



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez"

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS MICORRIZÓGENOS ARBUSCULARES COLONIZANDO AGUACATEO BAJO DOS CONDICIONES DE MANEJO EN LA REGION DE URUAPAN, MICHOACÁN

Tesis

Que como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:

Judith Lua Aldama

Directora de tesis

Dra. Ana Tztzqui Chávez Bárcenas

Uruapan, Michoacán, Agosto 2011



El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Interacciones Planta-Ambiente y Bromatología de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la UMSNH y en el laboratorio de Bioquímica Ecológica del CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato

CONTENIDO

	Pág.
CONTENIDO	i
INDICE DE CUADROS	iii
INDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DEL ANEXO	v
I INTRODUCCION	2
II REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1 El Aguacate	6
2.1.1 Importancia económica y social del aguacate	6
2.1.2 Generalidades del aguacatero	6
2.1.3 Los tipos de manejo del cultivo	7
2.1.3.1 Manejo convencional	8
2.1.3.2 Manejo orgánico	8
2.2 Hongos micorrizógenos arbusculares	9
2.2.1 Descripción general de los hongos micorrizógenos	9
2.2.2 sistemática de los hongos micorrizógenos arbusculares	10
2.2.3 ciclo de vida	12
2.2.4 Fisiología primordial en la asociación micorrícica	18
2.2.4.1 adquisición de agua y nutrientes	18
2.2.4.2 metabolismo de c en la micorriza	20
2.2.4.3 control de enfermedades	21
2.3 HMA y Aguacatero	23
2.3.1 Nutrición en aguacatero	23
2.3.2 Especies de HMA identificadas morfológicamente en la franja Aguacatera de Michoacán	24
2.3.3 Investigación molecular de HMA en aguacate y otros cultivos	24
III MATERIALES Y METODOS	26
3.1 Descripción del material vegetal y los sitios de muestreo	26
3.1.1 Descripción de los huertos con manejo Orgánico	27
3.1.1.1 El puerto	27
3.1.1.2 La mesa	27
3.1.1.3 Milpillás	28
3.1.1.4 El Parque	28
3.1.2 Descripción de huertos con manejo convencional	29
3.1.2.1 El puerto del Huizache	29
3.1.2.2 el Huitzicho	29
3.1.2.3 Santa Mónica	30
3.1.2.4 El Parque convencional	30
3.2 Muestreo de material biológico	31
3.3 Tinción de raíz	31
3.4 Evaluación de la colonización de raíces colectadas	32
3.5 Obtención de DNA	33
3.6 Análisis molecular de HMA colonizando raíz de aguacatero	34
3.6.1 PCR anidado a partir de DNA de raíces de aguacatero	34

	3.6.2 Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción RFLP	35
	3.6.3 Clonación de fragmentos amplificados	36
	3.6.4 Obtención de DNA plasmídico	38
	3.6.5 Secuenciación y análisis de secuencias clonadas	38
IV	RESULTADOS Y DISCUSION	40
4.1	Las raíces de aguacatero colectadas presentan micorrización	40
4.2	Evaluación del nivel de micorrización en las raíces colectadas	41
4.3	Optimización del protocolo para la obtención de DNA de raíz de aguacatero	45
4.4	Identificación de especies de HMA en raíces de aguacatero	46
	4.4.1 Las raíces de aguacatero colectadas presentan DNA de diversos grupos del Phylum Glomeromycota.	46
	4.4.2 Análisis y selección por RFLP de los amplicones obtenidos por PCR anidado	51
	4.4.3 La selección de colonias transformadas mostró que el vector tenía el inserto del producto de PCR anidado de HMA	52
	4.4.4 las secuencias obtenidas pertenecen a grupos de hongos micorrizógenos arbusculares	54
	4.4.5 Se encontró diversidad de especies de HMA entre manejos orgánico y convencional	58
V	CONCLUSIONES	62
VI	LITERATURA CITADA	63
	ANEXOS	75

INDICE DE CUADROS

1	Principales categorías de micorrizas y sus atributos. Adaptado de Smith y Read 1997	10
2	Clasificación de Hongos micorrizógenos arbusculares. Basada en características morfológicas y análisis moleculares	12
3	Huertos muestreados en las diferentes localidades de Uruapan, Michoacán, México	29
4	Ensayos realizados para la optimización de tinción de raíces de aguacatero	33
5	Oligonucleótidos usados en el estudio para la determinación de grupos de hongos micorrizógenos asociados a las raíces del aguacatero	36
6	Estimación del porcentaje de colonización por HMA en raíces de aguacatero con el programa MycoCalc	42
7	Matriz dicotómica de amplificaciones para cinco grupos de HMA con raíces micorrizadas de aguacatero de cuatro localidades de Michoacán bajo dos condiciones de manejo.	50
8	Características de las secuencias con mayor porcentaje de similitud con las obtenidas a partir de raíz de aguacatero.	54
9	Índices de diversidad con el programa TFPGA y Shannon-Wiener	59

INDICE DE FIGURAS

1	Ciclo de vida de HMA	13
2	Tipos de simbiosis micorrícica Arum y Paris	14
3	Estructuras formadas por hongos micorrizógenos arbusculares	17
4	Ubicación de las localidades de muestreo	26
5	Esquema de ubicación de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR anidado para identificar HMA	35
6	Estructuras formadas dentro de la raíz del aguacatero en asociación micorrícica. Imágenes tomadas con microscopio electrónico de barrido	40
7	Estructuras formadas dentro de la raíz de aguacatero por HMA. fotografías tomadas con microscopio compuesto de objetivos a 40 X y 100 X	41
8	Frecuencia de colonización por arbusculos de HMA en raíces de aguacatero de los huertos Santa Rosa y Toreo el bajo	43
9	Frecuencia de arbusculos de HMA presentes en raíces de aguacatero de los huertos San Juan Nuevo y El parque Nacional	44
10	Evaluación de protocolos de extracción de DNA de HMA de raíces de aguacatero	45
11	Primera etapa de PCR con los oligonucleótidos para detección de DNA fúngico	46
12	Amplificación selectiva de cuatro grupos de Glomeromycota	47
12	RFLP de productos de amplificación generados por PCR anidado	52
13	Selección de clonas positivas por PCR de colonias crecidas en Lb+Kanamicina	52
14	PCR de DNA plasmídico	53
15	Análisis filogenético de secuencias obtenidas en el estudio	56
16	Índices de diversidad de HMA calculados para las diferentes localidades de huertos de aguacatero	61

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1	Esquema del Vector pCR TOPO 2.1	75
ANEXO 2	Medios, soluciones y amortiguadores utilizados	76
ANEXO 3	Estimación de la colonización para el programa MycoCalc	78
ANEXO 4	Análisis estadísticos de la colonización por arbusculos en raíces de aguacatero	79

I. INTRODUCCIÓN

La micorriza es una asociación benéfica mutualista que se establece entre un grupo de hongos pertenecientes al Phylum *Glomeromycota* (Schüßler y *et al.*, 2001) y las raíces de la mayoría de las plantas superiores. Esta asociación favorece la absorción de agua, el aprovechamiento de nutrimentos y la tolerancia a patógenos por parte de la planta, sobre todo en aquellas plantas con ausencia o escaso número de pelos radiculares o tricoblastos, como la planta de aguacate.

La clasificación taxonómica de los hongos micorrizógenos, inicialmente se basaban en las características de ubicación de la simbiosis respecto a la raíz del componente vegetal, dividiéndose en ectomicorrizas y endomicorrizas, estas últimas incluían varios grupos de asociaciones entre las que destaca por su abundancia la asociación micorrícica arbuscular, en este grupo se consideró para su clasificación la morfología de alguna de las estructuras formadas en la simbiosis como sus esporas, principalmente por la estructura de la pared y las capas que presentan las esporas, sin embargo Con los avances en el desarrollo de la biología molecular se ha comenzado a caracterizar las diversas especies de HMA presentes en las raíces de las plantas con base en la comparación de sus secuencias de DNA (Helgason *et al.*, 1998), lo cual han brindado una herramienta más para el estudio filogenético de HMA, así como para su rápida caracterización e identificación de especies involucradas en simbiosis micorrícica. Lo cual ha resultado en la re-estructuración de la taxonomía de las especies de estos hongos, dando origen a un gran número de clasificaciones basadas en los estudios de sus secuencias de DNA describiendo más 200 especies, distribuidas en 17 géneros(Morton, 1990; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002; Read, 1997; Schüßler y Walker, 2010).

Aunado a esto, el estudio de estas asociaciones micorrícicas arbusculares se complica, ya que una vez establecida la simbiosis, los hongos que participan en ella no pueden ser identificados mediante métodos morfológicos, porque no es posible distinguir diferencias entre las distintas especies bajo estas condiciones. Sin embargo,

las herramientas moleculares han permitido que en algunas especies vegetales sea posible identificar los HMA asociados a ellas.

A pesar de los beneficios que hasta ahora se conocen de los HMA, los estudios sobre la simbiosis micorrícica se enfrenta a una gran limitante de manejo, ya que los HMA son simbiosiontes obligados, es decir que no son capaces de completar su ciclo de vida sin un hospedero, por lo que no es posible aislarlos y cultivarlos en condiciones axénicas, aunque recientemente ha tomado auge su reproducción *in vitro* en condiciones monoaxénicas en presencia de raíces transformadas de zanahoria, a pesar de ello, su estudio es muy limitado ya que bajo estas condiciones sólo se ha podido reproducir, eficientemente, a la especie *Glomus intraradices*.

En el estado de Michoacán, la región aguacatera más importante por sus volúmenes de producción de a nivel nacional e internacional, se ha reportado la presencia de esporas de HMA en el suelo de huertos de aguacate, estas esporas, han sido aisladas y caracterizadas (Bárcenas, 2008; Bárcenas *et al*, 2006), sin embargo, los HMA que se encuentran específicamente colonizando raíces de aguacate no han sido identificados en el cultivo. Es importante destacar que este cultivo fue establecido desde hace aproximadamente sesenta años, utilizando convencionalmente un manejo que incluye la aplicación de fertilizantes y plaguicidas químicos, sin embargo a partir de los años 90's, algunos productores comenzaron a fomentar el uso de compuestos de origen orgánico para sustituir a los compuestos químicos, con la intención de practicar una forma de manejo más sustentable. Estas condiciones de manejo pueden alterar la diversidad, abundancia y dinámica de las asociaciones micorrícicas en el aguacatero; sin embargo, esto no ha sido estudiado hasta ahora (Sánchez *et al.*, 1998; Gómez, 1999).

Por medio de la amplificación y comparación de las regiones del DNA nuclear ribosomal (nrDNA), es posible la identificación de HMA en su ambiente natural a partir de esporas en suelos o material fúngico en raíces micorrizadas (Rodríguez, 2004; Gamper, 2007; Redecker, 2000). Por lo que la información que pueda

generarse en este sentido permitirá ampliar el conocimiento sobre esta simbiosis micorrícica, así como la posible influencia que el tipo de manejo tiene sobre las poblaciones micorrícicas en el cultivo de aguacatero. En el presente trabajo se pretende identificar molecularmente los grupos de HMA asociados a raíces de aguacatero y evaluar el efecto que el tipo de manejo de huertos ejerce sobre la micorrización de estos frutales en la región productora más importante del planeta.

Hipótesis

El potencial de colonización de aguacatero por HMA es mayor en huertos bajo condiciones de manejo orgánico que en huertos con manejo convencional.

Objetivos

○ Objetivo general

- Identificar molecularmente especies de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) en simbiosis con raíces de aguacatero en la región de Uruapan y evaluar el efecto del tipo de manejo del cultivo en la micorrización.

○ Objetivos particulares

- Localizar huertos en producción bajo condiciones de manejo orgánico y manejo convencional.
- Comparar la frecuencia de micorrización en huertos bajo condiciones de manejo orgánico y convencional
- Generar una colección de DNA de raíces de aguacatero colonizado por HMA en la región de Uruapan, Michoacán.
- Amplificar el DNA nuclear ribosomal de HMA por PCR anidado a partir del DNA de raíces de aguacatero.
- Establecer relaciones filogenéticas entre los HMA asociados a raíces de aguacatero y amplificados por PCR y las especies con secuencias de DNA disponibles en las bases de datos públicas. Comparar la diversidad de especies de HMA encontradas en raíces de aguacatero cultivado bajo manejos orgánico y convencional.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El Aguacate

2.1.1 Importancia económica y social del cultivo del aguacate

México es el principal productor de aguacate a nivel mundial seguido de Chile e Indonesia (FAO 2008). En el año 2009 se reportó una producción de más de 1 millón 200 mil toneladas a nivel nacional contribuyendo con más del 94% de las exportaciones a nivel mundial (SIAP, 2011). Michoacán es el estado de mayor aportación para esta cifra reportando una producción de 1 millón de toneladas (SIAP, 2011). Por otro lado, la producción de aguacate representa una fuente básica en la generación de empleos fijos y eventuales conformados dentro de la región, con más de 81 mil empleos (Sánchez, 2007).

La región aguacatera del estado de Michoacán incluye a 22 municipios que se localizan sobre el eje neo volcánico en una zona de transición que va desde Zitácuaro en el oriente hasta Cotija en el poniente, en un intervalo de altitudes sobre el nivel del mar que van desde los 1150 m hasta los 2400 m. Esta zona es una región de transición climática y forestal, que antes perteneció a ecosistemas de bosques de pinos, encinos y selva baja; así como terrenos dedicados a la producción de maíz, trigo y en menor escala de caña de azúcar y al pastoreo, en donde en la actualidad el paisaje es dominado por arboles de aguacate (Sánchez, 2007).

2.1.2 Generalidades del aguacatero

El aguacate (*Persea americana* Mill) es un fruto de origen tropical de cultivo perenne, pertenece a la familia de las *Laureaceae*. Los arboles de aguacate de los huertos comerciales se forman por lo general de dos partes resultante del injerto: la copa y la raíz. La copa tiene origen del cultivar injertado y que también forma parte

del tronco, mientras que la raíz es parte del porta injerto y que por lo general también contribuye a la base del tronco.

El cultivo del aguacate desarrolla un abundante sistema radicular sobretodo en la parte más superficial del suelo, llegándose a observar brotes radiculares sobre la hojarasca que cubre el suelo. Debido al crecimiento radicular sólo donde existe humedad puede desarrollarse la raíz independientemente de la época del año y aún cuando existan nutrimentos en abundancia, sólo pueden tomar los del área de humedad. Sin embargo, este sistema radicular es muy particular, ya que el aguacatero carece de tricoblastos lo cual limita aún más el área de absorción tanto de nutrientes como de agua (Téliz y Mora, 2007).

2.1.3 Los tipos de manejo del cultivo

En la mayoría de los países productores de aguacate, se tienen problemas de bajos rendimientos, lo que es atribuido a la nutrición y fertilidad de los suelo (Sánchez, 2007). En la región aguacatera de Michoacán los suelos predominantes son andosoles, estos suelos son normalmente sueltos y muy susceptibles a la erosión, presentan buena aireación y drenaje, pero son pobres en nutrientes, los cuales se lixivian con facilidad además de la biodisponibilidad de aluminio que se han descrito en suelos ácidos los cuales suelen tener problemas de fijación de fosforo (Sánchez, 2007). Para resolver algunas de estos problemas en la actualidad se usan ampliamente fertilizantes y/o algunos insumos que mantengan y mejoren el ambiente, y al mismo tiempo suministren los nutrimentos necesarios a la mayoría de los cultivos. Los nutrientes son absorbidos por las raíces de las plantas en formas iónicas, independientemente del origen de procedencia ya sea de fuentes orgánicas o inorgánicas y después de que los iones han sido absorbidos por las raíces, las rutas y procesos metabólicos son los mismos no habiendo posible distinción de la fuente que aportó los nutrimentos (Salazar-García, 2002).

2.1.3.1 Manejo convencional

La agricultura fue inventada desde hace aproximadamente 10 000 años, desde aquel momento, el hombre ha tratado de modificar los procesos naturales a fin de obtener los alimentos y fibras que se necesita para satisfacer algunas necesidades básicas en la población; con el paso del tiempo ha ido cambiando progresivamente el modo de vincular la naturaleza con la innovación tecnológica y productiva. La transformación e intensificación de la agricultura se aceleró después de la llamada "revolución verde". Este proceso de intensificación permitió pasar en muy poco tiempo de una agricultura elemental y rudimentaria a una sofisticada a lo que se le llamo agricultura convencional (Pretty, 2001; Shiva, 2000). La agricultura convencional, se basa en un tipo de producción agropecuaria de alto rendimiento, mediante el uso intensivo de tractores y maquinarias de alta productividad e insumos externos como semilla de alto rendimiento, agroquímicos para la nutrición, fertilización, control de plagas, enfermedades y malezas (Navarro, 2009). Este tipo de agricultura muestra beneficios, como aplicar lo necesario para cubrir las necesidades de algún nutrimento en particular, además de estar disponibles más rápidamente para la planta, se pueden aplicar en las etapas y mezclas con los balances requeridos para el crecimiento de la planta. Sin embargo la principal desventaja que tiene este tipo de agricultura es que existe el peligro de que al usar excesos del fertilizante requerido se puede causar toxicidad a la planta, contaminación del suelo y aguas subterráneas al ser lixiviados a los mantos freáticos así como daños directos a la salud humana (Salazar-García, 2002; Produce, 2003).

2.1.3.2 Manejo Orgánico

La agricultura orgánica ha surgido como una alternativa de manejo de la producción debido a que la mayor parte de los insumos de síntesis química han propiciado erosiones y contaminación de los suelos, disminución de la biodiversidad genética, vulnerabilidad de los cultivos a las plagas, fomento del monocultivo y reducción de los alimentos disponibles, lo cual ocasiona el empobrecimiento de

muchos campesinos y el incremento de los conflictos sociales en el campo y la ciudad. Asimismo, la agricultura intensiva ha propiciado la erosión acelerada de los componentes físicos y biológicos de los suelos y ha propiciado el mayor nivel de desequilibrio ecológico en la historia de los agrosistemas (2000 Agro, 2011). La agricultura orgánica se generó con la intención de promover la protección de los suelos y los cultivos a través de prácticas tales como el reciclado de nutrientes y de materia orgánica, rotación de cultivos, la eliminación del uso de agroquímicos sintéticos y se caracteriza por el uso de insumos naturales para el manejo de la fertilización y el control de plagas y enfermedades con el uso de extractos de plantas con propiedades insecticidas y fungicidas, polvos minerales, enzimas ionizadas, entre otros. Cuando este manejo es llevado a cabo de manera adecuada, se pueden lograr niveles menores de residualidad de compuestos y contaminación ambiental a los obtenidos en el manejo convencional. Además, idealmente este tipo de manejo se instrumenta bajo buenas prácticas agrícolas, que promueven la protección del ambiente, con el fin de generar un sistema de producción agrícola sustentable a largo plazo y obtener productos libres de residuos tóxicos (Navarro, 2009).

2.2 Hongos micorrizógenos arbusculares

2.2.1 Descripción general de los hongos micorrizógenos

En el año de 1885, Albert Bernard Frank introdujo con sus estudios de la relación de los microorganismos del suelo y su relación con las plantas la palabra micorriza proveniente del término griego "*mycos*" (hongo) y el vocablo latino "*rhiza*" (raíz), los hongos micorrizógenos forman una relación simbiótica con las raíces de las plantas de un modo similar a los nódulos de bacterias fijadoras de nitrógeno de la raíz de leguminosas (Frank, 1885).

De acuerdo a Read, los hongos micorrizógenos se pueden subdividir, dependiendo de la morfología tanto del hongo como de la planta hospedante (Cuadro 1), sin embargo de los siete tipos de micorriza descritos (Arbuscular, Ectomicorriza,

Ectendomicorriza, Arbutoide, Monotropoide, Ericoide, y Orquideacea), la simbiosis micorrícica arbuscular comprende la asociación más común, ya que se relaciona y forma una asociación benéfica mutualista con más del 90% de las plantas vasculares (Brundett, 2002;Smith y Read, 1997; Brundett, 2004; Allen *et al.*,2003).

Cuadro 1. Principales categorías de micorrizas y sus atributos adaptado de Smith y Read (1997) (Anwuar *et al.*, 2008).

Tipo de micorriza	arbuscular	Ecto	Ectendo	arbutoide	monotropoide	ericoide	orquideacea
Taxones fúngicos	Glomero	Basidio Asco Zigo	Basidio Asco	basidio	Basidio	Asco	Basidio
Taxones de plantas	Brio Pterido Gimno	Gimno Angio	Gimno Angio	Ericales	monotropoideae	Ericales Brio	orquideaceae
Colonización intracelular	+	-	+	+	+	+	+
Vaina o manto fúngico	-	+	+/-	+/-	+	-	-
Red de Hartig	-	+	+	+	+	-	-
Vesículas	+/-	-	-	-	-	-	-
aclorofilicos	-	-	-	-	+	-	+

+ **Presencia**
- **Ausencia**

2.2.2 Sistemática de los hongos micorrizógenos arbusculares

Los Hongos micorrizógenos son habitantes naturales del suelo, son mutualistas obligados, es decir que dependen de la presencia de hospederos para suplir sus necesidades de carbono, pertenecientes al Phylum Glomeromycota que se caracterizan por formar estructuras típicas llamadas arbusculos, vesículas, hifas y/o rulos dentro de las células corticales de las raíces de las plantas y tienen distribución ubicua en los ecosistemas globales (Anwuar *et al.*, 2008).

El descubrimiento de arbusculos en *Aglaophyton major*, en la era Devoniana, proporcionó una inequívoca evidencia que la micorriza se estableció hace más de 400 millones de años (Remy *et al.*, 1994;Simon *et al.*, 1992; Malloch, 1980;Simon, 1993)

sin embargo, la taxonomía del reino Fungi hasta hace pocos años se clasificaba solamente en 4 Phyla, Chitridiomicota, Zigomicota, Ascomicota y Basidiomicota, colocando a los Hongos micorrícicos arbusculares dentro del phylum Zigomicota. Schüßler y colaboradores, en el año 2001 demostraron, basándose en la comparación de la sub unidad pequeña del gen RNA ribosomal (SSU) r-RNA por sus siglas en inglés, que los HMA del orden Glomerales dentro del Phylum Zigomicota son monofiléticos y notoriamente diferentes a los demás miembros de los demás taxa fúngicos y definieron el Phylum Glomeromycota, llamado así por el termino griego “*glomus*” que significa balón y “*mykes*” que significa hongo, la referencia puede ser para arbuscular como parecido a un arbusto o masas de hifas enrolladas de micelio que son comunes en el género *Glomus*, lo cual fue confirmado por estudios posteriores (Lutzoni y *et al.*, 2004; Schüßler, 2001; Schüßler y Walker, 2001). En estos estudios Schüßler describe a Glomeromycota con aproximadamente 150 especies, reproducción asexual, y formación de algunos conjuntos de esporas sueltas o agrupaciones, hifas vegetativas cenocíticas o sin septos, paredes con quitina.

En los años siguientes se ha reclasificado varias veces la distribución de las especies de HMA dentro del mismo Phylum, Morton y colaboradores (1998) argumentaron convincentemente, que la espora es diferente de otras partes del organismo y si esto es así, la variación entre esporas no necesariamente reflejará la verdadera filogenia, esto fue comprobado mediante métodos moleculares, y se ha hecho evidente que la morfología de la espora no permite la distinción entre especies de familias diferentes e incluso entre especies de la misma familia (Morton y Redecker, 2001; Walker *et al.*, 2007; Walker, 2008; Gamper *et al.*, 2009)

Recientemente Schüßler y Walker publicaron una nueva modificación a la clasificación de las especies de HMA dentro del Phylum Glomeromycota, con 4 ordenes integrados por 11 familias y 17 géneros (Cuadro 2) con cerca de 228 especies descritas basadas principalmente en el análisis del gen de la pequeña sub unidad (SSU) rRNA y considerando algunos datos de la sub unidad grande (SSL) y el

espacio transcrito interno que incluye el gen 5.8S rRNA y los ITS1 e ITS2, tomando en cuenta que la SSU es una región demasiado conservada para resolver el nivel especie dentro del Glomeromycota, pero es un marcador importante para la resolución de la robustez de las filogenias, por debajo de sub géneros (Schüßler y Walker, 2010).

Cuadro 2. Clasificación de hongos micorrizógenos arbusculares. Basada en características morfológicas y análisis moleculares de Schüßler y Walker 2010.

Phylum Glomeromycota

Clase glomeromycetes

Orden (4)	Familias (11)	Géneros (17)
Glomerales	<i>Glomeraceae</i>	<i>Glomus</i>
		<i>Funneliformis</i>
		<i>Rhizophagus</i>
		<i>Sclerocystis</i>
Diversisporales	<i>Claroideoglomeraceae</i>	<i>Claroideoglomus</i>
	<i>Gigasporaceae</i>	<i>Gigaspora</i>
		<i>Scutellospora</i>
		<i>Racocetra</i>
	<i>Acaulosporaceae</i>	<i>Acaulospora</i>
	<i>Entrophosporaceae</i>	<i>Entrophospora</i>
	<i>Pacisporaceae</i>	<i>Pacispora</i>
	<i>Diversisporaceae</i>	<i>Diversispora</i>
Paraglomerales		<i>Otospora</i>
	<i>Paraglomeraceae</i>	<i>Paraglomus</i>
Archaeosporales	<i>Geosiphonaceae</i>	<i>Geosiphon</i>
	<i>ambisporaceae</i>	<i>Ambispora</i>
	<i>Archaeosporaceae</i>	<i>Archaeospora</i>

2.2.3 Ciclo de vida

Los hongos Glomeromycota, son altamente dependientes de su hospedero, producen a la vez estructuras pre simbióticas, que constan de esporas asexuales e hifas y unidades de infección que involucran la epidermis y el cortex de los tejidos radiculares (Figura 1).

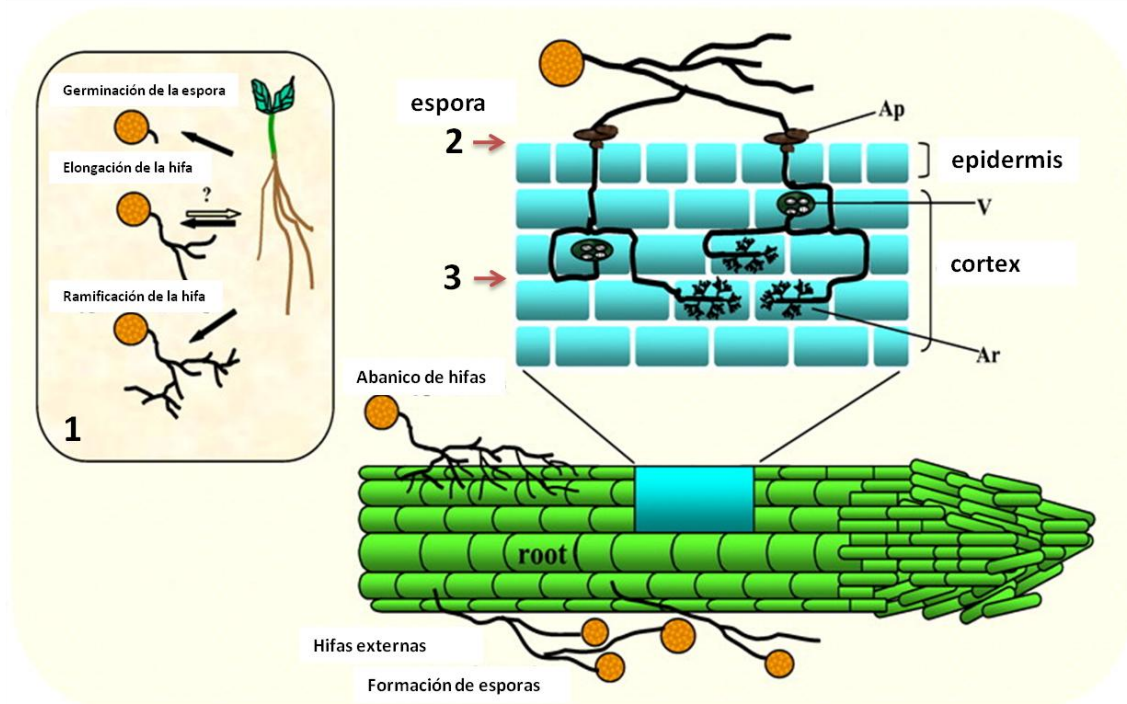


Figura 1. Ciclo de vida del hongo micorrizógeno arbuscular (HMA) inicia con **1**) la germinación de la espora en el suelo la hifa germinada tiene una elongación hasta encontrar una raíz que pueda ser colonizada, **2**) al establecerse la comunicación la hifa hace contacto con la raíz formando un apresorio (Ap) que es el que por fuerza mecánica y química ayudará a que la hifa penetre en las células epidérmicas y corticales; una vez dentro inicia **3**) el desarrollo de arbuscúlos (Ar) con la bifurcación terminal de la hifa y haciendo contacto con la célula cortical por medio de una invaginación siendo esta en donde se lleva a cabo el intercambio de nutrientes. Formando también vesículas (V) como estructuras de almacenamiento principalmente de lípidos. Imagen adaptada de Gadkar *et al.*, 2001

El ciclo de vida de los HMA se inicia con la germinación en el suelo de sus esporas, que desarrollan un tubo de germinación (Figura 1.1), las hifas extrarradicales crecen al azar buscando una raíz susceptible a ser colonizada, si este encuentro se produce, se establece un diálogo estrecho entre el fito y el micobionte por medio de señales producidas por ambos organismos (Bécard *et al.*, 1997), una vez que la comunicación se ha establecido, se forma un apresorio (Figura 1.2) sobre las células epidérmicas, penetrando enrollamientos de hifa de manera intracelular en el tejido (Bonfante, 1984). Una vez dentro del cortex de la raíz, el hongo empieza su desarrollo simbiótico y puede producir hifas longitudinales que se extienden y que son altamente ramificadas, tomando una forma muy parecida a un arbusto, llamados

arbúsculos (Smith y Read, 1997). Los arbúsculos son formados por ramificaciones dicotómicas de una hifa intraradical (Figura 1.3 (Ar)), conforme la hifa comienza incrementando las ramificaciones, aunque la anchura de la pared fúngica empieza a aumentar y la estructura de la pared se hace más abierta, el plasmalema de la célula hospedera no es perforado sino que crece de tal forma que la hifa de penetración y todas sus ramificaciones quedan rodeadas por el plasmalema produciendo una extensa superficie de contacto entre las células de ambos organismos (Bonfante-Fasolo *et al.*, 1990; Harrison, 1999). Gallaud usó por primera vez los términos Arum y Paris para describir las diferencias entre los patrones de colonización de arbusculos: el tipo arum (Figura 2a), es definido sobre la base de una extensiva fase de crecimiento intercelular de la hifa, con desarrollo de arbúsculos terminales, mientras que el tipo Paris (Figura 2b), muestra principalmente hifas enrolladas con arbúsculos intercalados.

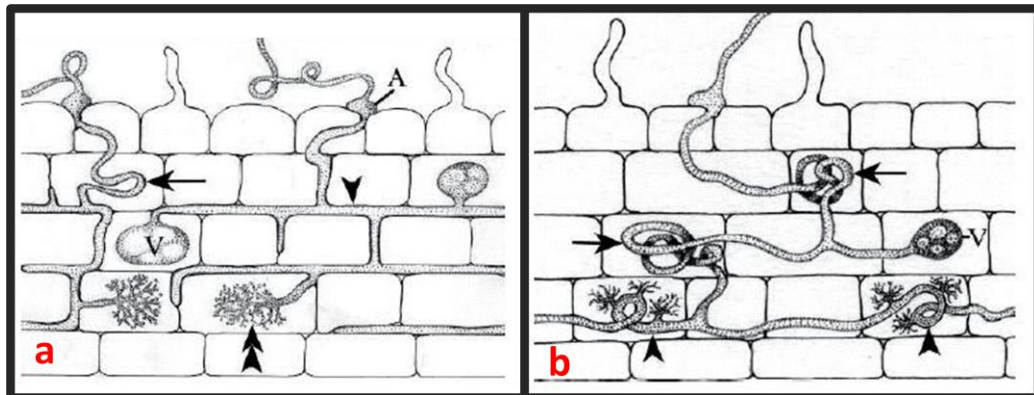


Figura 2. Se observan las diferencias básicas en los dos tipos de asociación micorrizica arbuscular, **a)** tipo Arum con crecimiento de hifas intercelular **b)** tipo Paris con crecimiento de hifas intracelular Tomado de Peterson *et al.*, 2004.

La actividad biosintética incrementa dentro de la célula del hospedero, permitiendo la producción de componentes adicionales de la membrana para continuar con el crecimiento arbuscular y como el arbúsculo se extiende y se bifurca, es envuelto por la membrana del hospedero recién sintetizada. En la célula madura arbusculada, la membrana del hospedero habrá aumentado su superficie varias veces para rodear completamente la estructura fúngica (Alexander *et al.*, 1988; Lohse *et al.*, 2005; Peterson *et al.*, 2004). Los arbúsculos son estructuras de vida corta y empieza

su senescencia después de 4 a 10 días de actividad, el arbusculo se debilita, y los restos son encapsulados por los componentes de las paredes celulares y degradados para que las células de las plantas regresen al estado pre-arbuscular y puedan ser nuevamente colonizados.

Otra de las estructuras formadas en la asociación micorrízica arbuscular son las vesículas, estas son cuerpos almacenadores de lípidos y glicolípidos (Figura 1.3; V), de pared delgada, producidos por un aumento del volumen en la zona terminal de la hifa intrarradical, estas pueden estar inter o intracelularmente en el cortex de la raíz en especies del orden Glomerales. En la familia *Glomaceae*. Las vesículas generalmente son ovoides o elipsoides, sin embargo, en la familia *Acaulosporaceae* son elipsoides a irregulares y nudosa, las vesículas difieren en el desarrollo micorrízico temprano en algunos miembros del género *Glomus*, pero generalmente proliferan aproximadamente al mismo tiempo provocando y aumentando la esporulación. La micorrización tardía, aproximadamente 70 a 90 días en cultivos trampa, muestra pocos arbusculos, pero abundantes hifas intrarradicales y vesículas, sin embargo no todas las especies de Glomeromycetes forman vesículas, algunos miembros del género *Gigaspora* y *Scutellospora* nunca forman vesículas (Figura 3g) (Morton, 2002; Morton y Redecker, 2001). No obstante, especies relacionadas, producen pequeñas estructuras hialinas de paredes delgadas parecidas a vesículas sobre un tubo germinativo e hifas externas, estas podrían ser análogas de las células auxiliares en *Gigasporaceae*, ya que las células auxiliares son grupos de células con paredes delgadas que se ramifican de la hifa extrarradical del hongo, en el suborden *Gigasporineae*. La superficie de la célula tiene una superficie espinosa en el género *Gigaspora* que son reducidos a nudos o una superficie casi lisa en varios grupos de *Scutellospora*. Las células auxiliares (Figura 3i), a menudo son diferenciadas sobre el tubo germinativo de esporas previo al establecimiento de alguna colonización micorrízica. Estas alcanzan su máxima expresión dentro de un periodo corto después del comienzo de la esporulación (Blaszkowski, 2003; Morton, 2002).

Finalmente, las esporas son estructuras de resistencia, diferenciadas ya sea en el suelo o en las raíces en todos los géneros. La esporulación puede llevarse a cabo en el suelo, así como en restos de plantas en descomposición o dentro de las raíces, esto ocurre de manera abundante en algunas especies de *Glomus*, la más notoria y consistente se ha observado en *Glomus intraradices* y *Glomus diaphanum*. Las esporas son células independientes multinucleadas, producidas básicamente en la punta de la hifa continua de la hifa extrarradical. El número de esporas producidas depende de la especie del hongo, del suelo, de la fertilización del suelo y aplicación de fertilizantes etc. (Morton, 2000; Blaskowski, 2003; Blaskowski, 1998; INVAM, 2011) la caracterización morfológica de las esporas de HMA se basa en las características del arreglo, desarrollo de estructuras dentro de la raíz colonizada (Figura 3h,g), pared, ornamentación, hifa de sostén, germinación, color, respuesta con algunos reactivos como el Mezler y PVLG de cada espora (Figura 3 a-d).

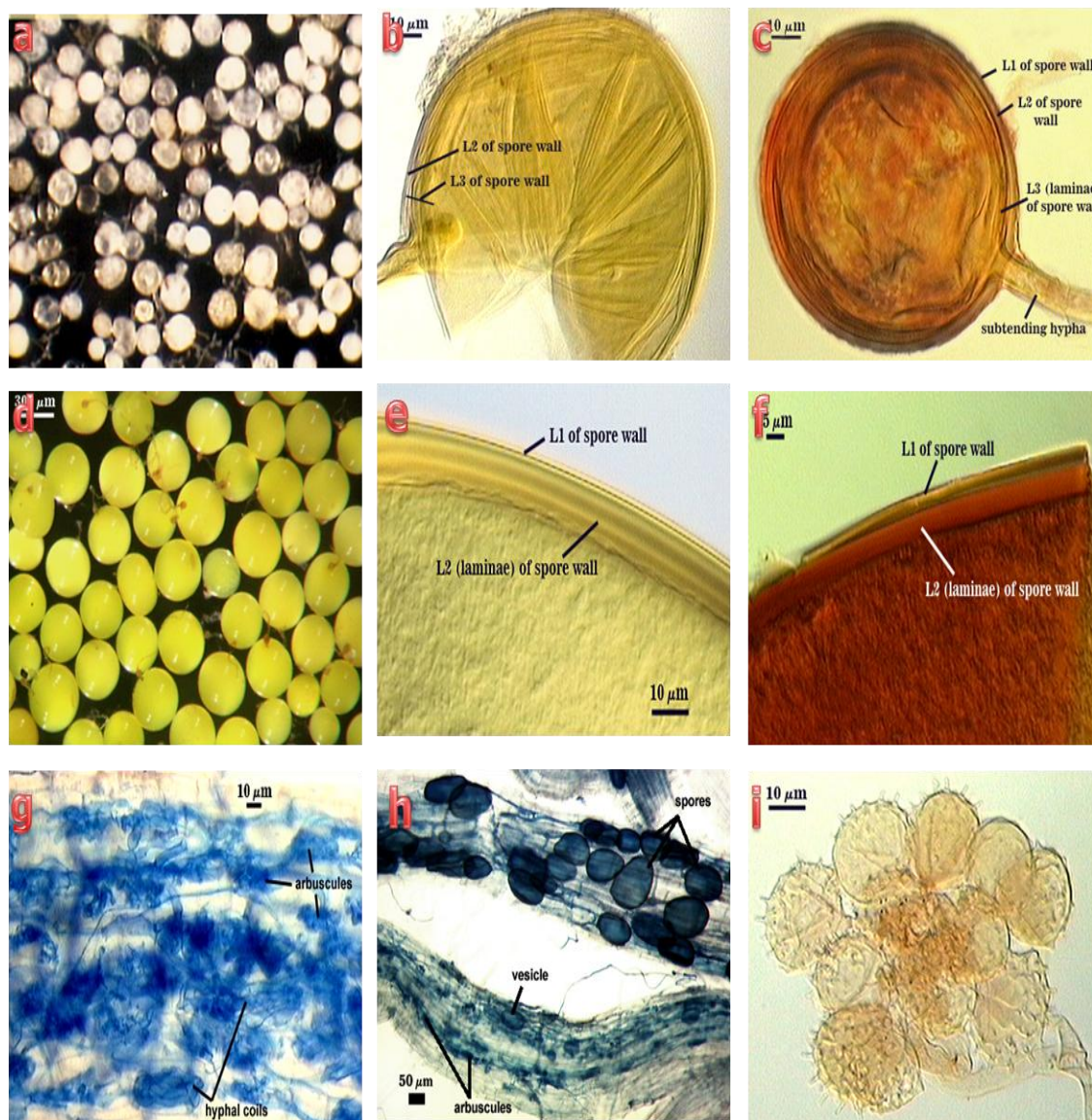


Figura 3. Estructuras formadas por hongos micorrizógenos arbusculares (HMA). *Glomus intrarradices* (a, b, c, h) **a.** espora; **b.** reacción de la espora al PVLG **c.** reacción de la espora al reactivo de Melzer + PVLG; **h.** estructuras formadas una vez establecida la asociación micorrícica dentro de la raíz de maíz (esporas, vesículas y arbusculos). Estructuras del HMA *Gigaspora gigantea* **d.** espora; **e.** Reacción de la espora al PVLG; **f.** Reacción de la espora al Melzer + PVLG; **g.** Estructuras formadas una vez establecida la asociación micorrícica dentro de la raíz de maíz (arbusculos y enrollamientos de hifas); **i.** células auxiliares. Imágenes tomadas de: <http://invam.caf.wvu.edu>

2.2.4 Fisiología primordial en la asociación micorrícica

2.2.4.1 Adquisición de agua y nutrientes

A las asociaciones micorrícicas se les atribuye la capacidad de aumentar la solubilización de minerales del suelo como Zn, Cu, K, S y N, pero principalmente P, haciéndolos disponibles para la planta hospedera (Ruiz-Lozano *et al.*, 1995; Newsham *et al.*, 1995), aumenta a su vez la asimilación del agua por la planta en condiciones limitantes, traducándose así en una mejor tolerancia a estrés abióticos (hídrico, salino, térmico) (Remy *et al.*, 1994; Ruiz-Lozano, et al., 1995).

Adquisición de P

El fósforo (P) es un nutriente esencial y es un limitante para el crecimiento de la planta en muchos ambientes, el P está presente en el suelo en forma de ortofosfato inorgánico (Pi) y es fácilmente secuestrable por cationes, especialmente en condiciones ácidas, de los cuales los más abundantes son hierro, aluminio y calcio. La movilidad del P secuestrado se reduce y como consecuencia de su absorción la planta rápidamente agota el P disponible en los alrededores del sistema radicular y crea una zona de agotamiento localizada (Bucher, 2007).

La absorción de los fosfatos por la planta se lleva a cabo por dos vías, por la vía directa, en ausencia de colonización y por vía indirecta, la cual se realiza cuando la planta está asociada a una simbiosis micorrícica (Smith *et al.*, 2003). Estas dos vías no son complementarias, pero funcionan como alternativas fisiológicas. El principio de la colonización micorrícica resulta en la expresión de transportadores de fosfatos, en donde la adquisición de este por las vías de micorrización arbuscular inicia con la absorción de Pi libre en el suelo por la hifa extraradical. Esta hifa fúngica se extiende más allá del sistema radical del hospedero permitiendo incrementar el volumen del suelo explorado para la adquisición de fosfato. Adicionalmente, la colonización micorrícica arbuscular promueve respuestas fisiológicas en el hospedero, tal como la bifurcación de las raíces y la secreción de fosfatasas que promueve indirectamente la

absorción de fosfatos, lo cual es mediado por la alta afinidad de transportadores de fosfato. (Ezawa *et al.*, 2005; Bennedetto *et al.*, 2005; Sawers *et al.*, 2008). Después de la adquisición por el hongo, el P es transferido a la vacuola fúngica donde es polimerizado para formar cadenas de polifosfatos, estos son traslocados por el compartimento vacuolar a la hifa intrarradical, donde se presume es previamente hidrolizado para su liberación como fosfatos libres dentro del apoplasto interfacial de las células arbusculadas (Ohtomo y Saito, 2005; Ezawa *et al.*, 2001; Ferrolet *et al.*, 2001) los mecanismos de desdoblamiento de los poli fosfatos no han sido caracterizados pero hipotéticamente parece requerir de una acción de enzimas fosfatasas fúngicas presentes en los arbúsculos.

Adquisición de N

De manera similar, el nitrógeno es un elemento indispensable para el desarrollo de las plantas, y está disponible en el suelo en forma de amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-), sin embargo, la concentración de amonio en el suelo es más baja que la de nitrato, el nitrógeno es tomado principalmente en forma de amonio cuando las plantas son sujetas a deficiencias de nitrógeno, crecimiento con baja disponibilidad de agua o suelos ácidos. El amonio es de baja movilidad en el suelo y se forma una zona de agotamiento en las cercanías de la raíz de manera muy similar a lo observado con fósforo, el micelio extrarradical de los hongos micorrizógenos pueden absorber amonio, nitrato y amino ácidos (Johansen *et al.*, 1997; Govindarajulu *et al.*, 2005) no hay evidencia de traslocación del amonio o nitratos, lo más parecido es que el nitrógeno se trasloca en forma de aminoácido (Bago *et al.*, 2001) se piensa que siendo la arginina el aminoácido mas abundante en el micelio extrarradical, es la principal forma de traslocación, el amonio es primeramente combinado con glutamato para formar glutamina por las enzimas de glutamina/sintasa, habiendo sido traslocada a la hifa intrarradical, la arginina es reducida por ornitina aminotransferasa y ureasa para liberar amonio (Govindarajulu *et al.*, 2005, Cruz *et al.*, 2007). El amonio des-protonado, tiene el potencial para difundirse pasivamente dentro del apoplasto

principalmente por gradiente de concentración y alternativamente pueden transportarse también mediante mecanismos proteicos. Los transportadores proteicos encargados de esto aún no han sido esclarecidos, sin embargo, en estudios en ectomicorrizas, se identificó un posible candidato, el cual hipotéticamente activaría la traslocación del amonio dentro de las vesículas intracelulares para su subsecuente liberación dentro del apoplasto interfacial por un mecanismo exocitótico y una vez en el apoplasto, el amonio es potencialmente absorbido directamente por la planta (Sawers *et al.*, 2008).

2.2.4.2 Metabolismo de C en la micorriza

Como una simbiosis mutualista, el intercambio nutrimental es bidireccional, y si bien el hongo ayuda a tener disponibles algunos elementos que por sí sola la planta no podría tomar, el transporte de compuestos carbonados procedentes de la fotosíntesis de la planta huésped, son cedidos por ésta a nivel de las células corticales al hongo simbiote y de esta manera consigue el aporte requerido de C para su condición heterotrófica, que le permite completar su ciclo de vida (Bago *et al.*, 2004).

El metabolismo de los hongos micorrizógenos arbusculares se basa en la adquisición de hexosas fundamentalmente glucosa y fructosa la cual se realiza fundamentalmente por las hifas intrarradicales, para ser transportadas hacia el micelio extraradical (Becard *et al.*, 1993; Bago *et al.*, 2004). Una vez incorporada, la glucosa adquirida es utilizada por el hongo para obtener energía metabólica y poder reductor con los que pone en funcionamiento su maquinaria celular. Además de esto las hexosas adquiridas constituyen la concentración citoplasmática base de glucosa que en distintas macromoléculas actúan como despensas de C tamponando así su contenido en el citoplasma, la primera de ellas es la trehalosa, un dímero de glucosa típicamente fúngico, cuyo papel parece ser el de reservorio de glucosa a muy corto plazo, se está constante y rápidamente reciclando y no se transporta a lo largo de las

hifas fúngicas. El glucógeno, es el segundo reservorio de glucosa para el HMA el cual es, a mediano plazo, interconvirtiéndose menos rápidamente que la trehalosa y pudiendo ser transportado a lo largo de las hifas fúngicas, y por último y como reserva a largo plazo de C, la glucosa citoplásmica es convertida en glicerol y ácidos grasos que se agrupan en glóbulos lipídicos del hongo también llamados oleosomas, de los cuales depende el micelio extraradical para obtener su combustible metabólico así como para esporular ya que el 95 % del contenido de las esporas son lípidos neutros. La reserva de C también será utilizada para formar moléculas estructurales como la quitina, principal componente de la pared celular del hongo (Bago *et al.*, 2004; Sawers *et al.*, 2008; Bago *et al.*, 2000).

2.2.4.3 Control de enfermedades

Casi todas las plantas terrestres tienen simbiosis micorrícica. Schüßler y colaboradores. (2001) informó que la acción de HMA influye en la diversidad biológica de las plantas (y así, de toda la diversidad biológica terrestre), ayuda a controlar a parásitos y a la protección de las raíces del hospedero contra patógenos, desplazando de manera eficiente a otros organismos del suelo que pueden causar enfermedades (Hernández-Montiel y Escalona, 2007).

Las asociaciones micorrícicas reducen los daños causados por patógenos, especialmente cuando estos son causados por hongos o nematodos, mejora la resistencia o tolerancia en raíces, pero difiere en cada cultivo, no es efectiva para todos los patógenos, la protección de enfermedades es modulada por el suelo y las condiciones ambientales, por lo tanto la interacción entre los diferentes hongos y los patógenos de la planta varían con el hospedero y el sistema de cultivo, Controlando Oomicetes, como *Phytophthora solanacearum* en eucalipto, *P. parasítica*, *P. capsici* (Ozgonen y erkilic, 2007; Pozo *et al.*, 2002; Trotta *et al.*, 1996; Akhtar y Siddiqui, 2008) y *P. cinnamomi* en aguacate (Mataré y Hattingh, 1978). Miembros de HMA de las familias *Gigasporaceae*, *Acaulosporaceae*, y *Glomaceae* han mostrado controlar el ataque de virus del mosaico amarillo del tabaco, tristeza del cítrico (Lingua *et*

al.,2002; Shaul *et al.*, 1999; Nemeč y Myhre, 1984), nematodos (aktar y siddiqui *et al.*, 2008), hongos como *Fusarium*, *Aphanomyces*, *Rizoctonia* y fitoplasmas controlados por *G. intraradices* en árboles de pera (García-Chapa *et al.*, 2004).

Las razones por las que se reduce el daño por las enfermedades producidas por patógenos es principalmente por el cambio en la morfología de la raíz, principalmente en un incremento de la superficie de la raíz, se observó el incremento de la lignificación en células endodérmicas en tomate y pepino reduciendo el ataque por *Fusarium*, reportándose posteriormente un efecto similar en cebolla (Becker 1976; Dehne *et al.*, 1978), así mismo estudios histopatológicos de los nódulos en raíces causadas por el nematodo *M. incognita*, mostraron que las plantas micorrizadas tienen menos células grandes, necesarias para el desarrollo de las larvas de nematodos (Siddiqui,2008). Cordiery colaboradores (1998), demostraron que el control de *P. parasítica* en raíces de tomate micorrizados involucra la inducción de resistencia en células que contienen un arbusculo ya que observaron que dos organismos no colonizan la misma raíz. La diferenciación que hace la planta entre un hongo micorrizógeno arbuscular y un patógeno principalmente se da en la respuesta de defensa ya que al establecerse una asociación micorrícica algunas proteínas son sintetizadas sólo localmente y poco acumuladas durante este proceso y regularmente son distribuidas alrededor de la hifa, no así con el desarrollo de la hifa de un patógeno (Siddiqui, 2008).

Estudios han reportado mejora en la sobrevivencia de plantas micorrizadas en situaciones de estrés (Kempa *et al.*, 2007; Bomsa y Vyn, 2008). Vidal y colaboradores (1992) reportaron un estudio en plantas de aguacate obtenidas *in vitro* en donde mostraron una respuesta favorable a la inoculación con *Glomus fasciculatum* para la aclimatación de plantas *in vitro* ayudándolas a tolerar el estrés ambiental del trasplante. La presencia de hongos formadores de micorriza, acelera también, la aclimatación de plantas de aguacatero *in vitro* (Vida *et al.*, 1992)y, mejora la agregación del suelo, gracias a la penetración de las hifas del hongo y la segregación

de glomalina, sustancia que actúa como una goma en la profundidad de los suelos formando agregados, estos polisacáridos se adhieren a los micro agregados de suelo, el cual se vuelve más aireado y poroso (Olalde y Aguilera, 2007; Alarcón *et al.*, 2001; Miller y Jastrow, 2000), se sabe que la presencia de HMA incrementa el número de flores por planta y promueve el aumento del peso fresco de la raíz en *Tagetes erecta* y resultados similares se conocen en *Zinnia elegans*. (Aboul-Nasr, 1996).

2.3 HMA y aguacatero

2.3.1 Nutrición en aguacate

Los suelos donde se produce el aguacate en el mundo generalmente son muy jóvenes, de fácil drenaje, friables, ligeros, y debido a estas características son también de baja fertilidad natural. La forma tradicional de suministrar elementos nutritivos que el suelo no puede proporcionar al cultivo del aguacate es a través de la aplicación de fertilizantes al suelo o vía foliar. El aguacate es, hasta cierto punto, un cultivo rustico, y de los elementos más demandados para este cultivo es el potasio y el nitrógeno, seguido del fosforo y, en Michoacán, las huertas donde se cultiva aguacate son pobres en nutrimentos (Téliz y Mora, 2007).

Siendo un cultivo con raíces superficiales carente de tricoblastos, lo cual limita su área de absorción el uso de HMA en simbiosis con las raíces de planta de aguacate juega el rol de los pelos radicales aumentando el área de absorción y mejorar la disponibilidad de los nutrientes en la solución del suelo para su traslocación a la planta (Ginsburg y Avizohar-Hershenson, 1965) Mengue en 1980, reportó que inoculando aguacate de vivero con *G. fasciculatum* el crecimiento de la planta fue mayor al aumentar la absorción de N, P y Cu en comparación con las plantas a las que se aplicó fertilización y un resultado similar obtuvieron Jaizme-Vega y Azcón en 1995 al inocular aguacate obtenido de micropropagación con *G. fasciculatum*.

2.3.2 Especies de HMA identificadas morfológicamente en la franja aguacatera de Michoacán.

En 1990, Hass y Mengue caracterizaron HMA en huertos de aguacate en suelos de Israel y California. En México, en particular en el estado de Michoacán, el grupo de trabajo de hongos micorrizógenos arbusculares de la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, han realizado estudios sobre la presencia y caracterización morfológica de HMA en huertos de Aguacate de Michoacán Bárcenas y colaboradores(2006) reportaron la caracterización de 29 especies de 3 familias de HMA en huertos de Aguacate y 11 morfoespecies mas fueron reportadas por Bárcenas para la franja aguacatera de Michoacán, así como el efecto de mejoradores de suelo sobre la diversidad de HMA en huertos de aguacatero (Bárcenas, 2008); el impacto del tipo de manejo (orgánico y convencional sobre la diversidad de microorganismos (Aguirre, 2009). Posteriormente se reportaron 49 morfoespecies de HMA de los ordenes Glomerales, Diversisporales y Archaeosporales, de siete familias y de los siguientes géneros *Glomus* (9), *Sclerocystis* (5), *Gigaspora* (3), *Scutellospora* (10), *Racocetra* (2) *Acaulospora* (15), *Entrophosphora* (1), *Pacispora* (1) *Archaeospora* (1) y *Ambispora* (2) (Bárcenas *et al* 2008) y en 2010 se propagaron ocho de esas especies en cultivos monoespecíficos utilizando sorgo (*Sorghum vulgare* Pers.) como planta trampa (Bárcenas *et al.*, 2010).

2.3.3 Investigación molecular de HMA en aguacate y otros cultivos

Una de las mayores dificultades que enfrenta la caracterización bioquímica y genética de los hongos Phylum Glomeromycota, ha sido su naturaleza biotrófica obligada, lo cual dificulta su cultivo en condiciones de laboratorio. Esta limitante se ha superado en parte con el desarrollo de los cultivos monoxénicos de raíces transformadas (Ri T-DNA) de alfalfa, jitomate, fresa, pero principalmente de zanahoria (Bago y Cano, 2005). Desde principios de 1990 los estudios moleculares de los HMA mostraron un rápido crecimiento, profundizando cada vez mas en el

conocimiento de la micorriza, enfocados principalmente en estudios de filogenia. La primera secuencia genómica de HMA reportada fue la subunidad pequeña (SSU) rRNA y el rDNA que comprende el ITS1, 5.8S e ITS2 posicionados entre las regiones 18S y 28S, este gen está sumamente conservado, además por medio de la amplificación y comparación de ITS, es posible la identificación de HMA en su ambiente natural, sean esporas en suelos o estructuras en raíces micorrizadas (Rodríguez, 2004; Gamper, 2007; Redecker, 2000). Sin embargo, se han realizado estudios con base en la relación de la SSU y la sub unidad grande (LSU) mostrando que Los hongos micorrizógenos presentan alta variabilidad genética inter- e intra-específica, en secuencias de *Glomus spp* obtenidas de cultivos trampa pero formando un grupo homogéneo cuando se incluye una secuencia de *G. intraradices*. Lo anterior muestra la importancia de analizar tanto la región SSU y LSU cuando de filogenia se trata ya que se requiere de un alto cuidado para evitar contaminantes en las secuencia (Dalpé *et al.*, 2005), por lo que se han desarrollado numerosos estudios comparativos de la secuencia nucleotídica del DNA ribosomal nuclear (rDNA), a través de amplificación por PCR y secuenciación. , lo cual ha permitido un fácil diseño de oligonucleótidos o cebadores universales o de amplio espectro para gran cantidad de especies y cebadores para amplificar rDNA de grupos específicos de organismos, sin embargo, Redecker (2000) mostró que uno de los principales problemas para la identificación de HMA dentro de raíces presenta algunas dificultades al utilizar oligonucleótidos específicos para una sola especie de HMA, ya que las raíces son colonizadas por diferentes HMA a la vez, pero esta limitante se reduce cuando se usa oligonucleótidos específicos para grupos de los Glomales, los cuales pueden después separarse por clonación de productos de PCR (Redecker *et al.*, 2003)., potencializando la posibilidad de identificar especies de HMA dentro de raíces (Van Tuinen *et al.*, 1998; Redecker *et al.*, 2003).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Descripción del material vegetal y los sitios de muestreo

Se utilizaron árboles de huertos comerciales de aguacate (*Persea americana* Mill.) var. Hass de más de 14 años de edad, ubicados en cuatro localidades del municipio del Uruapan, Michoacán (Figura 5), dentro de las coordenadas 19°24' de latitud norte y 102°03' de longitud oeste, a una altura de 1 600 a 1 800m.s.n.m. (INEGI, 1985). En cada localidad, dos huertos fueron elegidos por situarse en condiciones edafoclimáticas similares, ubicaciones geográficas paralelas pero presentar condiciones de manejo contrastantes, uno con el modelo de tipo convencional y el otro orgánico (Gutiérrez-contreras *et al.*, 2010; INEGI, 2011).

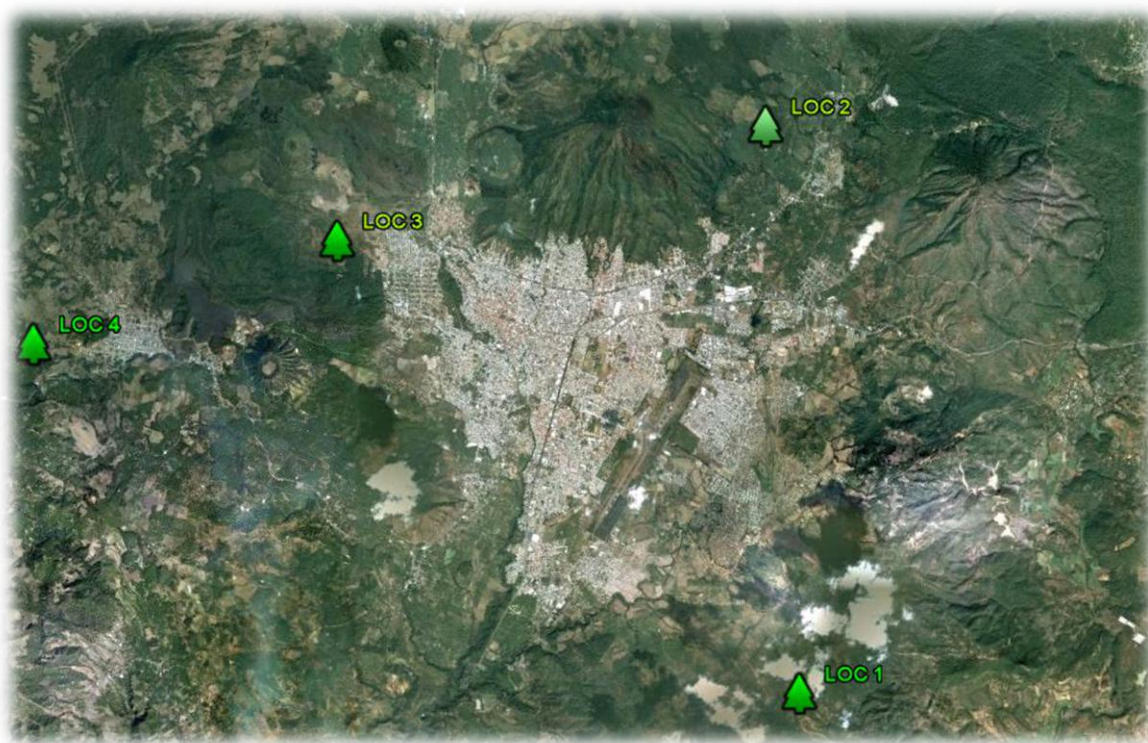


Figura 4.Ubicación de las localidades de muestreo LOC1) Pertenece a la ubicación de los huertos El puerto y el puerto del huizache de la localidad de Santa Rosa; LOC2) Huertos Huitzicho y la mesa de la localidad de Toreo el Bajo; LOC3) Huertos el Parque y el Parque convencional ubicados en el Parque Nacional de Uruapan; LOC4) Huertos. Imagen adaptada de Keyhole, Inc. y Google, 2011

3.1.1 Descripción de los huertos con manejo orgánico

3.1.1.1 Huerto "El Puerto"

El huerto "El Puerto", es propiedad del Sr. Antonio Guillén Rodríguez, tiene una superficie de 8 ha y está ubicado en las coordenadas 19°21 latitud norte y 102°01 longitud oeste en la localidad de Santa Rosa municipio de Uruapan, a una altura de 1680 msnm, presenta clima semicálido subhúmedo con lluvias en verano. La textura del suelo es migajón arenosa, su pH es ligeramente ácido (6.4 a 6.6). Los árboles fueron establecidos hace 31 años bajo un sistema de plantación en tres bolillo, a 10 m de distancia entre calles e hileras, lo cual permite la entrada de suficiente luz, cuenta con sistema de riego por microaspersión. Para el buen manejo este aplican biodigestadores, compostas, lombricompostas una vez al año, se utiliza control biológico con organismos como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium*, *Bacillus thuringiensis* para el control de plagas y enfermedades, el control de malezas se realiza manual y mecánico. El huerto está certificado por BIOAGRICERT (A. Guillén, comunicación personal, 16 de agosto de 2010).

3.1.1.2 Huerto "La mesa"

El huerto "La mesa" es del Sr. Luis Fernández Bravo, tiene una superficie de 5 ha y está ubicado en las coordenadas 19°27 latitud norte y 102°00 longitud oeste en la localidad de Tereo el bajo de Uruapan, a una altura de 1800msnm, presenta un clima templado subhúmedo con lluvias en verano. La textura del suelo es franco topure, su pH es ácido (5.8). Los árboles fueron establecidos hace 30 años bajo un sistema de plantación marco real, a 9 m de distancia entre calles e hileras, lo cual permite la entrada suficiente de luz cuenta con sistema de riego por microaspersión, Para el buen manejo se aplica roca fosfórica 5kg/árbol, estiércol 160kg/ha, lombricomposta 80kg/ha, lixiviados de lombriz y algas marinas. En el control de plagas y enfermedades se aplica *Beauveria bassiana*, *Metarhizium*, aceites y

extractos, el control de malezas se realiza mecánicamente. Es un huerto certificado por BIOAGRICERT (R.Fernández, comunicación personal, 23 de agosto de 2010).

3.1.1.3 Huerto "Milpillas"

El huerto "Milpillas" es propiedad de Agrotecnología orgánica SPR de RL, tiene una superficie de 36 ha y está ubicado en las coordenadas 19°24' latitud norte y 102°08 longitud oeste en la localidad de Nuevo San Juan Parangaricutiro a una altura de 1950 msnm presenta clima templado húmedo con abundantes lluvias en verano. La textura del suelo es franco arenoso, su pH es ligeramente ácido, los árboles fueron establecidos hace 40 años bajo un sistema de plantación marco real a 10 m de distancia entre calles e hileras se riega bajo condiciones de temporal. Para su buen manejo, se realiza la aplicación de compostas maduras y lóbricompostas; fermentos como biotes, compostas aeróbicas, enmiendas al suelo, realizando aplicación de tierras como leonarditas, tierra de atomila, dolomita, basalto, carbón vegetal, zeolita, y cal agrícola, se le realiza poda de clareo y se usa una vez al año caldo bordelés ligero (2kg/100 de agua) una vez al año para el control de plagas y enfermedades complementándose con control biológico. El control de malezas se realiza dos veces al año después de lluvias. Es un huerto certificado para exportación por USDA, GAP BPA SENASICA, BIOAGRICERT (A. Audrifed, comunicación personal 30 de agosto de 2010).

3.1.1.4 Huerto "El Parque"

El huerto "El Parque" se localiza en la reserva ecológica del Parque Nacional Barranca del Cupatitzio, en las coordenadas 19°25 latitud norte y 102°05 longitud oeste en la localidad de Uruapan está a una altura de 1750 msnm. Presenta un clima semicálido húmedo con lluvias en verano, establecido bajo condiciones de temporal, inicialmente en este huerto, se aplicaba agroquímicos en exceso, sin embargo hace aproximadamente 10 años se le dio inicio como huerto orgánico, aunque en la

actualidad, este huerto está prácticamente abandonado (Aguirre, P.S., comunicación personal, 6 de septiembre de 2010).

3.1.2 Descripción de huertos con manejo convencional

3.1.2.1 El puerto del Huizache

El huerto "puerto del huizache" es propiedad del Sr José Ruiz Ambríz, tiene una superficie de 5 ha y está ubicado en las coordenadas 19°21 latitud norte y 102°01 longitud oeste en la localidad de Santa Rosa municipio de Uruapan, a una altura de 1680 msnm. Presenta clima semicálido subhúmedo con lluvias en verano. La textura del suelo es franco arenosa, su pH es ligeramente ácido, los árboles fueron establecidos hace 30 años bajo un sistema de plantación tres bolillo a 10m de distancia entre calles e hileras bajo un sistema de microaspersión. Para el buen manejo se aplican orgánico de res y triple 18, así como para el control de plagas y enfermedades se aplica caldo bordeles en una proporción de 1:100 así como la aplicación de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium*. Es un huerto certificado por USDA-APEAM-SAGARPA (J. Ruíz, comunicación personal, 16 de agosto de 2010).

3.1.2.2 El Huitzicho

El huerto "Huitzicho" es propiedad del Sr, Vicente Bravo Ávila, tiene una superficie de 22 ha y está ubicado en las coordenadas 19°27 latitud norte y 102°00 longitud oeste en la localidad de Toreo el Bajo, Uruapan, a una altura de 1800 msnm, tiene un clima templado sub húmedo con lluvias en verano La textura del suelo es franco topure, su pH es ácido (5.8). , Los árboles fueron establecidos hace 40 años bajo un sistema de plantación 3 bolillo a 9 y 10m de distancia entre calles e hileras son árboles de copa frondosa bajo condiciones de temporal. Para el buen manejo se aplica 150kg de estiércol cada dos o tres años, triple 17 una vez por año 10kg/árbol. El control de plagas y enfermedades se realiza con agroquímicos autorizados dentro

del cuadro básico de plaguicidas permitidos para México, por organizaciones como: APEAM, comité estatal de sanidad vegetal, UDECAM, J.L.S.V. y Empresas de Agroquímicos; se realizan podas y quemas del material enfermo o infectado. El control de maleza se realiza mecánicamente usando una desbrozadora. Es un huerto certificado para exportación por USDA, SAGARPA, APEAM (C. Bravo, comunicación personal, 23 de agosto de 2010) .

3.1.2.3 Santa Mónica

El huerto "Santa Mónica" es atendido por el Ing. Benjamín Torres tiene una superficie de 5 ha y está ubicado en las coordenadas 19°24 latitud norte y 120°08 longitud oeste en la localidad de Nuevo San Juan Parangaricutiro, con una altura de 1950 msnm presenta clima templado húmedo con abundantes lluvias en verano, La textura del suelo es franco arenoso su pH es ligeramente ácido. Los árboles fueron establecidos hace 40 años bajo un sistema de plantación marco real 10 m entre calles e hileras, establecido bajo sistema de microaspersión, Para el buen manejo del huerto se realizan tres aplicaciones al año divididas en proporción 3:2:0.5 de la formulación recomendada de NPK y el control de maleza se realiza con herbicidas (T. Benjamín, comunicación personal 30 de agosto de 2010).

3.1.2.4 El Parque Convencional

El huerto de "el Parque" es propiedad del Sr. Antonio Lagunas Ángel con una extensión de 4 ha, edad de los árboles de 5 años, está ubicado en las coordenadas 19°25 latitud norte y 102°05 longitud oeste en la localidad de Uruapan ubicada a 1740 msnm presenta clima semicálido húmedo con lluvias en verano, establecido sistema de microaspersión., para su buena producción utilizan, fertilizantes químicos, insecticidas, fungicidas y herbicidas que son comunes en la producción de aguacate en Michoacán (L. Antonio, comunicación personal, 6 de septiembre de 2010)

Cuadro3. Huertos muestreados en las diferentes localidades de Uruapan, Michoacán México

H	NOMBRE DEL HUERTO	MANEJO	CONDICIONES DE RIEGO	CLIMA	LOCALIDAD
1	El puerto	Orgánico	microaspersión	A C (w2)(w)	Santa Rosa
2	Huizache	convencional	microaspersión	A C (w2)(w)	Santa Rosa
3	La mesa	Orgánico	microaspersión	C(w1)(w)	Toreo el bajo
4	Huitzicho	Convencional	Temporal	C(w1)(w)	Toreo el bajo
5	Milpillas	Orgánico	microaspersión	C(m)(w)	San Juan nuevo
6	Santa Mónica	convencional	microaspersión	C(m)(w)	San Juan nuevo
7	El Parque	Orgánico	Temporal	(A)C(m)(w)	Uruapan
8	El Parque	Convencional	microaspersión	(A)C(m)(w)	Uruapan

3.2 Muestreo del material biológico

En cada huerto se colectaron raíces de tres árboles adultos, se tomaron dos muestras de raíz de cada árbol, una con orientación N-S y otra E-O. La colecta se realizó bajo la zona de goteo del árbol, se seleccionó sólo el extremo terminal de las raíces jóvenes. Cada muestra se colocó en una bolsa de polietileno con suelo del mismo árbol y se transportaron en un recipiente térmico con hielo para mantener una temperatura cercana a 4 °C durante su traslado hasta los laboratorios de Interacciones Planta-Ambiente y de Bromatología en donde se procesaron para tinción de raíz y para la obtención de DNA.

3.3 Tinción de raíz

Las raíces se lavaron con agua corriente, se eliminó el exceso de agua, se cortaron en segmentos de aproximadamente 1cm, y se secaron en charolas de aluminio en una estufa a 50°C durante 10 h.

Una vez secas las raíces se colocaron en frascos y se realizó la tinción con modificaciones al protocolo propuesto por Phillips y Hayman (1970). Las modificaciones que se le hicieron al protocolo fueron básicamente en las concentraciones de reactivos (Cuadro 4) así se adicionó KOH 15 % y se colocó a 15lb por 15 min, lavándose posteriormente con agua corriente, se agregó H₂O₂ al 3 % (agua oxigenada comercial) durante 15 min a temperatura ambiente, se lavó con

agua corriente, una segunda decoloración con H₂O₂ al 3 % por 20 min, lavándose con agua corriente, adicionar HCl 1 %, durante 5 min decantar sin lavar. Se adicionó azul de tripano 0.05 % en acetoglicerol, colocándose a 15lb durante 10min.

3.4 Evaluación de la colonización de raíces colectadas

Las raíces teñidas se montaron en portaobjetos en grupos de tres segmentos de raíz, con tres repeticiones de cada muestra, con una gota de acetoglicerol y se observaron en un microscopio óptico de objetivos y un microscopio electrónico de barrido marca JEOL JMS-6480LV de INCAx-sight Oxford instruments, cuantificándose las estructuras características de la simbiosis micorrícica (vesículas, arbusculos e hifas) presentes en las raíces montadas.

La cuantificación de estructuras propias de HMA en el sistema radical se determinó con el método reportado por Biermann y Linderman (1981) el cual permite una mejor estimación de las estructuras micorrícicas presentes en los segmentos de raíces colectadas, ya que consiste en observar las raíces teñidas por barridos completos bajo microscopio compuesto y detectar las estructuras características de la simbiosis micorrícica arbuscular, se cuantifican por presencia dentro del campo de observación del microscopio. Se registraron estructuras como vesículas, arbusculos e hifas, pero para los análisis estadísticos y de estimación de colonización, se tomaron en cuenta sólo los arbusculos, ya que estos son una referencia de la actividad del hongo dentro de la planta, los datos obtenidos se sometieron al programa MycoCalc, reportado por Trouvelot y colaboradores (1986), que permite determinar la intensidad de la colonización y la abundancia en el sistema radical. Además, se realizó un análisis de comparación de medias de las dos poblaciones de cada localidad de colecta, usando muestras pareadas para determinar la influencia del manejo en el desarrollo de las estructuras formadas por los hongos micorrizógenos en raíces de aguacatero (George *et al.*, 1999).

Cuadro4 Optimización del protocolo de tinción de raíces de aguacatero. Condiciones de seis ensayos realizados y el resultado de la visualización al microscopio.

Decoloración	clareo	acidificación	Coloración	Visualización microscopio	Des tinción
KOH 10% 15lb/10min.	H2O2 alcalino 10-20 min	HCl 1% 3-5 min	Azul tripan 0.05% en acetoglicerol	No	acetoglicerol
KOH 15% 15lb/10min.	H2O2 alcalino 10-20 min	HCl 1% 3-5 min	Azul tripan 0.05% en acetoglicerol	No	acetoglicerol
KOH 15% 15lb/15min.+ KOH 15% 15lb/10min	H2O2 alcalino 10-20 min	HCl 1% 3-5 min	Azul tripan 0.05% en acetoglicerol	SI	acetoglicerol
KOH 15% 15lb/15min.	H2O2 3% 10- 20 min	HCl 1% 3-5 min	Azul tripan 0.05% en acetoglicerol	No	acetoglicerol
KOH 15% 15lb/10min.	H2O2 3% /20 min+H2O2 3%/20min	HCl 1% 5 min	Azul tripan 0.05% en acetoglicerol	SI	acetoglicerol
KOH 15% 15lb/10min.	H2O2 3% /20 min+H2O2 3%/20min	HCl 1% 5 min	Tinta china	No	acetoglicerol

3.5 Obtención de DNA

Se perfeccionó la técnica de extracción, previamente utilizada en nuestro grupo de trabajo, utilizando la combinación de un protocolo basado en el uso de CTAB con modificaciones de Khan y colaboradores en 2007 (3 % CTAB, 4 % β -mercaptoethanol, 2 M NaCl y 5 % PVP), lo cual permite eliminar metabolitos secundarios y polisacáridos de las muestras procesadas (Khan *et al.*, 2007) y el kit Illustra™. El protocolo final consistió en moler el tejido en un mortero estéril con nitrógeno líquido, colocar aproximadamente 50 mg de tejido en un tubo Eppendorf y adicionar el amortiguador de extracción de CTAB, mezclar hasta homogenizar, centrifugar por 10 min a 13000 rpm, colocar el sobrenadante en un tubo limpio. A continuación se adicionaron 500 μ l de *solución de lisis 2* (kit Illustra), la mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se vertió la mezcla en las columnas de purificación del kit, colocadas previamente sobre un tubo colector, se centrifugó a 13 000 rpm y desecharon las soluciones de lavado contenidas en el tubo colector, se agregaron 500 μ l de solución de lavado, se

centrifugó durante 15 min y se transfirió la columna a un tubo Eppendorf estéril. Se adicionaron 100 µl de solución amortiguadora de elusión, precalentada a 70 °C durante 5 min, se dejó a temperatura ambiente por 10 minutos y centrifugó a 13 000 rpm durante 1 min para colectar el DNA eluido. El producto obtenido se observó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 %.

3.6 Análisis moleculares de HMA colonizando raíz de aguacatero

3.6.1 PCR anidado a partir de DNA de raíces de aguacatero

El PCR anidado consistió en una primera ronda de amplificación con DNA total de raíz de aguacatero como blanco y oligonucleótidos universales para la amplificación de rDNA de hongos (NS5 e ITS 4; Figura 6A), seguido por una segunda ronda de amplificación en la que se utilizó como DNA blanco el producto del primer PCR, con juegos de oligonucleótidos diseñados para la amplificación de cinco grupos de HMA, anclados dentro de la secuencia del primer producto de PCR (Figura 6B). La secuencia de los oligonucleótidos utilizados se muestran a en el Cuadro 5 (Redecker, 2000).

En la primera reacción de PCR se utilizaron aproximadamente 100 ng de DNA total, dNTPs 200 µM, MgCl₂ 2 mM, oligonucleótidos NS5 e ITS 4 (White *et al.*, 1990) 20 pmol/µL c/u, *Taq* polimerasa 0.1 U/µL y amortiguador de reacción, de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Invitrogen). Las condiciones de amplificación fueron 94°C durante 1 min, 30 ciclos de 94°C/30 seg; 51°C/30 seg; 72°C/1 min, seguidos por 72°C durante 10 min como sugiere Redecker (2000; 2003)

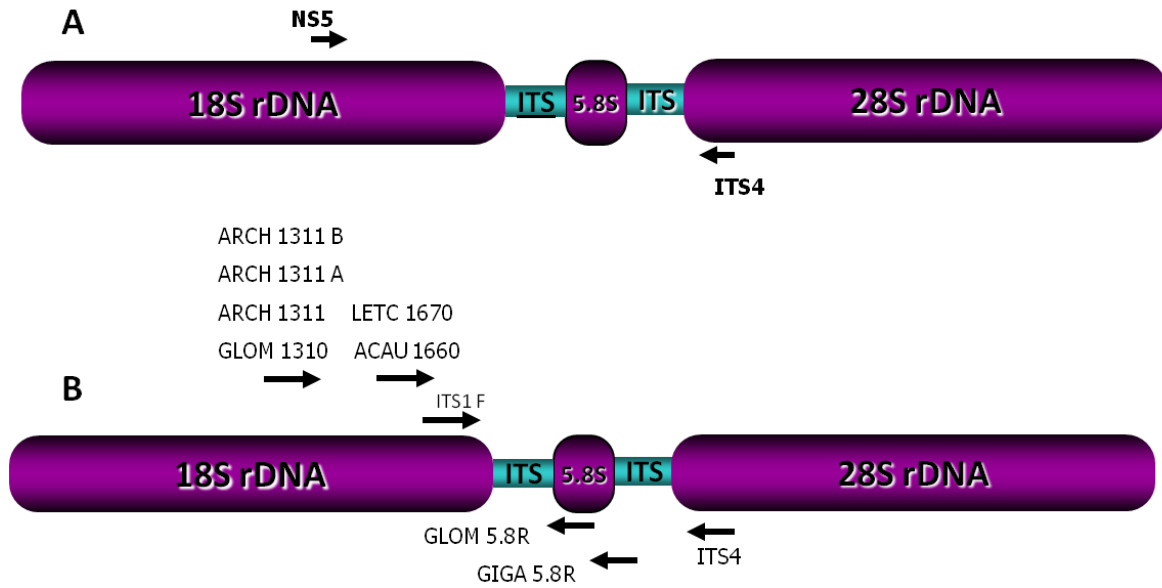


Figura 5. Esquema de ubicación de oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR anidado para identificar rDNA de HMA. **A.** Los Oligonucleótidos NS5 e ITS4 utilizados en la primer reacción de amplificación los juegos **B.** GLOM 1310/GLOM 5.8, ITS 1F/ GIGA 5.8R, ARCH 1311; 1311A; 1311B/ITS4, ACAU 1660/ITS4 Y LETC se aplicaron para las reacciones de PCR anidado (Redecker, 2000).

En una segunda etapa de PCR se utilizaron las mismas concentraciones de reactivos pero como DNA blanco se utilizó 1 a 2 µl del producto de la primera reacción de PCR. Los oligonucleótidos GLOM1310 y GLOM5.8R fueron usados para amplificar DNA de un grupo de *Glomus*(Figura 6B); ITS1F Y GIGA 5.8R, para *Gigasporaceae*; ACAU 1660, ARCH1311, ARCH1311A, ARCH1311B para un grupo de *Acaulosporaceae*, *Archaeosporaceae* y *Paraglomaceae* y finalmente LETC1670 y LETC1677 para otro grupo de *Glomus* estos últimos en combinación cada uno con ITS4 los cuales fueron reportados por redecker (2000) y Redecker y colaboradores (2006).Las condiciones de amplificación fueron 94°C durante 1 min, 30 ciclos de 94°C/30 seg; 55 °C/1 min; 72°C/1 min, seguidos por 72°C durante 10 min. Los productos obtenidos se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Cuadro 5. Oligonucleótidos usados en PCR y PCR anidado para la determinación de grupos de hongos micorrizógenos asociados alas raíces del aguacatero.

ETAPA	NOMBRE DEL OLIGONUCLEOTIDO	SECUENCIA	TAMAÑO	AUTOR
I	ITS4	5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'	21	White <i>et al.</i> , 1990
	NS5	F 5' AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G 3'	22	White <i>et al.</i> , 1990
	ACAU 1660	F 5' TGA GAC TCT CGG ATC GG 3'	17	Redecker D., 2000
	ARCH 1311	F 5' TCG TAA ATA GCC AGG CTG Y 3'	19	Redecker D., 2000
	ARCH 1311 A	F 5' TGC TAA ATA GCT AGG CTG C 3	19	Redecker D., 2006
	ARCH 1311 B	F 5' TGC TAA ATA GCC AGG CTG T 3'	19	Redecker D., 2006
II	GIGA 5.8R	R 5' ACT GAC CCT CAA GCA KGT G 3'	19	Redecker D., 2000
	GLOM 5.8R	R 5' TCC GTT GTT GAA AGT GAT C 3'	19	Redecker D., 2000
	LETC 1670	F 5' GAT CGG CGA TCG GTG AGT 3'	18	Redecker D., 2000
	LETC 1677	F 5' CG GTG AGT AGC AAT ATT CG 3'	19	Redecker D., 2006
	GLOM 1310	F 5' AGC TAG GYC TAA CAT TGT TA 3'	20	Redecker D., 2000

En donde: Y= C o T y K= G o T

3.6.2 Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción RFLP

Para la determinación de la diversidad se hizo un primer acercamiento por análisis de restricción de los productos del PCR anidado, es decir polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción o RFLP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*), este análisis también permitió seleccionar amplicones para su secuenciación posterior como recomienda Helgason y colaboradores (1999) y Redecker (2000). Para ello se utilizaron dos enzimas de restricción **Hinf I** cuyo sitio de reconocimiento es 5'G/ANTC y **Mob I** con sitio de reconocimiento 5' /GATC y es isoesquizómero de *Dpn II*. La mezcla de reacción se llevó a cabo con aproximadamente 450 ng de producto de reacción de PCR, 0.02 U/ μ L de la enzima de restricción correspondiente y el amortiguador de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Invitrogen), se incubó durante 2 horas a 37°C. Los fragmentos de la restricción se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2.5%.

3.6.3 Clonación de fragmentos amplificados

Los productos de PCR a secuenciar se clonaron en el vector pCR 2.1 TOPO, (Invitrogen). Para la ligación se mezclaron 450ng/ μ L de producto de PCR, 0.4 μ L de solución salina (1.2 M NaCl; 0.06 M MgCl₂) del kit de ligación, 2ng/ μ L del plasmido y el amortiguador de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen). La mezcla de reacción se incubó a 16 °C durante 2 horas, se adicionaron 20 μ L de células quimiocompetentes, se mezcló cuidadosamente, se colocó en hielo 5 minutos y se incubó la mezcla a 42°C/30 segundos, se colocó en hielo y se adicionaron 200 μ L de medio LB y se incubó durante 1 hora a 37°C y se sembró la mezcla en placas de medio selectivo LB con kanamicina por el método extensión con varilla en forma de "L" y se incubó a 37°C durante 16 horas.

Para corroborar la inserción del producto de PCR en las clonas, se realizó una reacción de PCR de colonias Finalmente se realizó el análisis de clonas positivas por la técnica de PCR de colonias para corroborar si las clonas tenían el fragmento obtenido del PCR anidado.

PCR de colonias

Para confirmar la incorporación del plásmido clonado con el producto de PCR en las colonias desarrolladas en el medio selectivo se realizó una reacción de PCR con los oligonucleótidos M13F y M13R, para la amplificación del fragmento inserto en el vector pCR 2.1 TOPO. las condiciones de amplificación fueron 94 °C durante 2 min, 39 ciclos de 94 °C/15 seg; 55°C/15seg; 72°C/ 30 seg; seguido por 72 °C durante 10 min. los productos del PCR se separaron en geles de agarosa al 1 %. Las colonias en donde se confirmó la presencia de un inserto mayor a 200 pb seseleccionaron como clonas positivas para su posterior secuenciación (sambrook,J.*et al.*, 1989; Krueger *et al*/2009).

3.6.4 Obtención de DNA plasmídico

El DNA de las clonas positivas se obtuvo por el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly (1979), para lo cual cada colonia se incubó en 3 mL de medio LB líquido a 37 °C en agitación vigorosa durante 16 h. Se colocó 1.5 ml del cultivo bacteriano en un tubo Eppendorf, se centrifugó a 12 000 g durante 1 minuto. Se eliminó el sobrenadante por inversión y la pastilla se resuspendió en 100 µL de *solución I* fría, agitando vigorosamente. Se adicionaron 200 µL de *solución II* mezclando cuidadosamente por inversión, se centrifugó a 12 000 g por 5 minutos a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se adicionaron 10 µL de RNAsa 20mg/mL y se incubó por 5 min, se centrifugó a 12 000 g por 5 minutos, se recuperó el sobrenadante en un tubo Eppendorf nuevo y se centrifugó a 12 000 g por 5 min, evitando así el uso de fenol:cloroformo. El DNA se precipitó adicionando dos volúmenes de etanol absoluto e incubando 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 13 000 rpm por cinco minutos a 4 °C formándose pastilla, se eliminó el etanol por decantación, se adicionó etanol 70% y se llevó a vortex para eliminar sales de la pastilla, se centrifugó a 13 000 durante 5 min, se eliminó el etanol 70 % por decantación, el tubo se colocó en termomixer a 37 °C para secar la pastilla y posteriormente se re suspendió en 30 µL de agua destilada estéril.

3.6.5 Secuenciación y análisis de secuencias clonadas

El DNA obtenido de las clonas seleccionadas fue enviado para su secuenciación al Departamento de secuenciación del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del CINVESTAV-IPN Irapuato, Guanajuato, México.

Las secuencias recibidas de LANGEBIO se analizaron con el programa Geneious 5.4.2 versión de prueba realizando aproximadamente 300 alineamientos con el método de alineamiento de geneious y construcción de arboles filogenéticos por el método Neighbor-Joining, se utilizó el modelo de distancias genéticas Jukes-

Cantor para obtener un dendograma indicando la cercanía genética de las secuencias obtenidas de los aislados de raíz de aguacatero con las secuencias de HMA depositadas en con la base de datos NCBI (del inglés *National Center for Biotechnology Information*) por medio de un BLAST (del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*).

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Las raíces de aguacatero colectadas presentan micorrización.

Las modificaciones realizadas en este estudio, del protocolo por Phillips y Hayman (1970) fueron principalmente para obtener un clareo en raíces leñosas como las del aguacate. Estas modificaciones nos permitieron observar estructuras formadas características de la asociación de los hongos micorrizógenos arbusculares con raíces de plantas terrestres (Figura 7 a-d). Mostrando arbuscúlos (Figura 7 a,b y 6 C), vesículas (Figura 7 c y 6 B), hifas (Figura 7 c "h" y 6 A) e incluso algunas esporas (Figura 7d "E") de *G. intraradices*, ya que esta especie se caracteriza por formar esporas dentro de las raíces del hospedero (INVAM; Schenck y Smith, 1982), un resultado similar reportaron por primera vez para raíces de aguacatero Ginsburg y Avizonhar-Hershenson en 1965, en donde se observaron estructuras que describe como una hifa enrollada y otra ramificada lo cual coincide con los llamados arbuscúlos que se encontraron en nuestro estudio (Figura 7 a,b).

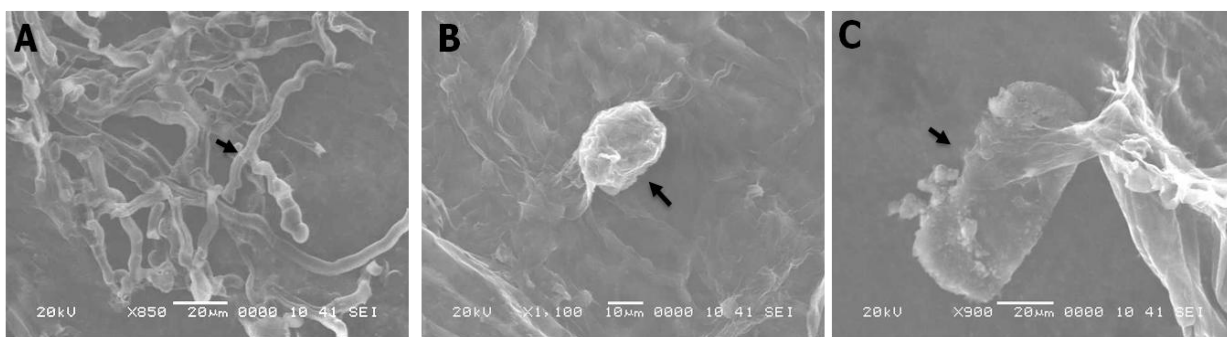


Figura 6. Estructuras formadas dentro de la raíz de aguacatero en la asociación micorrícica arbuscular fotografías tomadas con microscopio electrónico de marca JEOL JMS-6480LV de INCASIGHT Oxford instruments propiedad del Instituto Tecnológico Superior de Uruapan en donde A. hifas; B. vesícula; C. arbusculo

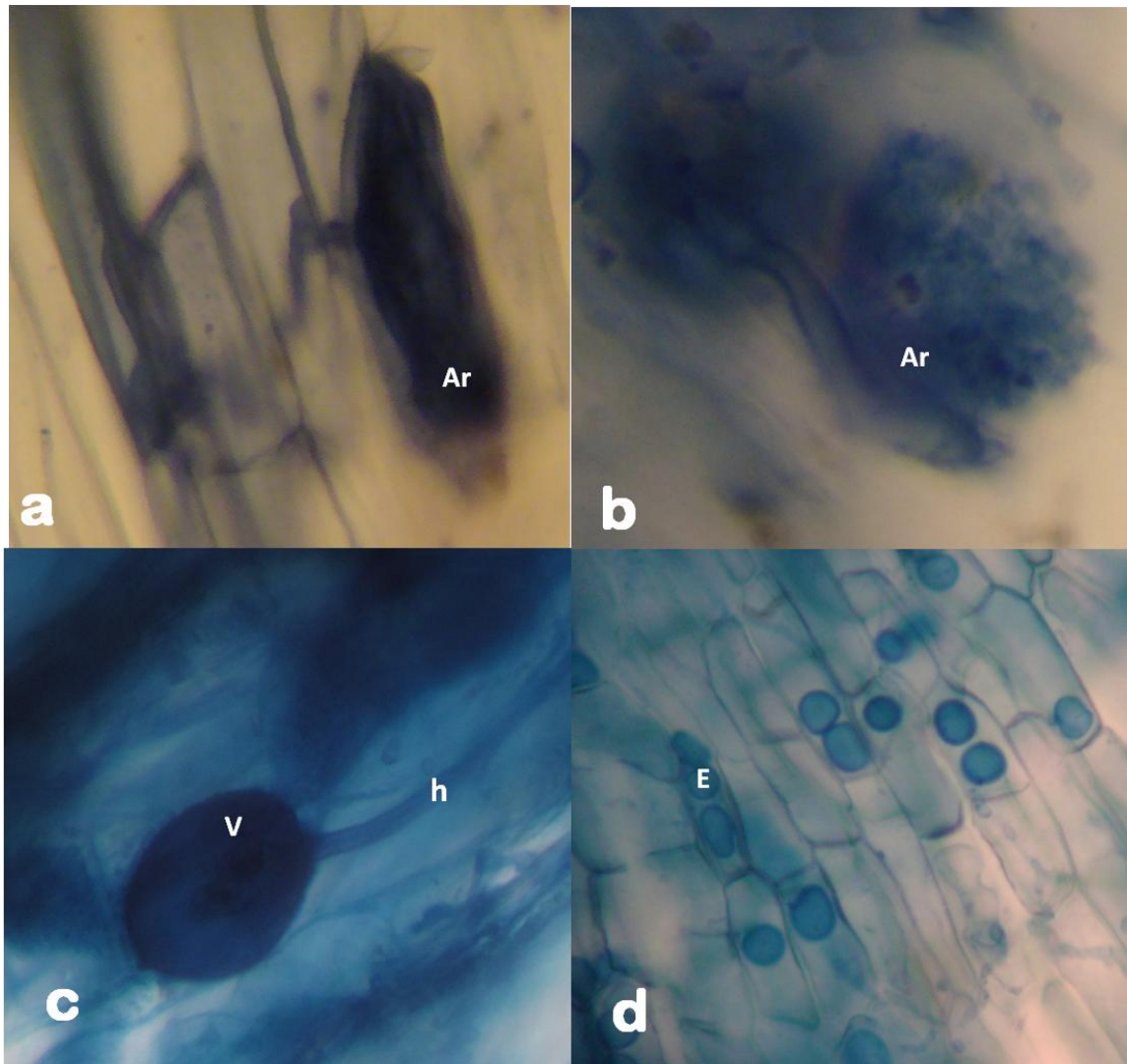


Figura 7. Estructuras formadas dentro de las raíces de aguacatero en la simbiosis micorrícica arbuscular. Observadas en microscopio compuesto a 40X y 100X en donde tenemos **a y b.** Arbúsculos (Ar); **c.** Vesículas (v); hifas (h); **d.** Esporas características de la especie *G. intraradices*

4.2 Evaluación del nivel de micorrización en las raíces colectadas

Con la verificación por barrido de las muestras de acuerdo a Biermann y Linderman(1981), observamos la presencia de simbiosis micorrícica a través de la identificación de estructuras intrarradicales propias de la simbiosis con HMA como vesículas (Figura 7c) y arbúsculos (Figura 7 a, b). Se estimó el nivel de micorrización con el programa MycoCalc, registrando la abundancia de arbúsculos en los segmentos

de raíces observadas y se reconoció que en las localidades de Santa Rosa (13.48 % orgánico y 10.53 % convencional), El Parque (36.59 % orgánico y 6.33 % convencional) y San Juan Nuevo (30.78 % orgánico y 3.59 % convencional), los porcentajes de la intensidad de colonización en el sistema radical (% M), fue mayor en los huertos bajo manejo orgánico que en los huertos bajo manejo convencional; sin embargo, en la localidad de Toreo el bajo la colonización estimada fue mayor en el huerto con manejo convencional (1.88 %) comparado con el 0.38% que presentó el huerto orgánico (Cuadro 6). Por otro lado, los análisis también mostraron que en los huertos bajo manejo orgánico de las localidades de Santa Rosa, El Parque y San Juan Nuevo, el porcentaje de la estimación de la abundancia de arbusculos en el sistema radical (% A), es mayor que en los huertos con manejo convencional, sin embargo, en los huertos de Toreo el bajo, el porcentaje de estimación de la abundancia de arbusculos fue mayor en el huerto con manejo convencional que en el orgánico (Cuadro 6).

Cuadro 6. Estimación del porcentaje de colonización por HMA en raíces de aguacatero con el programa MycoCalc

Localidad Manejo	% M		% A	
	orgánico	convencional	orgánico	convencional
Santa Rosa	13.48	10.53	5.25	3.65
Toreo el bajo	0.38	1.88	0.37	1.48
El Parque	36.59	6.33	0.24	0.05
San Juan Nuevo	30.72	3.59	5.4	0.07

% M= Estimación de la intensidad de la colonización en el sistema radical

% A= Estimación de la abundancia de arbusculos en el sistema radical

El número de arbusculos presentes en los segmentos de las raíces analizadas fueron también sometidos a un ensayo de comparación de medias de las poblaciones de las muestras pareadas, observando que para la localidad Santa Rosa y Toreo el

bajo no hubo diferencia estadística significativa entre muestras pareadas ($P < 0.05 \%$) en los tipos de manejo de los huertos (Figura 8 ver anexo 4 cuadro 1 y cuadro 2) Estos resultados podrían sugerir que el tipo de manejo de los huertos no influyen en la presencia de arbusculos, sin embargo, Lo anterior también podría deberse a que en huertos de la localidad de Santa Rosa y Toreo el bajo, a los huertos convencionales "Huitzicho" y El puerto se aplica cierta cantidad de estiércol y control biológico como parte de su manejo cada cierto tiempo. Por otro lado, en las localidades El Parque y San Juan Nuevo los resultados del análisis indican que hay diferencia significativa ($P < 0.05\%$) entre los manejos convencional y orgánico (Figura 9) respecto a la presencia de arbusculos en las raíces de aguacatero, siendo mayor la población de arbusculos en los huertos bajo manejo orgánico en comparación con el manejo convencional, lo cual nos dice que la variación podría deberse a que los huertos Santa Mónica y El Parque convencional para su buen manejo utilizan fertilizantes, herbicidas y fungicidas en comparación con los huertos "Milpillas" y El Parque los cuales son tratados únicamente con enmiendas orgánicas.

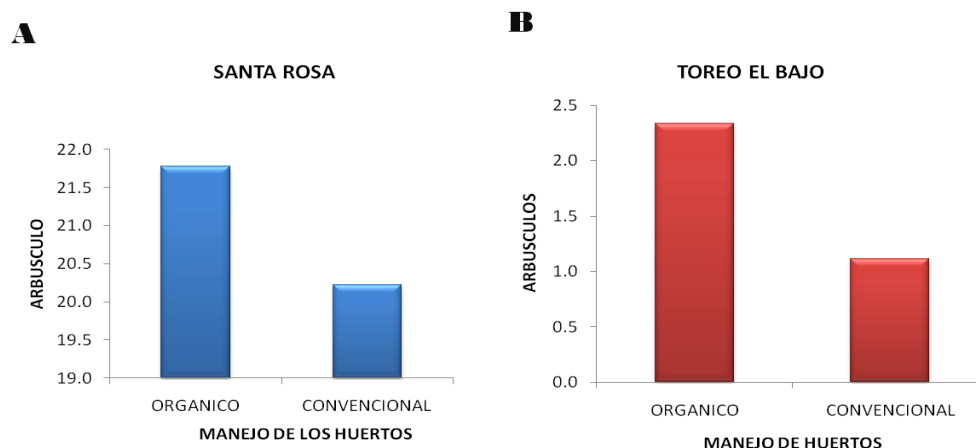


FIGURA 8. Frecuencia de la colonización por arbusculos de HMA en raíces de aguacatero de los huertos analizados por comparación de medias pareadas con significancia de 0.05 % de **A**) Localidad de Santa Rosa, Uruapan en donde el manejo orgánico pertenece al huerto "el Puerto" observándose mayor frecuencia de arbusculos presentes en raíces de aguacatero comparado con el huerto de manejo convencional "Huizache" de la misma localidad. , **B**) Localidad de Toreo el bajo el huerto bajo sistema orgánico "la mesa" presenta mayor frecuencia de colonización por arbusculos que el huerto con manejo convencional "Huitzicho" sin embargo no hay diferencia significativa entre manejos para la presencia de arbusculos en los diferentes huertos.

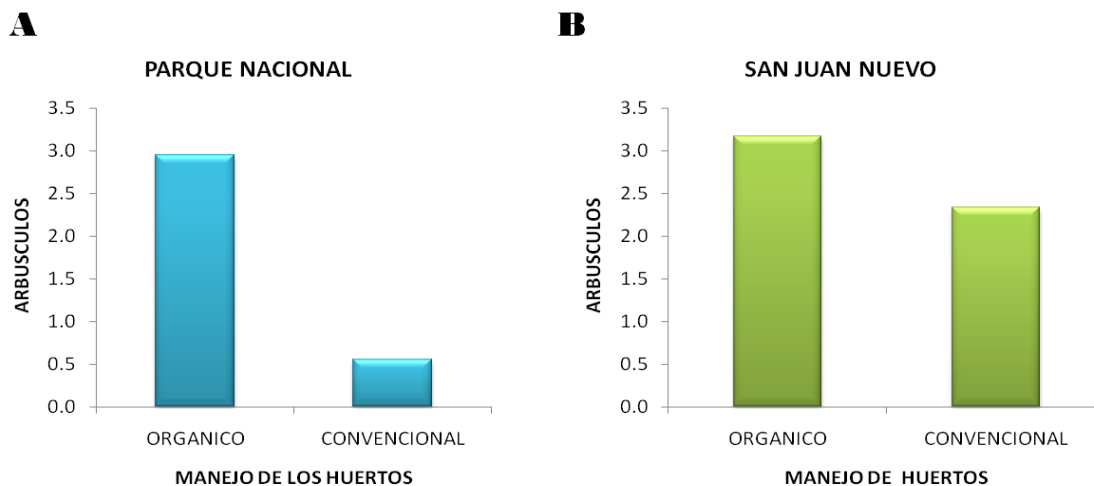


FIGURA 9. Frecuencias de arbusculos presentes en las raíces de aguacatero los gráficos muestran el análisis de comparación de medias 0.05 % de significancia **A)** localidad del Parque nacional en el huerto bajo manejo orgánico "El parque" se notó mayor presencia de arbusculos en comparación con el huerto "El parque convencional" mostrando que estadísticamente son diferentes **B)** en la localidad de San Juan Nuevo el huerto bajo manejo orgánico "Milpillars" de una manera similar presenta mayor frecuencia de colonización por arbusculos en raíces de aguacatero que en huerto bajo manejo convencional "Santa Mónica" y a su vez muestran diferencia estadística entre ellos.

En maíz se ha observado que el manejo orgánico produce una mayor actividad en los hongos micorrícicos arbusculares respecto al mismo cultivo en condiciones de manejo convencional (Douds, 1989); sin embargo, en el manejo convencional del aguacatero en la región de Michoacán se incluye el uso de enmiendas orgánicas como compostas, mientras que en el manejo orgánico puede incluirse el uso de bajas concentraciones de algunos compuestos químicos que están permitidos en este tipo de manejo, pero que pueden alterar la microbiota del suelo como lo es el sulfato de cobre, esta puede ser la razón de no encontrar diferencias estadísticas significativas en la abundancia de arbusculos entre los huertos pareados con condiciones de manejo distintas. Otras condiciones ambientales también pueden afectar la frecuencia de micorrización puede haber efecto de la época del año sobre las poblaciones de HMA, al respecto, se ha observado en maíz que esta variación podría deberse

principalmente a la época del año ya que Douds (1991) reporta que mientras en un cultivo orgánico en la época en la que se estima hay mayor presencia de material verde hay un 70 %, mientras que en un cultivo con manejo convencional solo llega a un 40 %. Sin embargo para evitar este posible efecto nosotros colectamos las diferentes muestras durante la misma época del año.

4.3 Optimización del protocolo para la obtención de DNA de raíz de aguacatero

Como se observa pese a las dificultades para el aislamiento de DNA de un tejido como el de la raíz de aguacate, con gran cantidad de compuestos fenólicos y azúcares, así como restos de materia orgánica y algunos otros componentes, la combinación del protocolo modificado por Khan *et al*, 2007 con base en CTAB y el uso del kit Illustra™ usado en este trabajo (Figura 10 A), nos permitió obtener DNA total de las muestras de raíces de aguacatero colectadas que, bajo las condiciones descritas en la metodología, fue de calidad y concentración suficientes para lograr amplificaciones adecuadas por PCR (Figura 10B).



Figura 10. Evaluación de protocolos para obtención de DNA de HMA de raíces de aguacatero y su amplificación por PCR **A)** evaluación de los protocolos para obtención de DNA total de raíz de aguacate (*Persea americana* Mill) carril (1-3); protocolo CTAB (1); kit Illustra (2); protocolo estandarizado para este estudio (3); marcador de peso molecular de 1kb (M). **B)** amplificaciones por PCR obtenidas de los protocolos evaluados de extracción de DNA protocolo CTAB (1); kit Illustra (2); protocolo estandarizado para este estudio (3)

4.4 Identificación de especies de HMA en raíces de aguacatero

El DNA aislado de las raíces de aguacatero nos permitió amplificar fragmentos de la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA de HMA por PCR anidado de acuerdo al protocolo y oligonucleótidos descritos por Redecker (2000) y Redecker (2006b).

4.4.1 las raíces de aguacatero colectadas presentan DNA de diversos grupos del Phylum Glomeromycota.

Las amplificaciones por PCR anidado para las muestras pareadas de cada localidad, bajo las condiciones descritas en materiales y métodos fueron adecuadas para la detección de grupos del Glomeromycota. En una primera reacción de amplificación se utilizaron los oligonucleótidos NS5 e ITS4 y las condiciones de amplificación descritas por Redecker (Redecker, 2000; Redecker *et al.*, 2003; Redecker, 2006), que fueron diseñadas para amplificar un fragmento de los rDNA de especies fúngicas (White *et al.* 1990). No en todas las muestras se observó un producto de amplificación detectable en el gel de electroforesis (Figura 11), ya que no siempre es observable la amplificación en la primera ronda (Redecker, 2000) sin embargo se continuó con el PCR anidado, a partir de todos los productos de la primera amplificación, independientemente de haber detectado o no amplificación en el gel de agarosa.

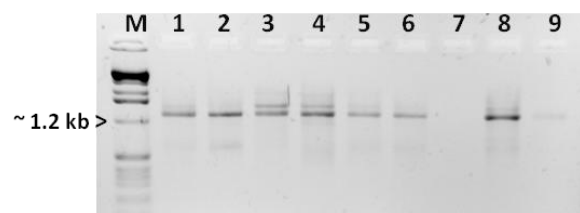


Figura 11 Primera etapa de PCR con los para detección de DNA fúngico utilizando los oligonucleótidos NS5 e ITS4 (1-9); marcador de peso molecular 1Kb el peso molecular de la banda es aproximadamente 1.2 Kb.

Las amplificaciones generadas por el PCR anidado a partir de los productos de la primera amplificación, con los cinco juegos de oligonucleótidos descritos para identificación de grupos de Glomeromycota, de acuerdo a Redecker (Redecker, 2000; Redecker *et al.*, 2003, Redecker, 2006b), mostraron amplicones de pesos moleculares entre 300 y 700 pb con distintos patrones, de acuerdo a lo esperado (Figura 12). En los cuatro huertos se obtuvieron amplificaciones con los oligonucleótidos diseñados para los grupos de *Glomus*, (Figura 12 a) *Acaulospora* (Figura 12 b), *Archaeospora* (Figura 12 d) y Gigaspora (Figura 12 b), sin embargo no todas las muestras de raíces presentaron amplificación para todos los grupos. El control negativo de amplificación para los grupos de Glomeromycota con todos los juegos de oligonucleótidos utilizados, a partir de DNA de órganos aéreos de aguacatero (yemas y hojas) no mostró productos de amplificación. Estos resultados sugieren que las raíces de aguacatero de los huertos comerciales establecidos en Michoacán presentan DNA distinto al de la especie vegetal y que las raíces de una misma planta pueden presentar DNA de distintos grupos de HMA.

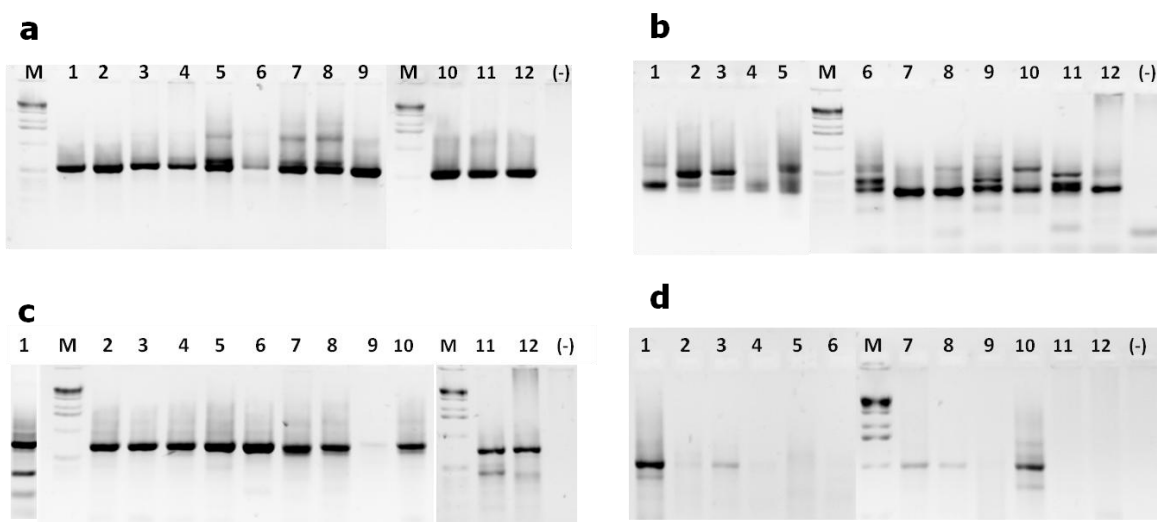


Figura 12. Amplificación selectiva de cuatro grupos de Glomeromycota a partir de DNA de aguacatero micorrizado. Los oligonucleótidos utilizados fueron: **a**, Glom 1310 y Glom 5.8R; **b**, ITS 1F y Giga 5.8R; **c**, ITS4 y ACAU 1660; **d**, ITS4 y Arch 1311. El DNA blanco pertenece a raíces de árboles de huertos bajo manejo orgánico (1-6), manejo convencional (7-12), yemas apicales de tejido aéreo de aguacatero (13). M, marcador de peso molecular de 1 kb.

En el Cuadro 7 se observa que de las 30 reacciones de amplificación ensayadas para las seis muestras de raíces de cada localidad por tipo de manejo 24 mostraron productos de amplificación en el huerto bajo manejo convencional de la localidad de Santa Rosa (LOC1). de las 24 reacciones, cinco fueron obtenidas con los oligonucleótidos GLOM 1310 y GLOM 5.8R, los cuales amplifican DNA del grupo donde se incluyen *Glomus mosseae*, *G. intraradices* y *G. versiforme*; cinco con el par GIGA 5.8R e ITS1F que amplifican *Gigasporaceas*; seis más con el juego de oligonucleótidos ACAU 1660 e ITS4, que están dirigidos a un grupo que incluye *Acaulosporaceae sensu A. stricto*; dos con ARCH 1311 en combinación con ITS4 que amplifican un grupo en donde incluye especies como *Archaeospora gerdemannii*, *A. trappei*, *Glomus occultum* y *Glomus brasilianum*; por último, con el par de oligonucleótidos LETC1670 e ITS4 que están diseñados para amplificar *Glomus etunicatum* y *Glomus claroideum* se obtuvieron seis

Para las muestras del huerto bajo manejo orgánico de la localidad de Toreo el Bajo (LOC2) se generaron un total de 16 reacciones de amplificación positiva, de las cuales seis se obtuvieron con los oligonucleótidos GLOM1310 y GLOM5.8R y con LETC1670 e ITS4; uno con el par GIGA5.8R e ITS1F, así como con ITS4 y ACAU1660; y dos con ARCH1311 e ITS4. En el huerto con manejo orgánico de la localidad de El Parque (LOC3) sólo se obtuvieron once reacciones con amplificación, de éstas, tres fueron con GLOM1310 y GLOM5.8R así como con GIGA5.8R e ITS1F y con ARCH1311 e ITS4; con ACAU1660 e ITS4 se obtuvieron dos, en esta localidad no obtuvimos amplificaciones evidentes con el juego de oligonucleótidos LETC1670 en combinación con ITS4. Finalmente, en el huerto orgánico de la localidad de San Juan Nuevo (LOC4) únicamente se obtuvieron tres reacciones con amplificaciones con GLOM1310 y GLOM 5.8R, para el resto de juegos de oligonucleótidos no se generaron amplificaciones. Estos resultados muestran que existen diferencias en la diversidad y abundancia de grupos de Glomeromycota en las raíces de aguacatero de las diferentes localidades evaluadas.

Para los huertos bajo manejo convencional la abundancia de amplificaciones por localidad fue similar (Cuadro 7). En la localidad de Santa Rosa se mostró el mayor número de reacciones de amplificación positiva (21), seis con los juegos de oligonucleótidos GLOM1310/GLOM5.8 y con GIGA/5.8/ITS1F, cinco, tres y una con los juegos ACAU1660/ITS4, ARCH 1311/ITS4 y LET1670/ITS4, respectivamente. En el huerto de Toreo el Bajo (LOC2) hubo un total de 16 reacciones de amplificación positivas, con un número más elevado al utilizar los oligos LETC1670/ITS4 (seis), tres con los juegos GIGA 5.8R/ITS1F, ARCH 1311/ITS4 y dos con los juegos GLOM1310/GLOM5.8 y ACAU1660/ITS4. Para el huerto de El Parque se obtuvieron 14 reacciones con amplificación, siendo más evidentes con los oligos GLOM1310/GLOM5.8, con seis reacciones positivas; cinco con GIGA/5.8/ITS1F; dos con LETC1670/ITS4, una con ARCH 1311/ITS4 y no se lograron productos de amplificación con el juego ACAU1660/ITS4. Por último, para el huerto de San Juan Nuevo (LOC4) sólo se obtuvo productos de amplificación en siete de las 30 reacciones, seis al utilizar los oligonucleótidos GLOM1310/GLOM5.8 y uno con GIGA/5.8/ITS1F.

Por lo que para ambos tipos de manejo, el mayor número de reacciones con amplificación se generó con los oligonucleótidos GLOM1310/GLOM5.8, seguido de los juegos GIGA/5.8/ITS1F, LETC1670/ITS4, ACAU1660/ITS4 y finalmente ARCH 1311/ITS4.

Sin embargo, del total de reacciones con amplificación observados, la mayoría se presentaron en la localidad de Santa Rosa tanto para los huertos bajo manejo orgánico (24), como para los huertos bajo manejo convencional (21). El número menor de reacciones positivas se observó en la localidad de San Juan Nuevo para los huertos bajo ambos manejos tres para el orgánico y siete para el de manejo convencional, lo cual puede deberse principalmente a las aplicaciones que se realizan en los huertos,

Cuadro 7 Amplificación para cinco grupos de HMA con raíces micorrizadas de aguacatero de cuatro localidades de Michoacán y bajo dos condiciones de manejo. Matriz dicotómica de ausencia/presencia (0/1) de productos de amplificación observados en el gel de agarosa al 1.2 % al utilizar cinco juegos de oligonucleótidos en 12 muestras de raíces de aguacatero bajo manejo orgánico y convencional, de las localidades de: Santa Rosa (Loc1), Toreo el Bajo (Loc2), El parque (Loc3) y San Juan Nuevo (Loc 4).

Oligonucleótidos	SITIOS DE COLECTA	Orgánico						Convencional							
		A1		A2		A3		TOTA	A4		A5		A6		TOTA
		1	2	1	2	1	2	L	1	2	1	2	1	2	L
GLOM1310 GLOM5.8	LOC1	1	1	1	1	1	0	5	1	1	1	1	1	1	6
	LOC2	1	1	1	1	1	1	6	1	1	0	1	0	0	2
	LOC3	0	0	1	1	0	1	3	1	1	1	1	1	1	6
	LOC4	0	0	0	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	6
	TOTAL							17							20
GIGA 5.8R ITS1 F	LOC1	1	1	1	0	1	1	5	1	1	1	1	1	1	6
	LOC2	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	3
	LOC3	0	0	1	1	0	1	3	1	1	0	1	1	1	5
	LOC4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	TOTAL							9							15
ACAU 1660 ITS4	LOC1	1	1	1	1	1	1	6	1	1	0	1	1	1	5
	LOC2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	2
	LOC3	0	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
	LOC4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	TOTAL							9							7
ARCH 1311 ITS4	LOC1	1	0	0	0	0	1	2	0	1	0	1	1	0	3
	LOC2	1	0	1	0	0	0	2	1	1	0	1	0	0	3
	LOC3	0	0	1	0	1	1	3	1	0	0	0	0	0	1
	LOC4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	TOTAL							7							7
LETC 1670 ITS4	LOC1	1	1	1	1	1	1	6	0	1	0	0	0	0	1
	LOC2	1	1	1	1	1	1	6	1	1	1	1	1	1	6
	LOC3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2
	LOC4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	TOTAL							12							9
TOTAL							54							58	

4.4.2 Análisis y selección por RFLP de los amplicones obtenidos por PCR anidado

Para distinguir polimorfismos entre los amplicones generados a partir de muestras distintas al utilizar un mismo juego de oligonucleótidos se realizaron ensayos de RFLP a los productos del PCR anidado. Las enzimas utilizadas para estos ensayos fueron *Hinf* I y *Mbo* I (isoesquizómero de *Dpn* II; Figura 13), observando patrones de restricción distintos para los amplicones generados con cada juego de oligonucleótidos, e incluso se encontraron diferencias entre amplicones obtenidos con los mismos juegos de oligonucleótidos. De acuerdo a Redecker (2000), los patrones obtenidos con las enzimas de restricción *Hinf* I y *Dpn* II podrían ser suficientes para distinguir especies de HMA, sin embargo, la mayoría de los patrones obtenidos en el presente trabajo no estaban representados entre los descritos por el autor (Redecker, 2000), únicamente se encontró similitud de dos patrones generados con *Hinf* I con los reportados para *Glomus brasilianum* y *Glomus clarum*, así como dos de los generados con *Mbo* I fueron similares a los correspondientes de *Acaulospora morrow* y *Acaulospora laevis*. Por esta razón, se resolvió ubicar los productos de amplificación que hubiesen mostrado patrones de restricción distintos entre sí y secuenciarlos para su mejor caracterización, seleccionando un total de 42 productos de amplificación diferentes.

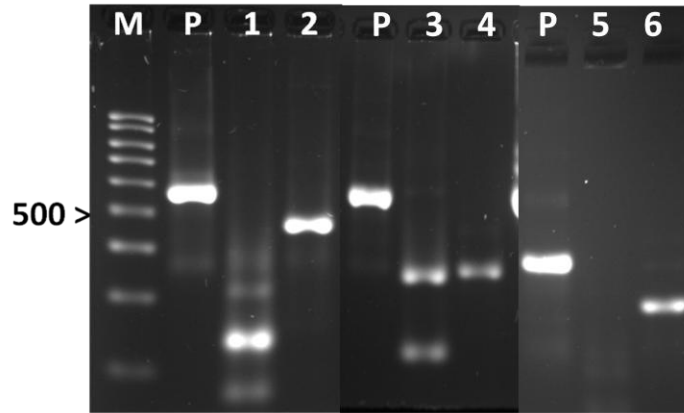


Fig. 12 Digestión con enzimas de restricción de los productos de PCR anidado. **M)** Marcador de peso molecular 100pb **P)** Producto de PCR anidado **1, 3 y 5)** digestión con la enzima de restricción *Hinf I*; **2,4 y 6)** digestión con la enzima *Mbo I*

4.4.3. La selección de colonias transformadas mostró que el vector tenía el inserto del producto de PCR anidado de HMA

Los 42 productos de PCR anidado fueron clonados en el vector pCR 2.1 TOPO, de los cuales se seleccionaron 135 clonas que se consideraron positivas por haber crecido en el medio selectivo. Se confirmó la presencia del inserto en cada clona por PCR con los oligonucleótidos M13F y M13R, que se anclan en secuencias flanqueantes al sitio de clonación múltiple del vector. Para seleccionar las clonas a ser secuenciadas se consideraron únicamente aquellas cuyo producto de amplificación fuera mayor a 200 pb (Figura 13), que es la distancia que separa a los sitios de anclaje de M13F y M13R, y las clonas con estos productos de amplificación correspondieron a falsos positivos. Se seleccionaron un total de 32 clonas positivas para su secuenciación.

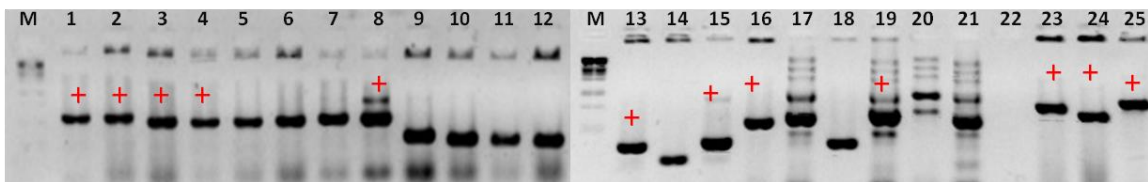


Figura 13 Selección de clonas positivas por PCR, utilizando los oligonucleótidos M13F y M13R. Amplicones de clonas positivas; marcadas con una cruz (+) se incubaron en medio Lb líquido (1-25); marcador de peso molecular de 100 pb (M)

Se obtuvo DNA plasmídico de las clonas seleccionadas a partir del cual se confirmó la presencia del inserto por amplificación por PCR con los oligonucleótidos M13F y M13R (Figura 14) y un total de 32 muestras, pertenecientes a clonas distintas, se nombraron HMAVO (hongo micorrizógeno en aguacatero) acompañado de un número consecutivo (1-32) y el grupo al que hipotéticamente pertenecían por los oligonucleótidos utilizados, y se enviaron para su secuenciación al laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del CINVESTAV-IPN Irapuato, Guanajuato, México.

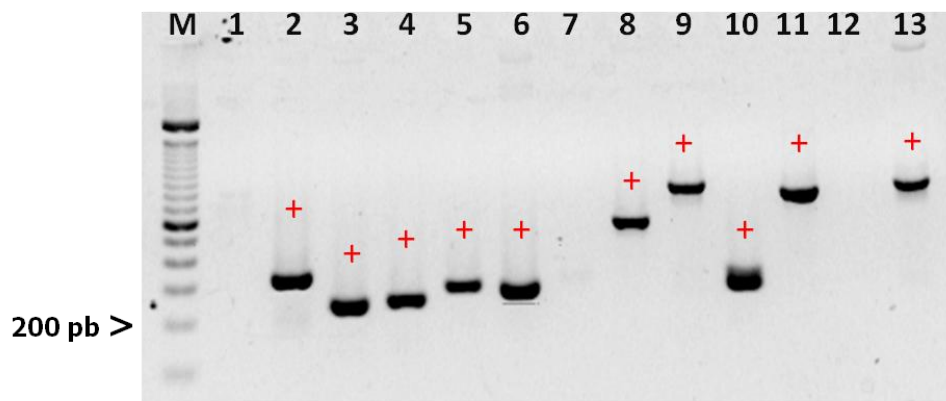


Figura 14. Amplificación por PCR de DNA plasmídico productos de la amplificación de DNA plasmídico usando los oligonucleótidos M13 F y M13 R (1-13). Los amplicones mayores de 200 pb marcados con una cruz (+) fueron preparados para enviar a secuenciar. Marcador de peso molecular (M)

4.4.4 Las secuencias obtenidas pertenecen a grupos de hongos micorrizógenos arbusculares

De las 32 secuencias de rDNA recibidas de LANGEBIO solamente se seleccionaron 15 ya que del resto sólo se obtuvieron secuencias parciales de tamaño menor a 60 pb que hacían inviable su comparación en los bancos de datos. Se hizo un análisis de alineamiento tipo Blast utilizando el programa Geneious versión 5.4.2 (Drummond *et al.*, 2010) para alineamiento por similitud con secuencias que el propio programa obtiene del banco público de datos "GenBank" del NCBI obteniendo

referencias de las secuencias descritas en el cuadro 8, las cuales fueron seleccionadas de más de 300 alineamientos con un mínimo de 130 secuencias por alineamiento tomando en cuenta el valor de "E-value" más cercano a cero, y el porcentaje de identidad más cercano a 100 % al compararlas con las secuencias obtenidas en este estudio.

Cuadro 8. Características de las secuencias con mayor porcentaje de similitud con las obtenidas a partir de raíz de aguacatero. Las secuencias fueron seleccionadas por un análisis tipo Blast con el programa Geneious y los datos de cada secuencia fueron obtenidos del Genbank NCBI.

organismo	accesión en NCBI	Región conservada	Origen de la secuencia	% Identidad	E-value	Referencia
<i>Glomus intraradices</i>	FJ009595	18, secuencia parcial de ITS1	Espora	97.5	0	Blaszkowski <i>et al.</i> , 2009
<i>Glomus irregulare</i>	FJ009617	18S, secuencia parcial de ITS1	Espora	95.1	0	Blaszkowski <i>et al.</i> , 2009
Glomus no cultivable	FN397340	Secuencia parcial de 18S, secuencia completa de ITS1, 5.8S, ITS2 y secuencia parcial de 28S.	Trufa negra	100	0	Bonfante <i>et al.</i> , 2010
<i>Gigaspora margarita</i>	FN547564	Secuencia parcial de 18S, secuencia completa de ITS1, 5.8S, ITS2 y secuencia parcial de 28S.	Espora	98.1	3.10e-123	Schüßler <i>et al.</i> , 2010
<i>Ceratobasidium</i> sp	DQ102437	Parcial 18S, ITS1, 5.8S ITS2, secuencia parcial de 28S	Ceratobasidium sp	97.5	0	Sharon <i>et al.</i> , 2007
Glomus no cultivable	AM992812	Secuencia parcial de 18S, secuencia completa de ITS1, 5.8S, ITS2 y secuencia parcial de 28S.	Raíces	95.9	0	Galván <i>et al.</i> , 2009

Finalmente se realizó un análisis filogenético con el método de construcción de arboles "Neighbor-Joining" y el modelo de distancias genéticas "Jukes-Cantor" en el programa Geneious, los análisis de "bootstrap" fueron hechos con 1000 replicas, usando las secuencias generadas por el análisis tipo Blast. Los cladogramas

realizados con los alineamientos muestran que el taxa es principalmente monofilético, lo cual sugiere que provienen de un mismo antecesor (Shüßler *et al.*, 2001), formando dos grupos principales en donde HMAVO 11, alineado con *Ceratobasidium* sp., forman el primer grupo y se separa del resto de las secuencias. En el segundo grupo se integran cuatro subgrupos, el primero incluye HMAVO 12 y HMAVO 15; con mayor similitud entre ellas mismas que con cualquiera de las secuencias depositadas en el GeneBank, el segundo subgrupo contiene HMAVO 13 alineada con la secuencia FN397340, que corresponde a un hongo no cultivable, de acuerdo a Bonfante y colaboradores (2010), en el tercer subgrupo se alinea HMAVO 14 con la secuencia FN547564 correspondiente a *Gigaspora margarita* (Schüßler *et al.*, 2010), dentro del cuarto subgrupo HMAVO 19 se separa del resto, indicando mayor similitud con los miembros de este subgrupo que con las secuencias de los tres subgrupos anteriores, sin embargo, al igual que HMAVO 12 y HMAVO 15 no se alinea con un alto porcentaje de similitud con las secuencias depositadas en el GeneBank, seis de las secuencias restantes del cuarto subgrupo (HMAVO 1, HMAVO 2, HMAVO 22, HMAVO 24, HMAVO 26 y HMAVO 3) forman el clado más grande del árbol filogenético, mostrando alta identidad con las secuencias de *Glomus intraradices* (Blaszkowski *et al.*, 2009), un *Glomus* no cultivable (Galván *et al.*, 2010) y *Glomus irregulare* (Blaszkowski *et al.*, 2009), sugiriendo que todas estas pertenecen a la misma especie, lo cual corresponde con el hecho de que *Glomus irregulare* es el anteriormente denominado *Glomus intraradices* (Blaszkowski y Czerniawska, 2008), por su parte la secuencia denominada *Glomus* no cultivable, fue obtenida a partir de raíces micorrizadas de cebolla (*Allium cepa* L), por lo que no logró ser caracterizada morfológicamente, sin embargo, por el porcentaje de identidad compartido con el resto de las secuencias de este clado, se sugiere que pertenece a la misma especie. Las últimas tres secuencias incluidas dentro del cuarto subgrupo se separan en dos clados, en donde HMAVO 10 se mantiene separado sin alinearse con alguna secuencia del grupo, ni con el resto del árbol, las secuencias HMAVO 20 y HMAVO 21 se alinean entre sí, indicando más cercanía entre ellas que con el resto de las secuencias del árbol filogenético o las reportadas en el GeneBank.

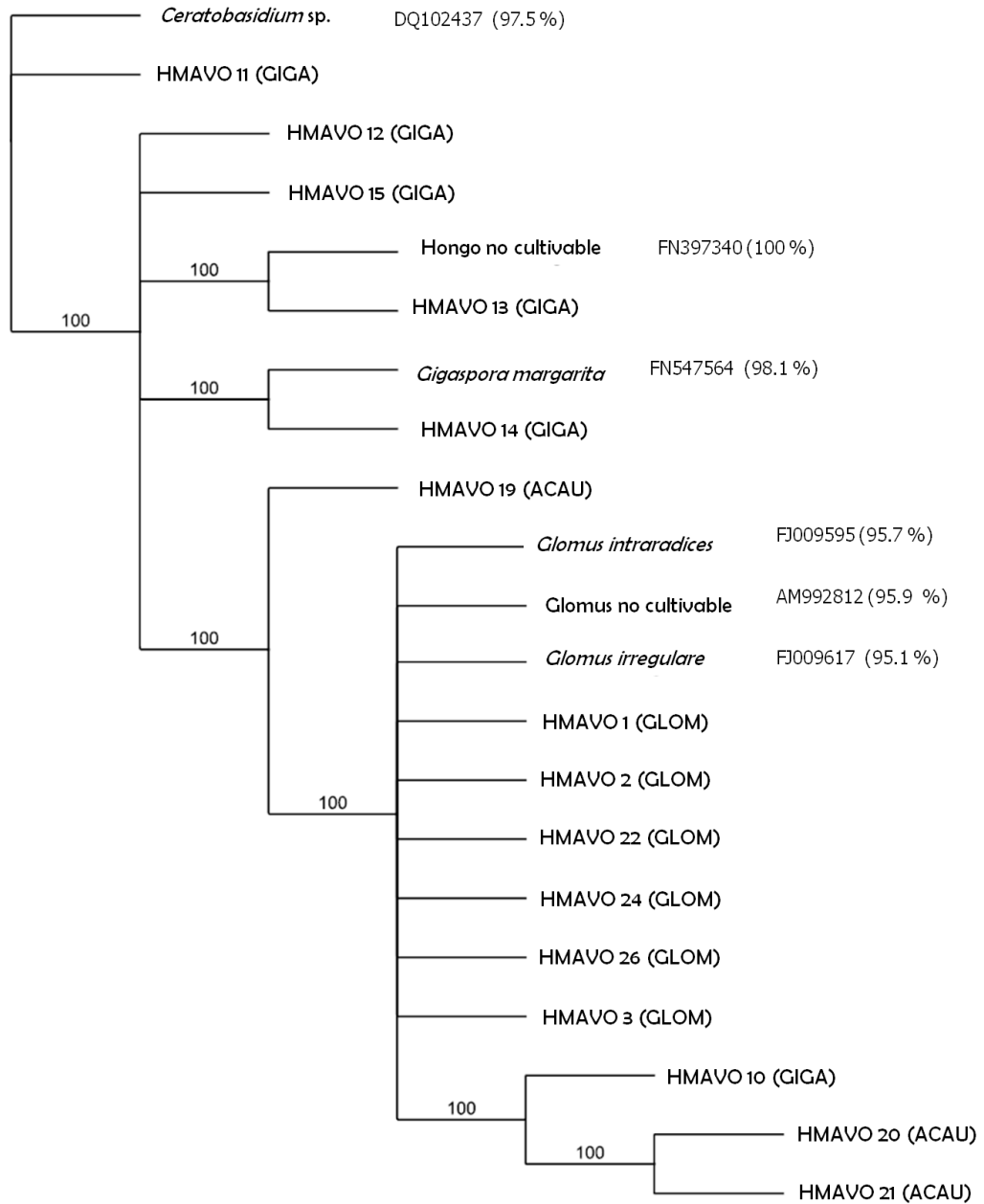


FIGURA 15. Análisis filogenético Neighbour-joining (vecino más cercano) de hongos micorrícicos arbusculares usando secuencias de rDNA obtenidas de raíces de Aguacate muestreadas en Uruapan, Michoacán México. El programa usado fue Geneious Basic 5.4.2 versión de prueba. En el árbol se muestra la escala del porcentaje del consenso de las secuencias obtenidas para este estudio fueron etiquetadas el nombre del hospedero y un número consecutivo y entre paréntesis grupo al que hipotéticamente pertenecen por los oligonucleótidos usados. Estos fueron alineados con secuencias obtenidas de esporas obtenidas del NCBI. Los valores de "bootstrap" de 1000 replicaciones indican la robustez del árbol de 100 % en las ramas.

Con seis de 15 secuencias asociadas a una especie se podría sugerir especies monofileticas y resaltando una alta abundancia de esta especie en las raíces de aguacate, lo cual coincide con lo reportado en esporas para el género de *Glomus* en un estudio realizado por Aguirre y colaboradores (2009) en donde reporta que este género está presente con mayor abundancia en huertos de aguacate, sin embargo, cuando se realizó el RFLP en las secuencias de *G. intraradices* se observó polimorfismos, ya que resultaron patrones distintos entre los amplicones correspondientes a estas secuencias.

Por otro lado, el análisis filogenético mostró que de las 15 secuencias, siete (HMAVO 15, HMAVO 14, HMAVO 19, HMAVO 22, HMAVO 24, HMAVO 26, HMAVO 21) pertenecen a huertos de aguacatero bajo manejo convencional y se alinean principalmente con grupos de *Glomus* sp. y *Gigaspora* sp., las seis secuencias restantes (HMAVO 11, HMAVO 12, HMAVO 13, HMAVO 1, HMAVO 2, HMAVO 10) pertenecen a huertos con manejo orgánico y se alinean principalmente con secuencias de grupos de *Glomus* sp y *Ceratobasidium* sp., por otro lado la figura 15 muestra la efectividad del uso de los oligonucleótidos diseñados por Redecker (2000; 2006b) para la detección grupos de HMA en raíces ya que en el cladograma no se muestran alineamientos que sugieran grupos monofiléticos entre secuencias obtenidas con juegos de oligonucleótidos distintos, Sin embargo la mayoría de los clados no presentan homología con secuencias reportadas en el GeneBank o se describen como hongos no cultivables, lo cual limita su identificación. Por lo que es necesario ampliar los bancos de datos o generar bancos genómicos con las secuencias de las especies de HMA obtenidas a partir de suelos donde se cultiva aguacatero.

4.4.5 Se encontró diversidad de especies de HMA entre manejos orgánico y convencional

Con la finalidad de analizar la diversidad de HMA presentes en las raíces de aguacatero, se hizo un análisis con base en el índice obtenido con el programa de análisis de datos de aloenzimas y poblaciones genéticas "Tool for population Genetic Analyses" (TFPGA) diseñado por Mark (1997). En este ensayo se generó una matriz binaria de datos para indicar la presencia o ausencia de los amplicones secuenciados encontrados en cada una de las muestras de raíces de aguacatero analizadas; señalando la ausencia del amplicón en cada muestra como "2", mientras que la presencia fue marcada como "1". Los resultados mostraron que el índice de diversidad de HMA asociados a raíces de aguacatero es mayor en los huertos de la localidad de Santa Rosa (Figura 16a), respecto al resto de los huertos, mientras que los huertos de la localidad de San Juan Nuevo presentan la menor diversidad encontrada. Además, en la mayor parte de los huertos se observó una diversidad más elevada en la mayoría de los huertos bajo manejo orgánico que en aquellos bajo manejo convencional. El huerto bajo manejo convencional "El Puerto del Huizache", de la localidad de Santa Rosa, fue el que presentó el más alto índice de diversidad. Es importante mencionar que este huerto, pese a ser considerado de manejo convencional, recibe enmiendas orgánicas, además de las fertilizaciones químicas, lo cual puede estar alterando las poblaciones microbianas en el suelo.

Al generar un ferograma resultante de conglomerados por el método de grupo de pares imponderados con media aritmética (UPGMA, por sus siglas en inglés), el cual nos muestra las similitudes entre las poblaciones de HMA en raíces de aguacatero de las localidades evaluadas, respecto, basado en la diversidad de especies encontradas en cada uno de los huertos, de acuerdo a los índices obtenidos con el programa TFPGA (Figura 16) se encontró que la diversidad entre todos los huertos analizados se divide en dos principales grupos, en uno de estos se agrupan únicamente los huertos de la localidad de Santa Rosa, cuya diversidad es más similar

entre los huertos, independientemente de su tipo de manejo, que con los del resto de las localidades, sin embargo la distancia entre ellos(0.035) indica la hay mayor divergencia entre ellos que en el resto de las localidades.

Por su parte, la discrepancia entre los huertos convencionales de “El Parque” y “San Juan Nuevo” es la más cercana entre todos los huertos, seguidos por los huertos con manejo orgánico de la localidad de Toreo el bajo (loc 2) y San Juan Nuevo (loc 4). Independientemente de que la ubicación geográfica no coincida entre ellos, el huerto organico “el parque” (loc 3), y el huerto convencional “La mesa” (loc 2) presentan una discrepancia muy cercana a cero y a los huertos convencionales de la localidad de el Parque y San Juan Nuevo, lo que podría indicar que las diversidades de HMA en estos huertos de son muy parecidas independientemente del manejo y la ubicación geográfica (Figura 16b).

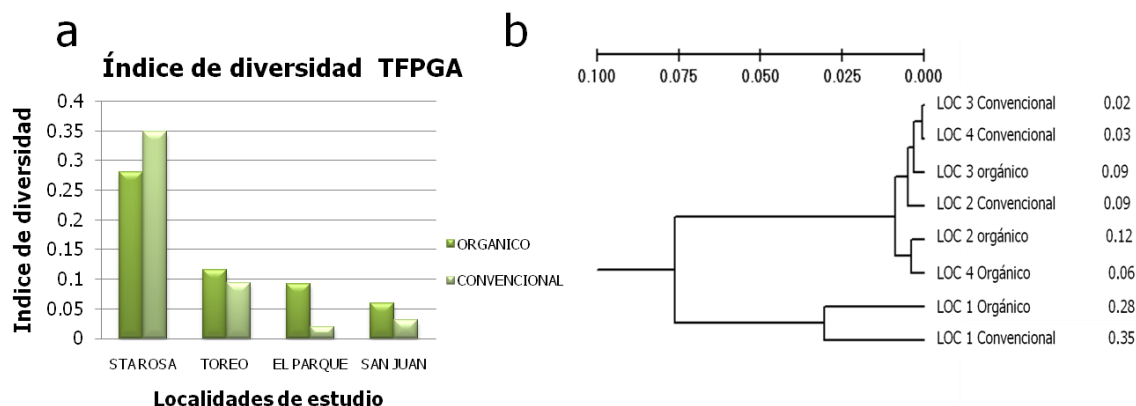


Figura 16. Índices de diversidad de HMA para huertos de aguacatero de cuatro localidades **a)** El gráfico muestra la diversidad de grupos de HMA presentes en las localidades de huertos bajo manejo orgánico y convencional, el gráfico se realizó con base en el índice de diversidad determinado por el programa TFPGA **b)** El ferograma muestra la similitud de las localidades respecto a los grupos de HMA presentes basadas en el índice de diversidad determinado por TFPGA.

Para corroborar la información de diversidad encontrada por el análisis de datos con el programa TFPGA se comparó con el índice de diversidad de Shannon usado para analizar la diversidad de especies. Los resultados mostraron que la diversidad de HMA en huertos orgánicos fue mayor que en huertos convencionales (Cuadro 9b) sin embargo, al analizar la diversidad molecular en el programa TFPGA usando bootstrap con 1000 replicas obtuvimos un valor (F-statistic) 0.0079 a una significancia de $P > 0.05$ %. Las diversidades medidas con el índice de Shannon-Weiner nos dieron un valor de 0.416 con significancia de $P > 0.05$ %, en ambos análisis no se mostró diferencia estadística significativa al 95 % de probabilidad, y aunque el índice de Shannon-Weiner es usado para determinar diversidad morfológica, para este estudio se calculó con base en el número de filotipos presentes por sistema de producción (orgánico y convencional), la diversidad de grupos de HMA obtenidos por secuenciación detectados en raíces de aguacatero bajo manejo orgánico y convencional no muestran diferencia, lo anterior coincide con un estudio reportado por Galván y colaboradores en donde al darle seguimiento durante dos años a un cultivo de cebolla bajo condiciones de manejo orgánico y convencional en una región de Europa (Flevolanda y Zelanda) en donde reportaron filotipos asociados con *Glomus mosseae* y *Glomus Caledonim*, sugiriendo que el sistema de cultivo no influye en la diversidad de HMA que colonizan las raíces (Galván, *et al.*, 2009)

Cuadro 9 Índices de diversidad de grupos de HMA **a)** diversidad calculada con el programa TFPGA para cada una de las localidades de muestreo; **b)** resultado del análisis de igualdad que comprueba la las diferencias del índice de diversidad respecto al tipo de manejo en las localidades estudiadas.

a

Localidades	Orgánico	Convencional
Santa Rosa	0.28	0.35
Toreo el Bajo	0.12	0.09
El Parque	0.09	0.02
San Juan Nuevo	0.06	0.03

b

Tipo de manejo de los huertos	TFPGA	Shannon-Wiener
Orgánico	0.15	2.61
convencional	0.14	2.49

Finalmente se corrobora que el programa TFPGA arroja resultados confiables para evaluar la diversidad molecular de especies respaldando con mayor soporte los resultados obtenidos para los análisis de diversidad de HMA en raíces micorrizadas de aguacatero.

V. CONCLUSIONES

La presencia de estructuras características de la simbiosis de HMA en raíces de aguacatero no se ve influenciada por el manejo.

Los resultados muestran alta diversidad en huertos de aguacatero producido bajo un sistema orgánico.

Gigaspora margarita y *Glomus intraradices* son especies identificadas por secuenciación de DNA de HMA aislado de raíces de aguacatero, predominando *G. intraradices*

Una especie del género *Ceratobasidium* fue identificada en los huertos bajo manejo orgánico

El estudio no reportó diferencia estadística en la diversidad de grupos de HMA en huertos de aguacatero bajo manejo convencional y orgánico

Los análisis filogenéticos sugieren que entre las especies asociadas a raíces de aguacate se encuentran *G. intraradices*, *Gigaspora margarita* y *Ceratobasidium*

Se confirmó que los juegos de oligonucleótidos son capaces de amplificar secuencias de grupos distintos.

VI. LITERATURA CITADA

- Aboul-Nasr, S. A.** 1996. Effects of Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza on *Tagetes erecta* And *Zinnia elegans*. Mycorrhiza 6:61-64 pp
- Aguirre, P.S.** 2008. Evaluación de la materia orgánica y de microorganismos en suelos de huertos de aguacate *Persea americana* Mill. en Uruapan, Mich.
- Alarcón, A.** y Ferrera-Cerrato R. 2001. Biofertilizantes: Importancia y Manejo en la Agricultura. Rev. Agricultura Técnica de México. 26:63-75pp.
- Alexander, T.,** Meier, R., Toth, R., y Weber, H., 1988, Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* L. with reference to *Zea mays* L. *New Phytol.* 110: 363–370
- Allen, E. B.,** Allen M. F. 1984. Competition between plants of different successional stages: mycorrhizae as regulators. *Can. J. Bot.* 62: 2625-2629.
- Allen, M.F.,** Swenson, W., Querejeta, J.I., Egerton-Warburton, L.M., and Treseder, K.K., 2003. Ecology of mycorrhizae: a conceptual framework for complex interactions among plants and fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* 41: 271–303.
- Azcón-Aguilar, C.,** Pozo M.N., Ferrol N. y Barea J.M. 2004. Papel de las micorrizas arbusculares en la protección frente a patógenos del suelo. En: Avance en el conocimiento de la biología de las micorrizas. Universidad de Guanajuato, México. 50-65.
- Bago, B.,** Pfeffer, P.E., and Shachar-Hill, Y., 2000, Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiol.* 124: 949–958
- Bago, B.,** Shachar-Hill, Y., and Pfeffer, P.E., 2001, Could the urea cycle be translocating nitrogen in the arbuscular mycorrhizal symbiosis? *New Phytol.* 149: 4–8.

- Bárcenas**, O.C.A.E. 2008. Efecto de mejoradores de suelo sobre la diversidad de hongos micorrizógenos arbusculares en huertos de aguacate. Tesis Doctoral UAN, Tepic, Nayarit 63.
- Bárcenas-Ortega** A.E., Varela-Fregoso L., Stürmer S.L., Aguirre-Paleo.S., Chávez-Bárcenas A.T.2009. Identificación de hongos micorrizógenos en cultivo de aguacate. En Memoria de la International Conference on Mycorrhiza, Belo Horizonte, Brasil.
- Bárcenas**, O.C A E. Varela L, Castro E, Feliciano R, Chávez Bárcenas T. 2010. Propagación de hongos micorrizógenos arbusculares de huertos de aguacate. En memoria del VI Symposium nacional y tercera reunión iberoamericana de la simbiosis micorrízica
- Bárcenas**, O.A.E., Varela F.L., Carreón A.Y., Lara CH.B.N., González C.J.C. y Aguirre P.S. 2006. Estudios sobre hongos micorrizógenos arbusculares en huertos de aguacate *Persea americana* Mill. (RANALES: LAURACEAE). En: Memoria del XXIX Congreso Nacional de Control Biológico. SMCB Manzanillo, Col. 1-5pp.
- Becard**, G., Pfeffer P.E., 1993. Status of Nuclear Division in Arbuscular Mycorrhizal Fungi During In-Vitro Development. *Protoplasma* 174:62-68
- Becker**, W. N., 1976, Quantification of onion vesicular-arbuscular mycorrhizae and their resistance to *Pyrenochaeta terrestris*. Ph.D. dissertataion, University of Illinois, Urbana, IL.
- Benedetto**, A., Magurno, F., Bonfante, P., and Lanfranco, L., 2005, Expression profiles of a phosphate transporter gene (*GmosPT*) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* 15: 620–627
- Biermann**, B. J. y Linderman R. G. 1981. Quantifying vesicular-arbuscular mycorrhizae: a proposed method towards standardization. *New Phytologist*, 87: 63-67.

- Blaszkowski, J.** 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota), *Endogone*, and *Complexipes* species deposited in the Department of Plant Pathology, University of Agriculture in Szczecin, Poland. <http://www.agro.ar.szczecin.pl/~jblaszkowski/>.
- Blaszkowski, J., Madej T., Tadych M.** 1998. *Entrophospora baltica* sp. nov. and *Glomus fuegianum*, two species in the Glomales from Poland. *Mycotaxon* 68: 165-184.
- Blaszkowski, J.** 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi (glomeromycota) endogone and complexipes species deposited in the department of plant Patology, University of Agriculture in Szczecin, Poland <http://www.lrz-muenchen.de/~schuessler/amphylo/> recuperado en mayo de 2011.
- Bonfante-Fasolo, P., Faccio, A., Perroto, S., y Schubert, D.,** 1990, Correlation between chitin distribution and cell wall morphology in the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Mycol. Res.* 94: 157–165.
- Brundett, M.** 2004. Diversity and Classification of Mycorrhizal Associations *Biol Rev.* 79:473-495.
- Brundrett, M.C.,** 2002, Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol.* **154**: 275–304
- Bucher, M.,** 2007, Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytol.* 173: 11–26.
- Cordier, C., Pozo, M. J., Gianinazzi, S., and Gianinazzi-Pearson, V.,** 1998, Cell defence responses associated with localised and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol. Plant Microbe Interc.* 11: 1017–1028.
- Cruz, C., Egsgaard, H., Trujillo, C., Ambus, P., Requena, N., Martins-Loucao, M.A., and Jakobsen, I.,** 2007, Enzymatic evidence for the key role of arginine in nitrogen translocation by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiol.* 144: 782–792

- De la Providencia**, I.E., de Souza F.A., Fernandez F., Delmas N.S., Declerck S. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hifal healing mechanisms between different phylogenic groups. *New Phytol.* 165:262-271.
- Drummond**, A.J., Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Heled J, Kearse M, Moir R, Stones-Havas S, Sturrock S, Thierer T, Wilson A. 2010. Geneious v5.3, Available from <http://www.geneious.com>
- Douds**, D.D., Schenck, N.C. 1991. Germination and hyphal growth of vam fungi during and after storage in soil at five matric potentials *SoilBiology and Biochemistry*, 23:2: 177-183p.
- Ezawa**, T., Hayatsu, M., and Saito, M., 2005, A new hypothesis on the strategy for acquisition of phosphorus in arbuscular mycorrhiza: up-regulation of secreted acid phosphatase gene in the host plant. *Mol. Plant Microbe Inter.* **18**: 1046–1053
- FAO**, 2008 Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura en línea: http://www.fao.org/index_es.htm consultado el mayo 2011.
- Ferrol**, N., Pozo, M.J., Antelo, M., y Azcón-Aguilar., 2002, Arbuscular mycorrhizal symbiosis regulates plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in tomato plants. *J.Exp. Bot.* 53: 1683–1687
- Frank**, A. B. 1885. Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernahrung gewisser Baume durch unterirdische Pilze.Ber. Deutch Bot. Gessell. 3: 128-145.
- Gadkard**, V., Schwartz-David, R., Kunik, T., Kapulnik, Y. 2001 Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. Factors involved in host recognition *Plant Physiology* 127: 1493-1499 pp.
- Galván**, A.G., Parádi, I., Burger, K., Baar, J., Kuyper, T.W., Scholten, E.O., Kik.,C. 2009. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in onion roots from organic and conventional farming systems in the Netherlands. *Mycorrhiza* 19: 317-328 p.

- Gamper, H.** y Luechtmann A. 2007. Taxon-Specific PCR primer to Detect two Inspicuous Arbuscular Mycorrhizal Fungi pron Temperate Agricultural Grassland. *Mycorrhiza* 17: 145-152 pp.
- García-Chapa, M.,** Batlle, A., Lavina, A., Camprubi, A., Estaun, V., y Calvet, C., 2004, Tolerance increase to pear decline phytoplasma in mycorrhizal OHF-333 pear root stock. *XIX Int. Symp.on Virus and Virus Like Diseases of Temperate Fruit Crops-Fruit Tree Diseases*, ed., Llacer, G., Valencia, Spain
- Gerdemann, J.W.** y Nicolson T.H. 1963. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Brit. Mycol. Soc* 46:235-244.
- Gerdemann, J. W.** y Trappe, J. M.1974. Endogonaceae in the Pacific Northwest. *Mycology Memoirs*, 5: 1-76.
- Gianinazzi-Pearson, V.** y Gianinazzi S. 1983.The Physiology of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal roots. *Plant and Soil* 71:197-209
- Ginsburg, O.,** y Avizohar-Hershenson, Z. 1965. Observation on vesicular-arbuscular mycorrhiza associated with avocado roots in Israel. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 48(1):101-104 p
- Giovannetti, M.** 1985. Seasonal variations of vesicular-arbuscular mycorrhizas and Endogonaceous spores in a maritime sand dunes. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 84: 679-684.
- González, C.J.F.** 2005. Diversidad de hongos micorrícicos arbusculares en un agrosistema de aguacate (*Persea americana* Mill) comparado con un bosque natural. Tesis de Maestría. Facultad de Biología UMSNH Morelia, Mich. 76p.
- Govindarajulu, M.,** Pfeffer, P., Jin, H., Abubaker, J., Douds, D.D., Allen, J.W., Bücking, H., Lammers, P.J., and Shachar-Hill, Y., 2005, Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*435: 819–823.
- Guerrero, G. N.K.** 1999, Fisiología y Anatomía de plantas de fresa Micropropagadas y Micorrizadas, tesis de Maestría CINVESTAV Irapuato, Guanajuato, México. 77p.

- Gutiérrez-Contreras**, M., Lara-Chávez B.N., Guillén-Andrade, H. y Chávez-Bárcenas, A.T. 2010, Agroecología de la Franja aguacatera en Michoacán, México. *Interciencia* 35:2:647-653p
- Harrison**, M., 1999, Biotrophic interfaces and nutrient transport in plant/fungal interfaces. *J. Exp. Bot.* 50: 1013–1022
- Hass** J.H. y Mengue J.A., 1990. VA-mycorrhizal fungi and soil characteristics in avocado (*Persea americana* Mill) orchard soils. *Plant and Soil* 127: 207-212.
- Hayman** D. S. 1970. *Endogone* spore numbers in soil and vesicular-arbuscular mycorrhiza in wheat as influenced by season and soil treatment. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 554: 53-63.
- Helgason** T., Daniell T.J., Husband, R., Fitter A.H., Young J.P.W. 1998 Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 394: 431.
- Helgason**, T., I. J. Watson, y J. P. W. Young. 2003. Phylogeny of the Glomerales and Diversisporales (Fungi: Glomeromycota) from actin and elongation factor 1-alpha sequences. *FEMS Microbiology Letters*. 229: 127-132.
- Hernández-Montiel**, Escalona L.G. y Escalona, M.A. 2007 ¿Cómo Pueden Algunas Bacterias y Hongos del Suelo Beneficiar el Crecimiento de las Plantas? Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz
- Hosny**, M., Hijri M., Passerieux E., Dulieu, H. 1999 rDNA units are highly polymorphic in *Scutellospora Castaneae* (Glomales, Zigomycetes. *Gene* 226: 61-71
- INVAM** The International culture collection on VA Mycorrhizal Fungi, Recuperado en mayo de 2011 de <http://invam.caf.wvu.edu/index.html>
- Jacobsen**, I., Rosendahl L. 1990. Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytol.* 115: 77-83.
- Jaizme-Vega** M.C. y Azcón R. 1995. Responses of some tropical and subtropical cultures to endomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 5: 213-217

- Khan** S., Qureshi M.I. Kamaluddin, Tanweer A. y Abdin Z. 2007. Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable from RAPD and restriction digestion. *African Journal of Biotechnology* 6:3: 175-178pp
- Kjøller** R. y Rosendahl S. Detection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Glomales) in Roots by Nested PCR an SSCP (single stranded conformation Polimorphism) plant and soil 226:189-196.
- Koide**, R.T. 2004. Mycorrhizal symbiosis. En: RM Goodman Encyclopedia of Plant and Crop Science. 770-772p.
- Lingua**, G., D'Agostino, G., Massa, N., Antosiano, M., and Berta, G., 2002, Mycorrhizainduced differential response to a yellow disease in tomato. *Mycorrhiza* 12: 191–198
- Lohse**, S., Schliemann, W., Ammer, C., Kopka, J., Strack, D., and Fester, T., 2005, Organization and metabolism of plastids and mitochondria in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 139: 329–340
- Malavolta**, E. 1985. Absorção e transporte de íons e nutrição mineral. In: Ferri, MG, *Fisiologia Vegetal* 1. EPU, São Paulo, Brasil, 77-97 p
- Malloch**, D.W., Pirozynski K.A. y Raven P.H. 1980. Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbiosis in vascular plants (a review). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 4: 2113-2118.
- Morton**, J. B. 2002. International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. West Virginia University. <http://www.invam.caf.wvu.edu/>.
- Morton**, J. B. y Benny G.L. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (zygomycetes): A new orden, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37: 471-491

- Morton**, J. B., Redecker D. 2001. Two families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 9: 181-195.
- Navarro**, G.H. ,2009 Agricultura Orgánica y Alternativa Universidad Autónoma de Chapingo, primera edición. Chapingo Edo. De México. 271p
- Nemec**, S., y Myhre, D., 1984, Virus-*Glomus etunicatum* interactions in Citrus rootstocks. *Plant Dis.* **68**: 311–314.
- Newsham**, K.K., Fitter A.H., Watkinson A.R. 1995. Arbuscular Mycorrhiza Protect an Annual Grass from Root Pathogenic Fungi in the field. *Journal Ecol.* 83: 991-1000
- Ohtomo**, R., and Saito, M., 2005, Polyphosphate dynamics in mycorrhizal roots during colonization of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.* 167: 571–578
- Olalde** P.V, Aguilera G. L.I. 2007. Microorganismos y Biodiversidad. *Terra* 16:3: 289-292
- Ozgonen**, H., y Erkilic, A., 2007, Growth enhancement and Phytophthora blight (*Phytophthora capsici* L.) control by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation in pepper. *Crop Protec.* 26: 1682–1688.
- Pawlowska**, T.E., Taylor J.W. 2002. Organization of genetic variation within glomalean individuals. Proceeding of the 7th international Mycological Congress, Osla 73.
- Peterson**, R.L., Massicotte, H.B., y Melville, L.H. 2004. Mycorrhizas: anatomy and cell biology. NRC Research Press, Ottawa, Ont.
- 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. *Transaction British Mycological Society* 55: 158-160 pp.
- Pozo**, M. J., Cordier, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi, S., Barea, J. M., y Azcon-Aguilar, C., 2002, Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *J. Exp. Bot.* **53**: 525–534.

- Produce**, 2007 Agenda administrativa y técnica para el manejo del cultivo del Aguacate en el estado de Michoacán Alianza Contigo, Fundación Produce Michoacán 76p.
- Redecker**, D. 2000. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* 10: 73-80
- Redecker**, D. 2002 Molecular identification and phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 244:67-73.
- Redecker**, D.; Morton, J. B. y Bruns, T. D., 2000. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Mol. Phylogen. Evol.*, 14:276-284.
- Redecker**, D., 2006b. Molecular ecology of arbuscular mycorrhizal fungi: a review of PCR-based techniques. En: Cooper, J., Rao, J.R. (Eds.), *Molecular Techniques for Soil and Rhizosphere Microorganisms*. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK, 198–212 pp.
- Redecker**, D. y Raab, P. 2006. Phylogeny of the Glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. *Mycologia* 98 (6) 885-895 pp.
- Redecker**, D., Hijri, I. y Wiemken, A. 2003. Molecular Identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: Perspectives and problems. *Folia Geobotanica* 38: 113-124 p.
- Remy**, W., Taykis N., Hass T., Hagen y Corp. Hans. 1994 Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Plant Biology*. 91:11841-11843
- Reyes-Alemán**, J.C., Ferrera-Serrato R., Cortés-Flores J.I. y Alarcón A. 2002. Simbiosis micorrízica y vermicomposta en el desarrollo de portainjertos de aguacate crecidos en sustratos agrícola y forestal. Memoria Fundación Salvador Sánchez Colín 1998-2001. CICTAMEX S. C. Coatepec Harinas, México. 64-79p.
- Rillig**, M., 2004. Arbuscular mycorrhizae, glomalin and soil aggregation. *Can J. Soil Sci.* 84:355-363.

- Ruiz-Lozano**, J.M., Azcón R., Gómez M. 1995 Effects Of Arbuscular Mycorrhizal *Glomus* Species on Drought Tolerance: Physiological and Nutritional Plant Responses. Applied and Environmental Microbiology 61:456–460.
- Salisbury**, F.B. 1994. Fisiología vegetal versión en español, ED. Iberoamericana, Mexico ISBN: 0-534-15162-0 759pp.
- Sambrook**, J; Fritsch EF y Maniatis T. 1989. SD Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2da ed. CSH E.U. 2120 pp
- Sánchez**, R, G., 2007 El Cluster del aguacate de Michoacán, desarrollo regional para el liderazgo global. Fundación produce Michoacán 241p.
- Sawers**, R.J., Yang S.,Gutjahr C. y Paszkowski U. 2008. The molecular components of nutrient exchange in arbuscular mycorrhizal interaction. En: Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry. 37-59 p Springer Science
- Schüßler**, A. 2002.Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of *Geosiphon pyriformis* and arbuscular mycorrhizal fungi. Plant and Soil 244: 75-83.
- Schüßler**, A. Schwarzott D., Walker C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: pylogeny and evolution. Myc. Res. 105: 1413-1421.
- Schüßler**, A. y Walker C. 2010. The Glomeromycota : A species list with new families and new genera. En Gloucester, England. 57p. en línea: http://www.lrz.de/~schuessler/amphylo/species_infos/higher_taxa
- Schüßler**, A., Kluge M. 2001.*Geosiphon pyriforme*, an endocytosymbiosis between fungus and cyanobacteria, and its meaning as a model system for AM research. In: Hock B. (ed.). The Mycota. Vol. IX. Fungal Associations, 151-161. Springer, Berlin.
- Shaul**, O., Galili, S., Volpin, H., Ginzberg, I., Elad, Y., Chet, I., and Kapulnik, Y., 1999, Mycorrhiza induced changes in disease severity and PR protein expression tobacco leaves.*Mol. Plant Microbe Inter.* **12**: 1000–1007.

- SIAP**, 2011 Servicio de Información y Agroalimentaria y Pesquera, recuperado el 20 de Julio de 2009 en: www.siap.sagarpa.gob.mx
- Siddiqui**, Z.A.y Akhtar M.S. 2008.Arbuscular mycorrhizal fungi as potential bioprotectants against plant pathogens. En: Sustainable Agriculture and Forestry Springer Science+ Business Media B.V. 91-97
- Sieverding**, E., Oehl F. 2006. Revision of *Entrophospora* and description of *Kuklospora* and *Intraspora*, two new genera in the arbuscular mycorrhizal Glomeromycetes. J. Appl. Bot. Food Qual. 80: 69-81.
- Simon**, L., Bousquet J., Levesque R.C., Lalonde M., 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. Nature 363:67-69.
- Simon**, L., Lalonde M., Bruns T.D. 1992. Specific Amplification of 18S Fungal Ribosomal Genes from Vesicular-Arbuscular Endomycorrhizal Fungi Colonizing Roots.American Society of Microbiology58: 291-295.
- Smith**, S. E., Read D. J. 1997. Mycorrhizal symbiosis.Academic Press. Harcourt Brace & Company, Publishers. San Diego, London, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto.
- Smith**, E. S. ; Andrew S.F. y Jakobsen I. 2003. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of Growth responses. Plant physiology, 133:16-20 pp
- Téliz**, D. y Mora, A., 2007 el aguacate y su manejo integrado 2da edición, ediciones Mundi Prensa, México D.F. 319p.
- Trotta**, A., Varese, G. C., Gnani, E., Fusconi, A., Sampo, S., and Berta, G., 1996, Interactions between the soilborne root pathogen *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* in tomato plants.*Plant Soil* 185: 199–209
- Trouvelot**, A, Kough JL & Gianinazzi-Pearson V.1986.Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire.Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification

fonctionnelle. In : Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae, V. Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi (eds.). INRA Press, Paris, pp. 217-221.

Trouvelot, S., Van Tuinen D., Hijri M., Gianninazzi-Pearson V. 1999 Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence in situ hybridization. *Mycorrhiza*. 8:203-206.

Van Tuinen, Jacquot E., Zhao B., Gollotte A. y Gianinazzi-Pearson. 1998 Characterization of Root Colonization Profiles by a Microcosm Community of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Molecular Ecology* 7: 879-887 pp.

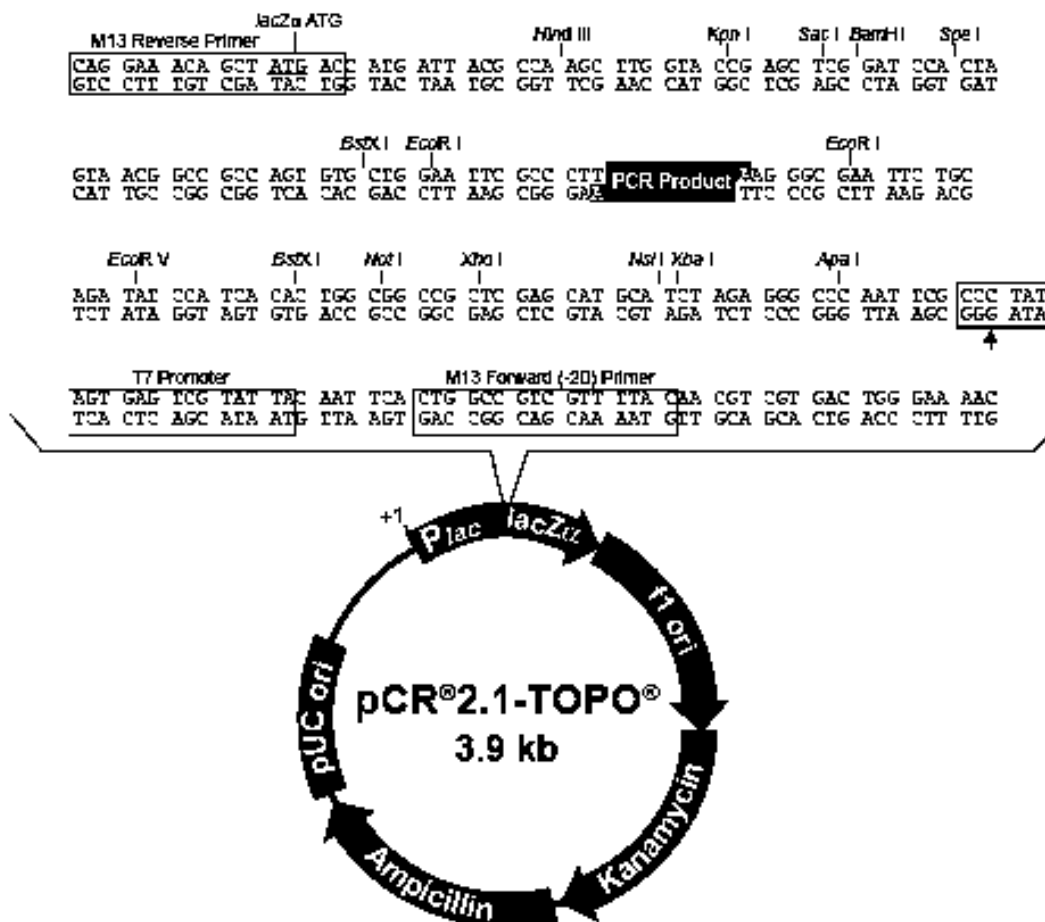
Vandenkoornhuyse, P., Husband R., Daniell I.J., Watson J.M., Duck M., Fitter A.H., Young J.P.W., 2002. Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Mol. Ecol.* 11:1555-1564.

Vidal, M.T., Azcón-Aguilar, C. y Barea J.M. 1992. Mycorrhizal inoculation enhances growth and development of micropropagated plants of avocado. *HortScience*. 27:7:785-787p.

White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S y Taylor, J. W. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. En: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* eds. M A Innis, Gelfand D H, Sninsky JJ y White T J. Pp. 315-322. Academic Press, Inc., New York.

ANEXOS

ANEXO 1 Esquema vector pCR Topo 2.1



Comments for pCR^{2.1-TOPO}[®]
3931 nucleotides

LacZα fragment: **bases 1-547**

M13 reverse priming site: **bases 205-221**

Multiple cloning site: **bases 234-357**

T7 promoter/priming site: **bases 364-383**

M13 Forward (-20) priming site: **bases 391-406**

f1 origin: **bases 548-985**

Kanamycin resistance ORF: **bases 1319-2113**

Ampicillin resistance ORF: **bases 2131-2991**

pUC origin: **bases 3136-3809**

ANEXO 2. Medios, soluciones y amortiguadores

Azul de tripano 0.05% en acetoglicerol (para 1 litro y medio)

400 mL Ácido acético 85%

500 mL Glicerol

600 mL Agua destilada

0.75g Azul de tripano

Acetoglicerol

400mL Ácido acético 85%

500 mL Glicerol

600 mL Agua destilada

Medio LB (1 Litro)

4g Extracto de levadura

10g triptona

5g NaCl

pH 7.0 aforar a 1 litro

Medio LB-agar (1 Litro)

4g Extracto de levadura

10g triptona

5g NaCl

15g agar bacteriológico

Obtención de Plásmidos (Birnboim and Doly (1979))

Solución I

50 mM glucosa, 25 mM Tris HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)

Solución II

0.2 N de NaOH, 1% SDS

Solución III

Acetato de potasio 5M, ácido acético glacial 3M

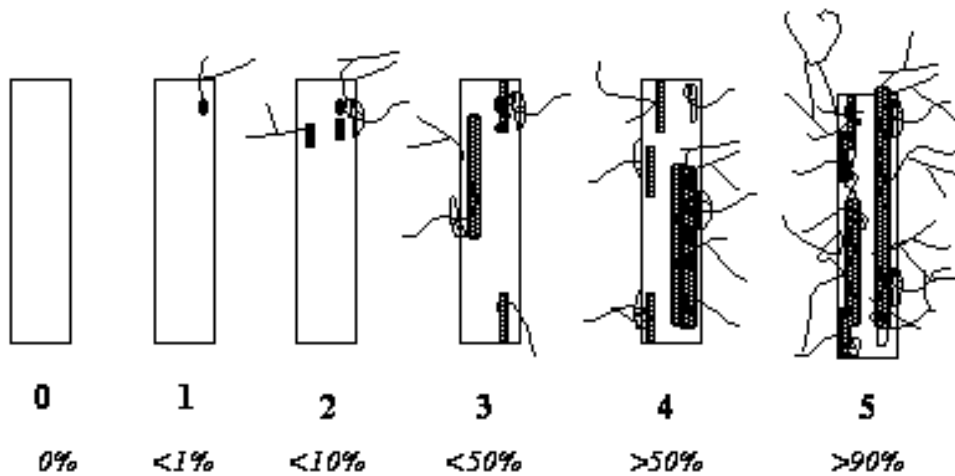
SB buffer 20X (1 Litro)

8g NaOH

~34g B(OH)₃

ANEXO 3 Esquema para el cálculo de la estimación de la colonización del sistema radical.

**SCORING MYCORRHIZAL COLONIZATION
IN CLASSES FROM 0 TO 5**



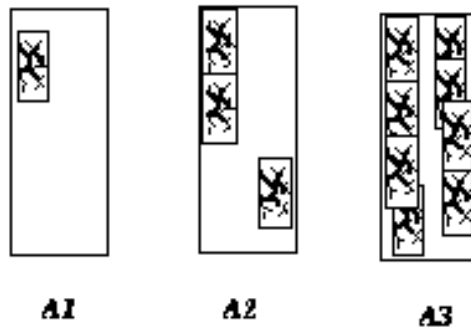
SCORING ARBUSCULE ABUNDANCE

None : A0

Few arbuscules : A1

Frequent : A2

Abundant : A3



ANEXO 4 Análisis estadísticos de comparación de medias

CUADRO 6.

d	(d-D) ²	S ² d	Sd	F	T calc	T tab
7	29.64	302.73	17.39	4.10	0.38	1.74
-12	183.75					
8	41.53				NO HAY DIFERENCIA	
11	89.19					
0	2.42					
-32	1125.97					
3	2.08		Manejo	Arbúsculos	Desvest	
-19	422.53		ORGANICO	21.8	10.85	
-14	241.97		CONVENCIONAL	20.2	9.86	
-21	508.75					
11	89.19					
-17	344.31					
33	988.75					
19	304.31					
20	340.21					
20	340.21					
11	89.20					
0	2.42					

Cuadro 7

d	(d-D) ²	S ² d	Sd	F	T calc	T tab
0	1.49	34.18	5.85	1.38	0.89	1.74
-7	67.60					
-7	67.60					NO HAY DIFERENCIA
0	1.49					
9	60.49					
0	1.49		Manejo	Arbúsculos	Desvest	
10	77.05		ORGANICO	2.3	5.44	
18	281.49		CONVENCIONAL	1.1	2.37	
0	1.49					
1	0.05					
0	1.49					
-2	10.38					
0	1.49					
0	1.49					
0	1.49					
0	1.49					
0	1.49					
0	1.49					
0	1.49					

Cuadro 8

d	(d-D)2	S ² d	Sd	F	T- calc	T tab
1	1.23	20.34	4.51	1.06	1.99	1.74
6	15.12					
13	118.57				EXISTE DIFERENCIA	
12	97.79					
5	8.35					
0	4.46					
6	15.12		Manejo	Arbúsculos	Desvest	
1	1.23		ORGANICO	2.9	4.15	
0	4.46		CONVENCIONAL	0.6	1.04	
0	4.46					
0	4.46					
-2	16.90					
-3	26.12					
0	4.46					
-1	9.68					
0	4.46					
0	4.46					
0	4.46					

Cuadro 9

d	(d-D) ²	S ² d	Sd	F	T calc	T tab
-3	61.36	77.32	8.79	2.07	2.33	1.74
0	23.36					
1	14.69				EXISTE DIFERENCIA	
2	8.03					
0	23.36					
23	330.03					
6	1.36					
6	1.36		Manejo	Arbusculos	Desvest	
5	0.03		ORGANICO	3.2	4.11	
0	23.36		CONVENCIONAL	2.3	4.21	
-3	61.36					
-2	46.69					
-3	61.36					
2	8.03					
14	84.03					
27	491.36					
12	51.36					
0	23.36					