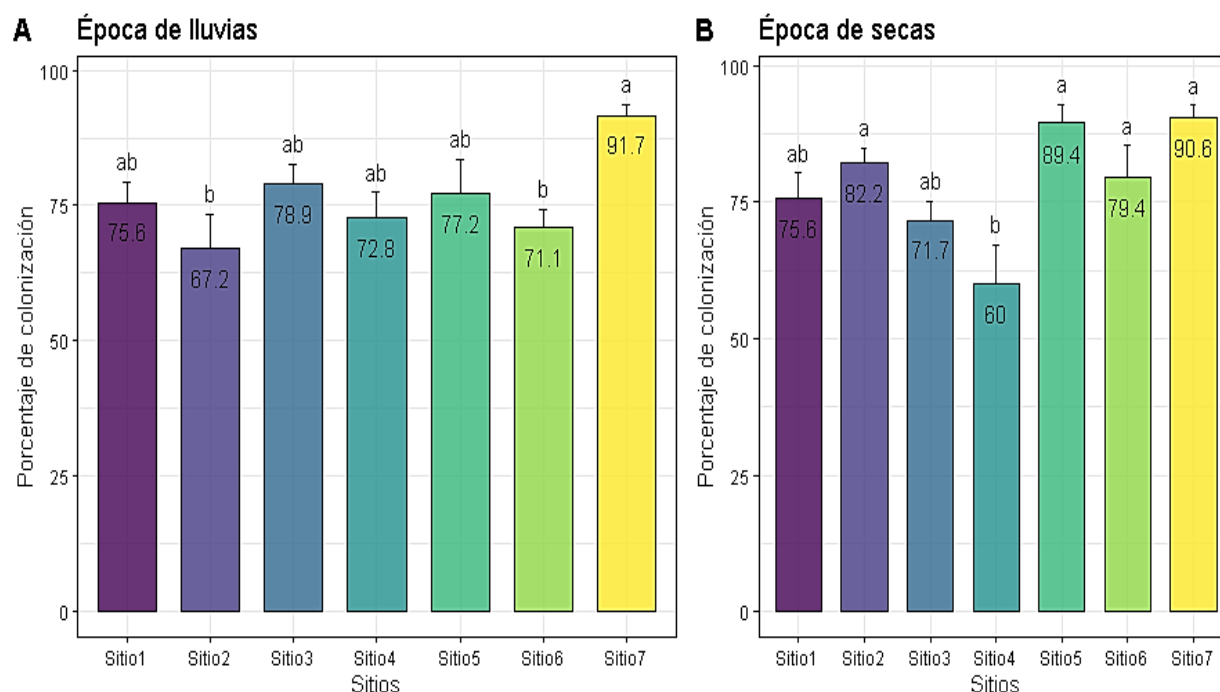


Figura 26. Porcentaje (%) de colonización de HMA en raíces de árboles de *P. americana* var. *drymifolia* en Tepeyanco, Tlaxcala. A) Época de Lluvias B) Época de Secas. Las letras situadas sobre las barras de error representan la significancia: letras iguales indican ausencia de significancia entre los grupos comparados, letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos comparados.

Posteriormente el porcentaje de colonización se analizó haciendo comparaciones entre el mismo sitio en diferente época, donde se encontró que el único sitio con diferencias significativas fue en el 2 con un valor de $p=0.041$ (Figura 27).

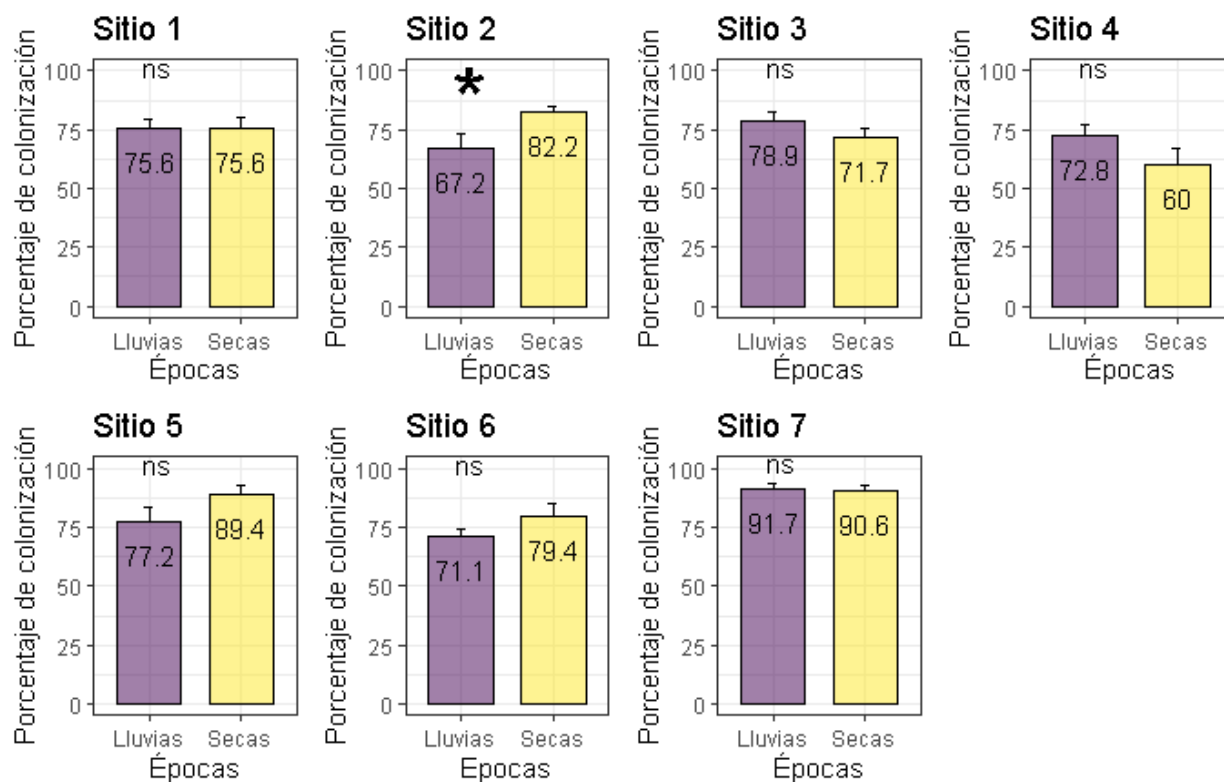


Figura 27. Porcentaje (%) de colonización de HMA de suelo rizosférico asociado a árboles de *P. americana* var. *drymifolia* en Tepeyanco, Tlaxcala. Comparación entre mismo sitio en diferente época. La prueba de Shapiro Wilk muestra normalidad en los datos $p=0.7364$, * el sitio 2 muestra diferencias significativas con una prueba de t de Student con valor $p=0.041$.

A los resultados del porcentaje de colonización se les aplicó el análisis de correlación con las características edáficas del suelo rizosférico de *P. americana* var. *drymifolia*, en la Figura 28 se observan los resultados que muestran que no existe una correlación fuerte entre las variables. El valor más cercano a 1 fue la Da con un valor de +0.39 y las texturas de arenoso franco y franco arenoso con un valor de +0.28 y -0.28, respectivamente, sin embargo, no indican una correlación.

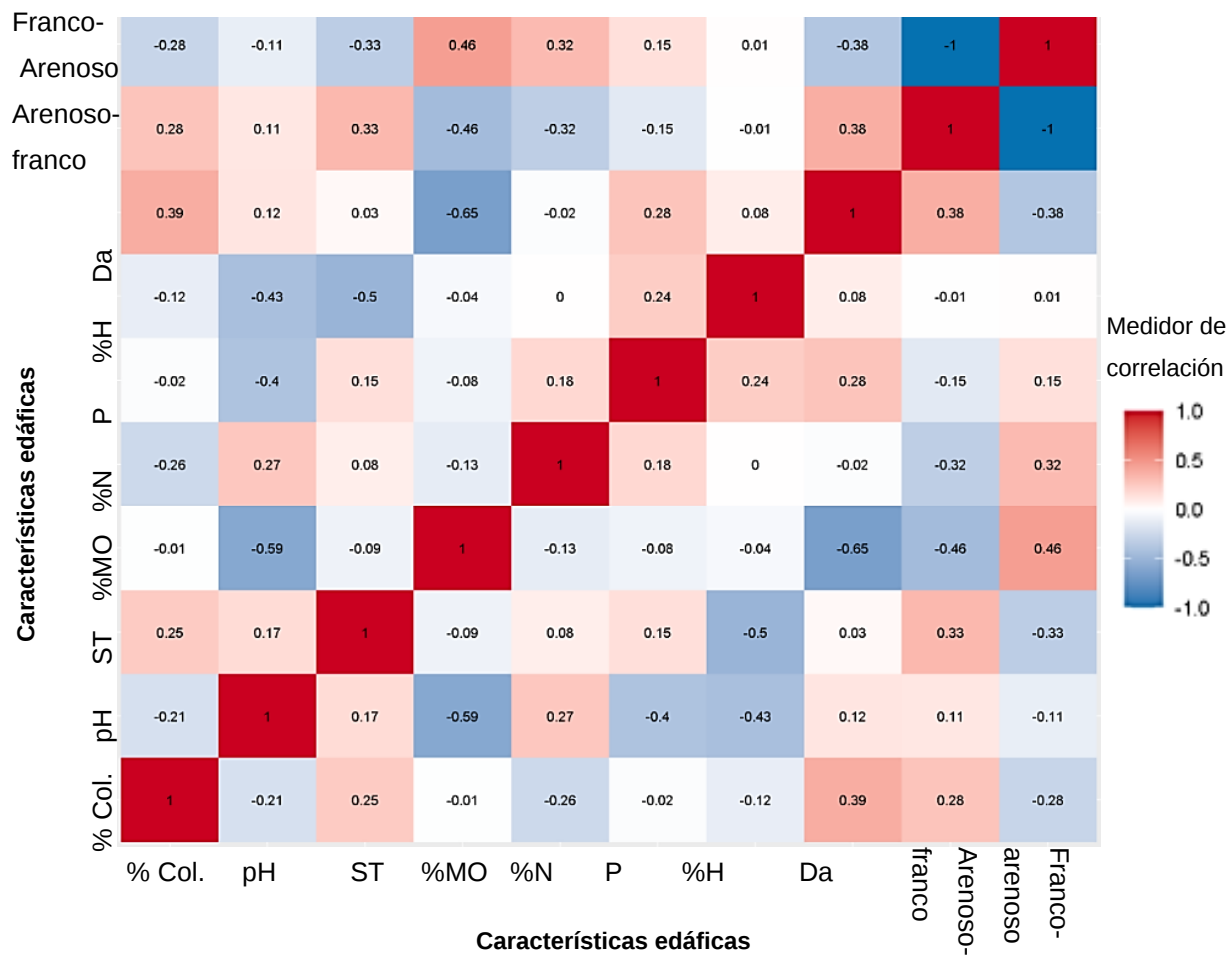
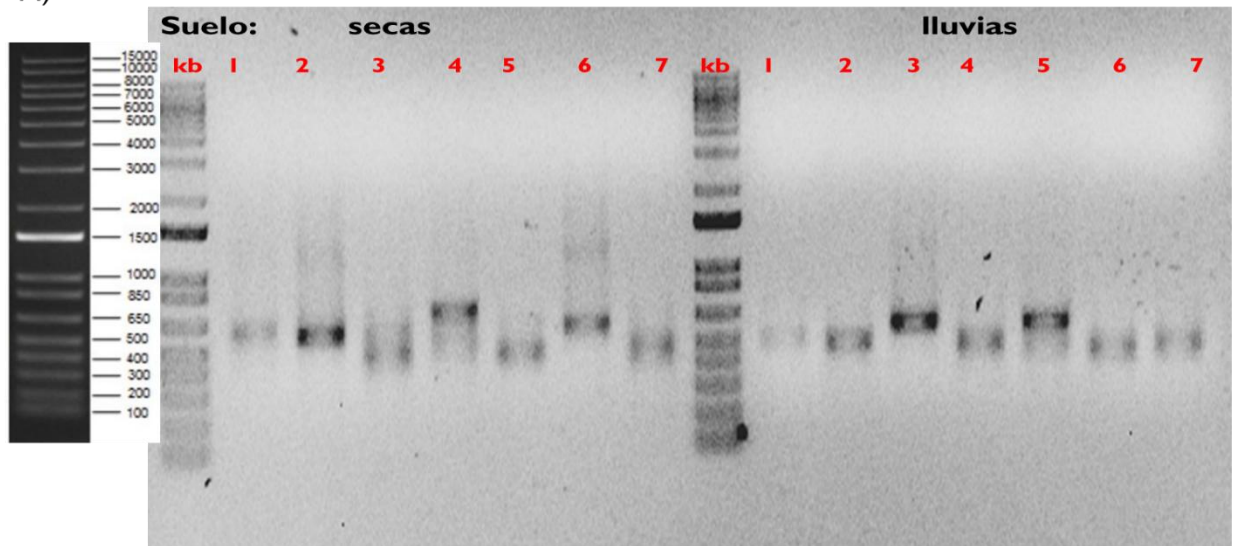


Figura 28. Análisis de correlación de porcentaje de colonización respecto de las características edáficas de suelo rizosferico de *P. americana* var. *drymifolia*. %Col.= Porcentaje de colonización. pH= Potencial de hidrogeno. ST= Sales totales. %MO= Porcentaje de materia orgánica. %N= Porcentaje de Nitrógeno total. P= Contenido de Fosforo. %H= Porcentaje de Humedad. Da= Densidad. aparente.

II.3 Resultados objetivo 3

En la Figura 29 se observa en gel de agarosa las bandas amplificadas, producto de PCR anidadas y purificadas de las muestras de suelo (Figura 29A) y de raíces (Figura 29B) de ambas épocas de cada uno de los sitios muestreados que se enviaron a secuenciar.

A)



B)

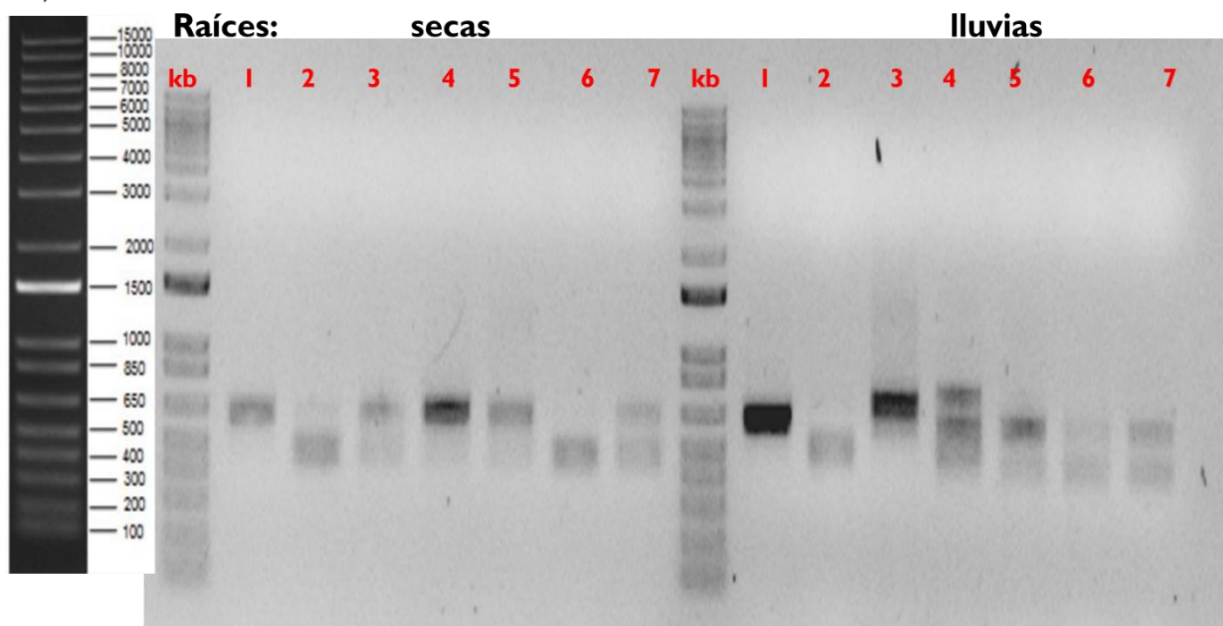


Figura 29. Productos de PCR anidada y purificados. Amplificaciones de bandas de 600 pb, época de secas (izquierda) y lluvias (derecha) en A) muestras de suelo y B) muestras de raíces en de los siete sitios muestreados de *P. americana* var. *drymifolia* en el municipio de Tepeyanco. El marcador de peso molecular (kb) corresponde a 1kb, con la banda de mayor intensidad de 1,500 pb.

Con base en los análisis moleculares mediante secuenciación masiva, se obtuvo un total de 1,218,987 millones de lecturas que muestran la abundancia relativa de diferentes filos de hongos que se encontraron en cada sitio (Figura 30). En las muestras de suelo, 146,767 lecturas se alinearon con secuencias pertenecientes al filo Glomeromycota, mientras que para las muestras de raíz fueron 441 dando un total de 147,208 lecturas que se alinearon con alguna secuencia reportada para este filo.

Con relación a las lecturas totales (147,208) que corresponden al 12.07 % y que fueron alineadas a secuencias del filo de interés permitieron determinar que las taxa de HMA están presentes tanto en suelo rizosférico como asociadas a las raíces de *P. americana* var. *drymifolia*.

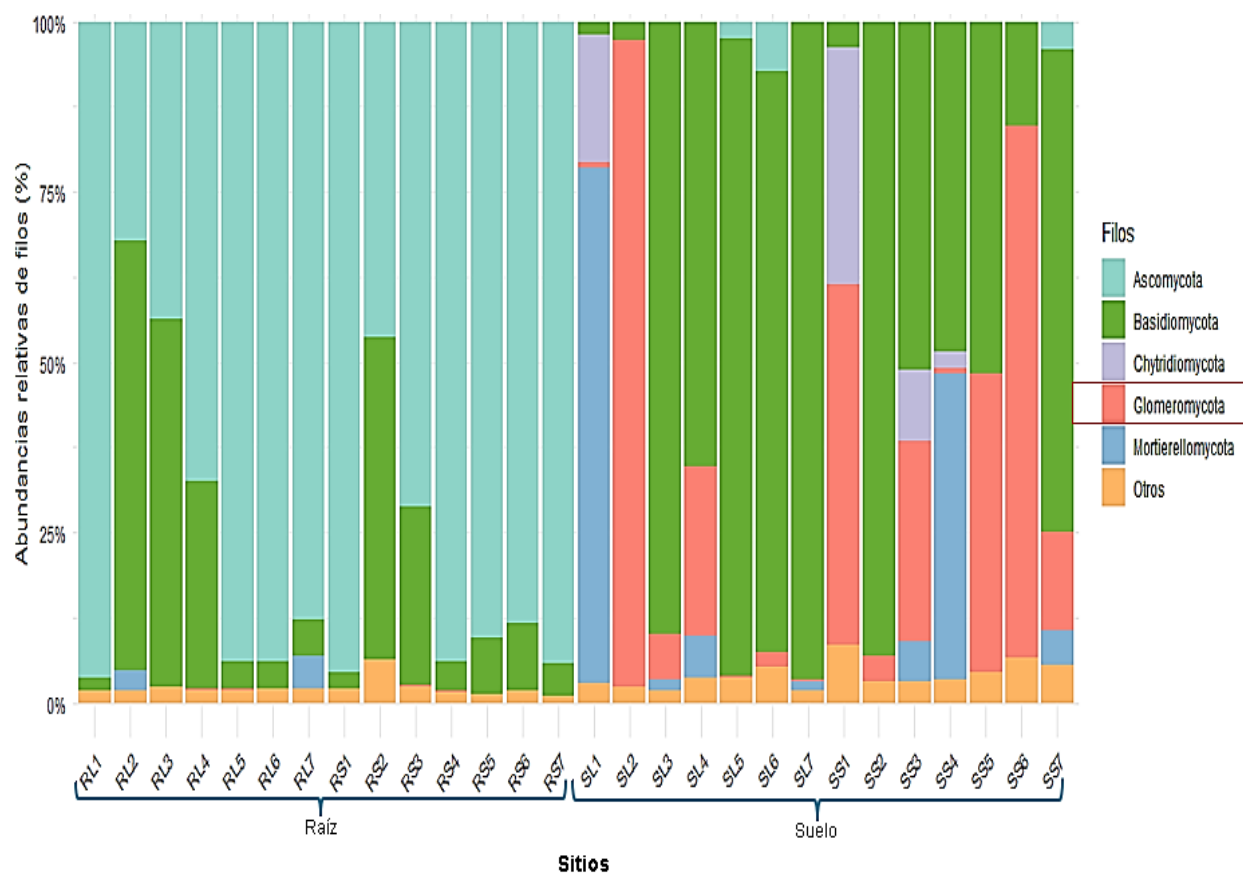


Figura 30. Abundancia relativa de filos de hongos encontrados en muestras de suelo rizosférico en época de secas (SS) y lluvias (SL), así como en raíz en secas (RS) y lluvias (RL) asociado a árboles de *Persea americana* var. *drymifolia* de Tepeyanco, Tlaxcala. **Glomeromycota** señalado en el recuadro rojo.

Las lecturas totales del filo Glomeromycota arrojaron como resultado 81 *taxa* virtuales, determinando 65 *taxa* incluyendo las que están identificadas como sp. (especie no definida). En la Figura 31A se muestra con un diagrama de Venn el número de *taxa* de HMA encontradas en ambas épocas, 17 *taxa* se hallaron exclusivamente en época de secas, 7 en la de lluvias y 41 *taxa* se encontraron en común. Asimismo, 44 *taxa* se presentaron en suelo, 3 solamente en raíz y 18 en común (Figura 31B).

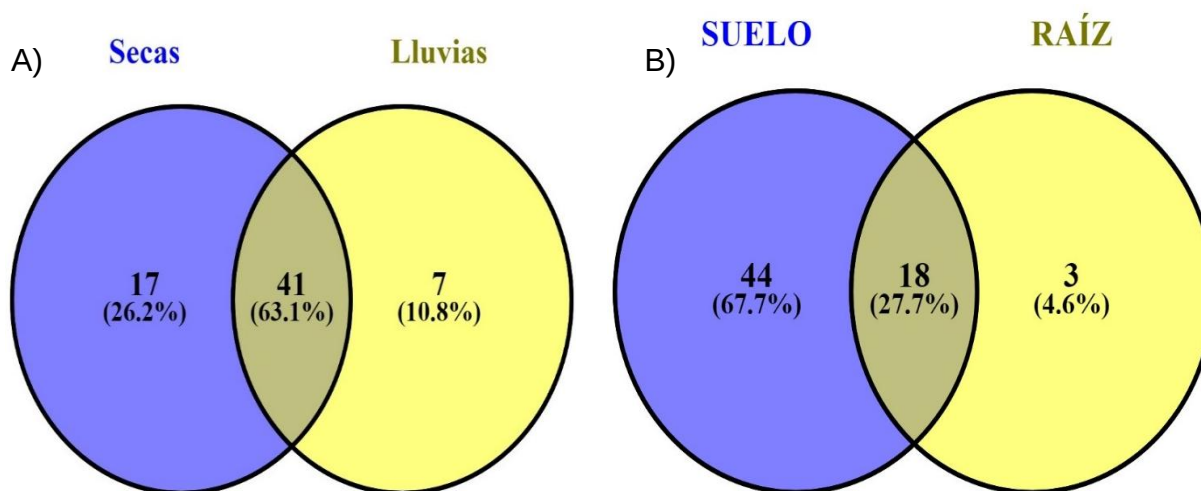


Figura 31. Número de *taxa* virtuales encontradas del filo Glomeromycota A) en cada época y B) en suelo de secas-lluvia y raíz secas-lluvia, incluyendo las clasificadas como sp (especie no definida).

Los 65 *taxa* virtuales corresponden a 88,207 lecturas que se alinearon con secuencias para especies del filo Glomeromycota que se muestran en la Tabla 6. La identificación que se obtuvo fue de 3 clases, 5 órdenes, 9 familias, 16 géneros y 38 especies (*taxa* virtuales) equivalente al 46.91% de los 81 *taxa* totales.

La presencia y ausencia de las 38 *taxa* de HMA en las muestras de suelo y raíz de cada sitio en época de secas y de lluvia se observa en la Figura 32, donde se muestra que en el suelo se agrupa la mayor presencia de *taxa*, contrariamente en las raíces se presenta el menor número de ellas. *Dominikia duoreactiva* y *Glomus compressum* fueron las *taxa* que se presentaron en la mayoría de las muestras de los diferentes sitios. Mientras que la riqueza por muestra se aprecia en la Figura 33, las muestras que presentan una mayor

riqueza son SS6, SL6, RL1 y RL5, también se resalta la mayor riqueza en las muestras de suelo recolectadas en época de secas respecto a la de lluvias.

Clase	Orden	Familia	Genero	Especie		
Archaeosporomycetes	Archaeosporales	Ambisporaceae	Ambispora	A. gerdemannii		
Glomeromycetes	Diversisporales	Archaeosporaceae	Palaeospora	P. spainiae		
		Acaulosporaceae	Acaulospora	A. colombiana		
				A. kentinensis		
				A. tortuosa		
				D. celata		
		Diversisporaceae	Diversispora	D. clara		
				D. epigaea		
				D. insculpta		
				D. varaderana		
				O. bareae		
				R. pulvinatum		
				P. scintillans		
				S. persica		
				C. drummondii		
				C. hanlinii		
	C. walkeri					
	Gigasporales Glomerales	Pacisporaceae	Pacispora	P. scintillans		
				Gigasporaceae	Scutellospora	S. persica
				Claroideoglomeraceae	Claroideoglosum	C. drummondii
		Glomeraceae	Dominikia	D. achra		
				D. aurea		
				D. bernensis		
				D. difficilevidera		
				D. disticha		
				D. duoreactiva		
				F. coronatum		
				F. mosseae		
				G. compressum		
				G. cubense		
				G. indicum		
G. macrocarpum						
K. perpusilla						
R. diaphanus						
R. fasciculatus						
R. intraradices						
R. prolifer						
S. constrictum						
S. turnauae						
S. viscosum						
P. laccatum						
Paraglomeromycetes	Paraglomerales			Paraglomeraceae	Paraglosum	
				38 taxa virtuales a nivel de especie		
Clase: 3	Orden: 5			Familia: 9	Género:16	especie

Tabla 6. Resultados de clasificación de análisis moleculares para la identificación de HMA del filo Glomeromycota.

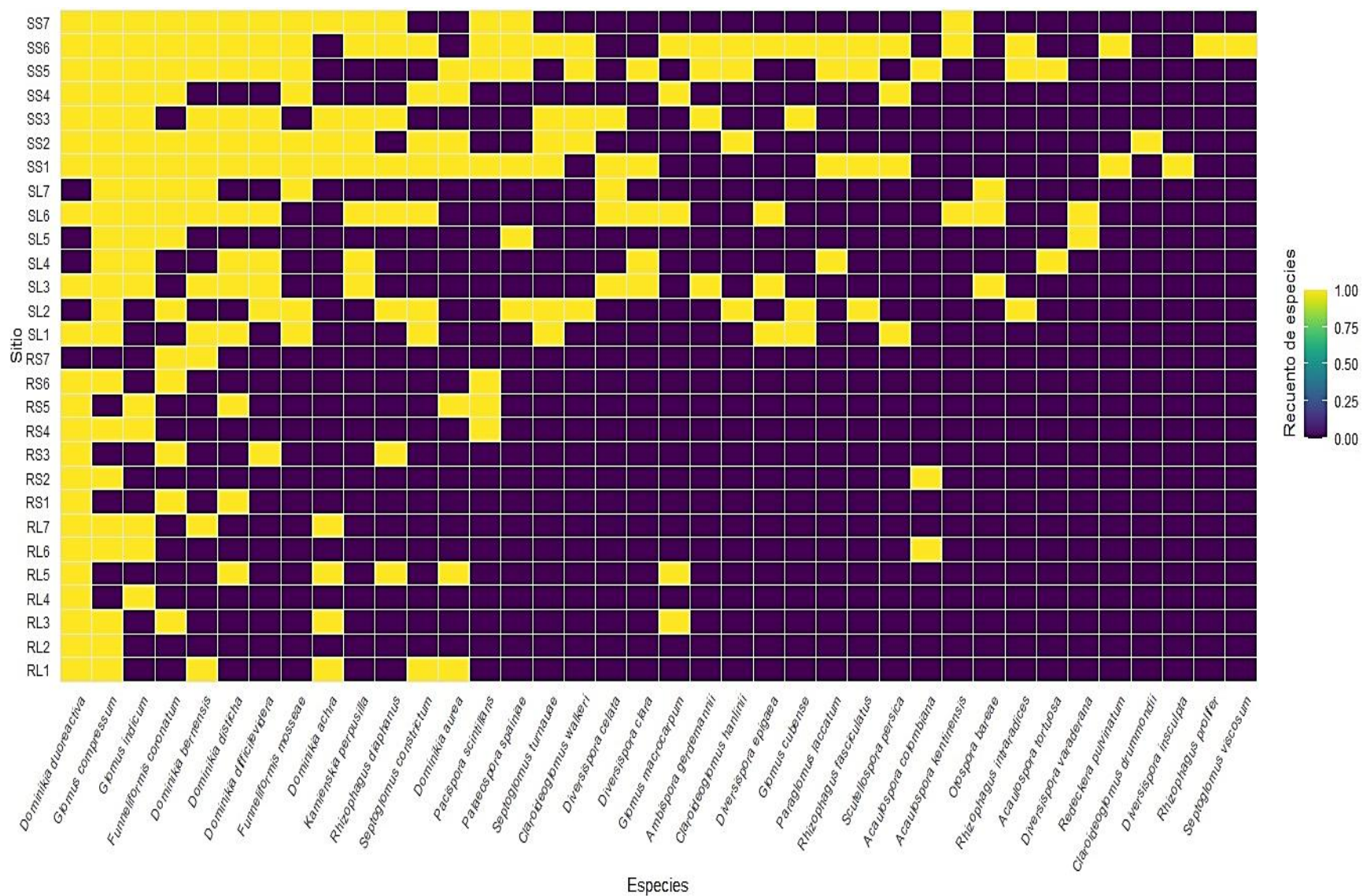


Figura 32. Presencia y ausencia de especies de HMA en muestras de suelo y raíz de cada sitio en épocas de secas y lluvias.

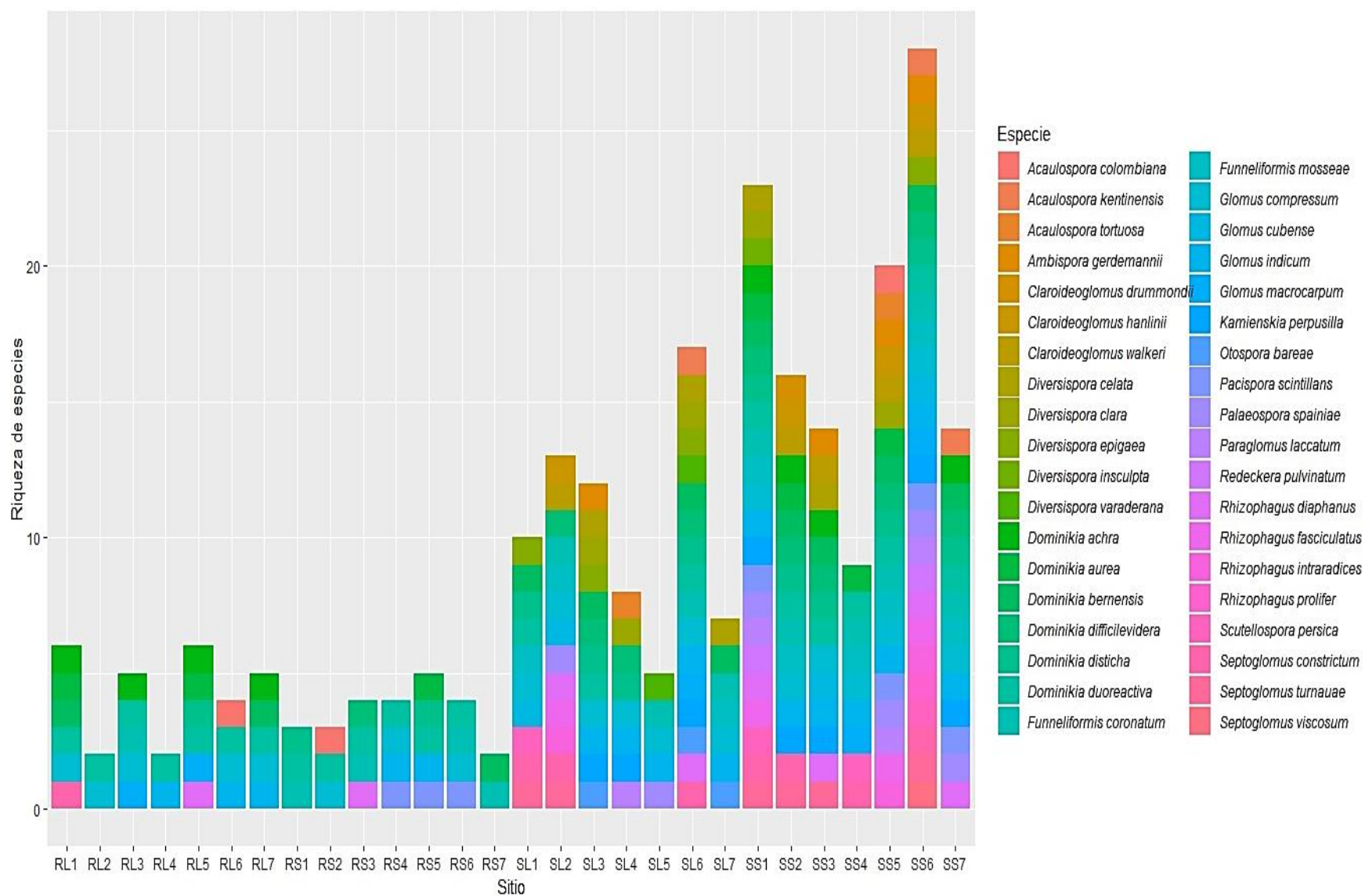


Figura 33. Riqueza de especies de HMA en muestra de suelo y raíz de cada sitio en épocas de secas y lluvias.

En la Figura 34 se muestran los resultados del Análisis de Componentes Principales (ACP) aplicado a los 38 taxa virtuales de HMA para observar la correlación entre las taxa encontradas y las características edáficas de los sitios analizados, sin embargo, el modelo utilizado no determina una correlación significativa entre las variables ambientales y la presencia de cada taxa ($p=0.433$), a pesar de que el modelo fundamenta la variabilidad en cuanto a la composición de las especies, la prueba de permutación ($n = 999$; PseudoF = 3.9362, $p = 0.433$) asienta a que no hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula respecto a que no existe una relación lineal significativa entre las variables (taxa de HMA-características edáficas-colonización) con un intervalo de confianza del 95%.

En el diagrama de Venn de la Figura 35 se observa la presencia de 24 y 14 taxa de HMA encontradas comúnmente en las muestras de suelo y raíz procedentes de ambas épocas de recolección. Mientras tanto en la Figura 36 se observa el número de taxa de HMA que son exclusivas y comunes de suelo y raíz en ambas épocas; en suelo de época de secas las especies exclusivas son *Diversispora insculpta*, *Redeckera pulvinatum*, *Claroideoglossum drummondii*, *Rhizophagus prolifer*, *Septoglossum viscosum*, las especies exclusivas presentes en suelo en época de lluvias son *Diversispora varaderana*, *Otospora barea*, las especies en común en suelo de ambas épocas son *Ambispora gerdemannii*, *Palaeospora spainiae*, *Acaulospora kentinensis*, *A. tortuosa*, *Diversispora celata*, *D. clara*, *D. epigaea*, *Scutellospora persica*, *Claroideoglossum hanlinii*, *Claroideoglossum walkeri*, *Funneliformis mosseae*, *Glomus cubense*, *Kamienskia perpusilla*, *Rhizophagus fasciculatus*, *R. intraradices*, *Septoglossum turnauae*, *Paraglossum laccatum*, la especie en común en suelo de ambas épocas y raíz de época de lluvias fue *Dominikia difficilevidera*, la especie en común en suelo y raíz de la época de secas fue *Pacispora scintillans*, las especies en común en raíz de ambas épocas y suelo de época de secas fueron *Acaulospora colombiana* y *Dominikia aurea*, mientras que las especies en común en suelo de ambas épocas y raíz de época de lluvias fueron *Glomus macrocarpum*, *Septoglossum constrictum*, la especie en común en suelo de época de secas y raíz de época de lluvias fue *Dominikia achra*, por último las especies en común en suelo y raíz de ambas épocas fueron *Dominikia bernensis*, *D. disticha*, *D.*

duoreactiva, *Funneliformis coronatum*, *Glomus compressum*, *G. indicum* y *Rhizophagus diaphanus*.

Los géneros dominantes de las 7 taxa virtuales encontrados tanto en suelo y raíz de ambas épocas es *Dominikia* y *Glomus* siendo *D. duoreactiva* y *G. compressum* las especies de HMA dominantes de los géneros mencionados (Tabla 7), con una abundancia relativa del 82% y 79% respectivamente en las 28 muestras totales analizadas (Figura 37). En cuanto a abundancia total de lecturas (reads, o número de secuencias) obtenidas las taxa más abundantes fueron *Funneliformis mossae* (28,156 lecturas), *G. indicum* (20,420 lecturas), *G. compressum* (13,411 lecturas), *F. coronatum* (9,843 lecturas), *D. duoreactiva* (8,929 lecturas) y *D. berkansis* (3,301 lecturas).

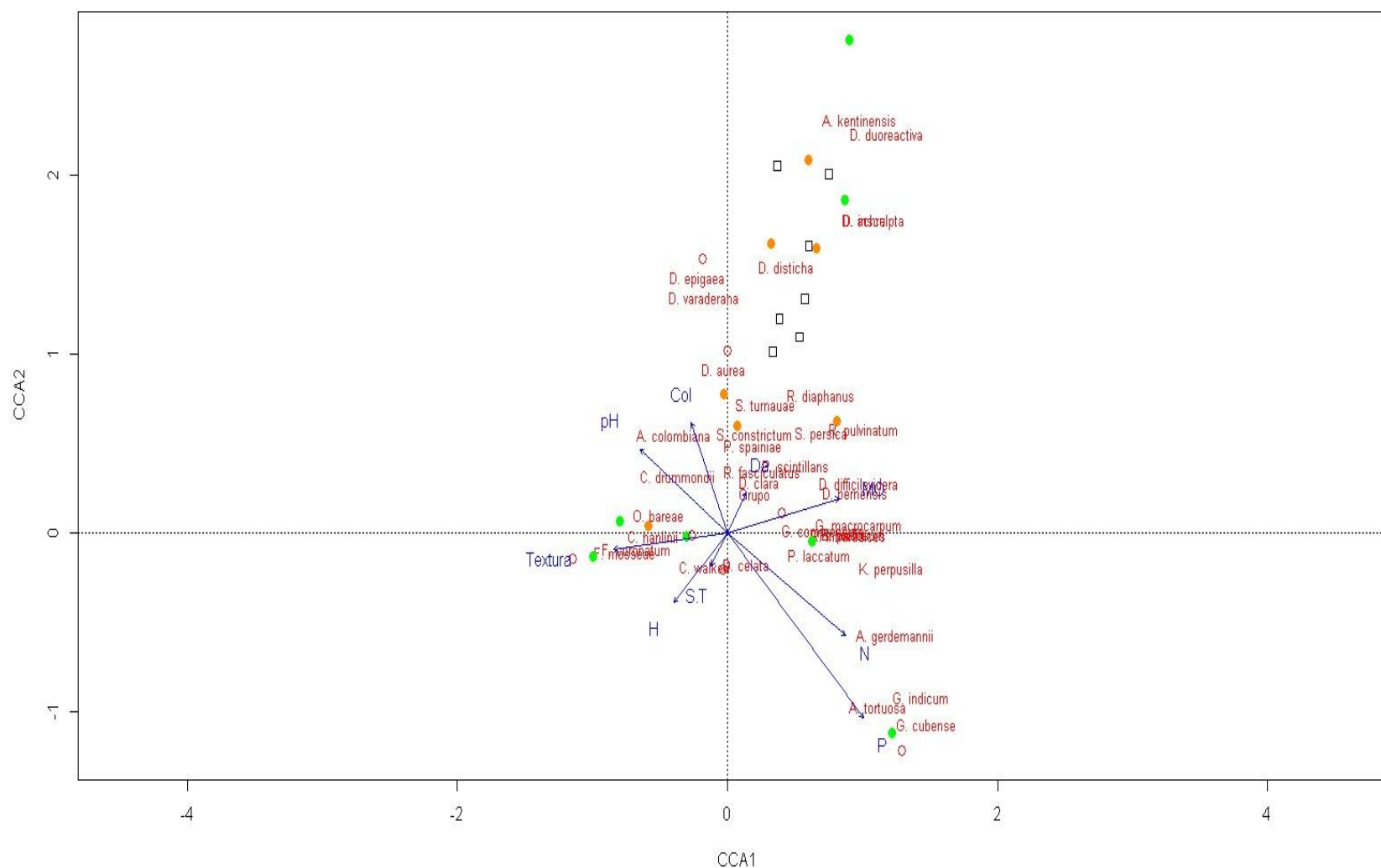


Figura 34. Análisis de Componentes Principales (ACP). Las épocas y las muestras se representan con figuras. Puntos verdes= Suelo de secas, Círculo rojo= Suelo de lluvias, Circulo naranja= Raíz de secas, Cuadro negro= Raíz de lluvias. Col.= Porcentaje de Colonización. pH= Potencial de Hidrogeno. ST= Sales totales. MO= Materia Orgánica. N= Nitrógeno. P= Fósforo. H= Humedad. Da= Densidad aparente.

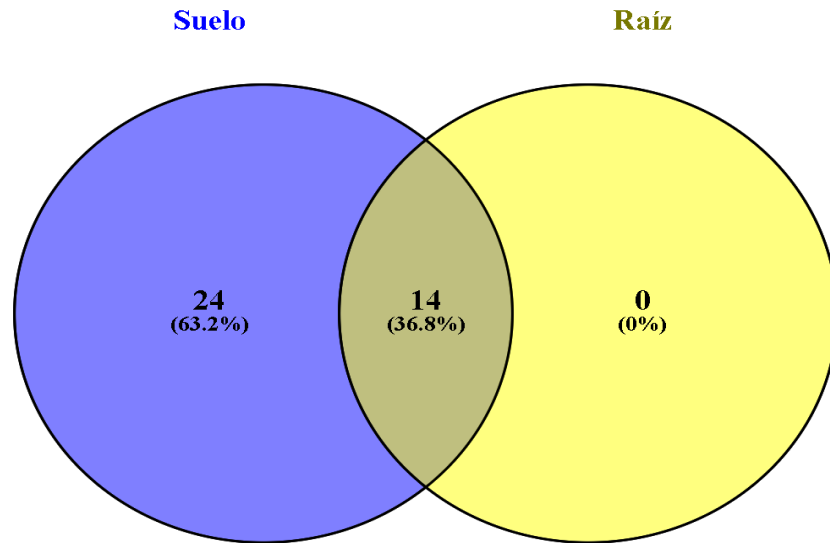


Figura 35. Número de taxa virtuales definidas a nivel de especie encontradas en muestras de suelo y raíz de manera global. 24 especies encontradas exclusivamente en suelo y 14 especies en común.

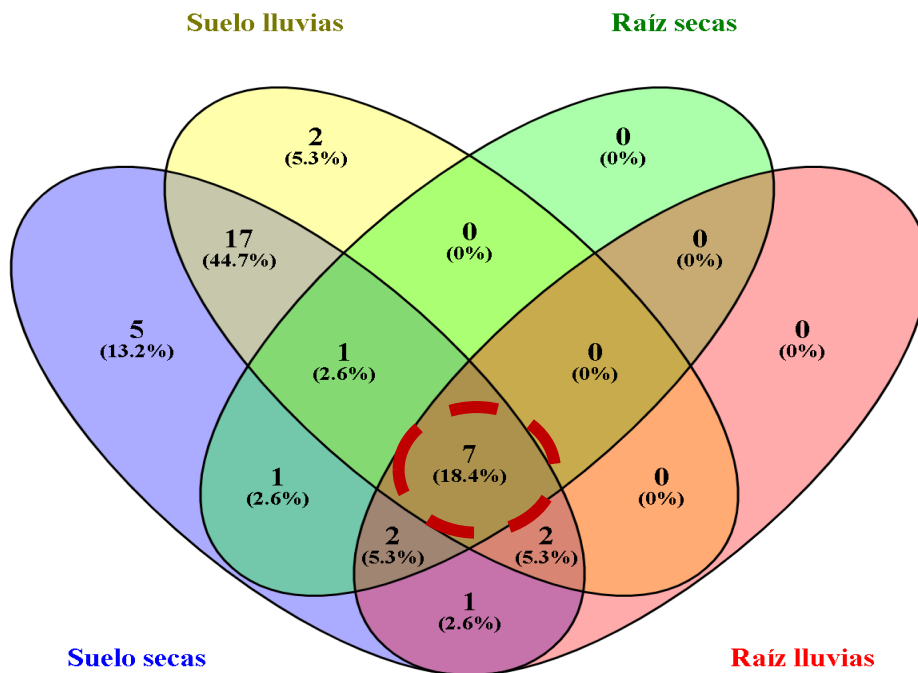


Figura 36. Número de taxa virtuales definidas a nivel de especie encontradas en suelo y raíz en época de secas y época de lluvia. El círculo con líneas punteadas indica la intersección de las especies en común en suelo y raíz de ambas épocas.

Especie	Muestras																							...28
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
<i>Dominikia bernensis</i>	SS1	SS2	SS3	SS5	SS6	SS7	SL1	SL3	SL6	SL7	RS7	RL1	RL7											
<i>Dominikia disticha</i>	SS1	SS2	SS3	SS5	SS6	SS7	SL1	SL3	SL4	SL6	RS1	RS5	RL5											
<i>Dominikia duoreactiva</i>	SS1	SS2	SS3	SS4	SS5	SS6	SS7	SL1	SL3	SL6	RS1	RS2	RS3	RS4	RS5	RS6	RL1	RL2	RL3	RL4	RL5	RL6	RL7	
<i>Funneliformis coronatum</i>	SS1	SS2	SS4	SS5	SS6	SS7	SL2	SL5	SL6	SL7	RS1	RS3	RS6	RS7	RL3									
<i>Glomus compressum</i>	SS1	SS2	SS3	SS4	SS5	SS6	SS7	SL1	SL2	SL3	SL4	SL5	SL6	SL7	RS2	RS4	RS6	RL1	RL2	RL3	RL6	RL7		
<i>Glomus indicum</i>	SS1	SS2	SS3	SS4	SS5	SS6	SS7	SL3	SL4	SL5	SL6	SL7	RS4	RS5	RL4	RL6	RL7							
<i>Rhizophagus diaphanus</i>	SS1	SS3	SS6	SS7	SL2	SL6	RS3	RL5																

Tabla 7. Especies dominantes de taxa virtuales de HMA asociados a *P. americana* var. *drymifolia* procedente del municipio de Tepeyanco Tlaxcala. SS: Suelo de Secas, SL: Suelo de Lluvias, RS: Raíz de Secas, RL: Raíz de Lluvia, el número después de la nomenclatura indica el número de sitio al que corresponde la muestra.

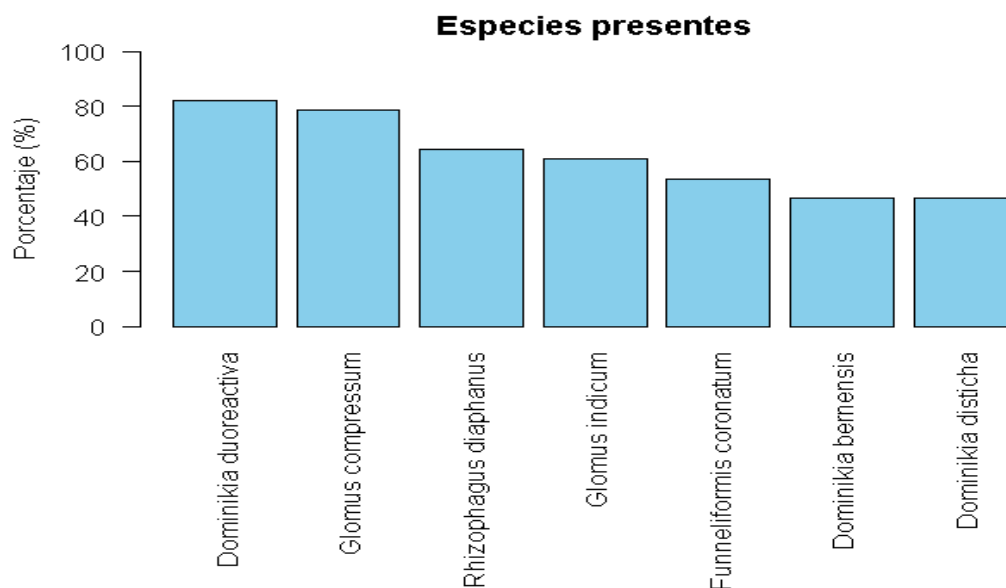


Figura 37. Abundancia relativa (%) de las taxa dominantes de HMA de suelo rizosferico y raíz de *P. americana* var. *drymifolia* procedentes de Tepeyanco, Tlaxcala.

En la Figura 38 se observa el número de especies de HMA encontradas en Michoacán en muestras de suelo rizosférico de *P. americana* var. Hass también descritas en la Tabla 2, siendo un total de 53 especies, así como también los 38 taxa virtuales encontrados en esta investigación de muestras de suelo rizosférico y raíces de *P. americana* var. *drymifolia* procedentes del municipio de Tepeyanco, Tlaxcala. Dos especies se encontraron en común *Glomus macrocarpum* y *Rhizophagus intraradices*.

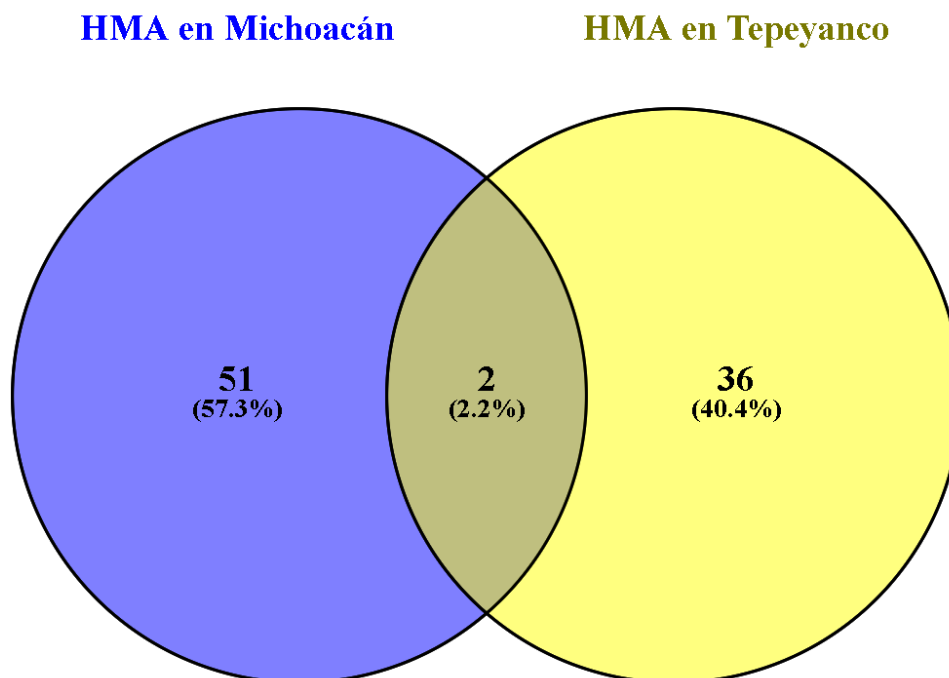


Figura 38. Número de especies de HMA encontradas en Michoacán y taxa virtuales de HMA encontradas en Tepeyanco, Tlaxcala.

III. Discusión

El microbioma del suelo es muy importante, y el conocimiento de los microorganismos que se encuentran en él, nos brinda información sobre la salud de un ecosistema, además de que son una ventaja para la agricultura y sostenibilidad de ellos debido a que mejoran y ayudan al desarrollo de vegetación (Olalde-Portugal y Aguilera Gómez, 1998). Los hongos micorrícicos arbusculares, forman parte de esta gran biodiversidad que se encuentra en el suelo, participando en la formación y estabilidad de los agregados de él (González-Chávez *et al.*, 2004), así como en la asociación simbiótica mutualista con las raíces de las plantas terrestres.

El análisis de las características edáficas en los diferentes puntos del municipio de Tepeyanco, Tlaxcala durante las épocas de secas (abril) y lluvias (septiembre) revela patrones interesantes sobre la homogeneidad y variabilidad de los suelos en la región. A pesar de diferir en cuanto a la textura en el sitio 5 (arenoso franco) del resto de los sitios

(franco arenoso), los resultados muestran las diferencias significativas entre algunas variables, mientras que otras permanecen constantes.

Las diferencias significativas observadas entre ST ppm (0.0468) y %H (0.0156) con $p \leq 0.05$ por épocas sugieren que estas propiedades son sensibles a las variaciones estacionales. La acumulación de sales puede ser más pronunciada durante la época de secas debido a la evaporación, concentrándose los solutos en el suelo. En contraste, en la época de lluvias probablemente se diluyan estas sales, disminuyendo así su concentración. La humedad del suelo, como era de esperarse, es significativamente mayor durante la época de lluvias, reflejando la mayor disponibilidad de agua. En la Figura 26 se hace evidente la moderada correlación negativa entre ST ppm y %H con un valor de -0.5 confirmando que al incrementar la humedad en época de lluvias las concentraciones de las sales tienden a disminuir (Rico-Gray y Palacios-Rios, 1996).

Con respecto a los parámetros de MO (0.9375), pH (0.0765), contenido de P mg/kg (0.3526), %N (1.0) y Da (0.8341) con resultados no menores o igual de $p=0.05$ cuyos valores presentaron diferencias no significativas sugieren una relativa estabilidad de estas propiedades durante ambas épocas. La estabilidad del pH y la MO puede indicar una buena capacidad *buffer* del suelo y una fuente constante de MO, respectivamente, tomando en cuenta que el pH presentó valores que se encuentran entre 6.34 y 7.40, indicando la posibilidad de la disponibilidad y asimilación de los nutrimentos. La estabilidad del %P y el %N puede estar asociada a las prácticas agrícolas que se llevan a cabo en el área de estudio y a sus condiciones ambientales, las cuales no varían significativamente entre las épocas (Neina, 2019). La Da constante sugiere que la estructura del suelo no se ve afectada por las variaciones estacionales en estos sitios. Salamanca-Jiménez y Sadeghian-Khalajabadi (2005) encontraron que la densidad aparente tiene una correlación negativa alta con la MO, en este trabajo se encontraron resultados similares con respecto a las dos características, en la Figura 26 se puede observar la correlación negativa con un valor de -0.65.

La textura en todos los sitios contribuyó a la homogeneidad general de los suelos del área de estudio. Sin embargo, las diferencias significativas en las concentraciones de sales totales y humedad indican que hay factores microambientales y/o de manejo que inducen la variabilidad estacional en estas propiedades específicas. Estos resultados destacan la importancia de considerar tanto la homogeneidad respecto a la textura como la variabilidad estacional en el manejo y la planificación del uso del suelo.

El municipio de Tepeyanco se encuentra dentro del eje Neovolcánico, sin embargo el suelo que predomina es Cambisol (79.70%), el uso de suelo en su mayoría es agrícola (75.23%) (INGEI, 2010), por lo que sus características han cambiado a causa del tipo de uso que ha tenido (Geissert-Kientz *et al.*, 2000; Meza-Pérez y Geissert Kientz, 2003). Con los análisis de textura se determinó que los tipos que predominan son los franco arenoso y arenoso franco que corresponde a suelo Cambisoles, que pueden variar desde arenosos a arcillosos dependiendo en gran medida del material parental y las condiciones de formación del suelo (INEGI, 2004 ; Bojórquez *et al.*, 2007 ; Gómez-González *et al.*, 2018 ; Vera-Macías *et al.* ; 2019).

El porcentaje de colonización de las raíces recolectadas en el municipio de Tepeyanco, Tlaxcala en época de secas fue de entre 60% y 90.6%, mientras que para el de lluvias fue de entre 67.2% y 91.7%, evidenciando un porcentaje menor con respecto al hallado en las raíces de *P. americana* de una huerta localizada en Jujucato, Michoacán, donde en época de secas encontraron colonización de entre el 98% y 100%, mientras que en lluvias fue del 94% y 100% (Gómez Dorantes *et al.*, 2012).

Se considera que el tipo de raíces de *P. americana* al no desarrollar pelos absorbentes en gran cantidad, es una especie con una afinidad importante por asociarse con HMA, se ha determinado en *P. americana* el porcentaje de colonización alcanzando un 75.8% (Carreón-Abud *et al.*, 2016) en tanto que en raíces de diferentes cultivos trampa se ha podido observar en alfalfa una colonización del 53.4%, en Etiopía la evaluación en sorgo fue del 23% y en *P. americana* fue de 72.7% (Belay *et al.*, 2015).

En cuanto a las características edáficas de los sitios de estudio se corroboró que estas no poseen una correlación con el porcentaje de colonización de las raíces del aguacate criollo, sin embargo, se observó una diferencia significativa entre el sitio 2 con respecto a las épocas de secas (82.2%) y de lluvia (67.2%), ya que el mayor porcentaje de colonización se presentó en el período de lluvias (Figura 29). Los resultados generados por medio del análisis de ACP, mostraron que el porcentaje de colonización no presentó una correlación con las características edáficas, sin embargo, otras investigaciones en bosques de la CDMX, se ha encontrado que la temperatura, pH, %MO, %N son variables que influyen sobre la composición de las especies de HMA (Peralta-Valencia *et al.*, 2023) (Figura 35), quizá esto puede ser el producto de que estos parámetros no presentan variaciones entre las épocas, lo cual se refleja en un porcentaje de colonización estable durante el año para este cultivo.

En este trabajo se encontró una riqueza de 38 taxa virtuales (especies) de HMA, esto representa un 14% de las 360 especies descritas del filo Glomeromycota reportadas a nivel mundial en el Catalogue of Life (2024). Se han utilizado en otras investigaciones técnicas moleculares para determinar las especies de HMA, utilizando ADN extraído de raíz de *P. americana* cultivado en Jujucato, Michoacán donde encontró que sus amplificaciones obtenidas corresponden a *Glomus geosporum*, además se hace mención que este género es común encontrarlo en cultivos de aguacate (Gómez Dorantes *et al.*, 2012), asimismo, han logrado identificar las secuencias de 7 morfotipos de HMA aislados del suelo rizosférico de *P. americana* var. Hass de la región de Lorena en Caldas, Colombia, 4 de ellos de la familia Glomeraceae de los cuales todos pertenecen al género *Glomus*, los 3 restantes de la familia Acaulosporaceae perteneciendo al género *Acaulospora* (Rivera Páez *et al.*, 2016).

Considerando el reto que es trabajar con raíces de *P. americana* var. *drymifolia* para la extracción de ADN, se logró identificar 14 taxa virtuales de HMA colonizando raíces de este árbol, las técnicas que se emplearon desde el muestreo hasta la mezcla de oligonucleótidos utilizados son procedimientos que van dirigidos a la búsqueda de especies de HMA con base en investigaciones dirigidas específicamente al filo

Glomeromycota (Krüger *et al.*, 2009) con su aportación al diseño de conjuntos de oligonucleótidos dirigidos a las diferentes taxa de este filo, empleando técnicas y procedimientos que facilitan la obtención de resultados favorables para el estudio de los HMA en otras especies vegetales (Peñuelas-Rubio *et al.*, 2021). A pesar de haber empleado esta metodología, la abundancia relativa de las secuencias pertenecientes a este filo fue muy pobre, sobre todo en las muestras de raíces de aguacate, sin embargo, se obtuvo un buen número de secuencias de hongos que probablemente estén en mayor cantidad que las de los HMA. Sin embargo, la profundidad de lecturas en la secuenciación permite obtener suficientes datos para realizar un análisis discreto de los taxa virtuales del filo Glomeromycota en esta especie vegetal.

Asimismo, se han determinado morfoespecies de HMA con técnicas morfológicas con esporas provenientes de suelo de *P. americana* var. Hass; 10 en Uruapan, Michoacán (Aguirre *et al.*, 2007), 49 morfoespecies de 14 huertos provenientes de diferentes municipios de Michoacán (Barcenas-Ortega *et al.*, 2011), 12 especies de HMA procedentes de diversas huertas de Uruapan, Michoacán (Carreón-Abud *et al.*, 2013), también 16 especies provenientes de dos parcelas de Jujucato, Michoacán (Carreón-Abud *et al.*, 2016) y finalmente 14 especies en huertas de Uruapan, Michoacán (Raya Montaña *et al.*, 2019). En el presente estudio hemos identificado 38 taxa virtuales a nivel de especie en Tepeyanco, Tlaxcala.

7 taxa virtuales de HMA estuvieron presentes tanto en suelo como en raíz en ambas épocas, siendo que los géneros dominantes fueron *Dominikia* y *Glomus*. *Dominikia duoreactiva* es una de las especies dominantes que ha sido encontrada asociada con plantas de dunas marítimas provenientes de la isla Giftun, Egipto (Błaszowski *et al.*, 2015). *Dominikia compressa* (*Glomus compressum*) ha sido encontrada asociada con diferentes cultivos agrícolas en Suiza, suroeste de Alemania y al noreste de Francia (Oehl *et al.*, 2014, 201). *Glomus indicum* se ha encontrado en la rizósfera de *Euphorbia heterophylla* que crece de manera natural en suelos costeros al Sur de India, y posteriormente se ha descrito morfológica y molecularmente (Błaszowski *et al.*, 2015), en México se reportó por primera vez en plantas de maíz (Cervantes-Gámez *et al.*, 2021).

Funneliformis coronatum (*Funneliformis coronatus*) (Schüßler y Walker, 2010), ha sido reportado en México asociado con árboles de *Conocarpus erectus* (Ramírez-Viga *et al.*, 2020). *Dominikia disticha* descrita mediante técnicas morfológicas y filogenia a partir de ADNr (Błaszowski *et al.*, 2015). Por ultimo *Rhizophagus diaphanus* descrita por Schüßler y Walker (2010) es ahora clasificada como *Oehlia diaphana* (Błaszowski *et al.*, 2018).

De las especies de HMA que se reportan en trabajos de Michoacán son un total de 67 especies, estos datos que han aportado información muy relevante mediante la identificación y descripción morfológica de aquellas especies de HMA que podrían estar asociadas a raíces de *P. americana* var. Hass. Sin embargo, estas investigaciones se han llevado a cabo solamente en suelo rizosférico lo que no resuelve del todo cuales especies de HMA son las que asocian a la raíz de este árbol. Por otro lado, con esta investigación se da a conocer a las taxa de HMA que se encuentran en el suelo rizosférico (38) y colonizando la raíz (14) de *P. americana* var. *drymifolia*, *Rhizophagus intraradices* y *Glomus macrocarpum* se encontraron tanto en suelo rizosférico procedente de *P. americana* Hass de Michoacán y suelo rizosférico del municipio de Tepeyanco, Tlaxcala. Es así como el 96.2% de las taxa virtuales reportadas en esta investigación son diferentes a las 53 especies reportadas en Michoacán (no considerando las sp), no obstante, se debe considerar las diferencias que se presentan como la variedad de *P. americana* analizada, la zona, las características del suelo, las épocas de cada muestreo, y la edad de los árboles como lo señala Husband *et al.*, (2002), quien evidenció que la edad o la etapa del hospedero juegan un papel en el reemplazo de las especies de HMA que se pueden encontrar entre diferentes sitios.

IV. Conclusiones

Las sales totales y el porcentaje de humedad son las características del suelo donde se encontraron diferencias significativas con respecto a las dos épocas. El porcentaje de colonización sólo presentó diferencias significativas en el sitio 2 (huerta local) conforme a ambas épocas, el sitio 7 (zona de cultivos) fue el que presentó una mayor colonización en ambas épocas, por otro lado, en cuanto a la época con mayor porcentaje de colonización se presentó en lluvias. Las características edáficas respecto al porcentaje de colonización y a los taxa virtuales reportadas no se encontraron correlaciones. Se presentó un mayor número de taxa virtuales en época de secas (58) en comparación con la de lluvias (48). En cuanto a las 65 taxa encontradas (incluidas aquellas que se describen como sp) en el suelo (66) se obtuvo un mayor número de taxa en comparación con las de las raíces (21) de las cuales 18 se encontraron en común.

De las 38 taxa virtuales de HMA encontradas en *P. americana* var. *drymifolia* en el municipio de Tepeyanco, Tlaxcala, el 96.2% son diferentes a las especies determinadas morfológicamente a las reportadas en investigaciones realizadas previamente en *P. americana* var. Hass. Los resultados de esta investigación brindan información de HMA presentes en suelo rizosférico de *P. americana* var. *drymifolia*, así como los hallados colonizando la raíz de esta variedad. La conservación de la biodiversidad de los cultivos de *P. americana* var. *drymifolia* es importante debido a que contienen información biológica relevante como la asociación simbiótica con los HMA, organismos con alto valor en la agricultura y el estado microbiómico del suelo para el cultivo del aguacate en general.

Las técnicas moleculares empleadas en este estudio dieron resultados satisfactorios para identificar las diferentes taxa del filo Glomeromycota en suelo rizosférico y raíces de plantas de aguacate criollo, son pocas las investigaciones empleando técnicas moleculares para analizar HMA en raíces de árboles, sin embargo las 38 especies de HMA que se han encontrado en este trabajo suman nuevos registros de HMA que no se habían reportado en asociación con *Persea americana* en una zona y en una variedad

no analizada anteriormente y aportan información al estudio de la biodiversidad de los microorganismos en el estado de Tlaxcala.

V. Perspectivas

Los resultados de esta investigación aportan nueva información sobre las especies de hongos micorrícicos arbusculares que se pueden encontrar en raíces de frutos criollos de aguacate, aunque hay un largo camino por recorrer se abren nuevas oportunidades de estudios en cuanto al beneficio en los cultivos, por lo que se plantean las siguientes perspectivas:

- Divulgación de la importancia de cultivos criollos, prevenir su pérdida y cambios en el uso del suelo.
- Identificar las esporas de cada taxa encontrada en esta investigación mediante técnicas morfológicas, aislar y propagar en plantas trampa.
- Evaluar la efectividad de las especies de HMA, es decir cuales tienen la capacidad de mejorar las características del fruto y la resistencia de la planta trampa.
- Llevar a cabo investigaciones experimentales en aguacate var. Hass para conocer si las especies de HMA tienen alguna afinidad por colonizar sus raíces.
- Desarrollo de biofertilizantes específicos para suelos de la región de Tepeyanco, Tlaxcala y sus alrededores.

VI. Anexos

VI.1 Constancia de participación en 7ma feria científica

“Vive la Ciencia” en CIIDIR IPN unidad Sinaloa durante mi estancia para llevar a cabo las pruebas moleculares.



Instituto Politécnico Nacional
"La Técnica al Servicio de la Patria"

Centro Interdisciplinario de Investigación
para el Desarrollo Integral Regional
CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa



Otorga la presente **CONSTANCIA** A **Karina Rojas Pérez**

*Por su participación como Ponente en Stand
en la "Feria Científica y Educativa Vive la Ciencia 2023".*

*Evento académico realizado en las instalaciones del CIIDIR IPN Unidad Sinaloa, los días
30 de Noviembre y 1 de Diciembre del 2023, con duración de 20 horas.*

"La Técnica al Servicio de la Patria"



Dr. Juan Carlos Sainz Hernández

Director CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa

Guasave, Sinaloa, México, a 15 de Diciembre de 2023



DFIE IPN
Dirección de Formación
e Innovación Educativa

CUR: DFIE/23/E7/147EA/4/O/P/113/301123-011223

CIIDIR IPN

VI Referencias

- Acosta Díaz, E., Hernández Torres, I., y Almeyda León, I. H. (2012). Evaluación de aguacates criollos en Nuevo León, México: Región sur. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(2), 245–257.
- AGRICULTURA y SIAP. (2022). *Escenario mensual de productos agroalimentarios*. Gobierno de México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/759460/Aguacate_Agosto_2022.pdf
- Agropunto. (s/f). *Productos biológicos para el campo*. Recuperado el 28 de noviembre de 2023, de <https://www.agropunto.com.mx/rizofermic>
- Aguilar, C. E., Alvarado, I., Martínez, F. B., Galdámez, J., Martínez, A., y Morales, J. A. (2016). Evaluación de tres abonos orgánicos en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.) en etapa de vivero. *Siembra*, 3(1), 011–020.
- Aguilera-Gómez, L. I., Olalde-Portugal, V., Arriaga, R., y Contreras, R. (2007). Micorrizas Arbusculares. *Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva*, 14(3), 300–306.
- Aguirre, S., Carreón, Y., Varela, L., Garcia, J. D., y Barcenás, A. E. (2007). *Evaluación de la materia orgánica y de microorganismos en suelos de huertos de aguacate Persea americana Mill. En Uruapan Mich (Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nayarit)*.
- Akiyama, K., y Hayashi, H. (2006). Strigolactones: Chemical Signals for Fungal Symbionts and Parasitic Weeds in Plant Roots. *Annals of Botany*, 97(6), 925–931. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl063>
- Alcantara-Cortés, J. S., Acero Godoy, J., Alcántara Cortés, J. D., y Sánchez Mora, R. M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109–129.
- Alvarez Ojeda, M. G., Pecina Quintero, V., Acosta Díaz, E., y Almeyda León, I. H. (2018). Caracterización molecular de aguacate criollo de Nuevo León, México. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(2), 38–46. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.69551>
- Andrade-Hoyos, P., Gayosso, E. M., y León, C. D. (2015). *Mecanismos de defensa en portainjertos de aguacate ante Phytophthora cinnamomi Rands*. 6, 347–360.
- Andrade-Torres, A. (2010). *Micorrizas: Antigua interacción entre plantas y hongos*. 84–90.
- Aranguren-Aroca, R. A., Ocampo-Guerrero, M. L., y Mesa-López, N. (2015). *Caracterización y obtención de cultivos puros de esporas nativas del género Glomus sp. Asociadas a rizósfera de aguacate Persea americana Mill*. 27. <https://revistaacsb.org/r/index.php/acsb/article/view/102>
- Asier-Mota, E., Vera-Sierra, F. J., y Feliu, J. (2020). *Papel de las estrigolactonas en el desarrollo vascular de Arabidopsis thaliana*. 1–45.

- Azcón-Bieto, J., y Talón, M. (2008). *Fundamentos de fisiología vegetal* (2da ed.). McGraw-Hill Interamericana.
<https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/FundamentosdeFisiologiaVegetal2008Azcon..pdf>
- Baíza-Avelar, V.-H. (2003). *Guía técnica del cultivo del aguacate* (1a ed.). Maya.
<http://repiica.iica.int/docs/B0218e/B0218e.pdf>
- Barcenás-Ortega, A., Varela, L., Stürmer, S. L., y Chávez-Bárcenas, T. (2011). Catálogo de hongos micorrizógenos arbusculares de huertos de aguacate de Michoacán, México. 2011, 7.
- Barrer, S. E. (2009). El uso de hongos micorrízicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. *Mayo 2009*, 7(1), 123–132.
- Barrientos-Priego, A. F., y López-López, L. (1998). *Historia y genética del aguacate*. 19.
- BBC News. (2023, septiembre 7). *La historia de cómo el cartero Rudolph Hass transformó por casualidad la palta en el mundo*. LA NACION.
<https://www.lanacion.com.ar/lifestyle/la-historia-de-como-el-cartero-rudolph-hass-transformo-por-casualidad-la-palta-en-el-mundo-nid21042023/>
- Belay, Z., Vestberg, M., y Assefa, F. (2015). *Diversity and abundance of arbuscular mycorrhizal fungi across different land use types in a humid low land area of Ethiopia*. 18(1), 47–69.
- Błaszowski, J., Chwat, G., Kozłowska, A., Ryszka, P., y Kovács, G. (2015). Two new genera, *Dominikia* and *Kamienskia*, and *D. disticha* sp. Nov. In *Glomeromycota. Nova Hedwigia*, 100. https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2014/0216
- Błaszowski, J., Chwat, G., Symanczik, S., y Góralska, A. (2015). *Dominikia duoreactiva* sp. Nov. And *Dominikia difficilevidera* sp. Nov., two new species in the Glomeromycota. *Botany*, 93(7), 389–396. <https://doi.org/10.1139/cjb-2015-0016>
- Błaszowski, J., Kozłowska, A., Niezgodna, P., Tomio Goto, B., y Dalpé, Y. (2018). A new genus, *Oehlia* with *Oehlia diaphana* comb. Nov. And an emended description of *Rhizoglosum vesiculiferum* comb. Nov. In the Glomeromycotina. *Nova Hedwigia*, 107. https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2018/0488
- Bojórquez, I., Hernández, A., García, D., Nájera, O., Flores, F., Madueño, A., y Bugarín, R. (2007). Características de los suelos cambisoles y fluvisoles de la llanura costera norte del estado de Nayarit, México. *Cultivos Tropicales*, 28(1), 19–24.
- Bonfante, P., y Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 1(1), 48. <https://doi.org/10.1038/ncomms1046>
- Brundrett, M. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 79, 473–495. <https://doi.org/10.1017/S1464793103006316>
- Brundrett, M. (2008). *Mycorrhizal Associations: Arbuscular Mycorrhizas*. <https://mycorrhizas.info>

- Brundrett, y Tedersoo. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, 220(4), 1108–1115. <https://doi.org/10.1111/nph.14976>
- Bucking, H., Liepold, E., y Ambilwade, P. (2012). The role of the mycorrhizal symbiosis in nutrient uptake of plants and the regulatory mechanisms underlying these transport processes. En N. K. Dhal (Ed.), *Plant Science*. InTech. <https://doi.org/10.5772/52570>
- Camarena-Gutiérrez, G. (2012). Interacción planta-hongos micorrízicos arbusculares. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 18(3), 409–421. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2011.11.093>
- Camargo-Ricalde, S. L., Montaña, N. M., de la Rosa-Mera, C. J., y Montaña-Arias, S. A. (2012). Micorrizas una gran unión debajo del suelo. *Revista Digital Universitaria*, 13(7), 19.
- Campos Mariscal, J. L., Álvarez Sánchez, M. E., Maldonado Torres, R., y Almaguer Vargas, G. (2020). Aplicación de abonos orgánicos en el rendimiento y desarrollo radicular en el cultivo de aguacate. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 11(2), 263–274. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i2.2301>
- Carreón Abud, Y., Aguirre Paleo, S., Gavito, M. E., Mendoza Solís, D. J., Juárez Chávez, R., Martínez Trujillo, M., y Trejo Aguilar, D. (2014). Inoculación micorrízico arbuscular en portainjertos de plantas de aguacate var. “Hass” en viveros de Michoacán, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 5(5), 847–857.
- Carreón-Abud, Y., Gómez-Durtante, N., Beltrán-Nmbo, M. de los A., Alvarado-Herrejón, M., y Varela-Fregoso, L. (2016). *Diversidad de hongos micorrízicos arbusculares provenientes de la rizósfera de aguacate (Persea americana Mill) y selección de plantas trampa para su propagación*. 18(2), 9.
- Carreón-Abud, Y., Jerónimo-Treviño, E., Beltrán-Nambo, M. de los Á., Martínez-Trujillo, M., Trejo Aguilar, D., y Gavito, M. E. (2013). Aislamiento y propagación de cultivos puros de hongos micorrízicos arbusculares provenientes de huertas de aguacate con diferente manejo agrícola por la técnica de minirizotróf. *Revista mexicana de micología*, 37, 29–39.
- Carrillo, R., Guerrero, J., Rodríguez, M., y Meriño-Gergichevich, C. (2015). Colonization of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) plantlets by ericoid mycorrhizae under nursery conditions. *Ciencia e investigación agraria*, 42(3), 365–374. <https://doi.org/10.4067/S0718-16202015000300005>
- Catalogue of Life. (2022). <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/4M>
- Catalogue of life. (2024, mayo 26). *Catalogue of Life*. Glomeromycota. <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/4M>
- Cervantes-Gámez, R. G., Peñuelas-Rubio, O., Araujo-Benard, N., Fierro-Coronado, R. A., Trejo-Aguilar, D., Maldonado-Mendoza, I. E., y Cordero-Ramírez, J. D. (2021). Diversidad de hongos micorrízicos arbusculares asociados a plantas voluntarias

- de maíz en suelos de transición: Ecosistema natural - uso agrícola. *Scientia fungorum*, 51. <https://doi.org/10.33885/sf.2021.51.1330>
- Chapin, F. S., Matson, P. A., y Vitousek, P. M. (2011). *Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology* (2a ed.). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9504-9>
- Charles, N. J., y Alonso, N. J. M. (2015). Uso y manejo de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y humus de lombriz en tomate (*Solanum lycopersicum* L.), bajo sistema protegido. *Cultivos Tropicales*, 36(1), 55–64.
- Chávez-Hernández, C. G., Barrera Aguilar, C. C., Téllez Espinosa, G. J., Chimal-Sánchez, E., y García-Sánchez, R. (2021). Colonización micorrízica y comunidades de hongos micorrizógenos arbusculares en plantas medicinales del bosque templado “Agua Escondida”, Taxco, Guerrero, México. *Scientia Fungorum*, 51, e1325. <https://doi.org/10.33885/sf.2021.51.1325>
- Chil, I., Molina Bertrán, S., Ortiz Zamora, L., Dutok Sánchez, C., y Souto, N. (2019). *Estado del Arte de la especie Persea americana Mill (aguacate)*. 08(21), 73–86.
- Choi, J., Summers, W., y Paszkowski, U. (2018). Mechanisms Underlying Establishment of Arbuscular Mycorrhizal Symbioses. *Annual Review of Phytopathology*, 56(1), 135–160. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035521>
- Cruz, A., Montaña, N., Camargo Ricalde, S. L., y Pacheco, L. (2014). Arbuscular mycorrhizal fungi and soil nutrients associated with four fern species in two ecosystems in Oaxaca, Mexico. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 20, 199–212. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2014.02.007>
- Cruz-López, D. F., Caamal-Cauich, I., Pat-Fernández, V. G., y Reza Salgado, J. (2022). Competitividad de las exportaciones de aguacate Hass de México en el mercado mundial. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 13(2), 355–362. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i2.2885>
- Cuenca, G., Cáceres, A., y Oirdobro, G. (2007). *Las micorrizas arbusculares como alternativa para una agricultura sustentable en áreas tropicales*. 32(1), 23–29.
- Delgado-Baquerizo, M., Hu, H.-W., Maestre, F. T., Guerra, C. A., Eisenhauer, N., Eldridge, D. J., Zhu, Y.-G., Chen, Q.-L., Trivedi, P., Du, S., Makhallanyane, T. P., Verma, J. P., Gozalo, B., Ochoa, V., Asensio, S., Wang, L., Zaady, E., Illán, J. G., Siebe, C., ... He, J.-Z. (2022). The global distribution and environmental drivers of the soil antibiotic resistome. *Microbiome*, 10(1), 219. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01405-w>
- Djukic, I., Zehetner, F., Mentler, A., y Gerzabek, M. H. (2010). Microbial community composition and activity in different Alpine vegetation zones. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(2), 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.10.006>
- Endomic. (s/f). Endomic. Fertilizantes Anguacanan. *Biofertilizantes Anguacanan*. Recuperado el 28 de noviembre de 2023, de http://anguacanan.blogspot.com/2009/12/endomic_13.html

- FAO. (2024). *Textura del suelo*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. https://www.fao.org/fishery/static/FAO_Training/FAO_Training/General/x6706s/x6706s06.htm
- FAOSTAT. (2021). *Datos sobre alimentación y agricultura. Base de datos estadísticos de la FAO. cultivos y productos de ganadería*. <https://www.fao.org/faostat/es/#search/aguacate>
- Fitonutrient. (2020, mayo 20). *¿Conoces la historia de los fertilizantes?* <https://fitonutrient.com/la-historia-de-los-fertilizantes/>
- Galindo Tovar, M. E., Lee Espinosa, H. E., Murguía González, J., Leyva Ovalle, O. R., y Landero Torres, I. (2013). Domesticación y distribución geográfica de *Persea americana* Mill. En la época precolombina. *Revista de Geografía Agrícola*, 50–51, 65–70. <https://doi.org/10.5154/r.rga.2013.50-51.05>
- Geissert-Kientz, D., Ramírez-Salazar, M., y Meza-Pérez, E. (2000). Propiedades físicas y químicas de un suelo volcánico bajo bosque y cultivo en Veracruz, México. *Foresta Veracruzana*, 2(1), 31–34.
- Gómez Dorantes, N. G., Martínez Trujillo, M., y Carreón Abud, Y. (2012). *Utilización del ADN ribosomal 18S para la identificación de hongos micorrízicos arbusculares que colonizan plantas de aguacate (Persea americana Mill.)*. 14(2), 42–47.
- Gómez-González, R., Palma-López, D. J., Obrador-Olan, J. J., y Ruiz-Rosado, O. (2018). Densidad radical y tipos de suelos en los que se produce café (*Coffea arabica* L.) en Chiapas, México. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 5(14), 203–215. <https://doi.org/10.19136/era.a5n14.1278>
- González-Chávez, M., Gutiérrez-Castorena, M., y Wright, S. (2004). *Hongos micorrízicos arbusculares en la agregación del suelo y su estabilidad*. 22(4), 507–514.
- Gutiérrez, N. L. (2020). Revolución verde en los suelos agrí-colas de México. Ciencia, polí-ticas públicas y agricultura del maí-z, 1943-1961. *Mundo Agrario*, 21(47), Article 47. <https://doi.org/10.24215/15155994e142>
- Hartmann, A., Rothballer, M., y Schmid, M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil*, 312, 7–14. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9514-z>
- Husband, R., Herre, E. A., y Young, J. P. W. (2002). Temporal variation in the arbuscular mycorrhizal communities colonising seedlings in a tropical forest. *FEMS Microbiology Ecology*, 42(1), 131–136. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb01002.x>
- INEGI. (2004). *Síntesis de Información geográfica del estado de Oaxaca*. https://www.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/historicos/2104/702825224394/702825224394_15.pdf
- INGEI. (2010). *Compendio de información geográfica municipal 2010. Tepeyanco, Tlaxcala*.

https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/29/29029.pdf

- Jaizme-Vega, M. D. C., Rodríguez-Romero, A. S., y Barroso Núñez, L. A. (2006). Effect of the combined inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria on papaya (*Carica papaya* L.) infected with the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Fruits*, 61(3), 151–162. <https://doi.org/10.1051/fruits:2006013>
- Jany, J., y Pawlowska, T. E. (2010). Multinucleate Spores Contribute to Evolutionary Longevity of Asexual Glomeromycota. *The American Naturalist*, 175(4), 424–435. <https://doi.org/10.1086/650725>
- Jiménez Martínez, A., M. C. Gutiérrez Castorena, E. Vladimir Gutiérrez Castorena, A. Alarcón, M. E. Gavito Pardo y N. M. Montaña Árias. 2019. El papel de los hongos en la conservación de Andosols: estudio de caso en Tlaxcala, México. *Terra Latinoamericana* 37: 93-103. <https://doi.org/10.28940/terra.v37i2.437>
- Kawo, N. S., y Karuppannan, S. (2018). Groundwater quality assessment using water quality index and GIS technique in Modjo River Basin, central Ethiopia. *Journal of African Earth Sciences*, 147, 300–311. <https://doi.org/10.1016/j.jafrearsci.2018.06.034>
- Khade, S. W., y Rodrigues, B. F. (2009). *Studies on Effects of Arbuscular Mycorrhizal (Am.) Fungi on Mineral Nutrition of Carica papaya L.* <https://doi.org/10.15835/nbha3713157>
- Koide, R. T. (1991). Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. *New Phytologist*, 117(3), 365–386. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1991.tb00001.x>
- Kokkoris, V., Stefani, F., Dalpé, Y., Dettman, J., y Corradi, N. (2020). Nuclear Dynamics in the Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Trends in Plant Science*, 25(8), 765–778. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.05.002>
- Krüger, M., Stockinger, H., Krüger, C., y Schüßler, A. (2009). DNA-based species level detection of *Glomeromycota*: One PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 183(1), 212–223. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02835.x>
- Kumar, S., Diksha, Sindhu, S. S., y Kumar, R. (2022). Biofertilizers: An ecofriendly technology for nutrient recycling and environmental sustainability. *Current Research in Microbial Sciences*, 3, 2–26. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100094>
- López-Morales, M. L., Leos-Escobedo, L., Alfaro-Hernández, L., y Morales-Morales, A. E. (2022). Impacto de abonos orgánicos asociados con micorrizas sobre rendimiento y calidad nutracéutica del pepino. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 13(5), 785–798. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i5.2868>

- López-Rivera, L. A., Ramírez-Ramírez, I., González-Hernández, V. A., Cruz-Huerta, N., y Téliz-Ortiz, D. (2017). Expresión diferencial de genes de defensa en aguacate en respuesta a la infección del viroide de la mancha de sol del aguacate. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1707-5>
- Lozano Sánchez, J. D., Armbrecht, I., y Montoya Lerma, J. (2015). Hongos formadores de micorrizas arbusculares y su efecto sobre la estructura de los suelos en fincas con manejos agroecológicos e intensivos. *Acta Agronómica*, 64(4), 289–296. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n4.46045>
- Peñuelas-Rubio, O., Trejo-Aguilar, D., Cervantes-Gámez R. G. y Maldonado-Mendoza, I. E. (2021). Análisis microbiómico de hongos micorrízicos arbusculares asociados a papaya, inoculada con consorcios de dos ecosistemas naturales. *Scientia Fungorum*, 51, e1292. <https://doi.org/10.33885/sf.2021.51.1292>
- Martínez-Villagómez, M., Campos-Rojas, E., Ayala-Arreola, J., Barrientos-Priego, A. F., y Espíndola-Barquera, M. C. (2016). Diversidad y distribución del género *Persea* Mill., en México. 2016, 9(4), 72–77.
- Masuda, Y., Mise, K., Xu, Z., Zhang, Z., Shiratori, Y., Senoo, K., y Itoh, H. (2024). Global soil metagenomics reveals distribution and predominance of Deltaproteobacteria in nitrogen-fixing microbiome. *Microbiome*, 12(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s40168-024-01812-1>
- McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L., y Swan, J. A. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 115(3), 495–501. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x>
- Méndez-Gálvez, S. (2021). Los hongos micorrízicos arbusculares para una agricultura sustentable. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 9(1), 1–2. <https://doi.org/10.36610/j.jsab.2021.090100001>
- Méndez-Zúñiga, S.-M., y Corrales-García, J.-E. (2020). *Aguacate criollo mexicano: Caracterización física, fisiológica, fitoquímica y variabilidad genética con marcadores ISSR* [UNIVERSIDAD AUTONOMA DE CHAPINGO]. <https://repositorio.chapingo.edu.mx/server/api/core/bitstreams/44a9110f-30e8-42ee-8803-1cffc154c13e/content>
- Meza-Pérez, E., y Geissert Kientz, D. (2003). Estructura, agregación y porosidad en suelos forestales y cultivados de origen volcánico del Cofre De Perote, Veracruz, México. *Foresta Veracruzana*, 5(2), 57–61.
- Montañez Orozco, I., Vargas Sarmiento, C., Cabezas Gutiérrez, M., y Cuervo Andrade, J. (2010). Colonización micorrízica en plantas de aguacate (*Persea americana* L.). *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*, 13(2), 51–60. <https://doi.org/10.31910/rudca.v13.n2.2010.729>

- Neina, D. (2019). The Role of Soil pH in Plant Nutrition and Soil Remediation. *Applied and Environmental Soil Science*, 2019, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2019/5794869>
- Oehl, F., Sánchez-Castro, I., De Sousa, N. M. F., Silva, G., y Palenzuela, J. (2015). *Dominikia bernensis*, a new arbuscular mycorrhizal fungus from a Swiss no-till farming site, and *D. aurea*, *D. compressa* and *D. indica*, three new combinations in *Dominikia*. *Nova Hedwigia*, 101(1–2), 65–76. https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2014/0235
- Oehl, F., Sánchez-Castro, I., Palenzuela, J., Da Silva, G. A., y Sieverding, E. (2014). *Glomus compressum*, a new arbuscular mycorrhizal fungus from different agro-ecosystems in Central Europe. *Nova Hedwigia*, 99(3–4), 429–439. <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2014/0200>
- Olalde-Portugal, V., y Aguilera Gómez, L. I. (1998). *Microorganismos y biodiversidad*. 16(3). <https://www.redalyc.org/pdf/573/57316312.pdf>
- Ortega, E. P. (2015). *Inducción de mecanismos de defensa en plantas de tomate (Solanum lycopersicon L.) micorrizadas frente al ataque de Oidiopsis taurica (Lev.) Salm.* 36(1), 51–60.
- Ortiz, Solorio, C. A. (2019). *Edafología* (1ra ed.). Trillas.
- Peralta-Valencia, A. L., Castillo-Argüero, S., Hernández-Cuevas, L. V., y Vázquez-Santos, Y. (2023). Variación temporal en la composición de hongos micorrizógenos arbusculares en un bosque templado. *Ecosistemas*, 32(3), 2572. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2572>
- Pérez-Álvarez, S., Ávila-Quezada, G., y Coto-Arbelo, O. (2015). *Revisión bibliográfica el aguacatero (Persea americana Mill)*. 36(2), 111–123.
- Phillips, J. M., y Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 18–29. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3)
- Porta, H., y Jiménez-Nopala, G. (2020). Papel de las hormonas vegetales en la regulación de la autofagia en plantas. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 22. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.160>
- PRO-MIX. (s/f). *¡Nuestras Micorrizas Al Servicio De Sus Plantas! | Pro-Mix*. Recuperado el 28 de noviembre de 2023, de <https://www.pthorticulture.com/es/centro-de-formacion/nuestras-micorrizas-al-servicio-de-sus-plantas/>
- Quiñones Aguilar, E. E., Hernández Cuevas, L. V., López Pérez, L., y Rincón Enríquez, G. (2019). Efectividad de hongos micorrízicos arbusculares nativos de rizósfera de Agave como promotores de crecimiento de papaya. *REVISTA TERRA LATINOAMERICANA*, 37(2), 163. <https://doi.org/10.28940/terra.v37i2.397>
- Ramírez-Viga, T. K., Ramos-Zapata, J. A., Cáceres G.-Cantón, C., Hernández-Cuevas, L., y Guadarrama-Chávez, P. (2020). Arbuscular mycorrhizal association in

- Conocarpus erectus* (Combretaceae) in mangroves from Yucatán, México. *Botanical Sciences*, 98(1), 66–75. <https://doi.org/10.17129/botsoci.2363>
- Raya Montaña, Y. A., Apáez Barrios, P., Aguirre Paleo, S., Vargas Sandoval, M., Paz Da Silva, R., y Lara-Chávez, Ma. B. N. (2019). Identificación de hongos micorrizógenos arbusculares en huertos de aguacate de Uruapan, Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 23, 267–276. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i23.2026>
- REVIVEMX. (2021). *Catálogo 2021 árboles de la red de viveros de biodiversidad*. chrome-extension://ehhttps://revivemx.org/Recursos/Catalogos/Catalogo_arboles_redviverosbio.pdf
- Reyes, G., y Cortés, J. (2017). *Intensidad en el uso de fertilizantes en América Latina y el Caribe (2006-2012)*. 29(1), 45–52.
- Reyes Tena, A., Quiñones Aguilar, E. E., Rincón Enríquez, G., y López Pérez, L. (2016). Micorrización en *Capsicum annuum* L. para promoción de crecimiento y bioprotección contra *Phytophthora capsici* L. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(4), 857–870.
- Rico-Gray, V., y Palacios-Rios, M. (1996). Salinidad y el nivel de agua como factores en la distribución de la vegetación en la ciénega del NW de Campeche, México. *Acta Botánica Mexicana*, 34, 53–61.
- Rivas, M., Warner, J., y Bermúdez, M. (1998). Presencia de micorrizas en orquídeas de un jardín botánico neotropical. *Revista de Biología Tropical*, 46(2), 211–216.
- Rivera Páez, F. A., González Salazar, V., González Acosta, J. G., y Ossa López, P. A. (2016). Caracterización molecular, análisis morfológico y colonización micorrízica en la rizósfera del aguacate (*Persea americana* Mill) en Caldas, Colombia. *Acta Agronómica*, 65(4), 398–405. <https://doi.org/10.15446/acag.v65n4.51714>
- Rodríguez, A., y Sánchez, P. (2005). *Especies de frutales cultivadas en cuba en la agricultura urbana*. yumpu.com. <https://www.yumpu.com/es/document/view/36422009/3ra-edicion-biblioteca-ihatuey>
- Roeder, A. H. K., Otegui, M. S., Dixit, R., Anderson, C. T., Faulkner, C., Zhang, Y., Harrison, M. J., Kirchhelle, C., Goshima, G., Coate, J. E., Doyle, J. J., Hamant, O., Sugimoto, K., Dolan, L., Meyer, H., Ehrhardt, D. W., Boudaoud, A., y Messina, C. (2022). Fifteen compelling open questions in plant cell biology. *The Plant Cell*, 34(1), 72–102. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab225>
- Salamanca-Jiménez, A., y Sadeghian-Khalajabadi, S. (2005). *La densidad aparente y su relación con otras propiedades en suelos de la zona cafetera Colombiana*. 56(4), 381–397.
- Sánchez-Colín, S., Mijares-Oviedo, P., López-López, L., y Barrientos-Priego, A. F. (1998). *Historia del aguacate en México*.

- http://www.avocadosource.com/journals/cictamex/cictamex_1998-2001/cictamex_1998-2001_pg_171-187.pdf
- Sánchez-Pérez, J., Jaimes-Lara, M., Salgado-Garciglia, R., y López-Meza, J. (2009). Root extracts from Mexican avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) inhibit the mycelial growth of the oomycete *Phytophthora cinnamomi*. *European Journal of Plant Pathology*, 124, 595–601. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9446-y>
- Santillan, M. L. (2016). *Así funcionan los biofertilizantes*. Ciencia UNAM. https://ciencia.unam.mx/leer/570/Asi_funcionan_los_biofertilizantes
- Saparrat, M. C. N., Ruscitti, M. F., y Arango, M. C. (Eds.). (2020). *Micorrizas arbusculares: Biología y aplicaciones en el sector agro-forestal* (1ra ed.). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://doi.org/10.35537/10915/99599>
- Schüßler, A., Schwarzott, D., y Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105, 1413–1421. <https://doi.org/10.1017/S0953756201005196>
- Schüßler, A., y Walker, C. (2010). The Glomeromycota. *The Royal Botanic Garden Kew*. https://www.researchgate.net/publication/285775809_The_Glomeromycota
- SEMARNAT. (2002). *Norma Oficial Mexicana NOM-021-REC NAT-2000*. <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69255.pdf>
- SINICS-FSSC-CICTAMEX. (2017). *Diversidad de aguacate en México*. www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/385096/P-Aguacate-high.pdf
- Smith, S. E., Facelli, E., Pope, S., y Andrew Smith, F. (2010). Plant performance in stressful environments: Interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil*, 326(1–2), 3–20. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9981-5>
- STATISTA, exportadores de aguacate. (2023). *Principales exportadores de aguacate 2023*. <https://es.statista.com/estadisticas/1263632/mayores-exportadores-de-aguacate-en-el-mundo/>
- STATISTA, producción de aguacate. (2022). *Aguacate: Principales productores a nivel mundial*. <https://es.statista.com/estadisticas/1263473/volumen-de-produccion-de-aguacate-por-pais/>
- Steinkellner, S., Lenzemo, V., Langer, I., Schweiger, P., Khaosaad, T., Toussaint, J.-P., y Vierheilig, H. (2007). Flavonoids and Strigolactones in Root Exudates as Signals in Symbiotic and Pathogenic Plant-Fungus Interactions. *Molecules*, 12(7), 1290–1306. <https://doi.org/10.3390/12071290>
- The World Bank Group. (2021). *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*. World Bank Open Data. https://datos.bancomundial.org/indicador/AG.CON.FERT.PT.ZS?end=2021ylocations=ZJymost_recent_year_desc=trueyskipRedirection=trueystart=1961ytype=shadedyview=chartyear=2021

- Universidad Veracruzana. (2017). *Manual de abonos orgánicos*.
<https://www.uv.mx/television/files/2015/10/abonos-organicos-09.pdf>
- Velázquez-Rodríguez, A. S., Báez-Pérez, A., Hidalgo-Moreno, C., Parsa-Retana, M., Etchevers-Barra, J., y Paz-Pellat, F. (2022). Formación de suelos a partir de tepetates: Unidades estructurales, carbono orgánico y estabilidad estructural. *Terra Latinoamericana*, 40.
<https://www.redalyc.org/journal/573/57371833022/html/>
- Vera-Macías, L. R., Hernández-Jiménez, A., Mesías-Gallo, F. W., Cedeño-Sacón, Á. F., Guzmán-Cedeño, Á. M., Ormaza-Cedeño, K. P., y López-Alava, G. A. (2019). Principales suelos y particularidades de su formación del sistema Carrizal-Chone, Manabí, Ecuador. *Cultivos Tropicales*, 40(2).
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstractypid=S0258-59362019000200006yIng=esynrm=isoytIng=es
- Vigneron, N., Radhakrishnan, G. V., y Delaux, P.-M. (2018). What have we learnt from studying the evolution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis? *Current Opinion in Plant Biology*, 44, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.02.004>
- Vivero S., A., Valenzuela B., R., Valenzuela B., A., y Morales, G. (2019). Palta: Compuestos bioactivos y sus potenciales beneficios en salud. *Revista chilena de nutrición*, 46(4), 491–498. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182019000400491>
- Wilches Ortiz, W. A., Ramírez Gómez, M. M., Pérez Moncada, U. A., Serralde Ordoñez, D. P., Peñaranda Rolon, A. M., y Ramírez, L. (2019). Asociación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) con plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) para la producción de panela en Colombia. *Terra Latinoamericana*, 37(2), 175. <https://doi.org/10.28940/terra.v37i2.481>