

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



CARACTERIZACIÓN DE ENDOMICORRIZAS
ENCONTRADAS EN SUELOS DE FINCAS AZUCARERAS DE
GUATEMALA PARA FUTUROS USOS EN AGRICULTURA

Trabajo de graduación presentado por Marie Andrée Salazar Mérida para
optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala
2023

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades




CARACTERIZACIÓN DE ENDOMICORRIZAS
ENCONTRADAS EN SUELOS DE FINCAS AZUCARERAS DE
GUATEMALA PARA FUTUROS USOS EN AGRICULTURA

Trabajo de graduación presentado por Marie Andrée Salazar Mérida para
optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

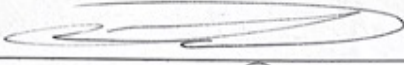
Guatemala
2023

Vo.Bo.


(f.) 

PhD. Dalia Lau-Bonilla

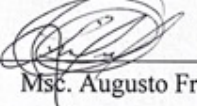
Tribunal examinador:

(f.) 

PhD. Diego Archila

(f.) 

PhD. Dalia Lau-Bonilla

(f.) 

Msc. Augusto Franco

Fecha de aprobación del examen de graduación:

Guatemala 13, de Enero del 2023

ÍNDICE

LISTA DE CUADROS	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN	XII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	3
3. OBJETIVOS.....	4
3.1 General.....	4
3.2 Específicos.....	4
4. MARCO TEÓRICO	5
4.1 Agricultura en Guatemala	5
4.1.1 Monocultivos	9
4.2 Caña de azúcar	10
4.3 Agricultura sostenible	16
4.4 Micorrizas	18
4.4.1 Tipos de Micorrizas	20
4.5 Técnicas moleculares	34
4.5.1 Secuenciación	35
4.5.2 Secuenciación de nueva generación.....	36
4.5.3 Metagenómica	37
5. METODOLOGÍA	38
5.1 Muestreo	38
5.2 Extracción de ADN	38

5.3	Análisis de datos.....	38
6.	RESULTADOS	39
6.1	Extracción de ADN y pureza	39
6.2	Lecturas filtradas.....	39
6.3	Abundancia relativa por filo.....	40
6.4	Abundancia relativa por género	41
7.	DISCUSIÓN	44
8.	CONCLUSIONES	49
9.	RECOMENDACIONES	50
10.	BIBLIOGRAFÍA	51
11.	ANEXOS	56
A.	Extracción de ADN	56
1.	Reactivos:.....	56
2.	Materiales:.....	56
3.	Equipo	56
4.	Recomendaciones	57
5.	Metodología	57
6.	Troubleshooting.....	58
B.	Resultados:	58

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Emisiones por agricultura en Guatemala en promedio del 2012 – 2018	8
Cuadro 2 Cambios potenciales en variables climáticas y posibles amenazas climáticas.	14
Cuadro 3 Ejemplos de micorrizas estudiadas para la biorremediación de distintos contaminantes	20
Cuadro 4. Resultados de cuantificación y pureza de ADN extraído de las muestras de suelo y raíz	39
Cuadro 5 Lecturas eliminadas después del control de calidad realizado a cada una de las muestras del marcador ITS1	39
Cuadro 6 Lecturas eliminadas después del control de calidad realizado a cada una de las muestras del marcador ITS2	39
Cuadro 7 Riqueza de los índices de diversidad alfa para el marcador ITS1.....	43
Cuadro 8 Riqueza de los índices de diversidad alfa para el marcador ITS2.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura porcentual de las exportaciones en Guatemala 2020	5
Figura 2. Tendencia de los precios de los fertilizantes nitrogenados, fosfatados y potásicos en Estados Unidos durante el 2021.	6
Figura 3. Fenómenos causados por el cambio climático y sus consecuencias en agricultura	7
Figura 4. Intensidad de uso de tierra por departamento en República de Guatemala	8
Figura 5. Diferencias de intensidad de uso de fertilizantes en la región de Latino América y el Caribe durante el 2006-2012.	10
Figura 6. Productividad toneladas de azúcar por hectárea (TAH) promedio del 2010-2015.	11
Figura 7. Los cinco productos con mayor exportación en Guatemala en el año 2020.	11
Figura 8. Superficie plantada en miles de hectáreas de azúcar del 2006 – 2020.	12
Figura 9. Área, producción de azúcar y precios de la caña 1959 – 2014, con fenómenos naturales.	13
Figura 10. Participación de los ingenios de producción, exportación y consumo interno de etanol en Guatemala.	15
Figura 11. Participación de los ingenios en la entrega de energía eléctrica al SIN	15
Figura 12. Concepto de agricultura sostenible.	17
Figura 13 Representación gráfica de los distintos tipos de micorrizas.	21
Figura 14. Clasificación de tipos de micorrizas de acuerdo a las características de los hongos y plantas involucradas en la asociación.	22
Figura 15 Micelio intracelular de una ectomicorriza	23
Figura 16 Representación de la interacción inter-intracelular de las hifas con las raíces de las plantas.	24
Figura 17. Géneros y especies de MA aisladas de plantas de café en México.	28
Figura 18 Abundancia relativa de los géneros de micorrizas arbusculares en estudio realizado en México.	28
Figura 19 Árbol filogenético realizado en estudio sobre simbiosis de árbol de mazanilla y micorrizas arbusculares.	30
Figura 20 Abundancia relativa de micorrizas arbusculares en distintas zonas del estudio	31
Figura 21. Rendimientos de toneladas de azúcar por hectárea (TAH) con los distintos tratamientos utilizados.	32
Figura 22 Estudio realizado de comparación de hongos cultivables y no cultivables con distintos métodos moleculares	34
Figura 23 Pasos en los que consiste la secuenciación de nueva generación.	37
Figura 24 Abundancia relativa por filo de cada muestra realizada para el marcador ITS1	40

Figura 25 Abundancia relativa por filo de cada muestra realizada para el marcador ITS2	41
Figura 26. Abundancia relativa por géneros de cada muestra realizada para el marcador ITS1.....	42
Figura 27 Abundancia relativa por géneros de cada muestra realizada para el marcador ITS2.....	42
Figura 28 Electroforesis en gel después de realizar la extracción de ADN de la muestra SEL	58
Figura 29 Electroforesis en gel después de realizar la extracción de ADN de la muestra COL.....	59
Figura 30 Tinción de azul de lactofenol proveída por la empresa azucarera en donde se observan endomicorizas de la finca COL.....	59
Figura 31 Tinción de azul de lactofenol proveída por la empresa azucarera en donde se observan endomicorizas de la finca SEL.....	60
Figura 32 Gráfica de control de calidad en las muestras "forward" para el marcador ITS1	61
Figura 33 Gráfica de control de calidad en las muestras "reverse" para el marcador ITS1	61
Figura 34 Gráfica de error para las muestras "forward" del marcador ITS1	62
Figura 35 Gráfica de error para las muestras "reverse" del marcador ITS1	62
Figura 36 Gráfica de control de calidad en las muestras "forward" para el marcador ITS2	63
Figura 37 Gráfica de control de calidad en las muestras "reverse" para el marcador ITS2	63
Figura 38 Gráfica de error para las muestras "forward" del marcador ITS2	64
Figura 39 Gráfica de error para las muestras "reverse" del marcador ITS2	64
Figura 40 Modelo de rarefacción para la muestra COL y SEL del marcador ITS1	65
Figura 41 Modelo de rarefacción para los tipos de muestra para el marcador ITS1	65
Figura 42 Modelo de rarefacción para la muestra COL y SEL del marcador ITS2	66
Figura 43 Modelo de rarefacción para los tipos de muestra para el marcador ITS2	66

LISTA DE ABREVIATURAS

FAO: Organización de las naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura

GEI: Gases de Efecto Invernadero

AZASGUA: Asociación de Azucareros de Guatemala

AM: Micorrizas Arbusculares

EMC: Ectomicorrizas

ERM: Micelio Radical Extra

PAH: Hidrocarburos aromáticos Policíclicos

COLOM: Finca Colombina

SEL: La Selva

POE: Procedimiento de Operación Estándar

RI: Resistencia Inducida

USAC: Universidad San Carlos de Guatemala

URL: Universidad Rafael Landívar

BM: Biología Molecular

AN: Ácidos Nucleicos

RFLP: Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Restringidos

PCR: Reacción en Cadena Polimerasa

RAPDs: ADN Polimórfico Amplificado al Azar

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido

AFLP: Polimorfismo de Longitud de Fragmento Amplificado

SRAP: Polimorfismo Amplificado Relacionado con la Secuencia

A: Adenina

C: Citosina

T: Timina

G: Guanina

ddNTs: Nucleótidos Modificados Dideoxinucleótidos Trifosfato

NGS: Secuenciación de Nueva Generación

RESUMEN

Ante el desafío del alto uso de recursos y el costo ambiental del sistema alimentario, los líderes de muchos países han acordado con una visión para lograr el desarrollo sostenible, particularmente para la agricultura como una parte importante en este movimiento. Entre las innovaciones que se han encontrado en estos últimos años ha sido el uso de micorrizas para mejoramiento de suelo y biofertilizante en la agricultura alrededor del mundo, debido a que estas han demostrado resultados positivos en distintos cultivos. Debido a que Guatemala es un país agrícola se utilizan varios tipos de fertilizantes para mejorar la productividad de cultivos, principalmente en la caña de azúcar, el cual es uno de los cultivos que representan al 36% de las exportaciones del país. Sin embargo, debido a la contaminación del suelo por fertilizantes químicos se han buscado alternativas orgánicas para mejorar su productividad. Es por esto por lo que en este estudio se plantea el objetivo de caracterizar micorrizas encontradas en suelos seleccionados de fincas azucareras de Guatemala por medio de la herramienta bioinformática R Studio. Para esto se realizó una extracción de ADN por medio del kit de QIAGEN “PowerSoil® DNA Extraction Kit”, secuenciando los datos con la empresa macrogen. Sin embargo, los resultados de este estudio no fueron los esperados ya que no se encontraron micorrizas en los suelos muestreados, debido a varios factores como el número y el tipo de muestras, la falta de variables los parámetros físicoquímicos y los marcadores utilizados (ITS1 – ITS2). Es por esto por lo que se recomienda realizar nuevamente este estudio cambiando los factores mencionados anteriormente para poder evaluar de nuevo si hay presencia de micorrizas en los suelos azucareros.

1. INTRODUCCIÓN

La agricultura es uno de los aspectos económicos más importantes para Guatemala porque no solo representa 10.8% del Producto Interno Bruto (PIB), sino también, es el mayor productor de empleo y genera más del 36.2% de las exportaciones del país (España Exportación e Inversiones [ICEX]. 2020). En Guatemala, el cultivo con mayor superficie cultivada es el maíz, seguido del café, la caña de azúcar y el frijol (Derlagen, C. Muñoz, S. De Salvo, P. 2020). La caña de azúcar es uno de los cultivos más importantes para Guatemala, de tal forma que el país es conocido como el sexto mayor exportador en el mundo y el tercero en América Latina. Además, fue el cuarto producto de mayor exportación, después del vestuario, cardamomo y banano. Además, en el 2020 generó, 54,000 trabajos directos y 280,000 trabajos indirectos (Asociación de Azucareros de Guatemala [ASAZGUA]. 2020).

Sin embargo, en los últimos años la agricultura en Guatemala se ha visto amenazada tanto en el aspecto económico como en el ecológico. Hablando de la parte económica, esta se ha visto afectada por el alto precio de los fertilizantes químicos debido a los elevados precios de energía, las perturbaciones en el comercio y los elevados precios del transporte. Esto hace que los precios de los cultivos se eleven y, por lo tanto, haya menos asequibilidad del producto por parte de la población (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, [FAO]. 2022).

Por otro lado, se ha visto que la agricultura enfrenta una crisis ambiental que radica principalmente en las prácticas agrícolas intensivas (Aldás-Jarrín et al., 2016) como lo son el uso de fertilizantes químicos los cuales son dañinos para la tierra y los cultivos cuando se usan de manera excesiva, algunas de las consecuencias que estas tienen en el medio ambiente son: eutrofización, toxicidad del agua, contaminación de aguas subterráneas, contaminación del aire, degradación del suelo y de los ecosistemas, desequilibrios biológicos y reducción de la biodiversidad. Sin embargo, es importante recalcar que las plantas solo pueden absorber entre un 30% - 50% de los fertilizantes y el resto se pierde en el suelo (Ulibarry, 2019). Es por esta razón que se están buscando distintas maneras de reemplazar estos fertilizantes químicos por fertilizantes orgánicos.

Los abonos de origen natural son los que se obtienen de la degradación y mineralización de materiales orgánicos (Mosquera, 2010). Entre estos se conoce el compostaje, fuentes de origen animal (harinas de pescado, cáscaras de huevo) o desechos agroindustriales como la cáscara del café (Garro Alfaro, 2016). Este tipo de fertilizantes ayudan a restaurar los niveles de materia orgánica en los suelos (Fonseca, A y Arias, C. 2012), además, mejoran su estructura, ayudan a retener los nutrientes, permiten la fijación

de carbono en el sustrato y favorecen la capacidad del cultivo para absorber el agua (Mosquera, 2010). Es por estas ventajas que los biofertilizantes, los cuales son productos formulados por microorganismos (hongos, bacterias y algas), proveen y mejoran la disponibilidad de nutrientes (Aldás-Jarrín et al., 2016). En los últimos años uno de los biofertilizantes más populares en el mercado ha sido el que es a base de micorrizas.

Las micorrizas, son conocidas como un mutualismo terrestre entre las raíces de las plantas y ciertas especies de hongos (Egerton-Warburton et al., 2005). En donde la planta le proporciona al hongo carbohidratos y un microhábitat para completar su ciclo de vida. El hongo a su vez le permite a la planta, una mejor captación de agua y nutrientes con baja disponibilidad en el suelo, además de una defensa contra patógenos externos (LCamargo-Ricalde et al., 2012). Las micorrizas se pueden agrupar dependiendo de las estructuras y relaciones que existen entre hongos y plantas. Entre estos se encuentran, con manto fúngico (ectomicorrizas, micorrizas monotropoides y micorrizas arbutoides), y sin manto fúngico (micorrizas arbusculares (endomycorrizas), ericoides y orquioides), (Upadhyay, 2019). Y de estas las que más popularidad han tenido en los últimos años son las endomicorrizas.

Las endomicorrizas son de gran importancia en la agricultura ya que ayudan a las plantas a obtener fósforo y nitrógeno de la tierra, entre otros nutrientes, favorecen el crecimiento de semillas, incrementan la productividad, reducen estrés abiótico y biótico, mejoran la calidad del suelo durante estrés como la salinidad o sequía (Pedone-Bonfim et al., 2018). Esto demuestra que las endomicorrizas pueden ser parte de la solución al uso de fertilizantes químicos y así poder alcanzar una agricultura orgánica y sostenible. En el mercado existen endomicorrizas comerciales las cuales se utilizan como aditivos en la agricultura, sin embargo, se ha demostrado que la inoculación de estas no siempre es positiva porque los sistemas agrícolas convencionales junto con el uso irracional de pesticidas reducen el efecto positivo del crecimiento de estas (Hernandez et al., 2019). Es por esto que se recomienda utilizar micorrizas nativas ya que están adecuadas al ambiente y a las plantaciones que se necesitan. Este estudio es importante en Guatemala porque a la fecha no se ha reportado ninguno en el país, mientras que a nivel mundial sobresalen los estudios realizados en Brasil, China, Chile, Italia, entre otros (Bhargava, 2019). Es por esto por lo que el propósito de esta investigación es caracterizar endomicorrizas con herramientas de secuenciación Illumina encontradas en suelos seleccionados de fincas azucareras de Guatemala por medio de la herramienta bioinformática R Studio para futuros usos en la agricultura.

2. JUSTIFICACIÓN

Según el INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geográfica e Informática de México) en octubre del 2021 el precio de los fertilizantes aumentó 20.7%, siendo este el mayor aumento de precio desde el 2012, esto debido a la crisis energética actual a nivel mundial y a las presiones ejercidas en la producción y distribución de agroquímicos derivados de la pandemia de COVID-19, lo que lleva a muchos agricultores a buscar alternativas orgánicas o naturales. Entre estas alternativas se encuentra el lombricompost, el estiércol entre muchos otros. Pero en los últimos años se han buscado nuevas alternativas que contengan microorganismos para ayudar al mejor rendimiento de la planta. Un ejemplo de estos es el uso de endomicorrizas, los cuales son hongos que penetran en el interior de las células de las raíces y tienen una simbiosis directa con las mismas, encontrándose en el 95% de estas (Wilmar. Wilches et al., 2022).

Entre las líneas de investigación de endomicorrizas más exploradas hoy en día se encuentra la ecología de las comunidades fúngicas, taxonomía y sistemática, biología molecular, su importancia en la estructura dinámica de las comunidades vegetales y ecosistemas, también la fisiología de la simbiosis, biotecnología y en ciencias ambientales para la biorremediación, restauración y rehabilitación de ecosistemas deteriorados (Valdés et al., 2011). Es por esto que el propósito de esta investigación es caracterizar endomicorrizas con herramientas de secuenciación Illumina encontradas en suelos seleccionados de fincas azucareras de Guatemala por medio de la herramienta bioinformática R Studio para futuros usos en la agricultura. Se decidió investigar sobre este tema ya que en Guatemala no hay una investigación de caracterización endomicorrízica. Existen 3 investigaciones de otras universidades de Guatemala en donde se habla de la producción de ectomicorrizas y su efecto en especies de pino (Turcios, 2009), su impacto en semillas híbridas (Orellana, 2004) e inóculos de endomicorrizas en el rendimiento de la caña de azúcar (Ordoñez, 2015), sin embargo, no se han publicado estudios genómicos de endomicorrizas en el país.

En otros países latinoamericanos existe más investigación sobre el tema. Por ejemplo, en México las principales líneas de investigación en micorrizas son: agricultura, ecología, taxonomía y sistemática, biología molecular, biotecnología, ciencias genómicas y ciencias ambientales. En donde la mayor parte de investigación está dirigido a endomicorrizas, seguido de ectomicorrizas (Camargo-Ricalde et al., 2012). Otro país que ha invertido en investigación con micorrizas es Colombia, donde se ha evaluado el uso de endomicorrizas para el mejoramiento y el rendimiento de caña de azúcar para la producción de panela (Wilches et al., 2022). Es por esto por lo que es importante empezar a investigar sobre el tema en Guatemala y poder comparar los resultados con otros países latinoamericanos.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Caracterizar endomicorrizas con herramientas de secuenciación Illumina encontradas en suelos seleccionados de fincas azucareras en Escuintla, Guatemala por medio de la herramienta bioinformática R Studio.

3.2 Específicos

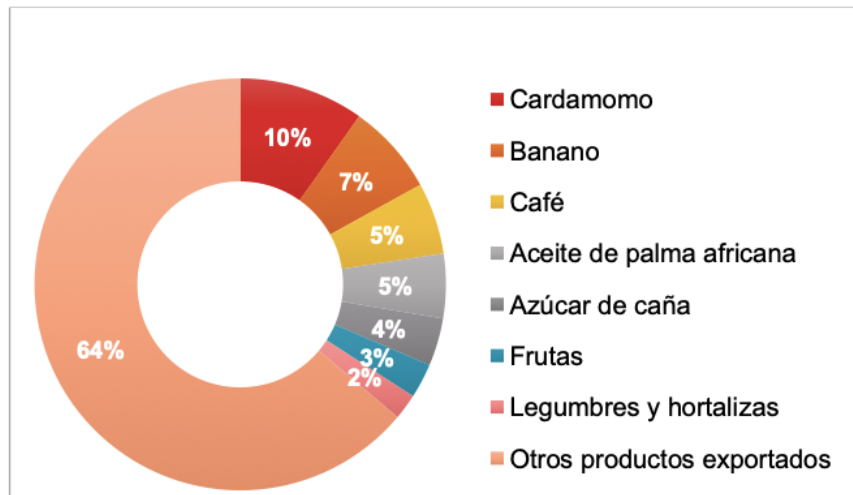
- 3.2.1 Utilizar herramientas de secuenciación para identificar los géneros de las endomicorrizas encontradas en las muestras de suelo y raíz proporcionadas.
- 3.2.2 Comparación de las micorrizas encontradas en las muestras de suelo y raíces proporcionadas con las encontradas en la literatura citada para seleccionar las más adecuadas para su uso futuro en agricultura.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Agricultura en Guatemala

La estructura productiva de Guatemala se caracteriza por su dependencia del sector agrícola. La riqueza natural del país ha permitido el desarrollo de una gran variedad de cultivos que constituyen uno de los principales motores de la economía nacional tanto por su contribución al PIB (10.8%) como su generación de empleos y divisas de exportación (36.2% de las divisas). Entre los productos más importantes de exportación se encuentra el cardamomo, banano, café, palma africana, caña de azúcar, frutas, legumbres y hortalizas, (Figura 1), (ICEX, 2020). Sin embargo, los cultivos en los últimos años se han visto afectados por el cambio climático y por el alto precio de los fertilizantes químicos, afectando su producción y por lo tanto a su exportación.

Figura 1. Estructura porcentual de las exportaciones en Guatemala 2020

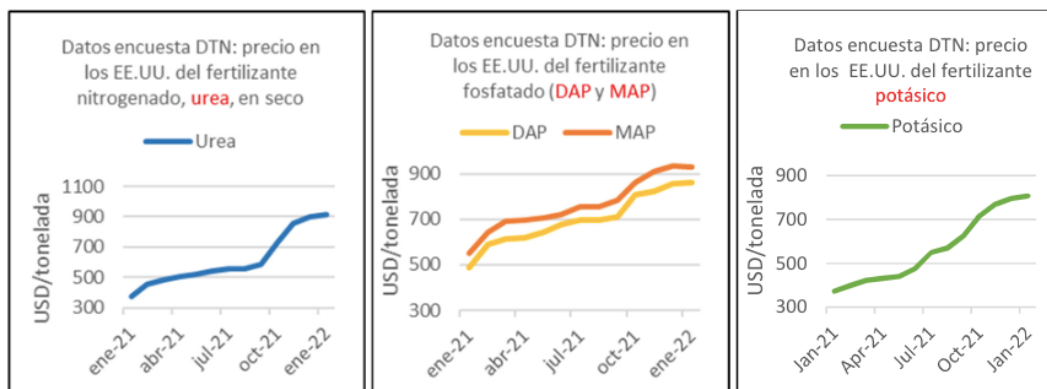


(ICEX, 2020)

Los precios de los fertilizantes químicos han ido en aumento desde el 2021 y muchos han alcanzado precios máximos históricos. El aumento más notable se ha visto en los fertilizantes nitrogenados, por ejemplo, el precio de la urea se ha triplicado en donde antes se pagaba \$245 la tonelada, ahora ha llegado a alcanzar un precio de \$901. Por otro lado, los fertilizantes fosfatados han subido un 50% en los últimos años y el precio de los fertilizantes de potasio ha empezado a subir en el último año (Figura 2). Estos precios se ven afectados debido a los elevados precios de la energía por su importante papel en producción. Otra razón se le atribuye al encarecimiento del transporte debido al gran aumento de costo de los fletes debido al COVID-19 (FAO, 2022). Es por esta razón que se están buscando reemplazos a los fertilizantes químicos para poder reducir gastos, además,

que los fertilizantes químicos son conocidos como uno de los mayores contribuyentes al cambio climático.

Figura 2. Tendencia de los precios de los fertilizantes nitrogenados, fosfatados y potásicos en Estados Unidos durante el 2021.



(FAO, 2022).

La agricultura es un sector que debe de abordarse desde dos enfoques: primero como un sector muy vulnerable a cambio climático, en el cual es necesario plantear medidas de adopción urgente y segundo como uno de los sectores que aporta significativamente al cambio climático. Hay estudios que indican que para el 2030 en Guatemala habrá cambios significativos con la temperatura y precipitación pluvial, llevando a un incremento de plagas, enfermedades, degradación de suelo, entre otros, (Figura 3). Esto podría llegar a afectar la economía del país, la seguridad alimentaria y la vida de sus habitantes (Garrido et al., 2019).

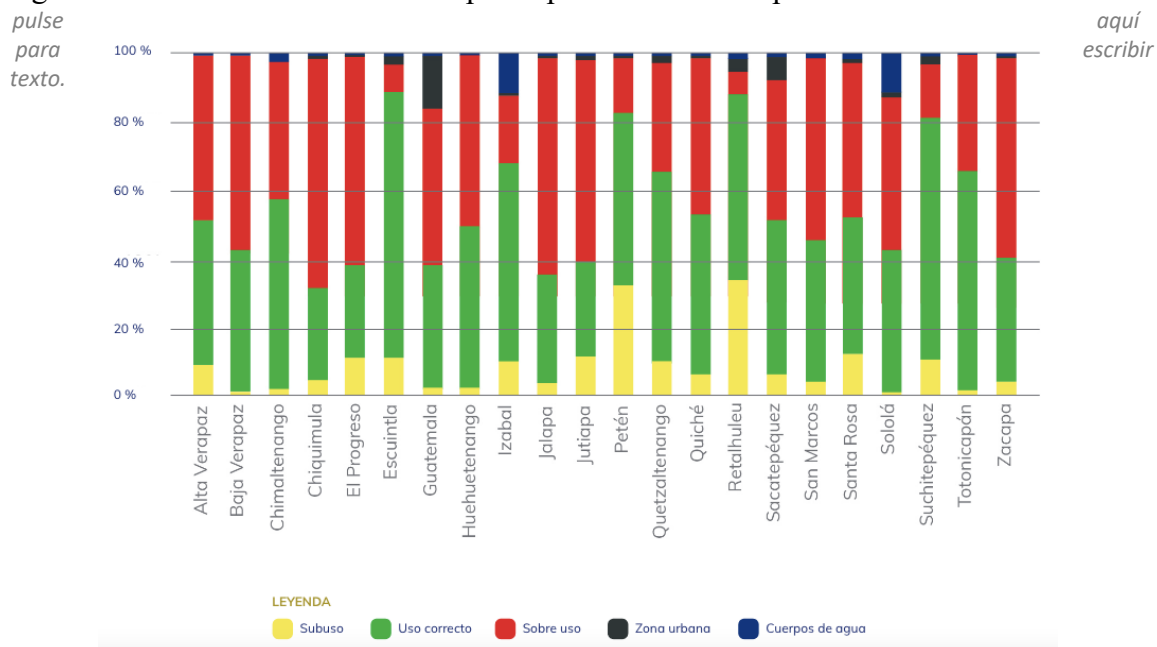
Figura 3. Fenómenos causados por el cambio climático y sus consecuencias en agricultura

Fenómenos y orientación de las tendencias	Efectos en agricultura, silvicultura, ecosistemas
Menos días y noches más templados y más días y noches más cálidos y aumento de la frecuencia de períodos cálidos	Disminución del rendimiento en entornos más cálidos (estrés térmico) y aumento de plagas de insectos, así como de incendios incontrolados
Aumento de la frecuencia de lluvias intensas	Daños a los cultivos, erosión del suelo, imposibilidad de cultivar tierras por saturación hídrica de los suelos
Aumento de las áreas afectadas por la sequía	Degradación de la tierra, disminución de los rendimientos, daños e inhabilitación de cultivos, mayor riesgo de incendios incontrolados
Aumento de la actividad ciclónica tropical intensa	Daños a los cultivos
Mayor incidencia de niveles de mar extremadamente altos (excluidos los tsunamis)	Salinización del agua de riego, estuarios y sistemas de agua dulce

(Guerra & Hernández, 2015).

Por ejemplo, la agricultura es uno de los principales causantes de erosión en el suelo, por el riego excesivo y por el sobreuso de tierras para la agricultura, (Figura 4). También es uno de los principales causantes de pérdida de diversidad biológica lo que provoca aumento de plagas y enfermedades en los cultivos agrícolas. La agricultura también aporta al cambio climático por la contribución de Gases de Efecto Invernadero (GEI) debido al uso excesivo de fertilizantes químicos (Cuadro 1) y también por la deforestación para tener más suelos agrícolas (Garrido et al., 2019).

Figura 4. Intensidad de uso de tierra por departamento en República de Guatemala *Haz clic o pulse para texto. aquí escribir*



(Garrido et al., 2019).

Cuadro 1. Emisiones por agricultura en Guatemala en promedio del 2012 – 2018

Emisiones GEI en cultivos	Promedio 2012 - 2018
Fertilizante sintético	1,119.7
Fertilizante orgánico	511.8
Residuos de cultivos	138.8

Adaptación de: (Derlagen et al., 2020)

Irónicamente el cambio climático también presenta un riesgo para la agricultura, principalmente porque está generando aumentos en la temperatura y una reducción de lluvia, haciendo que haya más frecuencia de sequías e inundaciones (Superintendencia de Bancos Guatemala, 2016). Otros de los problemas que tiene la agricultura por el cambio climático son, la reducción de la productividad y rendimientos de los cultivos, por otro lado, tiene impacto directo a las cosechas por efectos de fenómenos extremos. De igual manera, hay incremento de plagas y enfermedades de los cultivos y la reducción de polinizadores, siendo esto es de gran preocupación porque son esenciales para la producción de la mayoría de estos (Viguera et al., 2017). Sin embargo, los cultivos que más se verán afectados son los monocultivos, debido a su poca diversidad genética.

4.1.1 Monocultivos

El monocultivo es la práctica de plantar grandes extensiones de tierra con cultivos con una sola especie, aplicando los mismos patrones de cultivo, riego, fertilización y recolección, lo que deriva en la producción de grandes cantidades de un solo producto a muy bajo costo (Camposeco et al., 2020). Los monocultivos no solo son perjudiciales para el medio ambiente sino también para la misma agricultura. Esto se debe a que crea un ciclo destructivo que agota los nutrientes del suelo, dejándolo débil e incapaz de soportar el crecimiento saludable de las plantas, sin agregar cantidades cada vez mayores de fertilizantes químicos. También puede crear oportunidades para plagas, malas hierbas y enfermedades lo que da necesidad de aplicar más y fuertes productos químicos para combatirlos (Truitt, G. 2019).

Los monocultivos industriales no solo han reducido la biodiversidad de los paisajes por la deforestación, sino también por los impactos directos de pesticidas en polinizadores, en los enemigos naturales de las plagas y de la vida silvestre en general. La pérdida de rendimiento en los cultivos por este tipo de químicos se encuentra entre el 20 – 30% aproximadamente (Altieri, 2009). Otro problema es el uso de fertilizantes el cual se ha incrementado en los últimos años, parte de las estrategias gubernamentales y del sector privado para lograr una magnitud de producción como la que se necesita en el mundo ha sido el uso de fertilizantes en donde en la actualidad el 50% de la población mundial depende de fertilizantes (Reyes, 2017).

En un estudio se encontró que durante el período del 2006 – 2012 en toda la región de América Latina y el Caribe, la intensidad del uso de fertilizante incrementó un 27.1%. Donde los países que más aumentaron la utilización de estos fue Bolivia, Belice, El Salvador, Panamá, Uruguay y Brasil, además que Centro América fue la región donde se reportó más uso de fertilizantes en toda la región (Figura 5), (Reyes, 2017). Sin embargo, es un problema en el cambio climático porque estos se conocen por contaminar el suelo cuando se usan de manera excesiva y ha llevado que los cultivos lo utilicen de forma ineficiente. Además, también contaminan fuentes de agua, lo cual puede llegar a promover eutrofización, esto se debe principalmente a que los monocultivos carecen de mecanismos de resiliencia frente a los cambios climáticos externos (Altieri, M, 2009).

Figura 5. Diferencias de intensidad de uso de fertilizantes en la región de Latino América y el Caribe durante el 2006-2012.

País	Utilización de fertilizante		Variación de consumo 2012-2006 (%)
	2006	2012	
Argentina	10,2	10,3	1,0
Barbados	112,9	136,4	20,8
Belice	41,1	58,9	43,3
Bolivia	0,4	1,1	175,0
Brasil	32,5	45,7	40,6
Chile	40,7	30,3	-25,6
Colombia	25,8	27,7	7,4
Costa Rica	96,2	91,6	-4,8
Ecuador	34,4	37,8	9,9
El Salvador	44,6	77,6	74,0
Guatemala	47,6	54,9	15,3
Guyana	8,2	6,4	-22,0
Honduras	62,7	26,2	-58,2
Jamaica	17,7	22,6	27,7
México	15,1	15,6	3,3
Nicaragua	11,7	15,9	35,9
Panamá	9,3	15,2	63,4
Paraguay	12,8	17,1	33,6
Perú	14,5	17,8	22,8
RepDomin	26,7	30,0	12,4
TriniYTob	471,9	286,7	-39,2
Uruguay	14,2	22,2	56,3
Venezuela	21,2	21,7	2,4
Total ALC	21,4	27,2	27,1

(Reyes, 2017).

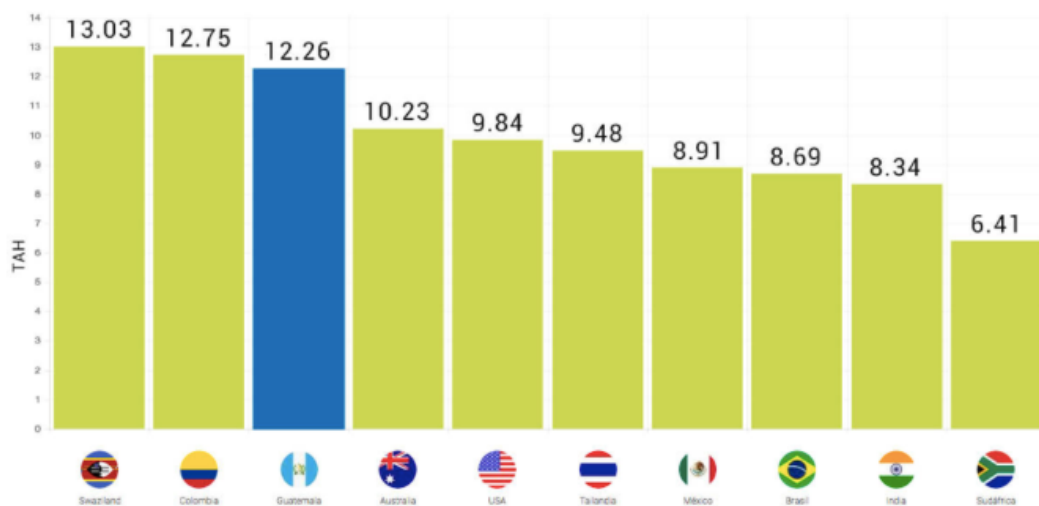
A nivel mundial, Guatemala es el cuarto país más vulnerable en términos de desastres naturales y noveno en términos de cambio climático. Se ha estudiado que el 70% de la deforestación en Guatemala se debe a la ganadería extensiva y la agricultura vinculada a monocultivos extensos (Camposeco et al., 2020). Por ejemplo, en la caña de azúcar, requieren homogenización de las áreas de cultivo, en donde se empieza con la eliminación de árboles y la cobertura vegetal relleno de barrancos para incrementar el área mecanizable y la construcción de canales para desviar los cauces de los ríos para los canales de riego. Por otro lado, no existe rotación del cultivo por lo que el suelo se desgasta y pierde su fertilidad, para compensar esto, las empresas utilizan fertilizantes químicos de los cuales se necesitan cantidades más grandes y empobrecen el suelo cada vez más (Escobar-Anleu, 2020).

4.2 Caña de azúcar

El azúcar es un producto agroindustrial de gran demanda en todo el mundo, debido a su uso en diversos alimentos. Entre los mayores exportadores de este producto en el mundo se encuentra Guatemala como el 6to mayor exportador y el 3ero en América Latina. Además, es el tercer país del mundo con mayor productividad de azúcar (Figura 6),

(Asazgua. 2020). Aportando al 1.6% de la producción y al 3.1% de las exportaciones mundiales (Superintendencia de Bancos Guatemala [SIB], 2016).

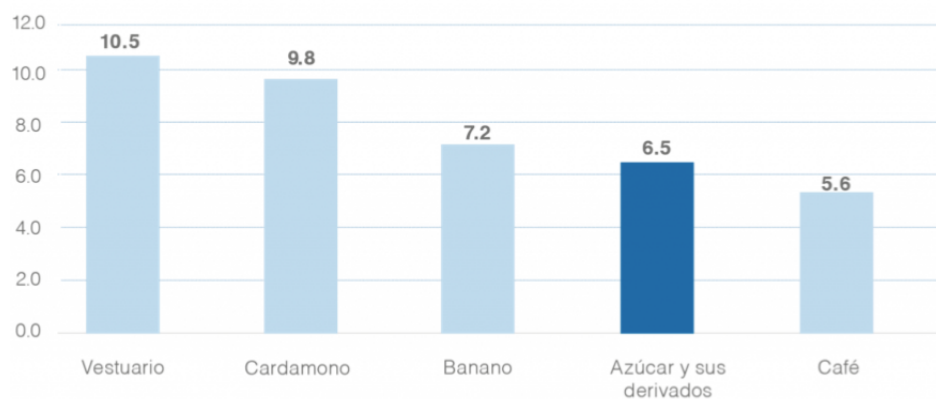
Figura 6. Productividad toneladas de azúcar por hectárea (TAH) promedio del 2010-2015.



(Azagua. 2020).

Para Guatemala la producción de azúcar es un importante generador de empleo (54,000 empleos directos y 280,000 empleos indirectos) y la exportación de azúcar es una de las principales fuentes de divisas en el país (\$756 millones), (SIB, 2016 y Asazgua. 2020). Esto se debe a que el azúcar y sus derivados fueron el 4to producto mayor exportado del país en el 2020, siendo este el 6.5% de las exportaciones a nivel nacional (Figura 7), (Asazgua. 2020).

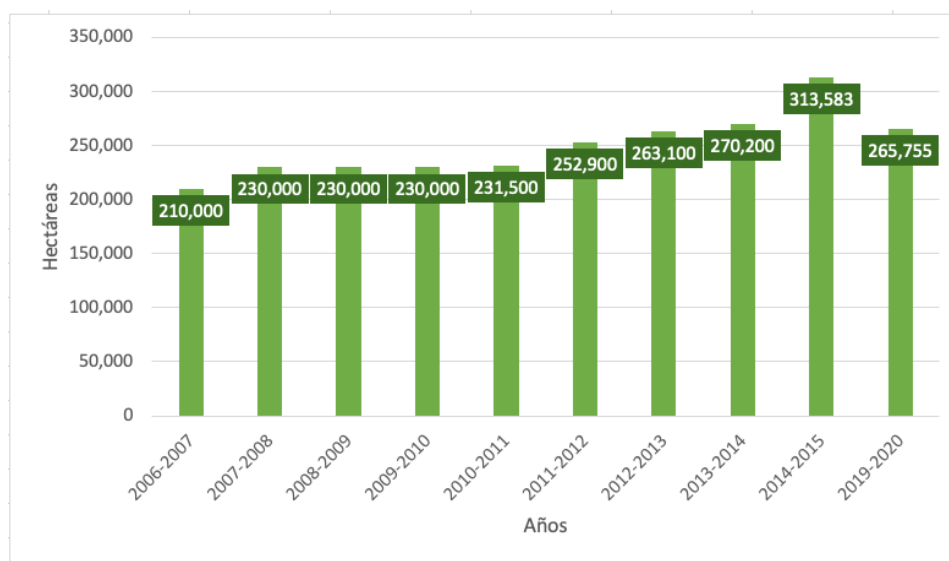
Figura 7. Los cinco productos con mayor exportación en Guatemala en el año 2020.



(Azagua. 2020).

Aunque la caña de azúcar es importante para el país, este cultivo es un claro ejemplo en donde la agricultura aporta al cambio climático y que es muy afectada por este. Por ejemplo, la caña de azúcar es un monocultivo que abarca la mayoría de tierra en Escuintla, Guatemala. En donde su expansión se limita a un crecimiento promedio de 2.0% anual debido a la falta de tierras adecuadas (Figura 8), (SIB, 2016). Por otro lado, al ser un monocultivo, utiliza grandes cantidades de fertilizante químico, plaguicidas y fungicidas que contaminan suelos y cuerpos de agua. Por ejemplo, las emisiones de óxido nitroso del sector azucarero representan aproximadamente el 2.6% y el metano el 1% del total de emisiones del sector agropecuario (Guerra & Hernández, 2015).

Figura 8. Superficie plantada en miles de hectáreas de azúcar del 2006 – 2020.



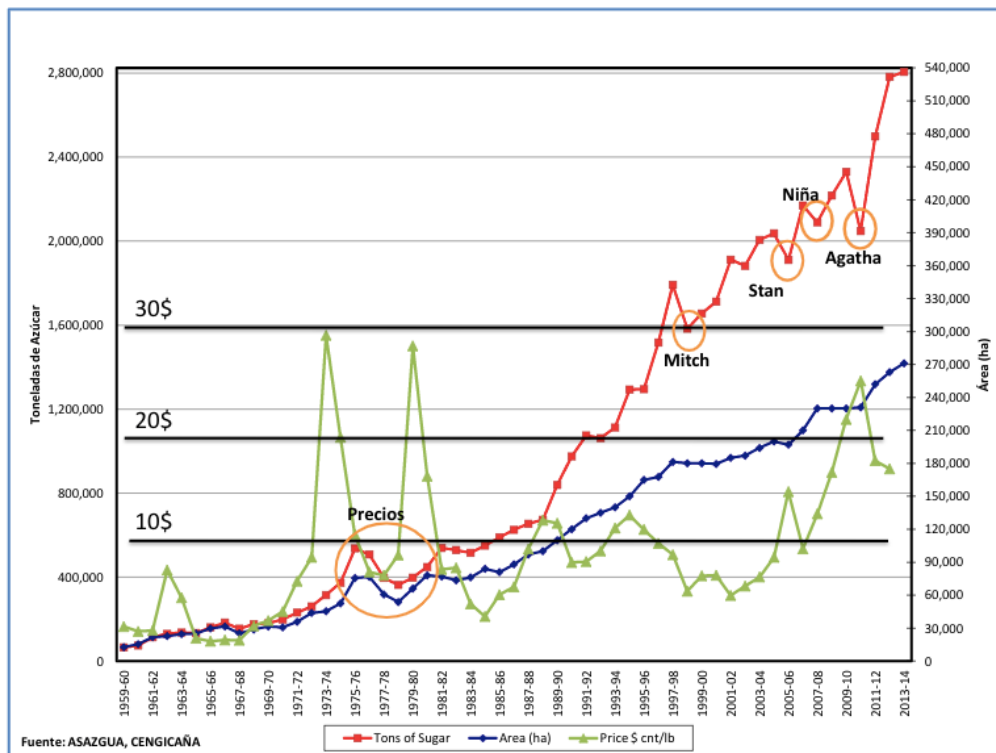
Adaptado de: Superintendencia de Bancos Guatemala, 2016 e Instituto Nacional de Estadística de Guatemala [INE], 2020.

Pero, por otro lado, las condiciones climatológicas y otros factores alteran la productividad de la caña en muchos aspectos (SIB, 2016). Por ejemplo, la caña tiene parámetros climáticos muy específicos para su cultivo. Se conoce que la temperatura óptima para su crecimiento es entre 27 – 33°C. Sin embargo, si esta aumenta o disminuye demasiado el crecimiento puede disminuir o paralizarse, también puede afectar el proceso de fotosíntesis e incluso la concentración de sacarosa. Es importante también que la temperatura del suelo se encuentre en los 27°C si esta sube o baja mucho puede ser un factor limitante para el desarrollo de la planta (Guerra & Hernández, 2015).

Por otro lado, la caña de azúcar necesita una cantidad de agua entre los 1,200 – 1,500 mm, lo cual va cambiando conforme el crecimiento de la planta. Por consiguiente, los excesos de lluvias y sequías son perjudiciales para la misma. Es por este motivo cambio

climático puede ser tan negativo para la caña de azúcar, porque ha contribuido a lluvias extremas, aumento de la temperatura máxima diaria, canículas más intensas y largas, entre otros (Figura 9). Esto llevando a amenazas climáticas como sequías, inundaciones, heladas, proliferación de plagas y enfermedades, etc. (Cuadro 2). Esto afectando a la producción y exportación de la caña (Guerra & Hernández, 2015).

Figura 9. Área, producción de azúcar y precios de la caña 1959 – 2014, con fenómenos naturales.



(Guerra & Hernández, 2015)

Cuadro 2 Cambios potenciales en variables climáticas y posibles amenazas climáticas.

Cambios potenciales en variables climáticas	Amenazas climáticas potenciales
Aumento o disminución en la cantidad anual de la lluvia	Inundaciones, desborde de ríos, sequías, escasez de agua para distintos usos, deslizamientos y derrumbes.
Inicio temprano o tardío de la época lluviosa	
Lluvia extrema	
Lluvias intensas en la época seca	
Aumento en el promedio de temperatura anual	
Aumento de la temperatura máxima diaria	Proliferación de plagas y enfermedades que afectan a los cultivos, heladas.
Aumento de la temperatura mínima diaria	
Aumento en los eventos de temperaturas extremas	
Aumento en eventos de vientos fuertes o con velocidades muy altas	-
Tormentas ciclónicas y huracanes más fuertes	-
Aumento en la evaporación y evapotranspiración	-

Adaptación de: (Guerra & Hernández, 2015).

Las implicaciones que los cambios climáticos pueden tener para la producción de la caña es la distribución de áreas aptas para su cultivo. Debido a que las condiciones de temperatura y humedad para la siembra de esta son muy específicas. Otro de los problemas es el aumento de temperatura, ya que esto provocará que los requerimientos de riego sean mayores por el aumento de la evapotranspiración. Por otro lado, los cambios de precipitación serán más inciertos lo cual puede causar daños graves en los cultivos, el transporte, el proceso y la comercialización de la caña (Guerra & Hernández, 2015).

Es por estas razones que las empresas azucareras están buscando alternativas para ayudar a mitigar el cambio climático. Por ejemplo, se encuentra la sustitución de los combustibles fósiles por biocombustibles (biodiésel y bioetanol), (Guerra & Hernández, 2015), el cual en el 2014 se estima que se exportó a Estados Unidos y Europa 278 millones de litros de etanol (Figura 10), (Melgar & Luis Quemé, 2015). Por otro lado, se encuentra también, la reducción del uso de fertilizantes químicos o su sustitución por biofertilizantes. También están empezando a utilizar la gasificación de residuos de bagazo y de caña de azúcar para su uso en bioelectricidad. Por ejemplo, en el 2013 los ingenios aportaron al sistema nacional interconectado 1521 GWh/año que presenta un 15.9% de la demanda total anual del país (Figura 11), (Melgar & Luis Quemé, 2015). También se han realizado pruebas para la validación de programas de riego bajo ciertas condiciones de suelo en la

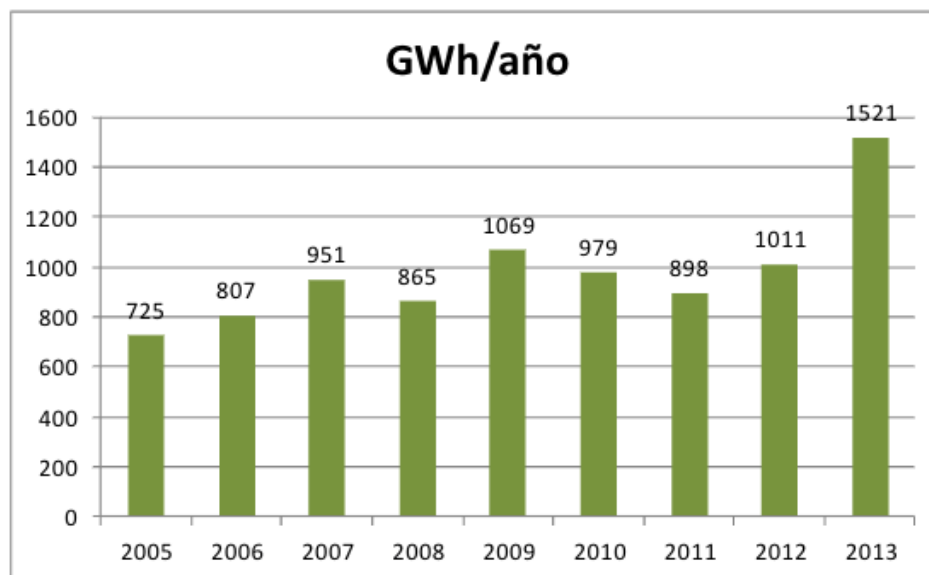
zona de la costa sur. Y, por último, se ha estudiado la opción de la cosecha mecanizada para reducir las emisiones de CO2 (Guerra & Hernández, 2015).

Figura 10. Participación de los ingenios de producción, exportación y consumo interno de etanol en Guatemala.



(Melgar & Luis Quemé, 2015).

Figura 11. Participación de los ingenios en la entrega de energía eléctrica al SIN



(Melgar & Luis Quemé, 2015).

Por otro lado, las empresas azucareras están buscando nuevas normas de innovación para poder adaptar a la industria de la caña al cambio climático. Entre las ideas de adaptación a la agricultura se encuentra, el mejoramiento genético y biotecnología, fertilización y nutrición vegetal, eficiencia de riego, suelos y métodos de conservación de agua, bioseguridad, cuarentena, monitoreo y medidas de control y mejores modelos de sistemas agrícolas (Melgar & Luis Quemé, 2015). Todo esto para poder llegar a alcanzar

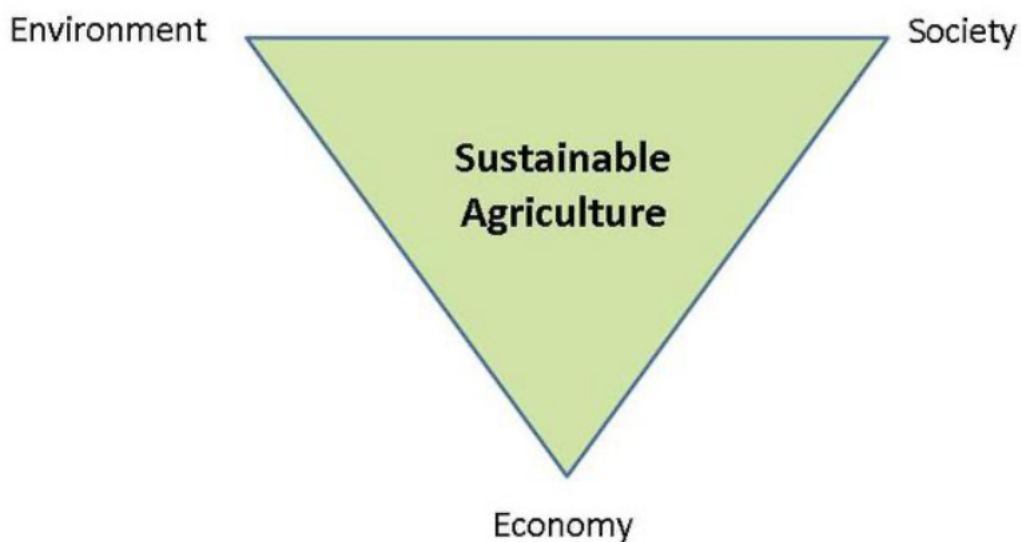
una agricultura sostenible, ayudando a mejorar el cambio climático y para adaptar la agricultura al mismo.

4.3 Agricultura sostenible

Globalmente 2 de cada 5 personas dependen de la agricultura para su sustento, es por esto por lo que se utiliza casi la mitad de la superficie terrestre mundial (Fuller, 2009). Y esto seguirá aumentando debido al crecimiento de la población mundial, donde se estima que para el 2050 se va a necesitar 60% más comida para poder saciar a todos los habitantes. Por consiguiente, los países van a tener que incrementar su producción agrícola, sin embargo, esto tendrá implicaciones con los recursos naturales limitados que tiene la agricultura disponible (Olaleye, 2015). Debido a la gran producción, el modelo industrial ha degradado el suelo y el agua, además ha reducido la biodiversidad el cual es un elemento clave para la seguridad alimentaria (Earles & Williams, 2005). Por tanto, las empresas y los gobiernos están buscando alternativas como la agricultura sostenible.

La agricultura sostenible es la que produce comida abundante sin agotar los recursos de la tierra o contaminando al medio ambiente y al mismo tiempo siendo rentable para el agricultor (Earles & Williams, 2005). Esta debe garantizar la seguridad alimentaria, al mismo tiempo debe promover ecosistemas saludables y apoyar a la gestión sostenible de la tierra, el agua y los recursos naturales. Además, debe de satisfacer las necesidades de las generaciones presentes y futuras de sus productos y servicios, garantizando al mismo tiempo la rentabilidad, la salud del medio ambiente, la equidad social y económica (FAO. 2022). Este tipo de agricultura promueve la biodiversidad, el reciclaje de nutrientes, la protección del suelo, el uso de nuevas biotecnologías y conservar y proteger el agua (Reiche & Jurgen Carls, 1996). Esto se forma en base a los resultados de tres las intersecciones entre 3 principales factores: el medio ambiente, la sociedad y la economía que a su vez interactúan entre cada uno de ellos. Por lo tanto, la intersección economía-medio ambiente (agroecología), medio ambiente-sociedad (conciencia ambiental) y economía-sociedad (estándar de vida), determina finalmente el concepto de “agricultura sostenible” (Figura 12), (Barea, 2015).

Figura 12. Concepto de agricultura sostenible



(Brodt, S., Six, J., Feenstra, G., Ingels, C. & Campbell, D. 2011).

Sin embargo, aunque sea una idea muy buena, ningún tipo de agricultura es sostenible si no es rentable (Earles & Williams, 2005). Por tanto, la tendencia de la agricultura sustentable se da principalmente en agricultores pequeños o familiares. Algunas de las técnicas sostenibles que los pequeños agricultores utilizan son: fertilizantes naturales como materiales orgánicos, abono de plantas, cobertura muerta, estiércol y composta. Utilizan también, herramientas para la mejora de suelo como las barreras de curva de nivel, lo cual permite que no haya erosión por la lluvia y que el agua se distribuya bien en todos los cultivos. Por otro lado, utilizan plaguicidas naturales, la rotación de cultivos y la siembra de varios cultivos juntos para evitar el brote de plagas (Conant, J y Fadem, P. 2011). Sin embargo, en los últimos años, las empresas grandes de agricultura han querido adoptar estas técnicas y al mismo tiempo hacer la agricultura sostenible más rentable.

Las empresas de la caña de azúcar han buscado formas de ayudar a la plantación a adaptarse al cambio climático y hacerla más sostenible. Por ejemplo, algunas de las técnicas son, utilizar mejoramiento genético, en donde se pretende desarrollar nuevas variedades con tolerancia a sequías, eficientes al consumo de agua y para temperaturas más altas. Por otro lado, se ha buscado aumentar la variabilidad genética, al igual que los cruzamientos entre estas. También se han investigado maneras eficientes para el uso del agua, además de indagar nuevas formas de fertilización. La nueva tendencia que hay de fertilizantes es utilizar productos con microorganismos que ayuden a mejorar el suelo y requieran de menos fertilización química. Algunos de los ejemplos de estos son bacterias que fijan nitrógeno que las plantas de caña no pueden aprovechar con el uso de fertilizantes químicos (Melgar & Luis Quemé, 2015). Otro ejemplo es el uso de hongos o micorrizas las cuales ayudan a una mejor absorción de nutrientes, y mejoramiento de suelos.

4.4 Micorrizas

El uso de fertilizantes químicos para la mejora de fertilidad de los suelos, la productividad y la calidad de los cultivos puede afectar de manera negativa, si se usa de manera excesiva, el complejo de sistema de los ciclos biogeoquímicos, causando lixiviación y escorrentía de nutrientes, principalmente de nitrógeno y fósforo, causando efectos negativos en el medio ambiente. Sin embargo, estos no solo son contaminantes si no que el exceso de estos puede afectar negativamente al crecimiento y calidad de las plantas (Ortiz et al., 2021). Es por esto por lo que se han estudiado otras maneras en la que las plantas puedan acceder mejor a los nutrientes sin utilizar fertilizantes químicos. En estudios recientes se ha visto que la actividad del microbioma del suelo funge un papel importante en el acceso de nutrientes a la planta, entre los cuales se encuentran bacterias y hongos principalmente. Estos proporcionan acceso de nutrientes a la planta de forma indirecta a través de la mineralización de nutrientes, sin embargo, se ha observado que los hongos micorrícicos proporcionan un suministro más directo. Es por esto por lo que estos tienen un rol predominante en bosques tropicales y en ecosistemas agrícolas (Camenzind et al., 2018).

Las micorrizas son microorganismos ubicuos del suelo que se asocian con el 90% de las raíces de las plantas terrestres, con el fin de asistir a su hospedero incrementando su consumo de nutrientes, (Upadhyay, 2019) y en respuesta, el huésped le transfiere al hongo de 4 - 20% de sus productos fotosintéticos (M. G. di Barbaro et al., 2021). Estas se conocen por jugar un rol principal en el crecimiento y sobrevivencia de las plantas, ya que proveen nitrógeno (N) y fósforo (P) del suelo a las plantas mejorando su estado fisiológico, por otro lado, proporcionan también, algunos micronutrientes como el zinc, el hierro, el manganeso y el cobre (Shukla, 2019 ; Toju y Sato, 2018). Por ejemplo, el fósforo mineralizado del suelo es difícil de obtener por las plantas, es por esto por lo que muchas de estas crean una relación simbiótica con el hongo para resolver este problema (Altindal, D y Altindal, N, 2019).

Se ha encontrado en diversos estudios que la eficacia para la absorción de fósforo inorgánico es de 3.1-4.7 veces mayor que en plantas que no tienen asociación con micorrizas. Por otro lado, se ha encontrado que las que tienen una interacción con estos hongos absorben zinc a mayores distancias, cruzando la zona de agotamiento (Upadhyay, 2019). En otro estudio realizado se observó que para aumentar la absorción de nitrógeno en el suelo de parte de las micorrizas a las plantas se aumenta la superficie de contacto con el suelo del sistema radicular promovido por el micelio formado externamente en las raíces (Belem de Moura et al., 2017). Las micorrizas son incapaces de fijar dinitrógeno (N₂) atmosférico pero favorecen la adquisición de nitrógeno a través de efectos indirectos, esto pasa gracias a que las hifas y las raíces colonizadas son capaces de tomar el nitrógeno del suelo de varias formas y transferirlo a las plantas (Bernardo et al., 2011).

Entre otros beneficios que la micorriza da a su hospedero, se encuentra la protección hacia estrés oxidativo, en donde eleva el contenido de lípidos e incrementa el volumen del sistema de raíces para crear una mayor área de absorción. Esto se debe a que existen algunas especies de plantas que tienen una estructura de raíces muy débiles y gruesas, por lo que no pueden proveer suficiente contacto con el suelo y la absorción de nutrientes no puede ser realizada en un nivel adecuado (Altindal, D y Altindal, N, 2019). Es en estos casos donde las micorrizas toman protagonismo, al facilitar la adquisición de nutrientes al hospedero. La asociación de micorrizas fortalece a la planta por el aumento de absorción de nutrientes por varios rasgos: primero, por el incremento del área de superficie absorbente, segundo con la movilización de fuentes de nutrientes escasamente disponibles, tercero excretando compuestos quelantes y, por último, produciendo exoenzimas (Upadhayay, 2019).

Sin embargo, el pH es un factor que influye en la absorción de nutrientes, esto debido a que el crecimiento de las plantas en suelos ácidos dificulta la absorción de algunos nutrientes minerales esenciales como los son el potasio (K), el calcio (Ca), el magnesio (Mg), el cobre (Cu) y el Zinc (Zn) (Bernardo et al., 2011). Los suelos ácidos tienden a acumular grandes concentraciones de aluminio (Al), hierro (Fe) y manganeso (Mn). Mientras más baja la escala del pH en el suelo más se liberan estos metales siendo tóxicos para las plantas. Los síntomas de toxicidad pueden ser reducción del crecimiento de la planta, daño estructural en las raíces y daño oxidativo extenso (Faria et al., 2022). Estas pueden ser superadas por la extensión de micelio externo del hongo (Bernardo et al., 2011).

Estos hongos también son conocidos por reducir los efectos nocivos de los patógenos en plantas hospedantes (Upadhayay, 2019 y Toju & Sato, 2018). Las plantas que tienen micorrizas han demostrado que son más resistentes a enfermedades, es importante reconocer que las micorrizas no pueden eliminar las enfermedades, sino que reducen síntomas y la severidad de estas. Los hongos forman una barrera física contra los patógenos y producen antibióticos útiles que juegan un rol importante en la defensa contra hongos fitopatógenos como *Fusarium* y otros (Altindal, D y Altindal, N, 2019).

Por otro lado, se ha encontrado que la explotación del uso de las micorrizas ofrece una ventaja en biorremediación y fitorremediación (Cuadro 3), porque estas pueden tomar directamente el suplemento de carbono del huésped para poder dar soporte al crecimiento en un área contaminada (Kumar et al., 2021). Estas tienen el potencial de alterar el patrón de exudación y de mejorar la actividad enzimática de las oxireductasas que están directamente involucradas en la degradación oxidativa de hidrocarburos aromáticos. Además, neutralizan compuestos tóxicos que pueden ser dañinos a la planta. La eficiencia de reducción de contaminantes de las micorrizas depende de varios factores importantes

como: la naturaleza química, la concentración del contaminante, la disponibilidad de microorganismos y la caracterización fisicoquímica del ambiente (Shukla, 2019).

Asimismo, los factores abióticos como la temperatura, pH, el contenido de materia orgánica, la aireación, el contenido de nutrientes y el tipo de suelo también están involucrados en la eficiencia de fitorremediación. También pueden ser tomados en cuenta los factores bióticos, que determinan la actividad metabólica de los microorganismos (Kumar et al., 2021). En estos se puede incluir inhibición de actividades enzimáticas, y el proceso de proliferación de degradación de microorganismos. El rango de degradación por hidrocarburos es generalmente dependiente en la concentración de contaminantes y el número total de microorganismos que contengan enzimas de descontaminación. El desarrollo de un número grande de hifas también puede contribuir a la translocación de nutrientes y aireación de la micorriza durante la biorremediación (Shukla, 2019).

Cuadro 3 Ejemplos de micorrizas estudiadas para la biorremediación de distintos contaminantes

Contaminantes	Micorrizas
Antraceno	<i>Glomus mosseae</i> , <i>Glomus intraradices</i>
Fenantreceno y pireno	<i>Glomus mosseae</i> , <i>Glomus etunicatum</i>
	<i>Glomus intraradices</i>
	<i>Rhizophagus custos</i>
Dibenzotiofeno	
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	<i>Glomus caledonium</i>

(Shukla, 2019).

Se ha demostrado en otros estudios que el uso de micorrizas ayuda a mejorar el suelo, a aumentar la altura de la planta, también ayudan a la síntesis de compuestos orgánicos como, vitaminas y aminoácidos. Es por esto por lo que hay muchos cultivos que son dependientes de las micorrizas como lo son, las manías, el maíz, la soya, la cebada, la alfalfa, las papas, la canola, el algodón entre otros. Esta relación simbiótica ha demostrado un incremento en la productividad de varios de estos (Sauvu et al., 2020). Es por esto por lo que se han investigado los distintos tipos de micorrizas para poder estudiar a más profundidad su beneficio en la agricultura.

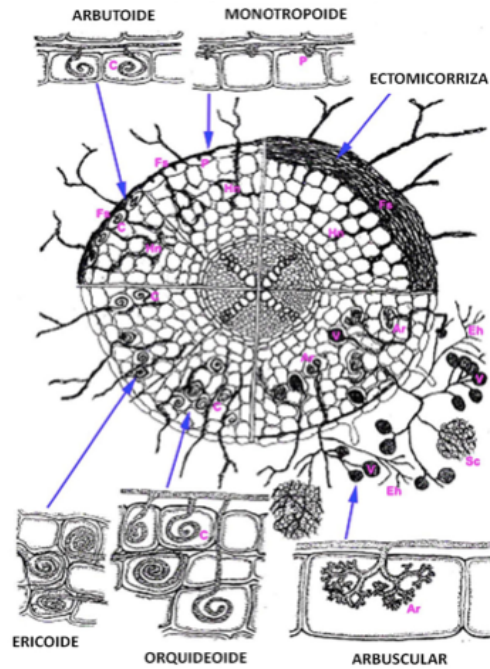
4.4.1 Tipos de Micorrizas

Las micorrizas se pueden clasificar mediante ciertas características morfológicas del hongo como la forma, el tipo de hifas, el nivel de la penetración o tejido y también por los taxones involucrados. Se han encontrado 2 tipos importantes de micorrizas, en base a su estructura y función las cuales son de manto fúngico que son de tipo arbutoide y ectomicorrizas. Y las de no manto fúngico que son endomicorrizas que incluyen micorrizas

ericoides, arbusculares, monotropoide y micorrizas orquidoide (Upadhayay, 2019 ; Camargo-Ricalde et al., 2012 y Valdes et al., 2011).

A diferencia de las micorrizas arbusculares que están muy extendidas entre varios taxones de plantas, las micorrizas ericoides y orquidoide están restringidas al orden Ericales y la familia Orchidaceae. La colonización de las ericoides es bastante simple ya que el hongo se desarrolla adentro de las células epidermales formando espirales que dan lugar a unidades de infección independientes. Y en las orquidoide las espirales se forman principalmente en las capas internas de la raíz (Figura 13), (Bonfante & Anca, 2009). Sin embargo, entre las diferentes categorías de hongos micorrícicos las endomicorrizas y las ectomicorrizas son los mayores grupos de hongos en bosques y suelos agrónomos (Figura 14), (Toju & Sato, 2018).

Figura 13 Representación gráfica de los distintos tipos de micorrizas.



(Toju & Sato, 2018).

Figura 14. Clasificación de tipos de micorrizas de acuerdo a las características de los hongos y plantas involucradas en la asociación.

Tipos de micorrizas	Ectomicorrizas	Ectendomicorrizas		Endomicorrizas			
		Otras	Arbutoide	Monotropoide	Ericoide	Orquideoide	MA
Hifas	septadas	septadas	septadas	septadas	septadas	septadas	sin septos
Penetración	inter-celular	intra-celular	intra-celular	intra-celular	intra-celular	intra-celular	intra-celular
Manto hifal	presente	presente/ausente	presente	presente	ausente	ausente	ausente
Simbionte fúngico	Basidio/Asco	Basidio/Asco	Basidio	Basidio	Asco	Basidio	Glomero
Simbionte vegetal	Gymno Angio	Gymno Angio	Ericales	Monotropoideae	Ericales Bryo	Orchidales	Bryo Pterido Gymno Angio

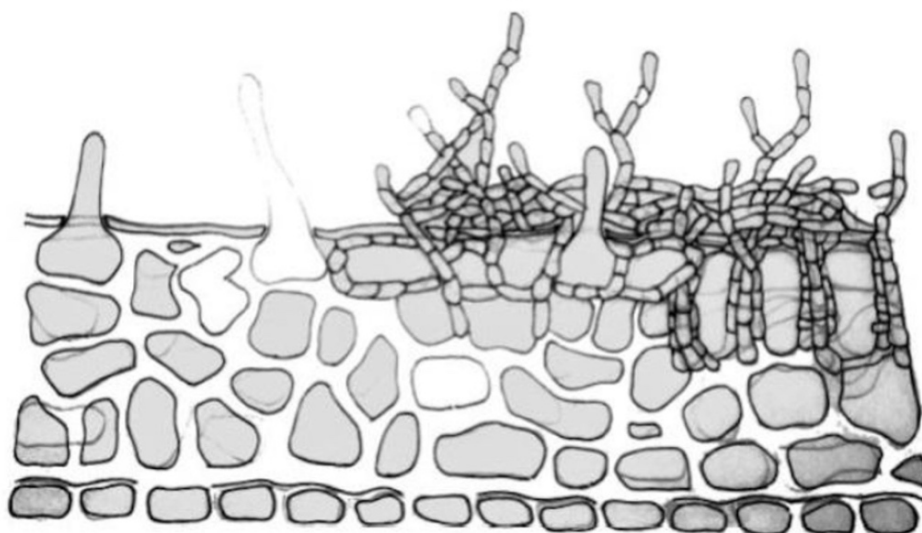
MA: Micorrizas arbusculares. Basidio: Basidiomycota Asco: Ascomycota Glomero: Glomeromycota Gymno: Gymnospera. Angio: Angiosperma. Bryo: Bryophyta. Pterido: Pteridophyta.

(Valdés et al., 2011).

4.4.1.1 Ectomicorrizas

Las ectomicorrizas (ECM) son hongos pertenecientes a *Ascomycota* o *Basidiomycota*, que colonizan las raíces de los árboles (Upadhyay, 2019), ramificándose entre las células de la raíz sin entrar a las mismas, pero emergiendo de la superficie y envolviéndola, formando un manto alrededor de la superficie de la raíz (puede representar el 40% del órgano), lo cual produce una modificación en la morfología de la raíz (Figura 15), (Altindal, D y Altindal, N, 2019; Baruah, G y Sahu, J. 2019 y Valdés et al., 2011). Estas micorrizas a diferencia de las arbusculares pueden obtener carbono no solo de las plantas sino también de material en descomposición (Toju & Sato, 2018). Estas se encuentran en alrededor del 3% de los grupos de plantas arboreo o arbustivo y en algunas hepáticas foliosas (Upadhyay, 2019 ; Valdés et al., 2011). A diferencia de las endomicorrizas estas ocurren en menor porcentaje porque tienen un rango de hospedantes vegetales menor y se limitan principalmente en áreas templadas y frías (Valdés et al., 2011).

Figura 15 Micelio intracelular de una ectomicorriza



(Valdés et al., 2011).

Las ECM son conocidas por producir un rango de enzimas extracelulares para degradar compuestos orgánicos complejos (Gorka et al., 2019). Además, que estas son capaces de realizar remediación en suelos contaminados con metales pesados y de restaurar suelos degradados. Ya que estos hongos proveen la protección hacia metales pesados por medio de evitación (precipitación extracelular, bioabsorción en la pared celular y reducir consumo) y por secuestro (quelación intracelular, compartimentación en las vacuolas del hongo), (Gil-Martínez et al., 2018). Asimismo, promueve la tolerancia hacia sequía en las plantas hospederas (Geetanjali, 2019). También se han estudiado mucho para ayudar a obtener nutrientes del suelo para las plantas hospederas.

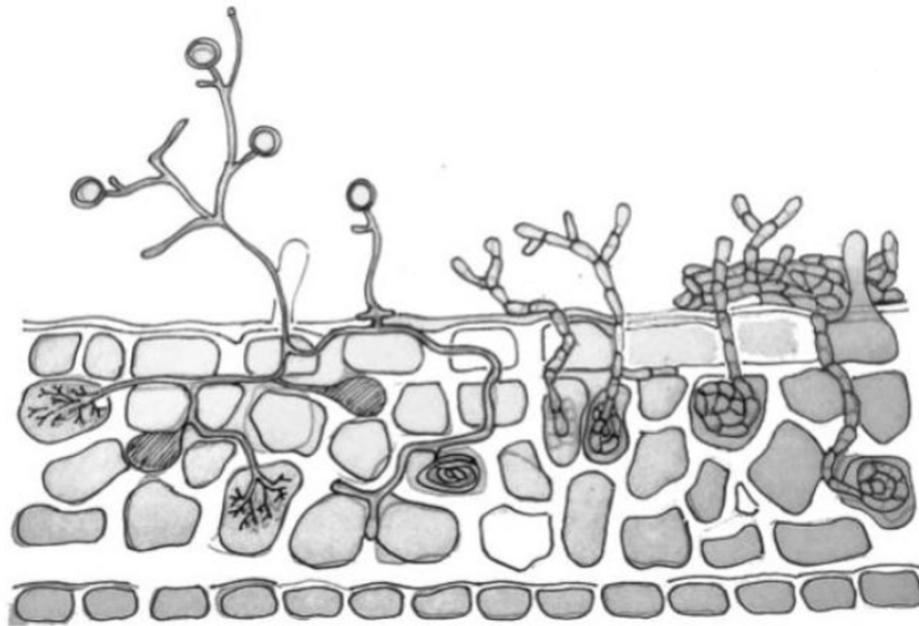
Las ectomicorrizas pueden obtener fuentes de nitrógeno inorgánico hábilmente de los suelos, pero su capacidad de utilizar nitrógeno orgánico y para hacer esta fuente disponible para su huésped es un factor esencial para la nutrición del nitrógeno para especies de plantas ectomicorrícicas (Gorka et al., 2019). Muchos de estos hongos pueden movilizar y utilizar amidas, aminoácidos (alanina, glutamina y glutamato), lo que puede representar una mayor cantidad de nitrógeno, particularmente en suelos orgánicos ácidos. El micelio radical extra (ERM) de las ectomicorrizas puede consumir fuentes de nitrógeno inorgánico, amonio o nitrato del suelo (Upadhyay, 2019).

4.4.1.2 Endomicorrizas

Las endomicorrizas son miembros del filo *Glomeromycota* (M. G. di Barbaro et al., 2021). En donde sus hifas crecen tanto inter como intracelularmente en la raíz, además, la presencia de un manto hifal no es común en estos hongos, sin embargo, algunos tipos de estas si las utilizan. Dentro de la raíz del hongo colonizan las células de la corteza, pero no

llegan a la endodermis (Figura 16). El grupo más grande y conocido de las endomicorizas son las micorrizas arbusculares (MA), además estos hongos son caracterizados por su presencia en la mayoría de las especies vegetales y su amplia distribución en ambientes naturales y en cultivos agrícolas (Valdés et al., 2011).

Figura 16 Representación de la interacción inter-intracelular de las hifas con las raíces de las plantas.



(Valdés et al., 2011).

Son conocidos como simbioses biotróficos obligados, es decir que no pueden sobrevivir sin su hospedero (Upadhyay, 2019). Se conoce que forman una simbiosis mutualista con el 85% de las plantas terrestres (Hernandez et al., 2019), siendo de gran importancia para el desarrollo de la planta. Estas crecen en el espacio entre las células y el espacio intracelular del fungicórtex, formando vesículas lípidas en forma de óvalos, siendo estas las que guardan y transportan nutrientes. Por otro lado, las endomicorizas se conocen por proveer una contribución significativa a la actividad de unión del nitrógeno en los organismos del suelo para su consumo de fuentes orgánicas complejas promoviendo el crecimiento de la planta (Altindal, D y Altindal, N, 2019).

Estos hongos difieren de las ectomicorizas en términos de penetración, las endomicorizas adentran las células de las hifas en la corteza interna de la raíz para crear estructuras ramificadas específicas llamadas “arbusculos”. Estos forman una interfaz de transferencia de nutrientes particular que es integrada con numerosos transportadores de plantas y hongos, lo que ayuda a la transferencia de nutrientes entre los simbioses (Pedone-Bonfim et al., 2018). El desarrollo de las micorrizas arbusculares tienen diferentes fases.

En una fase asimbiótica, la germinación de esporas ocurre, ya que este tipo de hongo tiene una exhibición limitada de desarrollo de hifas en la ausencia de un hospedero. Pero cuando hay presencia de raíces estos entran a una fase pre-simbiótica la cual se describe por la ramificación amplia de hifas. La ruta de las micorrizas la cual involucra el consumo de nutrientes por el micelio radical extra (ERM) y transporta al micelio intraradicular y la planta lo toma por la apoplasta interfacial. El ERM de las endomicorrizas puede consumir fuentes de nitrógeno inorgánico, amonio o nitrato del suelo (Upadhayay, 2019).

Se ha encontrado que las endomicorrizas tienen una mayor asociación con las plantas, lo cual es integral para los ecosistemas terrestres. Las hifas de estas tienen el potencial de crear una extensa red de micelio bajo tierra que están directamente conectados entre las raíces de las plantas, el suelo y el microbiota contiguo (G. di Barbaro et al., 2017). Esta red ayuda a que se liberen nutrientes y contaminantes orgánicos de las partículas del suelo y facilitando el consumo de agua y nutrientes en la planta. Se ha encontrado en varios estudios que estas micorrizas muestran un efecto positivo en una potencial estabilización de la planta y la posible desintoxicación de hidrocarburos en el suelo (Shukla, 2019).

Existen muchos estudios en donde se ha encontrado que las micorrizas arbusculares inhiben, mejoran o no afectan al crecimiento del desarrollo de la enfermedad (Altindal, D y Altindal, N, 2019). También ayudan a la tolerancia al estrés abiótico y mejoran la calidad química y física del suelo ayudando así al crecimiento de las plantas (Herrera Monroy et al., 2019). Esto ha demostrado la importancia de estos hongos principalmente en la industria agrícola porque con el cambio climática se están buscando alternativas más sostenibles en como producir cultivos alrededor del mundo y las endomicorrizas son una de las soluciones más viables. Estos hongos tienen la capacidad de proteger a las raíces de las plantas empleando una resistencia inducida (RI) con esto se establece una protección tanto a nivel local como sistémico permitiendo una activación de respuesta contra un patógeno más eficiente (Rodríguez, 2021).

En muchos estudios de campo con condiciones controladas se ha demostrado que la colonización de raíces ha ayudado a la tolerancia de sequía al igual que la absorción de nutrientes (Eulenstein et al., 2017) de plantas como la cebolla, el puerro, zanahoria, pepino, frijol y tomate y chile pimiento, (Hernandez et al., 2019). En un estudio se pudo observar la importancia de las endomicorrizas para la mejora del rendimiento del cultivo del girasol (M. G. di Barbaro et al., 2021). En otro estudio se investigó la importancia de las micorrizas en las plantaciones de café y su ayuda a la mitigación de patógenos como la roya (Herrera Monroy et al., 2019).

4.4.2 Importancia de las endomicorrizas en agricultura sostenible

Según varios estudios existen cultivos importantes a nivel mundial que son dependientes de micorrizas como el café, el maíz, el frijol y la caña de azúcar. Esto debido a que las AM juegan un rol importante en el consumo de nutrientes, regulan su diversidad y participan en la protección contra patógenos de la planta. Por otro lado, benefician el crecimiento de las plantas porque pueden obtener fácilmente fósforo del suelo al igual que nitrógeno y potasio, es por esto por lo que pueden ser consideradas “biofertilizantes” (Chatterjee, A. 2019).

La aplicación de endomicorrizas como fertilizantes naturales es de suma importancia porque funciona como un enlace clave entre la planta hospedera y los minerales del suelo (Upadhyay. 2019). Por ejemplo, en Cuba el biofertilizante EcoMic®, realizado a base de endomicorrizas se ha utilizado para cultivos de frijol, banano, yuca, tabaco, tomate, pimiento y arroz, principalmente para aumentar los rendimientos de los diferentes cultivos (Pérez-Madruga et al., 2019). Por otro lado existe un fertilizante llamado MYCO-Active utilizado en la mayor parte de Europa en donde se ha visto una mejora en las plantaciones donde se han protegido de la sequía y ha mejorado el consumo de nutrientes ante el estrés hídrico (Eulenstein et al., 2017).

En otro estudio realizado para ver la eficiencia de las micorrizas como biofertilizante se realizaron inoculaciones de estas en plantas de *Mimosa tenuiflora* sin fertilizante químico en donde se encontró que las plantas inoculadas tuvieron un mayor crecimiento en altura, número de hojas y diámetro del tallo, a diferencia de las plantas que fueron fertilizadas solo con fosfato químico. Lo que muestra la eficiencia de las endomicorrizas a diferencia de la fertilización química. Además, que en este mismo estudio se encontró que al utilizar exceso de fertilizante químico se interfiere negativamente a la colonización de AMF y por lo tanto afecta a la esporulación de estas en las raíces de las plantas (Pedone-Bonfim et al., 2018).

Por otro lado, las endomicorrizas son un biofertilizante eficaz porque aparte de dar más nutrientes a las plantas, las protege contra patógenos. En un estudio realizado en caña de azúcar se encontró que las plantas de caña inoculadas con el hongo redujeron el daño provocado por *F. andiyazi* el cual es uno de los principales patógenos de este cultivo. Este mismo resultado se ha observado en plantas de melón, tomate y agave infectadas por *Fusarium oxysporum*. En este mismo estudio en caña se pudo observar que al inocular las plantas de caña con endomicorrizas estas tuvieron un aumento en la biomasa radicular y folicular, además, tuvieron una menor incidencia de daños de raíces ocasionados por *F. andiyazi* y, por último, presentó mayor efectividad en la producción de biomasa (Rodríguez, 2021).

Hoy en día se busca una gestión sostenible y conservadora de los recursos de los sistemas de producción hortícola en donde se incluye la gestión eficiente de los microorganismos del suelo como lo son las micorrizas (Eulenstein et al., 2017). Es por esto que se han realizado varios estudios de caracterización de endomicorrizas para poder evaluar cuales se encuentran en los suelos agricultores y así poder producir e inocular con micorrizas como biofertilizantes.

4.4.3 Géneros más importantes de endomicorrizas

Las especies más importantes de endomicorrizas se encuentran dentro del género *Glomus*, en donde una de las especies más importantes es *Rhizophagus irregularis*, previamente conocido como *Glomus intraradices*. Esta especie se ha estudiado para suprimir la expresión de los transportadores de expresión de la ruta del fósforo en las plantas en donde *G. mosseae* tiene el efecto más mínimo (Upadhyay, V., et.,al. 2019). Por otro lado, se ha investigado que el transportador de de *R. irregularis* está muy involucrado en el consumo de amonio por el ERM cuando hay poca disponibilidad de amonio en la tierra, además, es la especie de micorriza más efectiva para la transmisión de nutrientes hacia el hospedero (Altindal, D y Altindal, N. 2019).

Por otro lado, se ha encontrado que este género puede ayudar al consumo de zinc desde una distancia de 50 mm de las raíces de maíz (Upadhyay, V., et.,al. 2019). También se han estudiado que las especies de *Rhizoglyphus intraradices* y *Paraglyphus occultum* promueven el crecimiento de la planta, el desarrollo de la raíz y la producción de clorofila. Además, se ha encontrado que la micorriza que provee mayor contenido de fósforo es *G. clarium* (Altindal, D y Altindal, N. 2019). Por ejemplo, se encontró en un estudio realizado a plantas de café los géneros *Rhizophagus*, *Septoglyphus* y *Glomus* son reconocidos en la industria de biofertilizantes por su versatilidad y gran capacidad de adaptación a distintos tipos de suelos y de ambientes, así como su persistencia en campos de cultivo durante varios ciclos agrícolas (Figura 17), (Herrera Monroy et al., 2019).

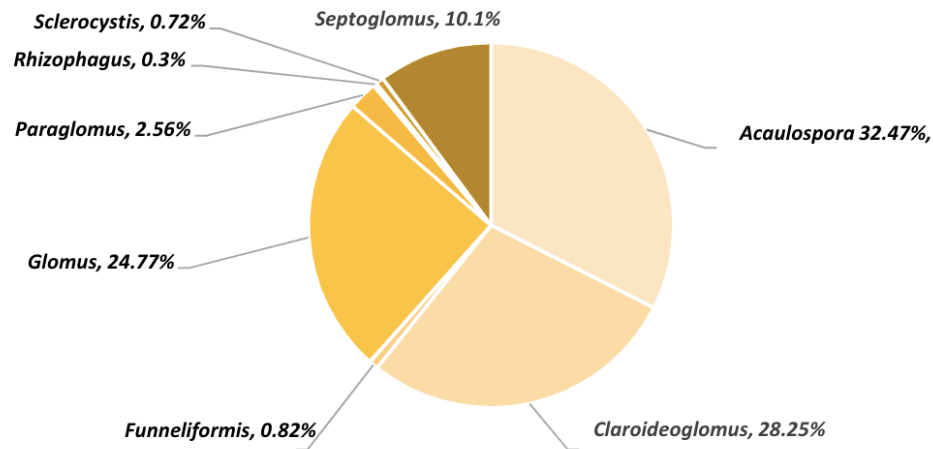
Figura 17. Géneros y especies de MA aisladas de plantas de café en México.

Estatus de la planta donde se aisló	Género de MA aislado	Especies
Cr _S , Cr _E	<i>Acaulospora</i>	<i>Ac. foveata</i> , <i>Ac. scrobiculata</i> , <i>Ac. mellea</i> , <i>Ac. laevis</i> , <i>Ac. delicata</i> , <i>Ac. capsicula</i> , <i>Ac. spinosa</i> , <i>Ac. lacuosa</i> , <i>Ac. remhi</i> , <i>Ac. sp.</i>
Cr _S , Cr _E	<i>Ambispora</i>	<i>Am. leptoticha</i>
Cr _S , Cr _E	<i>Claroideoglossum</i>	<i>Cl. lamellosum</i> , <i>Cl.</i> , <i>entunicatum</i> , <i>Cl. luteum</i> , <i>Cl. claroideum</i> , <i>Cl. sp</i>
Cr _E	<i>Dentiscutata</i>	<i>D. biornata</i>
Cr _S , Cr _E	<i>Diversispora</i>	<i>D. tortuosa</i> , sp1., sp2, sp3
Cr _E	<i>Entrophospora</i>	<i>En. infrecuens</i>
Cr _E	<i>Funneliformis</i>	<i>Fu. mosseae</i> , <i>Fu. coronatum</i>
Cr _S , Cr _E	<i>Gigaspora</i>	<i>Gi. margarita</i> , <i>Gi. sp2</i>
Cr _S , Cr _E	<i>Glomus</i>	<i>Gl. sp1</i>
Cr _S	<i>Paraglossum</i>	<i>Pa. sp1</i>
Cr _S , Cr _E	<i>Racocetra</i>	<i>Ra. verruculosa</i>
Cr _S , Cr _E	<i>Rhizophagus</i>	<i>Rh. fasciculatus</i> , <i>Rh. manihotis</i> , <i>Rh. irregularis</i> , <i>Rh. intraradices</i> , <i>Rh. clarus</i> , <i>Rh. Sp.</i>
Cr _S , Cr _E	<i>Septoglossum</i>	<i>Se. deserticola</i>
Cr _S , Cr _E	<i>Sclerocystis</i>	<i>Sc. sinuosum</i>

(Herrera Monroy et al., 2019).

Por otro lado, en un estudio realizado en Colombia, se observó que en diferentes suelos de cultivos se encontraron micorrizas muy similares. Por ejemplo, en los suelos de café se encontraron los morfotipos de *Glomus* sp4 y *Glomus* sp7, *Acaulospora* sp2 y *Acaulospora* sp3. En la pastura se encontraron los géneros *Glomus* sp1 y *Acaulospora* mellea. Y, por último, en caña se encontraron los géneros *Glomus ambisporum* y *Glomus* sp3 (Piedemonte Amazónico et al., 2012). En otro estudio realizado en caña se encontraron 15 morfoespecies de micorrizas arbusculares lo cual concuerda con los estudios realizados anteriormente, siendo *Glomus* y *Acaulospora* los más importantes para la agroindustria, (Figura 18), (Rodríguez, 2021).

Figura 18 Abundancia relativa de los géneros de micorrizas arbusculares en estudio realizado en México.

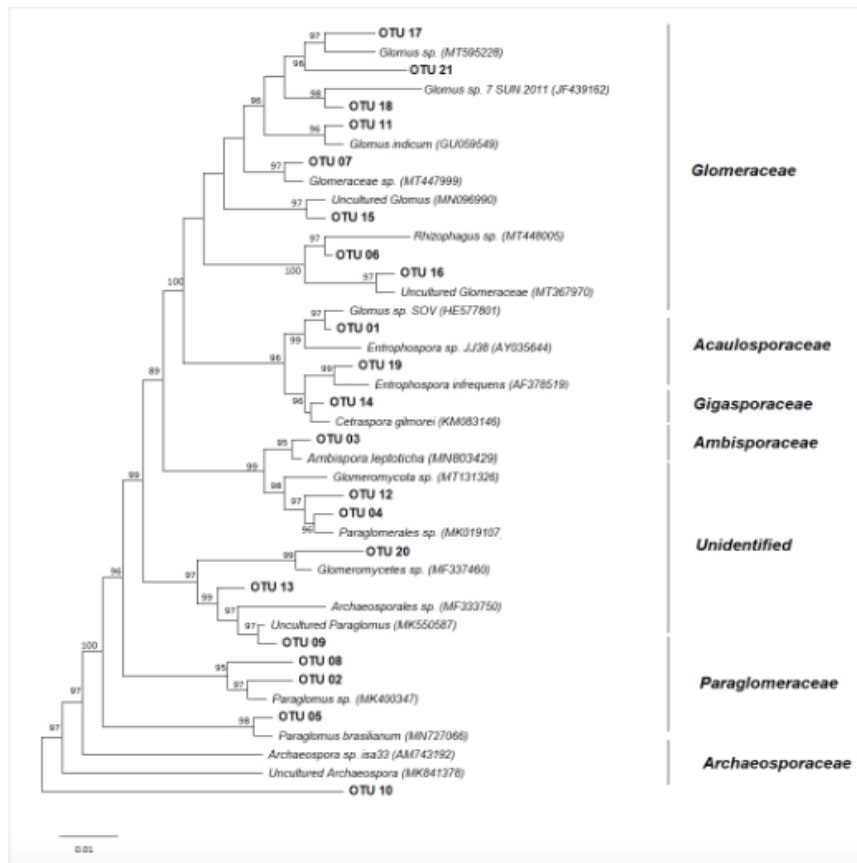


(Rodríguez, 2021).

Asimismo, se han analizado especies que ayudan a la bioremediación del suelo, entre las que se encuentran: *Glomus mosseae* y *Rhizophagus irregularis* que ayudan a la remediación de antraeceno. *Glomus mosseae*, *Rhizophagus irregularis*, *Rhizophagus custos* y *G. etunicatum* que apoya a la remediación de fenantreno y pireno. *Rhizophagus custos* favorece a la remediación de dibenzotofeno. Y, por último, *Glomus caledonium* el cual ayuda a la remediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), (Shukla, A. et.,al. 2019). Estos estudios han sido realizados por medio de técnicas microbiológicas pero estos hongos se han vuelto tan importantes a nivel mundial que los países desarrollados están empezando a utilizar técnicas moleculares para obtener una mejor identificación de especies (Turcios, 2009).

Por ejemplo, en un estudio realizado sobre la asociación de micorrizas arbusculares y los árboles de manzanilla se realizó la investigación a base de secuenciación de ilumina en donde se logró encontrar con mayor precisión las familias a las que pertenecían las micorrizas de la tierra estudiada, esto se realizó por medio de un árbol filogenético (Figura 19). También se pudo estudiar la abundancia de las diferentes familias de MA en distintas zonas por medio de un estudio de abundancia relativa (Figura 20), (Robles et al., 2020).

Figura 19 Árbol filogenético realizado en estudio sobre simbiosis de árbol de mazorca y micorrizas arbusculares.



(Robles et al., 2020).

Figura 21. Rendimientos de toneladas de azúcar por hectárea (TAH) con los distintos tratamientos utilizados.

INÓCULO	Medias de	
	TAH	LETRA
<i>Glomus</i> sp	12.7	A
<i>Gigaspora</i> sp	12.4	A
<i>Glomus clarum</i>	11.1	AB
Micoral	10.8	AB
<i>Glomus etunicatum</i>	10.8	AB
Testigo sin inóculo	9.8	B

(Ordoñez, 2015).

El último estudio fue realizado en la USAC en el 2004 en donde se investigó sobre el uso y el manejo de endomicorrizas para la producción de semillas híbridas de *Impatiens wallerana*. En donde se encontró que la aplicación de estos hongos a las semillas fue efectiva en 50gr por planta, ya que la simbiosis fue efectiva con la calidad y cantidad que se buscaba. Por otro lado, se encontró que con el uso de estos hongos se mejora el rendimiento y calidad de la semilla a menor costo (Orellana, 2004). Sin embargo en Guatemala no hay estudios con técnicas moleculares que ayuden a identificar con mayor precisión los géneros de MA que hay en los suelos agrícolas del país.

4.4.5 Identificación de micorrizas

Los hongos son los segundos organismos más ricos en diversidad después de los insectos, sin embargo, es mucho más difícil de completar el inventario global de estos, comparado a otros organismos como las plantas. Al día de hoy solo el 7% de las especies de 1.5 millones hipotetizadas están completamente descritos. Existen distintos cálculos que indican que en promedio el número de nuevas especies descubiertas incrementó desde 1430 por año desde el 2008 – 2012.

Sin embargo, se estimaba que el número de hongos existentes rondaba entre 3.5 – 5.1 millones de especies basados en la secuenciación de nueva generación. Pero, en un cálculo más actualizado se ha visto que hay entre 2.2 – 3.8 millones más alrededor del mundo. En un análisis realizado se estima que la descripción de las 1.5 millones de especies se alcanzara hasta el año 2184. Igualmente, la descripción de las 2.2 – 3.8 millones de especies se alcanzará en el año 2210 – 2245. Los métodos anteriores son obstaculizados por el hecho que todos los datos y estimaciones se basan en de secuencias de ADNr de ITS y ahora se sabe que este locus de ADN no es el adecuado para reflejar la verdadera diversidad de especies dentro de un género o familia determinados.

Sin embargo, estas estimaciones tienen diversas opiniones ya que la “Fungus Recollection DataBase” estima que hay 1 millones de especies más, pero, hay otros

estudios que reflejan que hace falta describir 1.3 millones de hongos endofíticos. La mayor limitación de estos estimados es que los únicos blancos son los hongos que producen frutos o los que se pueden sembrar fácilmente en un medio artificial. Muchos de los hongos endofíticos no esporulan en medios de cultivo lo que hace que la identificación morfológica de este tipo de hongos sea muy difícil.

Es por esta razón por la cual el desarrollo de técnicas moleculares como la secuenciación ha contribuido a la identificación de la diversidad que antes era desconocida. Por ejemplo, ahora el estimado de especies de hongos gracias a la secuenciación se estima que es de 3.5 – 5.1 millones de especies. Llevando esto a un total de estimación de toda la diversidad de hongos de 12 millones de especies sin identificar. Se realizó un estudio de comparación de hongos cultivables con los no cultivables por distintos métodos moleculares en donde se encontraban: electroforesis en gel de gradiente termal (TGGE), electroforesis en gel de gradiente desnaturalizado (DGGE), Polimorfismo de conformación de una sola hebra (SSCP), Polimorfismos de longitud de fragmento de restricción (RFLP), polimorfismo de longitud de fragmento de restricción terminal (TRFLP), análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA), piro secuenciación 454 y secuenciación de Illumina MiSeq. En donde se encontraron más especies de hongos no cultivables que los cultivables (Figura 22). Sin embargo, se encontró una menor simetría entre los datos obtenidos de los distintos métodos, esto debido a que por un lado los hongos cultivables necesitarán distintos sustratos y condiciones de cultivo. Y que hay ciertos hongos no cultivables que no pueden detectarse ni siquiera por métodos basados por PCR que utilizan cebadores comúnmente empleados. Es por esto por lo que es necesario establecer cebadores epecíficos para su taxonomía y filogenia (Wu et al., 2019).

Figura 22 Estudio realizado de comparación de hongos cultivables y no cultivables con distintos métodos moleculares

Culture-independent methods	Substrates	Species by culture	OTU numbers	Ratio	References
TGGE	Wheat rhizosphere	30	41	1.4	Smit et al. 1999
TGGE	Air	24	20	0.8	Nieguitsila et al. 2007
DGGE	Plant hair roots	38	32	0.8	Bougoure and Cairney 2005
DGGE	Plant hair roots	22	24	1.1	Bougoure and Cairney 2005
DGGE	Plant hair roots	25	30	1.2	Bougoure and Cairney 2005
DGGE	Soil	71	100	1.4	Arenz et al. 2006
DGGE	Soil	37	43	1.2	Malosso et al. 2006
DGGE	Sponge	14	23	1.6	Gao et al. 2008
DGGE	Sponge	20	21	1.1	Gao et al. 2008
DGGE	Acidic soil	5	35-40	8	Cosgrove et al. 2010
DGGE	Neutral soil	4	35-40	10	Cosgrove et al. 2010
DGGE	Deep sea sediment	19	46	2.4	Singh et al. 2012
DGGE	Periglacial soil	37	75	2.0	Rodolff et al. 2016
DGGE	Dough fermentation starter	4	16	4.0	Li et al. 2016
DGGE	Traditionally prepared dried starters	19	46	2.4	Sha et al. 2018
DGGE	Book	7	24	3.4	Oikpalanozie et al. 2018
SSCP	Soil	21	42	2.0	Zachow et al. 2009
SSCP	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>	92	118	1.3	Zhang et al. 2010
RFLP	Soil	29	30	1.0	Viaud et al. 2000
RFLP	Mycorrhizal roots	39	156	4.0	Allen et al. 2003
RFLP	Adult date palm	5	13	2.6	Chobba et al. 2013
RFLP	Needle litter	71	122	1.7	Haňáková et al. 2015
T-RFLP	Soil	12	85	7.1	Lord et al. 2002
T-RFLP	Soil	12	23 (185)	1.9	Lord et al. 2002
18S ARDRA	Grassland soils	6	18	3.0	Hunt et al. 2004
18S ARDRA	Grassland soils	7	22	3.1	Hunt et al. 2004
18S ARDRA	Grassland soils	8	29	3.6	Hunt et al. 2004
ARDRA	Soil	36	67	1.9	Malosso et al. 2006
Sequencing	Soil (Orbiliaceae)	8	18	2.3	Smith and Jaffee 2009
PCR-sequencing	Human gut	5	18	3.6	Gouba et al. 2013
Quantitative PCR	Dust	35	450	12.9	Nonnenmann et al. 2012
RISA	Rice wine wheat Qu	8	5	0.6	Xie et al. 2007
Clone libraries	Human distal gut	3	13	4.3	Scanlan and Marchesi 2008
Clone libraries	Dust	35	394	11.3	Pitkäranta et al. 2008
Clone libraries	Moisture buildings	33	305	9.2	Pitkäranta et al. 2011
Clone libraries	Deep sea sediment	20	39	2.0	Singh et al. 2011
Clone libraries	Root	153	304	2.0	Walker et al. 2011
Clone libraries	Human faecal	5	16	3.2	Hamad et al. 2016
Clone libraries	Epoxy resin	16	25	1.6	Pangallo et al. 2015
Clone libraries	Cheese	8	17	2.1	Suranská et al. 2016
Pyrosequencing	Grassland	7	74	10.6	Lumini et al. 2010
454 pyrosequencing	Root	39	312	8.0	Tedersoo et al. 2010
454 pyrosequencing	Air	24	986	41.1	Adams et al. 2013
454 pyrosequencing	Soil	29	54	1.9	Hirsch et al. 2013
454 pyrosequencing	Hydrocarbon-contaminated soils	49	360	7.3	Stefani et al. 2015
454 pyrosequencing	Plant roots	41	592	14.4	Bourdel et al. 2016
454 pyrosequencing	Grape must	5	15	3.0	Wang et al. 2015a
454 pyrosequencing	Zea mays	9	60	6.7	Bokati et al. 2016
454 pyrosequencing	<i>Triticum aestivum</i>	18	248	13.8	Bokati et al. 2016
454 pyrosequencing	Beer	18	1931	107.3	Takahashi et al. 2015
454 pyrosequencing	Chicha	16	81	5.1	Mendoza et al. 2017
454 pyrosequencing	Must	10	387	38.7	David et al. 2014
Illumina MiSeq	Root	43	1168	27.2	Parnar et al. 2018
Illumina MiSeq	Book	13	179	13.8	Kraková et al. 2018
Illumina MiSeq	Leaf	70	597	8.5	Siddique et al. 2017
Illumina MiSeq	Cheese	9	14	1.6	Santos et al. 2017
Illumina MiSeq	Wine	28	254	9.1	Li et al. 2018
Illumina MiSeq	Collembola body	31	896	28.9	Anslan et al. 2016
Illumina MiSeq	Collembola gut	25	667	26.7	Anslan et al. 2016
Illumina MiSeq	Rhizospheric	43	860	20.0	Miao et al. 2016
Illumina MiSeq	Chronic-wound	17	482	28.4	Kalan et al. 2016
Illumina HiSeq2500	Stems of grapevine	28	59	2.1	Dissanayake et al. 2018
Illumina HiSeq2500	Museum	9	85	9.4	Liu et al. 2018
Illumina HiSeq2501	Lake	398	479	1.2	Wahl et al. 2018
	Average ratio			8.8	

4.5 Técnicas moleculares

Las técnicas de biología molecular (BM) permiten la detección del material genético como el ADN o el ARN. En microbiología esto posibilita la detección de ácidos nucleicos (AN) que son específicos para cada microorganismo. Muchas de estas técnicas se utilizan para todos aquellos microorganismos que no se pueden aislar en técnicas convencionales de microbiología como lo son virus, micorrizas arbusculares entre otros. Estas nos permiten además de la detección y cuantificación de AN, poder detectar mutaciones, genotipos, translocaciones y determinaciones (Stamboulian, 2015); (Barea, 2015). Entre sus principales ventajas se encuentra su alta sensibilidad, especificidad y rapidez. Sin embargo, se puede encontrar la probabilidad de falsos positivos por contaminación externa a la investigación, además de la probabilidad de falsos negativos por la presencia de inhibidores

o inconvenientes en los diferentes pasos de las técnicas agregando también los altos costos que estos tienen (Stambouliau, 2015).

Desde que se desarrollaron las técnicas biología molecular de primera generación, Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Restringidos (RFLP) y la Reacción en Cadena Polimerasa (PCR), se han desarrollado varios marcadores de ADN en la investigación biológica como el ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPDs), el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP) y el polimorfismo amplificado relacionado con la secuencia (SRAP) entre muchos otros (Fang et al., 2016 ; A. V. Wilches, 2004). Estas modernas tecnologías de ADN con alta viabilidad son medidas importantes para garantizar el desarrollo sostenible de la agricultura (Fang et al., 2016),

Ha habido muchos avances en las técnicas de BM para analizar la diversidad del microbiota debido a que son fundamentales para evaluar los impactos de perturbación provocados por estrés abiótico y biótico en la diversidad del microbioma del suelo y entre las interacciones del microbioma y la planta. Estas han sido de gran avance en la investigación de la agricultura del suelo principalmente porque ya no se necesita aislar los microorganismos, es decir, todo el microbioma del suelo incluidos los cultivables y los no cultivables se pueden lisar directamente del suelo para extraer su ADN/ARN y otros marcadores bioquímicos. La evaluación de la diversidad de productos de PCR se puede realizar mediante métodos de tipificación molecular bien conocidos, que permiten una huella digital molecular para la estructura de la comunidad microbiana objetivo, además, la diversidad de amplicones también se puede evaluar mediante otros métodos que implican la clonación y la secuenciación (Barea, 2015).

4.5.1 Secuenciación

Los avances en el análisis de secuencias del ADN han sido claves para mejorar la comprensión biológica y la aplicación del conocimiento biológico (Henry, 2022). El ADN es una molécula que consiste en una doble hélice donde cada una de estas cadenas es un polímero integrado por nucleótidos. Cada uno de estos está formado por desoxirribosa, una base nitrogenada (Adenina (A), Citosina (C), Timina (T) y Guanina (G)) y un grupo fosfato. El orden que tienen estos nucleótidos es lo que denomina la secuencia; las técnicas y métodos que se utilizan para conocerla se llaman “técnicas de secuenciación”. La secuenciación de ADN permite determinar el orden de los nucleótidos de una molécula de ADN. Conocer el orden de estos es una herramienta con infinidad de aplicaciones porque este orden determina la información genética para el funcionamiento de los organismos (Márquez Valdelamar et al., n.d.) ; (Alcántara et al., 2021).

Cuando iniciaron las técnicas de secuenciación a obtener resultados era muy costoso y complicado. Sin embargo, con los avances científicos y tecnológicos se ha permitido que hoy en día se puedan secuenciar muchos genomas de importancia en la salud, fisiología, ecología entre muchos otros (Márquez Valdelamar et al., n.d.). El método más antiguo pero que se sigue utilizando en la actualidad es la secuenciación de Sanger este método se basa en la síntesis enzimática de ADN con una ADN polimerasa y en presencia de nucleótidos modificados dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) que crecen de hidroxilo del carbono

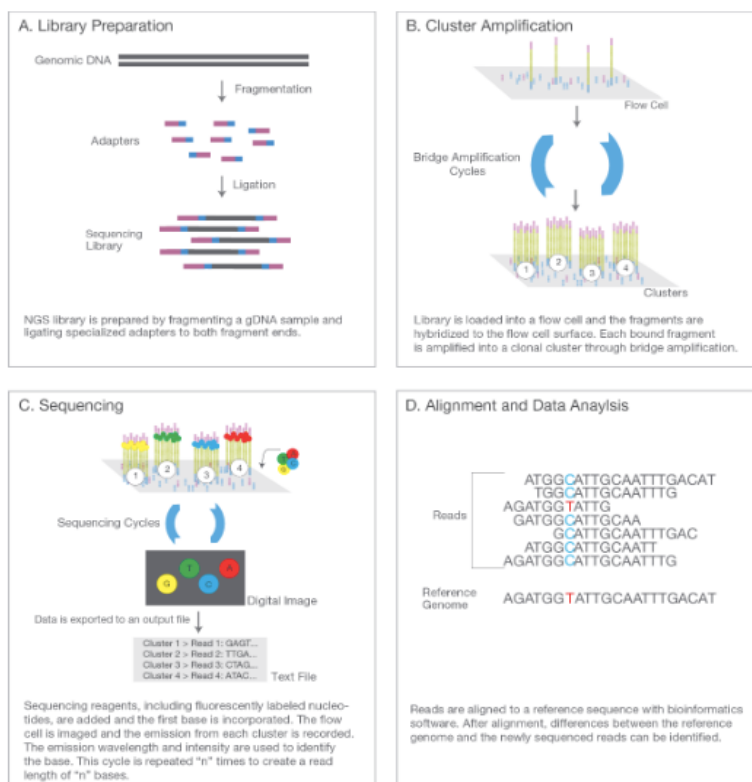
3' del azúcar el cual es esencial para que se pueda llevar a cabo el enlace fosfodiéster entre los nucleótidos durante la síntesis de la cadena de ADN (Alcántara et al., 2021). La secuenciación de ADN en el siglo XX se basó en gran medida en este tipo de secuenciación, el cual limita tanto la calidad como el volumen de datos que podían generarse a comparación con la secuenciación de nueva generación que existe hoy en día (Márquez Valdelamar et al., n.d.). La secuenciación de Sanger ha hecho importantes contribuciones para comprender (Cheng & Xiao, 2022).

4.5.2 Secuenciación de nueva generación

La secuenciación de nueva generación (NGS) es una tecnología que ha evolucionado rápidamente, dando como resultado cambios importantes en las estrategias que se utilizan para secuenciar y ensamblar genomas (Henry, 2022). Esta técnica permite la secuenciación a gran escala, además, de ser aplicable a genomas completos (Márquez Valdelamar et al., n.d.), esto ha permitido que se reduzcan costos teniendo un impacto enorme en la investigación contemporánea de la biología, medicina y otros campos. Es por esto por lo que las plataformas de NGS se han vuelto las principales plataformas de secuenciación actuales, lo que permite el uso de la secuenciación para proporcionar una de las principales fuentes de big data (Cheng & Xiao, 2022).

Las plataformas de NGS proveen una data más grande, pero con una tasa de error más alta (0.1-15%) a diferencia de la secuenciación de Sanger (tasa de error 0.0001%). Aunque el ensamblaje de alta cobertura puede reducir errores de secuenciación, solo garantiza la precisión de la información de secuenciación para una determinada secuencia de abundancia y las secuencias de baja abundancia pueden descartarse como errores de secuenciación. Por lo tanto, cuando la misma plantilla de ADN se vuelve a secuenciar varias veces de diferentes maneras y la información de secuenciación se puede alinear por completo, se puede evaluar la precisión de la información en una sola lectura (Cheng & Xiao, 2022). Con esta lectura completada se puede realizar un análisis de datos para poder realizar un estudio de metagenómica.

Figura 23 Pasos en los que consiste la secuenciación de nueva generación



(Illumina, n.d.).

4.5.3 Metagenómica

El ADN aislado de las comunidades microbianas constituye una entidad denominada metagenoma. Por lo tanto, la metagenómica se refiere al aislamiento y clonación de grandes fragmentos de ADN intactos que incluyen varios genes y operones. El ADN total extraído de muestras ambientales puede someterse a diferentes técnicas basadas en enfoques de clonación, amplificación por PCR y secuenciación de alto rendimiento, lo que permite la construcción de bibliotecas metagenómicas que se pueden seleccionar para genes estructurales o funcionales para rasgos fenotípicos relacionados con proteínas, incluidas enzimas y perfiles de metabolitos secundarios. Los enfoques basados en bioinformática siempre están involucrados en los estudios de metagenómica microbiana del suelo (Barea, 2015).

5. METODOLOGÍA

5.1 Muestreo

Se proporcionaron 1 muestra de tierra (COL) y una de raíz (SEL) por una empresa de cultivo de caña de azúcar en Guatemala, dependiendo del interés de esta.

5.2 Extracción de ADN

Se extrajo ADN de las muestras identificadas como: COLOM y SEL, recolectadas de fincas azucareras de Guatemala utilizando el kit “Dneasy® PowerSoil® Pro-kit”. Ver Anexos “” Se modificó del procedimiento original del kit, en el paso 2, en donde en vez de pesar 500mg de muestra se pesaron 250 mg y en el paso 3 donde se realizó un lavado de fenol:cloroformo:isoamil alcohol (25:24:1), (QUIAGEN. 2021). Después de la extracción se realizó una cuantificación del ADN con un NanoDrop y se realizó también un PCR para identificar el fragmento ITS de las muestras seguido de un gel de electroforesis para comprobar la amplificación del fragmento. Después se purificaron las muestras y se mandaron a la empresa Macrogen en Corea para realizar un análisis metagenómico.

5.3 Análisis de datos

El análisis de datos se realizó con el Software “R Studio” versión 4.1.2
Se siguieron los pasos de https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial_1_8.html

6. RESULTADOS

6.1 Extracción de ADN y pureza

En el Cuadro 7, se puede observar los parámetros de cuantificación y pureza del ADN después de ser extraído con el kit DNeasy® PowerSoil® Pro. La cuantificación del ADN cumple con los parámetros requeridos para una buena secuenciación los cuales son tener una concentración mayor a 5ng/μL. Por otro lado, la pureza A260/230 también cumple con los parámetros requeridos en donde el rango tiene que estar entre 1.8 - 2.5. Sin embargo, el último parámetro de pureza A260/280 está muy bajo para la muestra COL lo cual puede llegar a alterar el paso de secuenciación, ya que puede significar contaminación por compuestos aromáticos, proteínas y fenoles.

Cuadro 4. Resultados de cuantificación y pureza de ADN extraído de las muestras de suelo y raíz

Muestra	ng/μL	A260/230	A260/280
COL	326.10	1.89	0.91
SEL	322.90	1.89	1.72

6.2 Lecturas filtradas

Al realizar el control de calidad por medio de R se pudo observar que se perdieron muchas lecturas durante este proceso (Cuadro 5).

Cuadro 5 Lecturas eliminadas después del control de calidad realizado a cada una de las muestras del marcador ITS1

Muestra	Lecturas entrantes	Lecturas filtradas
COL	92702	3228
SEL	93404	4101

En el Cuadro 6, se puede observar que también se perdieron varias lecturas para la muestra del marcador ITS2 al completar los pasos de control de calidad.

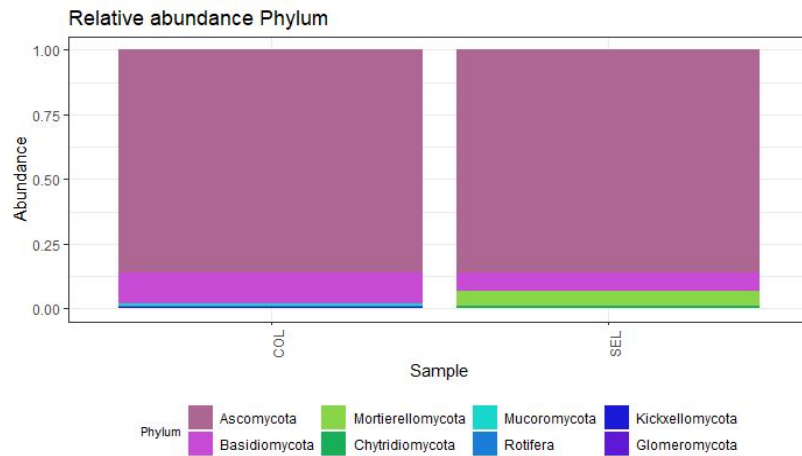
Cuadro 6 Lecturas eliminadas después del control de calidad realizado a cada una de las muestras del marcador ITS2

Muestra	Lecturas entrantes	Lecturas finales
COL	118508	1657
SEL	118412	9134

6.3 Abundancia relativa por filo

En la Figura 24, se puede observar que, de los 8 filos identificados, solo se logró obtener 1 filo de endomicorrizas el cual es *Glomeromycota*, sin embargo, tiene una presencia muy leve en la muestra COL a diferencia de la SEL que era la muestra en la que se esperaba encontrar más de este filo por ser una muestra de raíz. Sin embargo, se puede observar que en ambas muestras el filo más abundante fue *Ascomycota* y *Basidiomycota*, los cuales son los principales hongos en formar ectomicorrizas lo cual puede ser de interés en el estudio.

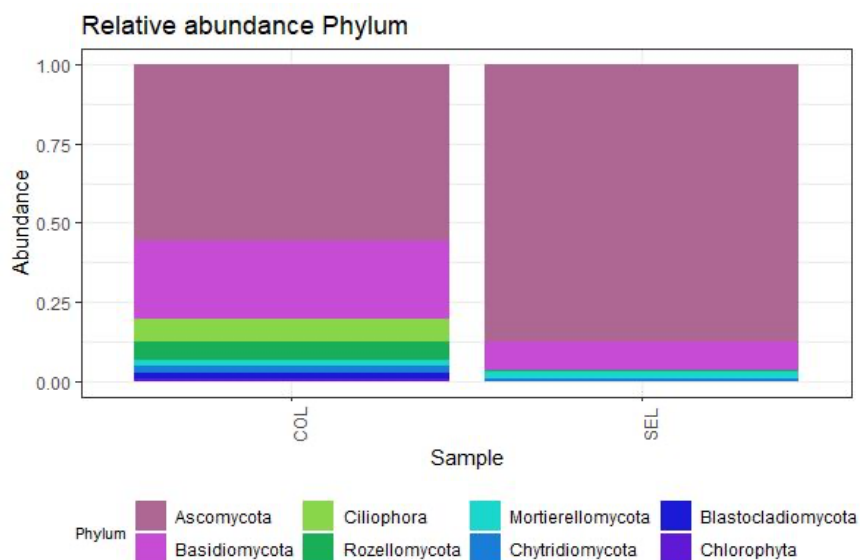
Figura 24 Abundancia relativa por filo de cada muestra realizada para el marcador ITS1



En la Figura 25, se puede observar una mayor diversidad de filos para la muestra COL que la que se observó en la figura 24. Sin embargo, al igual que la figura anterior el filo más común en ambas muestras fue *Ascomycota* seguido de *Basidiomycota*. Hablando de los demás hongos encontrados en este estudio, se encontró el filo *Mortierellomycota* el cual ha sido muy poco investigado, pero se ha encontrado que este tipo de hongos pueden acumular distintos tipos de ácidos en el micelio los cuales inducen resistencia a fitopatógenos de plantas de importancia agrícola (Mares, Y. 2007).

Otro de los hongos de importancia que encontrados en este estudio fue *Blastocladiomycota* el cual se ha investigado que ayuda a las plantas con su requerimiento de sulfuro y nitrógeno siendo este una gran opción para biofertilizantes (Martin W. 2010). Entre los demás hongos se recomienda prestarles atención a los filos *Mucoromycota* y *Chytridiomycota* los cuales son considerados patógenos en plantas (Alvarez, E. 2013).

Figura 25 Abundancia relativa por filo de cada muestra realizada para el marcador ITS2

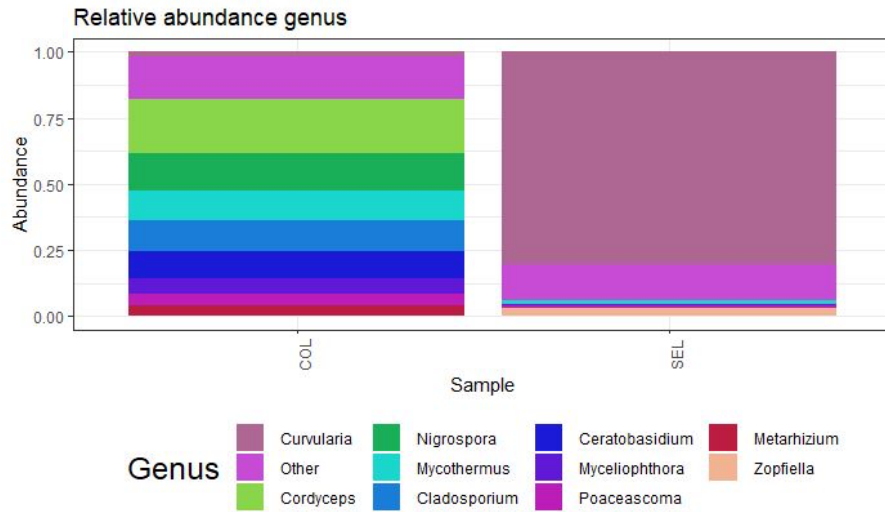


6.4 Abundancia relativa por género

En la Figura 26, se puede observar una mayor abundancia de géneros en la muestra COL a diferencia de la muestra SEL. Sin embargo, no se encontró presencia de los géneros esperados (*Glomeraceae*, *Acuoloporaceae*, *Gigasporaceae* y *Rhizophagus*). Por otro lado, se encontraron géneros como *Curvularia*, el cual es considerado patógeno para algunas plantas pero también puede actuar como agente beneficioso en otras, (Madrid, H., et.,al. 2019). Por eso se recomienda realizar una investigación a más profundidad sobre este género.

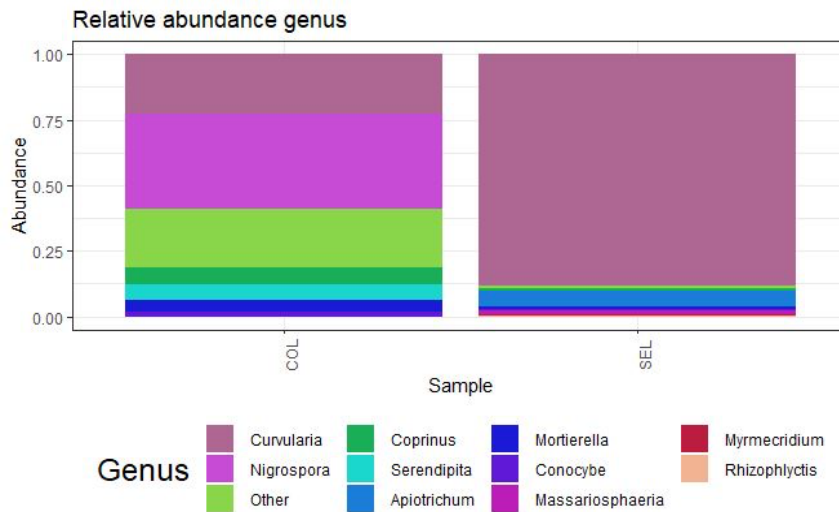
Otro de los géneros con información relativa encontrados fue *Mycothermus*, el cual se ha estudiado por su producción de celulosa y hemicelulasas en plantas de arroz y trigo lo cual podría ser de interés más adelante en el estudio (Bassotra, N. 2016). Entre otros géneros interesantes se encontró *Ceratobasidium*, el cual es considerado un hongo micorrízico para orquídeas a pesar de que estos no eran algunos de los géneros que estábamos esperando, se ha encontrado en estudios recientes que este tipo de micorriza ayuda a plantas de arroz a combatir enfermedades y patógenos por lo que también se recomienda seguir estudiando este género. *Myceliphthora* es otro de los géneros encontrados y este se ha investigado por su producción en enzimas importantes para las plantas como lo son las xylemosas (Chadha, B. 2019) y por último, *Metarhizium* el cual es uno de los hongos más utilizados en la industria de la agricultura para biocontrol utilizado principalmente para regular poblaciones de plagas y evitar la inducción de resistencia de insectos por el uso de agroquímicos (Hernandez, F. et al., 2019).

Figura 26. Abundancia relativa por géneros de cada muestra realizada para el marcador ITS1



En la Figura 27, se observa al igual que la figura 26 una mayor diversidad de géneros en la muestra COL que en la muestra SEL. Sin embargo, no se encontró ninguno de los géneros esperados esto debido a que no se encontró el filo que se esperaba. Pero, sí se encontraron géneros como *Serendipita*, el cual es un hongo endófito que ayuda a la respuesta de las plantas frente a condiciones de estrés teniendo una similitud al papel de las micorrizas que se está buscando en este estudio. *Mortierellales* y *Rhizophlyctis* los cuales son benéficos para las plantas y pueden ser de importancia para este estudio.

Figura 27 Abundancia relativa por géneros de cada muestra realizada para el marcador ITS2



En el Cuadro 7, se puede observar que la muestra COL es más diversa y tiene más riqueza que la muestra SEL, lo cual no se esperaba en estos resultados debido a que en la muestra SEL se extrajo

de raíz y suelo y de COL solo de suelo. La diversidad de Shannon es el que contempla la cantidad de especies presentes en el área de estudio (riqueza de especies) y la cantidad relativa de individuos de cada una de las especies (abundancia). Por otro lado, el índice de Simpson manifiesta la probabilidad de que los individuos, tomados al azar de una muestra, sean de la misma especie este está fuertemente influenciado por la importancia de la presencia de las especies más dominantes y su valor inverso a la equidad.

Cuadro 7 Riqueza de los índices de diversidad alfa para el marcador ITS1

No.	Muestra	Observado	Diversidad Gini Simpson	Diversidad Shannon
1	COL	69	0.95	3.58
2	SEL	30	0.79	2.17

En el Cuadro 8, se puede observar que en el marcador ITS2 también hay una mayor riqueza y diversidad en la muestra COL que en la muestra SEL. Además, todos los rangos que se encuentran tanto de la diversidad Simpson y Shannon como de la riqueza se encuentran dentro de los parámetros que se encuentran en la literatura. Sin embargo, hay que recalcar que son hongos de suelo y no endomicorrizas.

Cuadro 8 Riqueza de los índices de diversidad alfa para el marcador ITS2

No.	Muestra	Observado	Diversidad Gini Simpson	Diversidad Shannon
1	COL	41	0.94	3.20
2	SEL	28	0.42	1.1

7. DISCUSIÓN

En este estudio se encontró que ambas muestras presentaron resultados favorables en cuanto a la cantidad extraída como a la relación A260/230. Sin embargo, al hablar de la relación A260/280 en la muestra COL no se logró llegar al valor de pureza que se esperaba (1.7-1.9), el cual fue mucho más bajo (0.91), debido a que este valor es menor a 1.6 se puede esperar que sea por una contaminación de compuestos aromáticos como fenoles o proteínas lo cual indica que no hubo una buena limpieza durante la extracción del ADN (Cuadro 4), (Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN, 2020). Por otro lado, se conoce que en la caña de azúcar la principal fuente de contaminación se encuentra en el uso excesivo de fertilizantes (potasio, nitrógeno y fósforo), esta es otra razón que puede llegar a interferir con la calidad y el rendimiento del ADN, lo cual puede llegar a tener repercusiones en la secuenciación más adelante (Mata Espinosa, n.d.).

Al terminar el análisis de secuenciación y metagenómica se obtuvieron como resultados las gráficas de abundancia relativa (figuras 24 – 27), donde se puede ver representado que no se encontraron los géneros esperados en las muestras (*Glomeraceae*, *Acuolosporeae*, *Gigasporaceae* y *Rhizophagus*). Sin embargo, en la figuras 24 y 26 se logra observar que hay presencia del filo *Glomeromycota* y del género *Ceratobasidium* en el marcador ITS1, los cuales pueden ser de interés en este estudio.

Sin embargo, es importante recalcar que en el estudio de abundancia descrita por filos (figuras 24 y 25), aunque no se encontró en mayor abundancia el filo esperado se encontraron los filos *Ascomycota* y *Basidiomycota* los cuales son hongos formadores de ectomicorrizas, los cuales pueden ser benéficos para las plantas de caña. Por otro lado, se encontraron también varios géneros (figuras 26 – 27), principalmente ectomicorrícicos que son benéficos para las plantas entre estos se encontró el hongo *Curvularia* este hongo es considerado saprofito o patogénico, sin embargo, hay varios estudios que reportan que son endofíticos con varias gramas y árboles donde actúan como inhibidores de hongos y bacterias fitopatógenas. Hay estudios donde asocian a este género con enfermedades en plantas de caña de azúcar como enfermedades foliares, de follaje, raíces y hojas. Sin embargo, hay otros donde se reporta que es parte de la rizosfera saludable de la caña por lo tanto se recomienda realizar un estudio con este género de hongo para determinar si es benéfico o no para la planta (Fors et al., 2020).

Por otro lado, se encontró el hongo *Nigrospora*, este es conocido por distintas relaciones con plantas tanto patogénicas, principalmente en hojas (Fors et al., 2020). Pero también se ha estudiado que puede llegar a tener una relación endofítica con las plantas en donde produce metabolitos secundarios antivirales y antifúngicos (Wang et al., 2017). Otro hongo benéfico que se encontró es *Mycothermus*, este hongo es conocido por aguantar

temperaturas hasta de 45-55°C y se cree que puede llegar a ser benéficos para las plantas debido a sus enzimas amilasas, celulasas, lipasas, pectinasas y xylanases, ya que estas ayudan al hongo a compostar y reciclar carbono orgánico, lo cual ayuda a las plantas en su proceso de fotosíntesis (Basotra et al., 2016). Asimismo, otro hongo termófilo encontrado en este estudio fue *Myceliophthora* este al igual que el hongo mencionado anteriormente también puede llegar a crecer en condiciones entre 45 – 50°C, sin embargo este a diferencia del pasado tiene la habilidad de degradar celulosa lo cual es benéfico para el reciclaje de nutrientes en el suelo (Sutton et al., n.d.).

Otro hongo muy conocido que se encontró en este estudio fue *Metarhizium*, este hongo es uno de los entomopatógenos empleados como bioinsecticida en la agricultura, el cual tiene un amplio rango de insectos hospederos de diferentes órdenes, en donde se incluye plagas de lepidópteros de importancia agrícola (Acuña Jiménez et al., 2015). Por otro lado, se encontraron dos géneros de micorrizas de orquídeas en este estudio la primera es *Ceratobasidium* (Mosquera-Espinosa et al., 2010) y la segunda *Serendipita* de la cual varios estudios reportan que ayuda al estrés salínico y es resistente a patógenos de la raíz (Mahdi et al., 2022). Asimismo, se encontró el hongo *Mortierellales* el cual es un hongo saprófito, el cual se dedica a degradar materiales orgánicos ayudando al reciclaje de nutrientes (Mares-Ponce de León et al., 2017). También se encontró el hongo *Rhizophlyctis* el cual es conocido como un descomponedor de celulosa (Willoughby, 2001). Y, por último, se reportó el género *Poaceascoma* este género es de gran interés porque se conoce muy poco su relación con la caña de azúcar y se ha reportado solo en dos estudios en donde se mira la relación de este género con este cultivo (Fors et al., 2020).

Sin embargo, el no haber encontrado las endomicorrizas esperadas puede ser debido a varias razones, la primera que como se puede observar en los Cuadros 5 y 6 al empezar el estudio había muchas más secuencias que al terminar el control de calidad en donde quedaron menos de la mitad de las muestras primeramente secuenciadas lo que pudo haber eliminado posibles secuencias de interés en el estudio. En segundo lugar, la abundancia de las especies se puede ver afectada por la forma en la que se realizó la extracción porque la muestra COL fue una extracción de tierra y en la muestra SEL fue una extracción de raíz y tierra. Por lo que se puede intentar realizar la extracción de otras maneras y ver si los resultados cambian.

Algunos ejemplos de distintas extracciones se pueden ver en un estudio realizado en la Universidad de las Fuerzas Armadas de Ecuador en donde se estudiaron micorrizas en las raíces de árboles de manzanilla, realizaron la extracción solo con las raíces de las plantas y llevaron a cabo un proceso de lavado que pudo haber mejorado las muestras para la extracción (Robles et al., 2020). En otro estudio realizado en raíces de la planta de la yuca se realizó la extracción igualmente solo de raíz, sin embargo, en este estudio maceraron la raíz, realizando 3 ciclos de congelamiento para cada maceración esto con el fin que las

muestras no se hidraten (Leonn Velandia D, 2015) lo que hace que haya menos impurezas de otros hongos como los hongos del suelo que se presentaron en este estudio como lo son *Ascomycota* y *Basidiomycota*. En otro estudio realizado por el Instituto Politécnico Nacional de México se realizó el muestreo por medio de muestras de suelo en parcelas de maíz antes de la siembra y después de la siembra del cultivo. Sin embargo, en sus resultados ocurrió lo mismo que en este estudio, en donde la abundancia de micorrizas encontradas fue muy poco a comparación de hongos de suelo por lo que tener muestras de tierra puede ser un factor muy influyente en los resultados de este estudio (González Reyes, 2014).

Otro problema que se pudo encontrar es el número de muestras utilizadas, aquí solo se utilizaron dos muestras lo que puede limitar bastante la abundancia relativa de géneros que se deseaba encontrar. Por ejemplo, en el estudio realizado en raíces de plantas de yuca se utilizaron 200 muestras de raíces, en el estudio realizado en árboles de manzanilla se utilizaron 27 muestras y en el de maíz utilizaron 18 muestras lo que incrementa la abundancia de géneros de micorrizas (Leonn Velandia D, 2015); (Robles et al., 2020); (González Reyes, 2014).(González Reyes, 2014). Además, en este estudio no se evaluó ninguna variable por ejemplo, en la investigación de yuca antes mencionada se evaluaron las micorrizas en distintas épocas del año (lluviosa y seca) y en la de manzanilla se realizó el estudio con las variables de diferentes tipos de zonas (tropical y templado frío) lo que permitió estudiar mejor las distintas especies de micorrizas que se encontraban en las raíces. Por otro lado, en el estudio de maíz se analizaron las micorrizas antes y después del cultivo de maíz para observar la abundancia de la simbiosis de las plantas con las AM.

Por otro lado, se encuentran los marcadores utilizados, en el estudio tanto de yuca como de manzanilla se utilizó el marcador 28S ya que este es el recomendando para la identificación de niveles taxonómicos intermedios como familia y género al igual que el marcador LSU. En este estudio los marcadores que se utilizaron fueron el ITS1 el cual se ha visto en otras investigaciones que a pesar de que funciona bien como un marcador genético puede tener ciertos problemas como la variación interespecifica en algunos grupos de hongos, especialmente en los filos de *Ascomycota*, *Basidiomycota* y *Glomeromycota* (Robles et al., 2020). Es por esto por lo que se recomienda buscar otros tipos de marcadores y probarlos en las muestras anteriores y ver si hay distintos resultados. También se utilizó el marcador ITS2 el cual es la elección óptima para la identificación de taxones poco estudiados, lo que en los últimos años ha ayudado a identificar un número de taxones virtuales de AMF. Otra ventaja de utilizar el marcador ITS2 para la identificación es que se ha almacenado una base de datos de secuencias sustancialmente representativa en NCBI en comparación a otras regiones marcadoras. (Kryukov et al., 2020).

En un estudio realizado en donde se compararon distintas técnicas moleculares para la identificación de hongos no cultivables se llegó a la conclusión que alguno de estos no pueden detectarse ni siquiera por métodos basados por PCR que utilizan cebadores

comúnmente empleados. Es por esto por lo que es necesario establecer cebadores específicos para su taxonomía y filogenia (Wu et al., 2019). Posteriormente, se utilizó la base de datos de UNITE para realizar la asignación taxonómica, sin embargo, en la investigación de árboles de manzanilla y de yuca se utilizaron las bases de datos de GenBank y Maarjam para comparar los datos de ambas bases. Lo cual podría otra razón por la que este estudio no cumplió con el objetivo esperado porque puede ser que la base de datos de UNITE no este lo suficientemente actualizada con micorrizas y por lo tanto no, las reconoce.

En varios estudios recomiendan que al realizar una asignación taxonómica de micorrizas es importante realizarla con más de una base de datos para evitar la identificación errónea. Y así como estas hay muchas otras bases de datos que se pueden utilizar como lo son EBI metagenomics, entre otras (Donovan et al., 2018). Además, es importante recalcar que a la hora de realizar la asignación taxonómica se encontraron taxones desconocidos, es decir, que no han sido secuenciados. Esto se debe a que la identificación tanto de hongos en general como micorrizas es muy escasa y muchas veces no se encuentran las secuencias en las bases de datos (Wu et al., 2019).

Al seguir con el análisis metagenómico se consiguió obtener la diversidad alfa, como se puede observar en los cuadros 7 y 8 que para ambos marcadores la muestra COL tuvo una mayor riqueza y diversidad que la muestra SEL. Esto no era lo esperado en este estudio porque a la muestra SEL se le extrajo ADN de raíz y de tierra por lo tanto se esperaba mucha más diversidad que la muestra COL que solo fue muestra de tierra. Además, que la muestra SEL tuvo una extracción de ADN mucho más exitosa que la de la muestra COL. En otros estudios la riqueza de especies presentes de micorrizas por muestra oscila entre los 20 - 50 especies en ecosistemas agrícolas. Por otro lado, se puede ver en los cuadros 7 y 8 que la riqueza en este estudio oscila entre 28-69 especies por muestra, lo cual si se encuentra dentro del parámetro aceptado. Al hablar del índice de Shannon en otros estudios se ha visto que este oscila entre 1-5, en los cuadros antes mencionados se puede ver que los valores oscilan entre 1.1 – 3.58 lo cual se encuentra dentro de los parámetros. Sin embargo, es importante mencionar que esta riqueza es de los hongos que se presentaron en este estudio no de micorrizas por lo tanto se recomienda realizar este estudio otra vez para poder determinar las micorrizas encontradas en suelos de caña de azúcar.

Posteriormente hay estudios que afirman que las muestras que se recolectan deben tener deben tener aproximadamente 4 meses de edad, este parámetro es establecido porque es la edad adecuada para recolectar las raíces secundarias y para que se dé el establecimiento de la simbiosis de la planta y micorriza. Esto porque se ha reportado que el establecimiento de la simbiosis tarda 4 meses en colonizar nuevas plantas sembradas (Leonn Velandia D, 2015). Esto puede ser otro factor por el cual no hay abundancia de micorrizas en el estudio realizado ya que se recolecto muestra de tierra. Sin embargo, la

raíz que se muestreo tenía al menos 1 año por lo que se deberían analizar otros factores de porque no se encontró abundancia de micorrizas en esta muestra, como la influencia de los parámetros fisicoquímicos de la tierra en donde se encontraba sembrada.

En este estudio no se evaluaron las condiciones fisicoquímicas del suelo, pero se sugiere que el tipo de suelo y sus condiciones fisicoquímicas pueden ser importantes para la generación de esporas de ciertas familias de hongos y así la colonización de esporas (Robles et al., 2020). Estos parámetros son de suma importancia en este tipo de estudio porque la producción de esporas de las AM es altamente dependiente de los parámetros fisicoquímicos y de las condiciones ambientales. Se ha reportado que bajo ciertas condiciones y en ciertas épocas estacionales del año algunos AM pueden producir muchas esporas y parecer un colonizador dominante mientras que bajo otras circunstancias puede que no esporule (Leonn Velandia D, 2015). Al no haber medido en este estudio los parámetros fisicoquímicos puede ser que la tierra en donde se encuentran las plantas de caña no sea la adecuada para realizar una simbiosis con las micorrizas y por eso no se encontró la suficiente abundancia deseada en los resultados obtenidos.

En este estudio no se logró determinar que el Illumina MiSeq fuera un método adecuado porque no se logró la identificación de un gran número de AM en las muestras realizadas. Sin embargo, hay muchos estudios que difieren de esta conclusión porque se ha encontrado que hay distintos métodos de NGS para realizar estos estudios, pero el MiSeq es uno de los más eficientes y puede proveer lecturas más largas y muy pocos errores a comparación de los demás métodos, incluso si la proporción de los marcadores de las secuencias son pequeños. Pero, una de las desventajas que tiene el Illumina MiSeq, según la literatura es que las lecturas son relativamente cortas y por eso no permiten el uso de marcadores largos, es por esto por lo que el marcador más utilizado para este método es el ITS2 y es una de las razones por las que se utilizó en este estudio (Robles et al., 2020).

Por otro lado, también es importante explorar la diversidad genética aparte de los métodos moleculares con la identificación morfológica para comunidades micorrícicas para evitar problemas de identificación y caracterización (Robles et al., 2020). El combinar los resultados de biología molecular con la identificación morfológica puede ser una buena opción en estos estudios de caracterización de AM porque, la base de datos de NCBI sigue siendo insuficiente para la identificación de algunas especies de AM. La razón de esto es que más de la mitad de los taxones de AM conocidos todavía están ausentes en las bases de datos (Kryukov et al., 2020). Es por esto por lo que en este estudio no se logró cumplir con el objetivo propuesto, el cual era la caracterización de endomicorrizas en los suelos de caña de azúcar, esto debido a muchos factores faltantes en esta investigación. Es por esto por lo que se recomienda para futuros estudios realizar de nuevo la investigación tomando en cuenta todos estos factores y así poder comparar los resultados obtenidos.

8. CONCLUSIONES

En este estudio se encontró que las se puede concluir que el objetivo principal de este estudio no se logró cumplir, esto debido a que no se lograron caracterizar endomicorrizas, a pesar de que se encontraron otros hongos benéficos principalmente del filo *Ascomycota*. Esto debido a muchos factores faltantes en este estudio como lo son variables, número de muestras, tipos de muestras, factores fisicoquímicos del suelo, entre muchos otros. Por otro lado, se pudo observar que hubo una mayor abundancia de *Ascomycota*, *Basidiomycota* y *Glomeromycota* en el ITS1 que en el ITS2, y es por esto por lo que se recomienda utilizar otros cebadores y marcadores y compararlos con este estudio para observar diferencias entre los taxones.

Por otro lado, la comparación de géneros de endomicorrizas de la literatura citada con la descrita no se pudo llevar a cabo ya que en los resultados taxonomía no se encontró ningún género importante de endomicorriza arbuscular para la agricultura. Como lo son *Glomus*, *Gigaspora*, *Acaulosporaceae* y *Rhizophagus*. Sin embargo, si se encontraron otros géneros importantes como *Curvularia*, *Nigrospora*, *Metharizium*, entre otros, pero no son endomicorrizas si no ectomicorrizas del género *Ascomycota*. Por último, se encontró que tanto la riqueza como la diversidad tanto para la muestra COL como para la muestra SEL fue buena a comparación de los parámetros establecidos lo que indica que los suelos son bastante ricos y diversos en microorganismos.

9. RECOMENDACIONES

- Es importante comprender que el grupo de hongos micorrícicos es muy diverso, además, muy pocos han sido secuenciados y puestos en disposición en distintas bases de datos, es por esto por lo que se recomienda que el investigador complete su investigación molecular conjunto con una identificación morfológica.
- Estudiar los parámetros fisicoquímicos del suelo ya que estos pueden afectar al crecimiento y rendimiento de las micorrizas.
- Realizar el mismo estudio con distintas bases de datos a UNITE para poder comparar las diferentes endomicorrizas que se puedan encontrar en varias bases de datos.
- Utilizar más muestras para tener una mayor abundancia de micorrizas en los estudios realizados.
- Realizar este estudio nuevamente con distintos marcadores a ITS como LSU y comparar la diferencia entre marcadores.
- Realizar este estudio con distintas variables y observar si las micorrizas cambian con las distintas variables.
- Utilizar cebadores más específicos para endomicorrizas en vez de utilizar cebadores generales.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña Jiménez, M., García Gutiérrez, C., María, N., García, R., Meyer, M. L., Carlos, J., & Hernández, S. (2015). FORMULACIÓN DE *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN CON POLÍMEROS BIODEGRADABLES Y SU VIRULENCIA CONTRA *Heliothis virescens* (FABRICIUS). In *Rev. Int. Contam. Ambie* (Vol. 31, Issue 3).
- Alcántara, H., González, M., Silva, R., Vilchis Landeros, L., & Huerta, C. (2021). *Comité Editorial: González Andrade Secuenciación de ADN por el método de terminación de la cadena de Sanger. DNA sequencing by Sanger chain-termination method. MENSAJE BIOQUÍMICO*. <http://bq.facmed.unam.mx/tab>
- Aldás-Jarrín, J. C., Zurita-Vásquez, J. H., Cruz-Tobar, S. E., Villacís-Aldaz, L. A., Pomboza-Tamaquiza, P. P., León-Gordón, O. A., & Carlos Aldás Jarrín. (2016). Fertilizer effect *Azolla-Anabaena* in maize (*Zea mays* L.) Palabras clave: Editado por: Selva Andina Research Society. In *J Selva Andina Biosph* (Vol. 4, Issue 2).
- Barea, J. M. (2015). Future challenges and perspectives for applying microbial biotechnology in sustainable agriculture based on a better understanding of plant-microbiome interactions. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15(2), 261–282.
- Basotra, N., Kaur, B., di Falco, M., Tsang, A., & Chadha, B. S. (2016). *Mycothermus thermophilus* (Syn. *Scytalidium thermophilum*): Repertoire of a diverse array of efficient cellulases and hemicellulases in the secretome revealed. *Bioresource Technology*, 222, 413–421. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.018>
- Belem de Moura, J., André, D., Filho, L. C. L., de Souza, F. R., & Furquim, C. L. (2017). Arbuscular mycorrhizas in sugar cane under different planting systems and sources of nitrogen. *Scientia Agraria*, 18(3), 20–29. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=99553122003>
- Bonfante, P., & Anca, I. A. (2009). Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: A network of interactions. In *Annual Review of Microbiology* (Vol. 63, pp. 363–383). <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073504>
- Camargo-Ricalde, L. M. S. N. M., de La Rosa-Mera, C. J., Adriana, S., & Arias, M. (2012). MICORRIZAS: UNA GRAN UNIÓN DEBAJO DEL SUELO. *Digital Universitaria*, 13(7), 1–19.
- Camenzind, T., Hammer, E. C., Lehmann, J., Solomon, D., Horn, S., Rillig, M. C., & Hempel, S. (2018). Arbuscular mycorrhizal fungal and soil microbial communities in African Dark Earths. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(4). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy033>
- Camposeco, J., Tamasiunas, J., Mazariegos, M., Zetina, E., Martínez, O., Cameros, V., Alcides Enriquez Flores Jorge Enrique Calderón Rodas, F., Lucrecia Vela Armas Waldemar Nufio Reyes, M., Elena Monterroso Bonilla Carmen Raquel Torselli Bech, M., & Gabriel Vásquez Us, M. (2020). *Situación actual del sector y de los recursos forestales*.
- Carlos, M., Saparrat, N., Ruscitti, M. F., & Arango, M. C. (2011). *Micorrizas arbusculares*.
- Cheng, C., & Xiao, P. (2022). Evaluation of the correctable decoding sequencing as a new powerful strategy for DNA sequencing. *Life Science Alliance*, 5(8). <https://doi.org/10.26508/lsa.202101294>
- Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN. (2020). *PROGRAMA CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS DE ADN Y ARN PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS DE ADN Y ARN*. https://cit.liguecancer.net/CIT_Public/images/stories/CIT/pdf/WebSite%20CIT-%20QC%20PF%20Saint-di-Barbaro
- di Barbaro, G., Andrada, H., González Basso, V., Alurralde, A. L., del Valle, E., & Brandán de Weht, C. (2017). Micorrizas arbusculares y hongos septados oscuros nativos en topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) en Catamarca, Argentina. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 34(2). <https://doi.org/10.22267/rcia.173402.75>

- di Barbaro, M. G., Andrada, H. E., del Valle, E. E., & Brandán, C. I. (2021). Biological activity of soils cultivated with yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poep. & Endl) H. Robinson, inoculated with *Azospirillum brasilense* and native mycorrhizal fungi. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 38(1), 125–133. <https://doi.org/10.22267/rcia.213801.148>
- Donovan, P. D., Gonzalez, G., Higgins, D. G., Butler, G., & Ito, K. (2018). Identification of fungi in shotgun metagenomics datasets. *PLoS ONE*, 13(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192898>
- Dr. Stambouliau. (2015). Técnicas moleculares de microbiología en la práctica diaria. *Bioanálisis*, 1–5.
- Earles, R., & Williams, P. (2005). *Sustainable Agriculture: An Introduction*. www.attra.ncat.org
- Egerton-Warburton, L. M., Querejeta, J. I., & Allen, M. F. (2005). *MYCORRHIZAL FUNGI*.
- Emanuelli, M. S. (2009). *Azúcar roja desiertos verdes informe latinoamericano sobre monocultivos y violaciones al derecho al la alimentación y a la vivienda adecuadas, al agua, a la tierra y el territorio* (Maria. M. S. y T. Soledad. Emmanuelli, Ed.; Primera). FIAN Internacional.
- Escobar-Anleu, B. I. (2020). Monocultivos e industrias extractivas en Guatemala: ¿Qué relación tienen la deficiencia institucional, la falta de investigación científica y los impactos ambientales? *Ciencia, Tecnología y Salud*, 7(1). <https://doi.org/10.36829/63cts.v7i1.829>
- España Exportación e Inversiones. (2020). *CIFRAS CLAVE Sector agrícola en Guatemala*.
- Eulenstein, F., Tauschke, M., Behrendt, A., Monk, J., Schindler, U., Lana, M. A., & Monk, S. (2017). The application of mycorrhizal fungi and organic fertilisers in horticultural potting soils to improve water use efficiency of crops. *Horticulturae*, 3(1). <https://doi.org/10.3390/horticulturae3010008>
- Fang, J., Zhu, X., Wang, C., & Shanguan, L. (2016). Applications of DNA Technologies in Agriculture. *Current Genomics*, 17, 379–386.
- Faria, J. M. S., Pinto, A. P., Teixeira, D. M., Barrulas, P., Brito, I., & Carvalho, M. (2022). Subcellular Element Distribution in Shoots of Wheat Grown in an Acidic Soil with Native AMF Extraradical Mycelium. *Agronomy*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/agronomy12092173>
- Fors, R. O., Patreze, C. M., Berbara, R. L. L., Carneiro, M. A. C., & Saggin, O. J. (2020). Dark septate endophytic fungi associated with sugarcane plants cultivated in Sao Paulo, Brazil. *Diversity*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/D12090351>
- Fuller, R. (2009). *Sustainable agriculture links to international development sustainability*. www.publications.parliament.
- Garrido, L., Ochoa, W., & Carrera, J. (2019). *AGRICULTURA Y SEGURIDAD ALIMENTARIA*.
- Garro Alfaro, J. E. (2016). *EL SUELO Y LOS ABONOS ORGÁNICOS* (L. y M. M. Ramírez, Ed.; Primera). Impresiones el Uniyornio.
- Gil-Martínez, M., López-García, Á., Domínguez, M. T., Navarro-Fernández, C. M., Kjøller, R., Tibbett, M., & Marañón, T. (2018). Ectomycorrhizal fungal communities and their functional traits mediate plant–soil interactions in trace element contaminated soils. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01682>
- González Reyes, J. A. (2014). *Análisis metagenómico de hongos en suelos cultivados con maíz en el norte de Tamaulipas*. Instituto Politécnico Nacional.
- Gorka, S., Dietrich, M., Mayerhofer, W., Gabriel, R., Wiesenbauer, J., Martin, V., Zheng, Q., Imai, B., Prommer, J., Weidinger, M., Schweiger, P., Eichorst, S. A., Wagner, M., Richter, A., Schintlmeister, A., Woebken, D., & Kaiser, C. (2019). Rapid transfer of plant photosynthates to soil bacteria via ectomycorrhizal hyphae and its interaction with nitrogen availability. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00168>
- Guerra, A., & Hernández, A. (2015). *EL CAMBIO CLIMÁTICO Y EL CULTIVO DE LA CAÑA DE AZÚCAR*. www.icc.org.gt
- Henry, R. J. (2022). Progress in Plant Genome Sequencing. *Applied Biosciences*, 1(2), 113–128. <https://doi.org/10.3390/applbiosci1020008>

- Hernandez, F. S., Villarreal, R. M., Torres, V. R., & Gallou, A. (2019). Monosporic inoculation of economically important horticultural species with native endomycorrhizae under greenhouse conditions. *Agronomy*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/agronomy9030130>
- Herrera Monroy, S., Castro Brindis, R., Pérez Moreno, J., & Valdés Velarde, E. (2019). Diversidad endomicorrícica en plantas de café (*Coffea arabica* L.) infestadas con roya (*Hemileia vastatrix*). *Nova Scientia*, 11(22), 102–123. <https://doi.org/10.21640/ns.v11i22.1642>
- Illumina. (n.d.). *An introduction to Next-Generation Sequencing Technology*. www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html
- Instituto Nacional de Estadística de Guatemala [INE]. (2020). *Encuesta Nacional Agropecuaria con enfoque en granos básicos y cultivos permanentes*.
- Kryukov, A. A., Gorbunova, A. O., Machs, E. M., Mikhaylova, Y. v., Rodionov, A. v., Zhurbenko, P. M., & Yurkov, A. P. (2020). Perspectives of using Illumina MiSeq for identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*, 24(2), 158–167. <https://doi.org/10.18699/VJ19.38-O>
- Kumar, V., Saxena, G., & Peters Book, A. A. K. (2021). *MICROBE-ASSISTED PHYTOREMEDIATION OF ENVIRONMENTAL POLLUTANTS RECENT ADVANCES AND CHALLENGES*.
- Leonn Velandia Daniela. (2015). *Comunidades nativas de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociadas a yuca silvestre en la amazonia colombiana en época seca y lluviosabajo dos tipos de paisaje (denundación y llanura aluvial)*. 1–313.
- Mahdi, L. K., Miyauchi, S., Uhlmann, C., Garrido-Oter, R., Langen, G., Wawra, S., Niu, Y., Guan, R., Robertson-Albertyn, S., Bulgarelli, D., Parker, J. E., & Zuccaro, A. (2022). The fungal root endophyte *Serendipita vermifera* displays inter-kingdom synergistic beneficial effects with the microbiota in *Arabidopsis thaliana* and barley. *ISME Journal*, 16(3), 876–889. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01138-y>
- Mares-Ponce de León, Y., Muñoz-Castellanos, L. N., Ruiz-Cisneros, M. F., Pérez-Corral, D. A., Ornelas-Paz, J. de J., Acosta-Muñiz, C. H., Berlanga-Reyes, D. I., & Rios-Velasco, C. (2017). Identificación morfológica y molecular de especies de *Mortierella* asociados a rizosfera de manzanos con síntomas de enfermedades radiculares. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1710-2>
- Márquez Valdelamar, L. M., Serrato Díaz, A., & Flores, R. C. (n.d.). *Secuenciación de fragmentos de ADN*. <http://www.nd.edu/~aseriann/maxam.html>,
- Mata Espinosa, H. A. (n.d.). Los contaminantes en el cultivo e industrialización de la caña de azúcar. *Agroproductividad*, 17–20.
- Melgar, M., & Luis Quemé, J. (2015). *ADAPTACIÓN DEL CULTIVO DE LA CAÑA DE AZÚCAR AL CAMBIO CLIMÁTICO EN GUATEMALA*. <http://gain.fas.usda.gov/Lists/Advanced%20Search/AllItems.aspx>
- Mosquera, B. (2010). *Abonos orgánicos protegen el suelo y garantizan alimentación sana. Manual para la elaborar y aplicar abonos y plaguicidas orgánicos* (N. Figueroa Puente, Ed.; Primera). USAID.
- Mosquera-Espinosa, A. T., Bayman, P., & Otero, J. T. (2010). *Ceratobasidium como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia Ceratobasidium as orchid mycorrhizal fungi in Colombia*.
- Olaleye, I. (2015). *What is sustainable agriculture?*
- Ordoñez, J. (2015). *Efecto de inóculos de hongos micorrízicos arbusculares sobre la nutrición fosfatada y rendimiento de caña de azúcar*. Universidad Rafael Landívar.
- Orellana, A. (2004). *Uso y manejo de endomicorrizas en la producción de semillas híbridas de *impatiens wallerana**. Universidad San Carlos de Guatemala.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2022). *El mercado mundial de fertilizantes: balance de la situación de un mercado en dificultades*. <https://investing.com>.

- Ortiz, A., Arboleda, E., & Medina, M. (2021). Bromatological quality of kikuyu grass in response to inoculation with mycorrhizal fungi and chemical fertilization. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 32(3). <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V32I3.17645>
- Pedone-Bonfim, M. V. L., Silva, D. K. A. da, Silva-Batista, A. R. da, de Oliveira, A. P., Almeida, J. R. G. da S., Yano-Melo, A. M., & Maia, L. C. (2018). Mycorrhizal inoculation as an alternative for the sustainable production of Mimosa tenuiflora seedlings with improved growth and secondary compounds content. *Fungal Biology*, 122(9), 918–927. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.05.009>
- Pérez-Madruga, Y., Rosales-Jenquis, P. R., & Falcón-Rodríguez, A. (2019). Aplicación combinada de quitosano y HMA en el rendimiento de maíz Daimy Costales-Menéndez 1. *Cultivos Tropicales*, 40(4), 6. <http://ediciones.inca.edu.cu/octubre-diciembre>
- Piedemonte Amazónico, D., Antonio Franco Castro, L., & Ruth García Conde, M. (2012). CARACTERIZACIÓN DE LAS ENDOMICORRIZAS Y SIETE GRUPOS DE MICROORGANISMOS EN AGROSISTEMAS Characterization of the Endomycorrhizal and Seven Groups of Microorganisms in Agro Systems of the Amazon Piedmont, Colombia. In *Colomb* (Vol. 17, Issue 2).
- Reiche, C., & Jurgen Carls. (1996). Modelos para el desarrollo de una agricultura sostenible. *COMUNICA*, 1(3), 29–33.
- Reyes, G. y C. J. (2017). Intensidad en el uso de fertilizantes en América latina y el Caribe (2006-2012). *Bioagro*, 29(1), 45–52.
- Robles, S., Valeria, S., Escobar, D., & Ivonne, J. (2020). *Composición de las comunidades de hongos micorrízicos arbusculares asociados a la raíz del árbol manzanilla de la muerte (Hippomane mancinella), en dos ecosistemas.*
- Rodríguez, M. (2021). *Evaluación de micorrizas arbusculares nativas del estado de morelos en el desarrollo de plantas de caña de azúcar y en el biocontrol de Fusarium andiyazi.* Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Sauvu, Crizostro., Nápoles, María., Falcón, Alejandro., Lamz, A., & Ruiz, M. (2020). Bioestimulantes en el crecimiento y rendimiento de la soya. *Cultivos Tropicales*, 41(3), 1–15.
- Superintendencia de Bancos Guatemala. (2016). *Análisis de sector económico.*
- Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., & Sanche, S. E. (n.d.). CHAPTER 14 - Dematiaceous fungi. In *Clinical Mycology*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-5680-5.10014-3>
- Toju, H., & Sato, H. (2018). Root-associated fungi shared between arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal conifers in a temperate forest. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00433>
- Turcios, A. (2009). *Evaluación de la producción de micorrizas y su efecto en las especies de pino, por cuatro especies de hongos ectomicorrízicos en contenedor e informe de diagnóstico y servicios realizados en la escuela nacional central de agricultura, Bárcena Villa Nueva.* Universidad San Carlos de Guatemala.
- Ulibarry, P. G. (2019). *Consecuencias ambientales de la aplicación de fertilizantes.* <http://bcn.cl/28ziq>
- Varma, A. y C. D. (2019). Mycorrhizosphere and Pedogenesis. In *Mycorrhizosphere and Pedogenesis*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-6480-8>
- Viguera, B., Ruth Martínez-Rodríguez, M., Donatti, C. I., Harvey, C. A., & Alpízar, F. (2017). *Módulo 2 Impactos del cambio climático en la agricultura de Centroamérica, estrategias de mitigación y adaptación.* www.conservation.org/cascade-espanol
- Wang, M., Liu, F., Crous, P. W., & Cai, L. (2017). Phylogenetic reassessment of Nigrospora: Ubiquitous endophytes, plant and human pathogens. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 39(December), 118–142. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2017.39.06>
- Wilches, A. V. (2004). *Descripción de algunas herramientas moleculares y sus aplicaciones.* Universidad Rafael Landívar.

- Wilches, Wilmar., Ramírez, Margarita. R. Laura., Pérez, Urley., Serralde, Diana., & Peñaranda, Rolón. (2022). Uso de micorrizas arbusculares en dos variedades de caña de azúcar para producción de panela en Suaita-Santander, Colombia. *Siembra*, 9(1), 1–14.
- Wu, B., Hussain, M., Zhang, W., Stadler, M., Liu, X., & Xiang, M. (2019). Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. In *Mycology* (Vol. 10, Issue 3, pp. 127–140). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1614106>

11. ANEXOS

A. Extracción de ADN

1. Reactivos:

- Tubo “Powerbead Pro tube”: Perlas para la dispersión de la muestra, solución de ácido húmico y para proteger el material genético.
- CD1: Solución para la lisis celular
- CD2: Solución con IRT, reactivo especializado para remover contaminantes orgánicos e inorgánicos.
- CD3: Solución con gran concentración de sales. Contribuye a que el ADN se una a las columnas de sílica.
- EA: Solución de lavado. Remueve contaminantes proteicos y acuosos.
- CD5: Base de etanol, remueve sales, ácido húmico y otros contaminantes. Mantiene el ADN pegado a la columna.
- CD6: Solución de elución, libera el ADN de la columna.
- Fenol:cloroformo:isoamilico (25:24:1)
- Solución EA

2. Materiales:

- Tubos de microcentrifuga (2mL)
- Tubos de elución (2mL)
- Tubos de recolección (2mL)
- Tubos de microcentrifuga (2mL)
- “MB Spin Column”
- Pipetas de 1000µl, 100µl y 10µl
- Puntas de 1000µl, 100µl y 10µl

3. Equipo

- Centrífuga
- Vórtex
- “Bead beater”
- Microcentrifuga
- Incubadora
- Congelador a -80°C
- Congelador a -20°C
- Nanodrop 200nm

4. Recomendaciones

- Asegurarse que el tubo “Powerbead Pro tube” rote dentro de la centrífuga libremente sin rozar.
- Si la solución CD3 se precipita, calentar a 60°C hasta que el precipitado se deshaga.
- Todos los pasos de centrifugación se deben de realizar a una temperatura ambiente (15-25°C).
- Dejar descongelar la solución CD2 15-20 minutos antes de utilizarlo

5. Metodología

1. Se mezcló el tubo “Powerbead Pro tube” brevemente para asegurar que las perlas se hayan asentado al fondo del tubo.
2. Se añadieron 500 mg de tierra al tubo anterior.
3. Se añadieron 800µL de la solución CD1 al tubo anterior.
4. Se añadieron 300µL de fenol:cloroformo:isoamil alcohol (25:24:1)
5. Se mezcló con Vortex brevemente.
6. Se aseguró el “Powerbead Pro tube” horizontalmente en el adaptador de Vortex por 10-20 minutos en el “Bead beater” a máxima velocidad
7. Se centrifugó el tubo “Powerbead Pro tube” a 15,000 x g por 5 minutos.
8. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio de microcentrífuga de 2mL (se espera un volumen de 500-600µL). El sobrenadante puede llegar a contener partículas del suelo.
9. Se añadieron 200µL de solución de CD2 y se mezcló con el Vortex.
10. Se centrifugó a 15,000 x g por 1 minuto.
11. Obviando el pellet se transfirieron 700µL del sobrenadante a un tubo limpio de microcentrífuga de 2mL (se espera un volumen de 500-600µL).
12. Se añadieron 600µL de la solución CD3 y se mezcló con el Vortex.
13. Se cargaron 650µL del lisado en la columna “MB Spin column”.
14. Se centrifugó a 15,000 x g por 1 minuto.
15. Se descartó el sobrenadante y se repitió el paso 12 para asegurándose que todo el lisado se haya pasado por la columna.
16. Con cuidado se colocó la columna en un tubo de recolección de 2mL. Y se evitó salpicar parte del sobrenadante en la columna. (Se descartará el sobrenadante).
17. Se añadieron 500µL de solución EA en la columna.
18. Se centrifugó a 15,000 x g por 1 minuto.
19. Se descartó el sobrenadante.
20. Se colocó la columna en el mismo tubo de recolección de 2mL.
21. Se añadió 500µL de la solución CD5 en la columna.
22. Se centrifugó a 15,000 x g por 1 minuto.
23. Se descartó el sobrenadante y se colocará la columna en un nuevo tubo de recolección de 2mL.
24. Se centrifugó a máxima velocidad por 2 minutos.
25. Con cuidado se colocó la columna en un nuevo tubo de elución de 1.5mL.
26. Se añadió 50-100µL de solución CD6 en el centro del filtro de membrana blanca.
27. Se incubó por 2 minutos.
28. Se centrifugó a 15,000 x g por 3 minutos.
29. Se descartó la columna. El ADN ahora estará listo para aplicaciones río abajo.

30. Se almacenó el ADN en frío (-30 a 15°C o -90°C a -65°C) porque la solución CD6 no contiene EDTA.

31. Se cuantificó la concentración del ADN para cada muestra

- 1) gADN puro típicamente tiene un A260/A280 de 1.7-1.9
- 2) A260/A230 de 1.8-2.5

6. Troubleshooting

Se usó el “Troubleshooting Guide” del protocolo de “DNeasy® Power soil® Pro Kit Handbook” para aumentar la pureza de las muestras las cuales no llegaron a la pureza necesaria para poder realizar las librerías y secuenciar. Se utilizó la guía del apartado de “DNA” el inciso “c: concentrating eluted DNA”.

a. Se tomaron 25µl del ADN extraído y antes cuantificado con el Nanodrop y se concentraron añadiendo entre 5-10µl de NaCl a 3M y se invirtió de 3-5 veces para mezclar. Después se añadieron 100µl de etanol al 100% frío y se centrifugó a 10,000 g por 5 minutos a temperatura ambiente, se decantó el líquido y el etanol restante se dejó secar a temperatura ambiente.

1) Se evitó que se sobre secase el pellet o la resuspensión hubiera sido muy difícil.

b. Se repitió el lavado con etanol, la centrifugación y el secado.

c. Se resuspendió el ADN precipitado con 25µl de la solución C6.

d. Se volvió a leer en el Nanodrop

B. Resultados:

Figura 28 Electroforesis en gel después de realizar la extracción de ADN de la muestra SEL

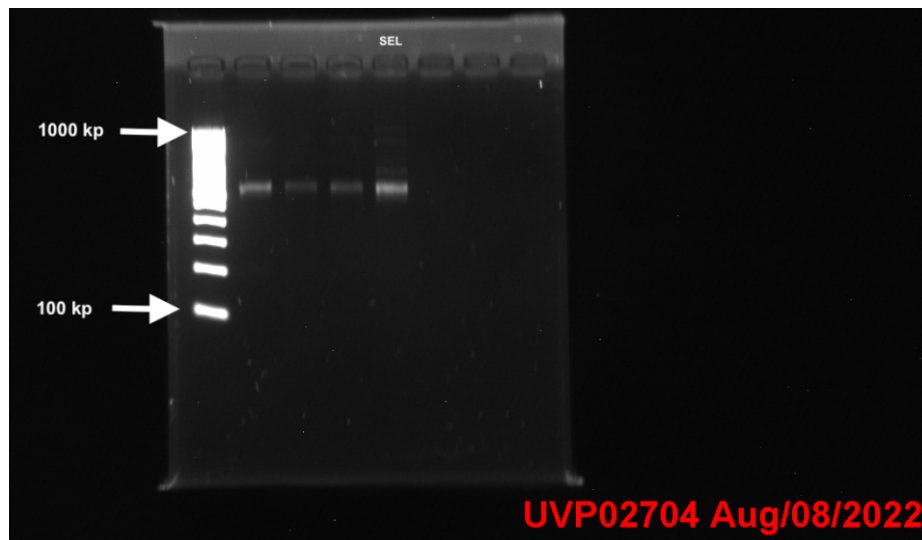


Figura 29 Electroforesis en gel después de realizar la extracción de ADN de la muestra COL

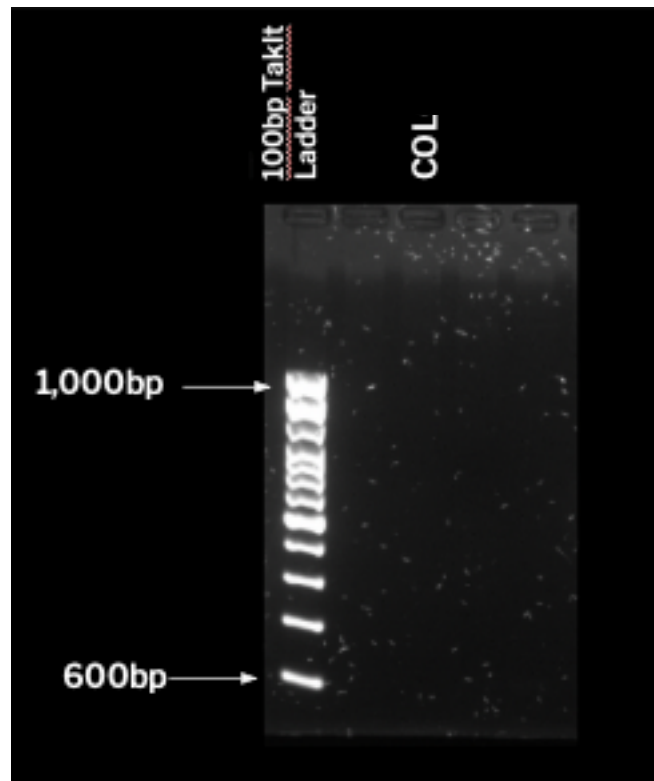


Figura 30 Tinción de azul de lactofenol proveída por la empresa azucarera en donde se observan endomicorrizas de la finca COL



Figura 31 Tinción de azul de lactofenol proveída por la empresa azucarera en donde se observan endomicorrizas de la finca SEL

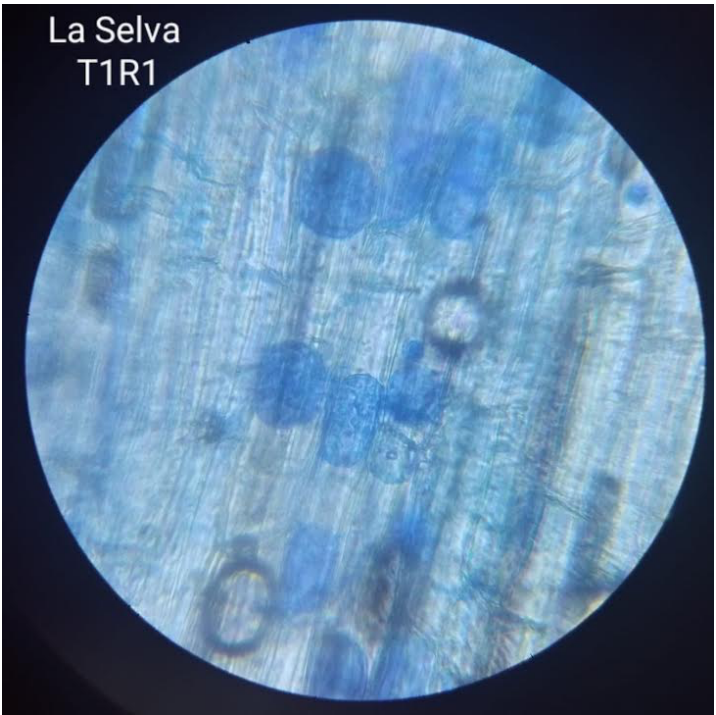


Figura 32 Gráfica de control de calidad en las muestras "forward" para el marcador ITS1

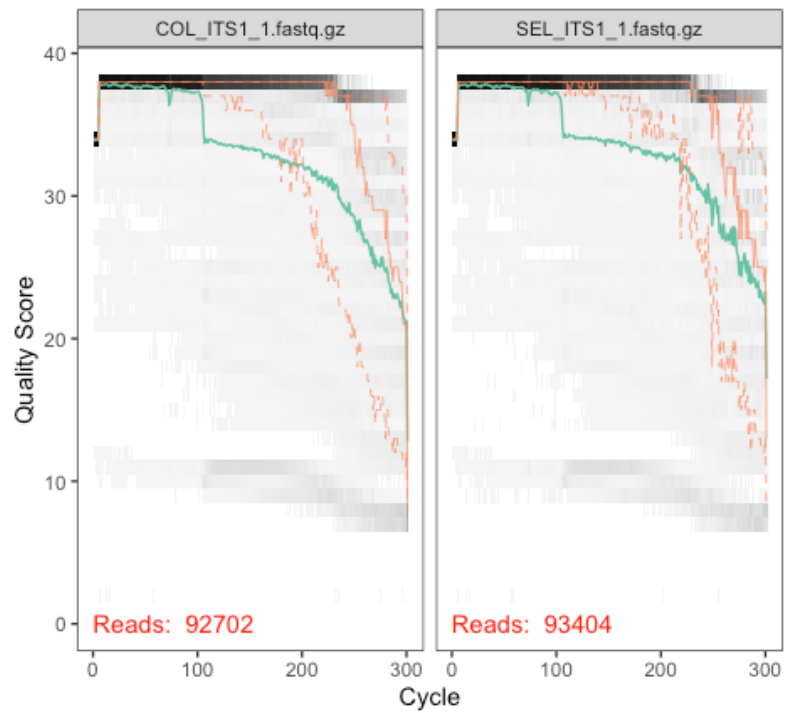


Figura 33 Gráfica de control de calidad en las muestras "reverse" para el marcador ITS1

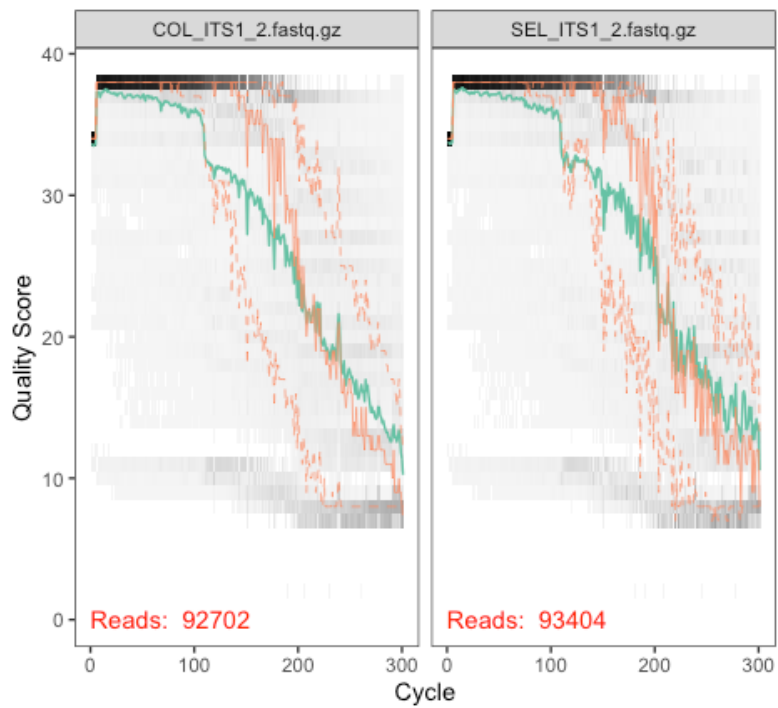


Figura 34 Gráfica de error para las muestras "forward" del marcador ITS1

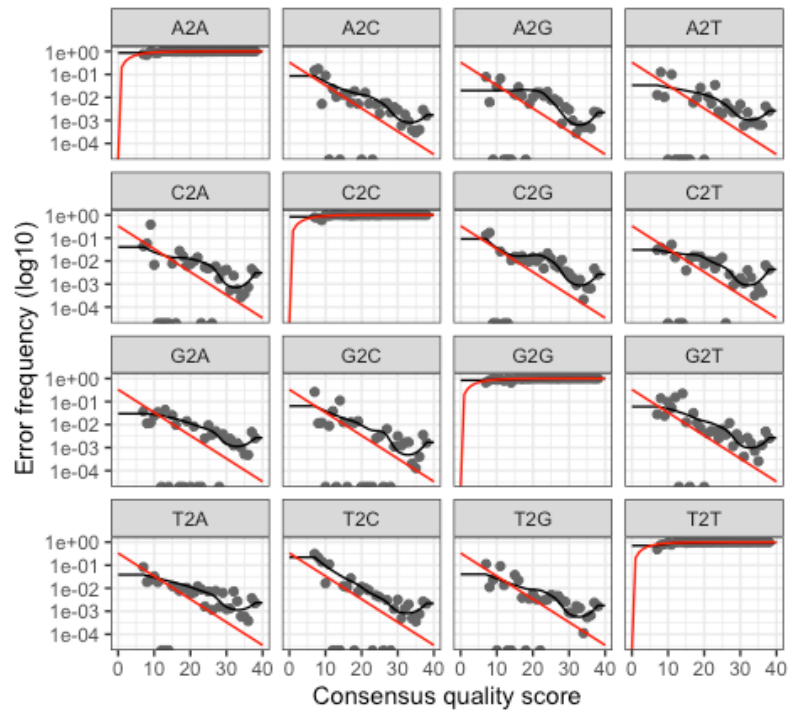


Figura 35 Gráfica de error para las muestras "reverse" del marcador ITS1

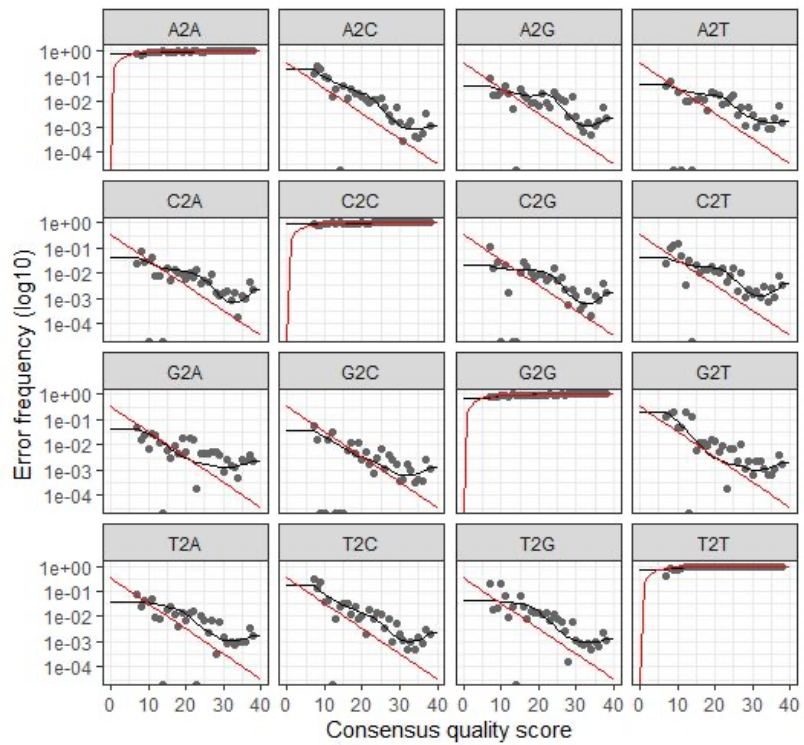


Figura 36 Gráfica de control de calidad en las muestras "forward" para el marcador ITS2

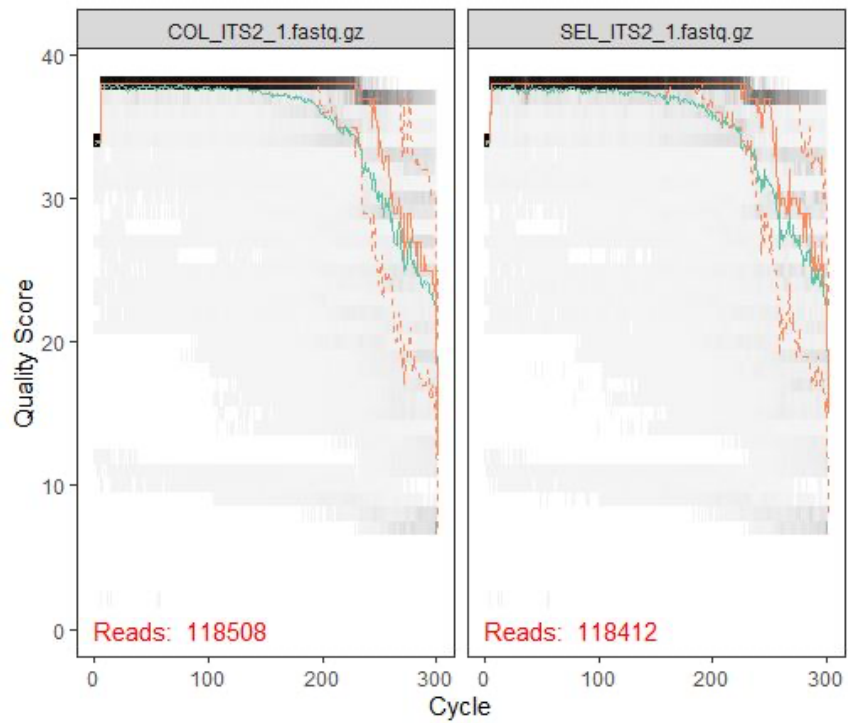


Figura 37 Gráfica de control de calidad en las muestras "reverse" para el marcador ITS2

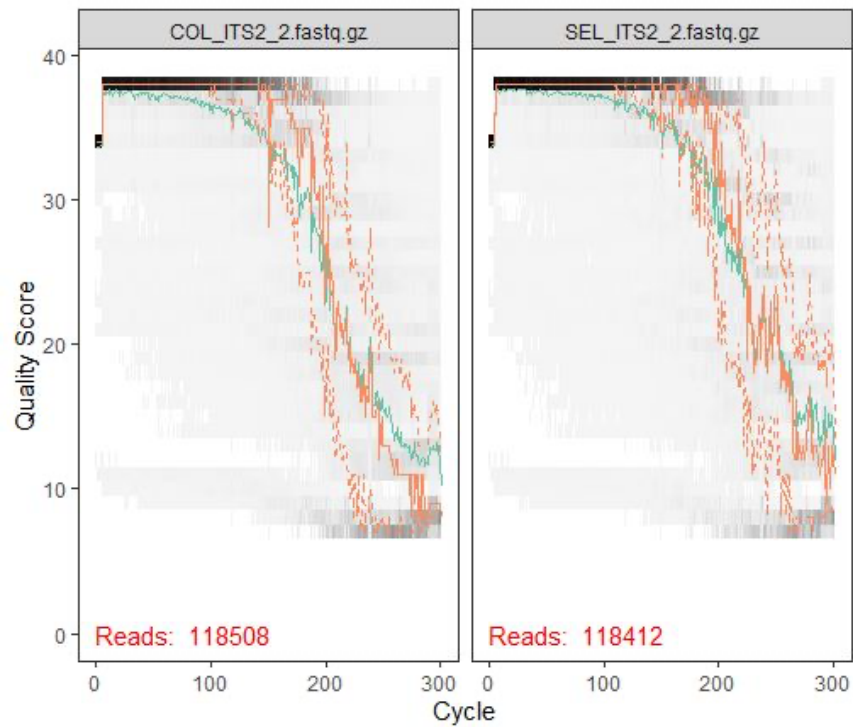


Figura 38 Gráfica de error para las muestras "forward" del marcador ITS2

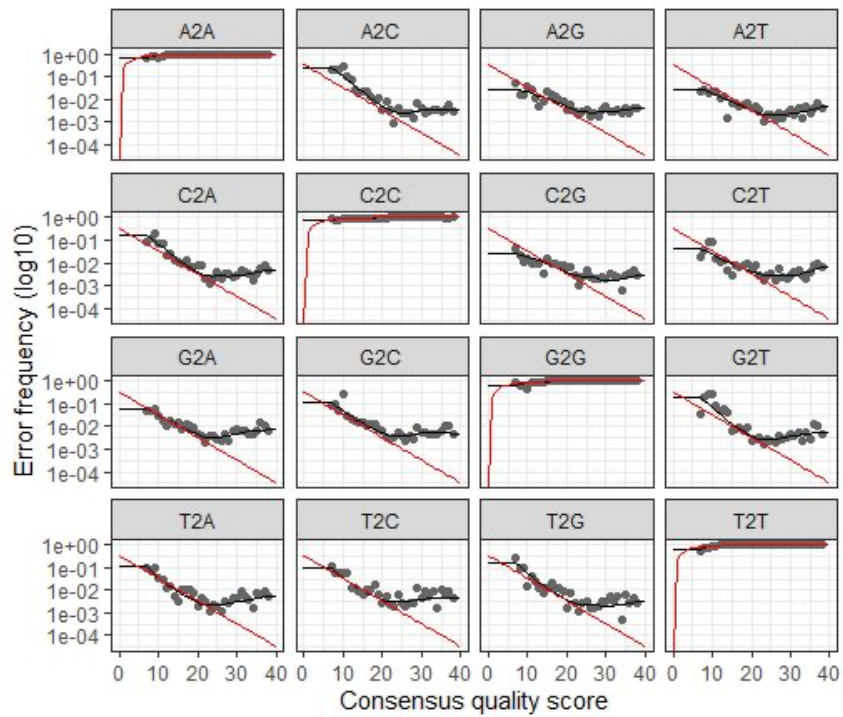


Figura 39 Gráfica de error para las muestras "reverse" del marcador ITS2

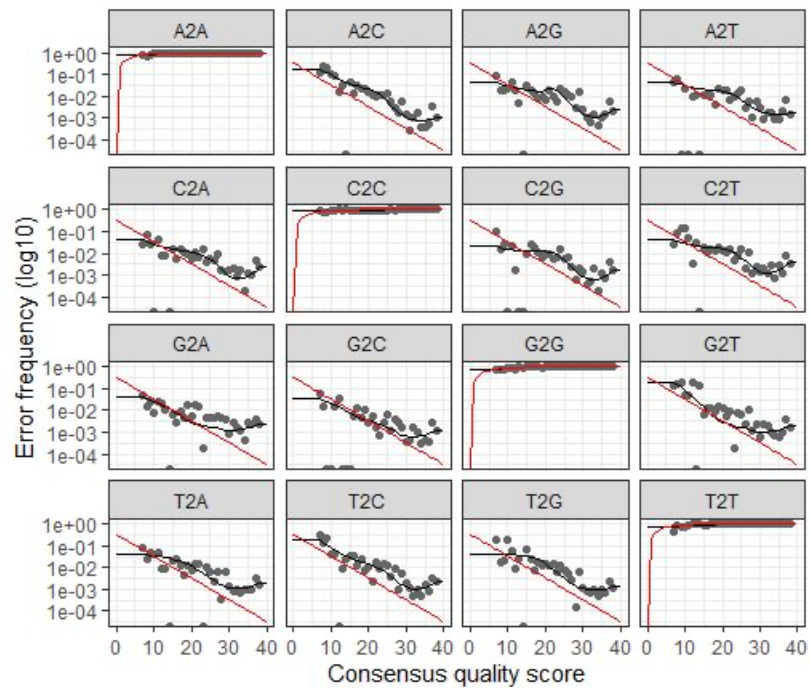


Figura 40 Modelo de rarefacción para la muestra COL y SEL del marcador ITS1

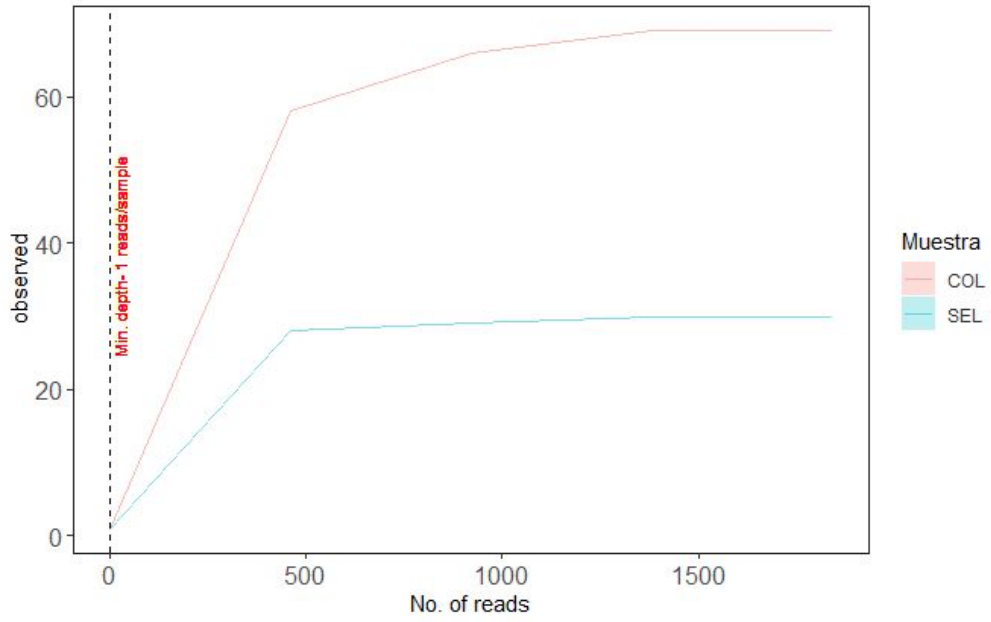


Figura 41 Modelo de rarefacción para los tipos de muestra para el marcador ITS1

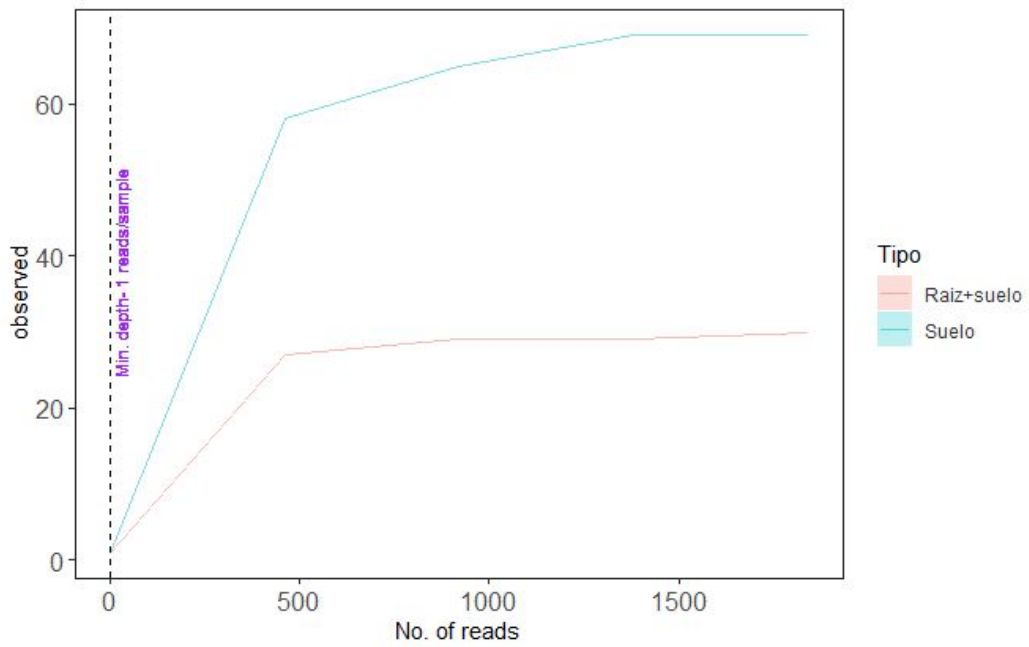


Figura 42 Modelo de rarefacción para la muestra COL y SEL del marcador ITS2

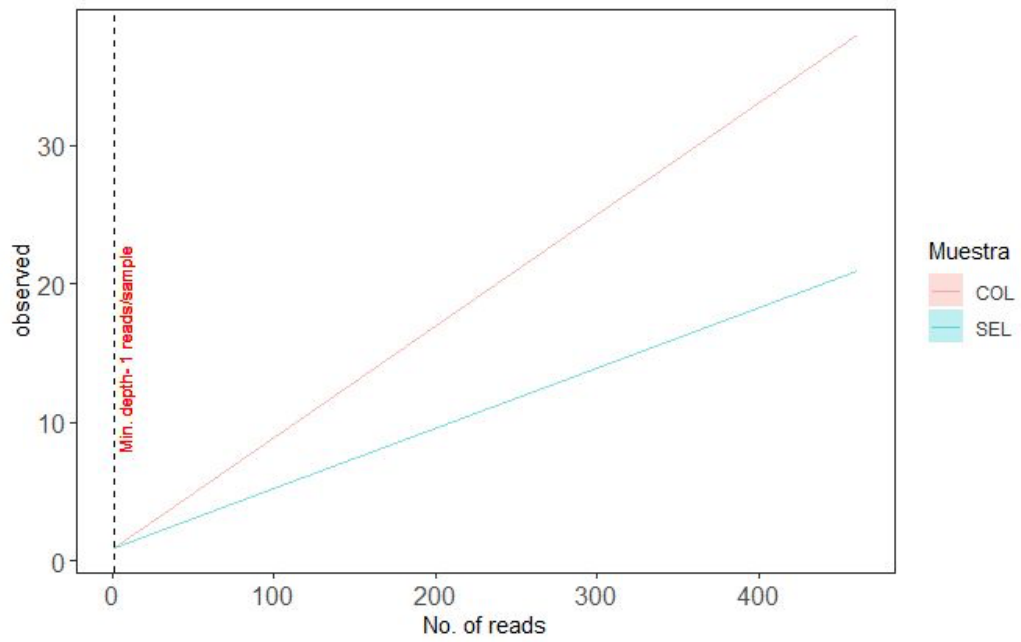


Figura 43 Modelo de rarefacción para los tipos de muestra para el marcador ITS2

