



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ANÁLISIS POR *METABARCODING* DE LAS
COMUNIDADES BACTERIANAS Y FÚNGICAS
ASOCIADAS A LA RIZÓSFERA DE ÁRBOLES DE
Cordia dodecandra, EN FUNCIÓN DE LA CONDICIÓN
DE CRECIMIENTO Y LA ÉPOCA DEL AÑO

Tesis que presenta

TOBÍAS MARCELO LÓPEZ RAMÍREZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS
(Ciencias Biológicas: *OPCIÓN BIOTECNOLOGÍA*)

Mérida, Yucatán, México

2022

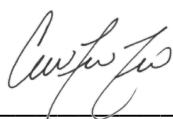
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Tobías Marcelo López Ramírez** titulado “**Análisis por *metabarcoding* de las comunidades bacterianas y fúngicas asociadas a la rizósfera de árboles de *Cordia dodecandra*, en función de la condición de crecimiento y la época del año**”, fue realizado en la Unidad de Biotecnología, en la línea de análisis de comunidades microbianas, en el laboratorio de Metagenómica del **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.**, bajo la dirección de la **Dra. Ingrid Aileen O’Connor Sánchez** y la **Dra. Blondy Beatriz Canto Canché**, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 1 de febrero de 2022

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Tobías Marcelo López Ramírez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de la Dra. Ingrid Aileen O'Connor Sánchez y Dra. Blondy Beatriz Canto Canché.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue posible gracias al apoyo económico del CONACYT en su formato Becas Nacionales (Tradicional) 2019 – 2, número 757863, y del Programa de Becas CONACYT-OEA-AMEXCID 2019. De igual manera, el proyecto fue financiado por el fondo FOSEC SEP-INVESTIGACIÓN BÁSICA, clave FSSEP02-C-2018-3.

Gracias al Centro de Investigación Científica de Yucatán en la persona de su director, el Dr. Pedro Iván González Chí por su oferta del posgrado en Ciencias Biológicas y al Dr. Lorenzo Felipe Sánchez Teyer coordinador de posgrado de la Opción Biotecnología. Al “Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas y Agua (LASPA)” del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CCBA) de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY) por los análisis de suelo. A la Dra. Aileen O’Connor por recibirme en su laboratorio y su equipo de trabajo además de sus correcciones en el presente documento, su paciencia y apoyo en estos años. A la Dra. Blondy Canto por las correcciones técnicas y la oportuna charla y dirección motivacional. Al Dr. Héctor Estrada por sus críticas al documento y el cercano acompañamiento en todas las salidas de campo y el análisis de los datos. A la Dra. Ileana Echevarría Machado por sus críticas en el documento y en la defensa del mismo. Al Dr. César De Los Santos Briones por su cercano acompañamiento en el laboratorio y en las salidas de campo.

A los compañeros de laboratorio Enrique Escalante y Oscar Álvarez por su tiempo y ayuda para las salidas de campo. A los compañeros Diego Garza y Francisco Cárdenas por su tiempo y ayuda en el entrenamiento en el uso de las herramientas bioinformáticas. A los compañeros Oscar Álvarez, Diego Garza, Diana Jacinto y Daniel Macías en el equipo de redacción y corrección del documento final.

DEDICATORIAS

A mi bella familia y los amigos, que hice en México y los que me esperaron y recibieron en Paraguay.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES	3
1.1 CIRICOTE	3
1.1.1. ESTUDIOS SOBRE EL CIRICOTE	4
1.1.2. PROYECTO CIRICOTE	5
1.2. DOMESTICACIÓN DE PLANTAS	6
1.2.1. GENERALIDADES.....	6
1.2.2. DOMESTICACIÓN DE PLANTAS Y SU RELACIÓN CON SU MICROBIOTA.....	7
1.3. SUELO	7
1.3.1. GENERALIDADES.....	7
1.3.2. SUELOS EN YUCATÁN.....	8
1.3.3. INTERACCIÓN PLANTA-SUELO	9
1.3.3.1. LA RAÍZ DEL CIRICOTE.....	10
1.4. MICROBIOTA VEGETAL	11
1.4.1. GENERALIDADES.....	11
1.4.2. RIZÓSFERA	11
1.4.3. EVOLUCIÓN Y FUNCIÓN DE LAS MICROBIOTAS EN PLANTAS	13
1.4.4 PRINCIPALES PHyla PROCARIOTAS Y EUCARIOTAS PRESENTES EN SUELOS Y RIZÓSFERAS.....	16

1.4.4.1 PROCARIOTAS	17
1.4.4.2 EUCARIOTAS.....	19
1.5. METAGENÓMICA	20
1.5.1. GENERALIDADES.....	20
1.5.2. SECUENCIACIÓN	21
1.5.2.1. ILLUMINA	22
1.5.3. HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS.....	24
1.5.3.1. <i>Ribosomal database project</i> (RDP)	24
1.5.3.2. QIIME.....	24
JUSTIFICACIÓN	25
PREGUNTAS PRINCIPALES.....	26
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
CAPITULO II.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS	29
2.1 DESCRIPCIÓN DE LOS LUGARES Y TEMPORADAS DE MUESTREO	29
2.2 COLECTA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SUELO Y RIZÓSFERA.....	30
2.3 ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES DE LAS MUESTRAS DE SUELO	33
2.4 EXTRACCIÓN, CONTROL DE CALIDAD Y CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN	33

2.5 SECUENCIACIÓN DE AMPLICONES, TRATAMIENTO INFORMÁTICO, ÍNDICES ECOLÓGICOS Y CURVAS DE RAREFACCIÓN Y ASIGNACIÓN TAXONÓMICA.....	34
2.5.1 Secuenciación de amplicones.....	34
2.5.2 Tratamiento informático.....	35
2.5.2.1 Procariotas.....	35
2.5.2.2 Eucariotas.....	35
CAPÍTULO III.....	38
RESULTADOS.....	38
3.1 ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES DE LAS MUESTRAS DE SUELO.....	38
3.2 CONTROL DE CALIDAD DE LA EXTRACCIÓN DEL ADN METAGENÓMICO.....	40
3.3 TRATAMIENTO BIOINFORMÁTICO.....	42
3.3.1 Procariotas.....	42
3.3.1.1 Curvas de rarefacción e índices ecológicos.....	43
3.3.1.2 Asignación taxonómica y estructura de las comunidades.....	44
3.3.1.2.1 Análisis a nivel de <i>Phylum</i>	44
3.3.1.2.1.1 Análisis de similitud.....	47
3.3.1.2.2 Análisis a nivel de Orden.....	48
3.3.1.2.2.1 Análisis de similitud.....	51
3.3.2 Eucariotas.....	52
3.3.2.1 Curvas de rarefacción e índices ecológicos.....	52
3.3.2.2 Asignación taxonómica y estructura de las comunidades.....	54

3.3.2.2.1 Análisis a nivel de <i>Phylum</i>	54
3.3.2.2.1.1 Análisis de similitud	56
3.3.2.2.2 Análisis a nivel de Orden.....	56
3.3.2.2.2.1 Análisis de similitud	59
CAPÍTULO IV	61
DISCUSIÓN	61
4.1 SUELO	61
4.2 PROCARIOTAS	65
4.3 EUCARIOTAS.....	71
CAPÍTULO V	77
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	77
5.1 CONCLUSIONES.....	77
5.2 PERSPECTIVAS.....	78
BIBLIOGRAFÍA.....	81
ANEXOS.....	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Árbol de ciricote presente en un parque de la ciudad de Mérida.	4
Figura 1.2. Ciclo Fenológico Reproductivo del ciricote.	5
Figura 1.3. Representación esquemática de la compartimentalización de la microbiota vegetal en una planta dicotiledónea y una monocotiledónea.	11
Figura 1.4 Esquema de las bibliotecas de ADN al final de la preparación de las muestras.	23
Figura 2.1 Punto de muestreo.	29
Figura 2.2 Puntos de muestreo.	30
Figura 2.3. Muestreo de raíces.	31
Figura 2.4. Colecta de raíces y codificación de muestras.	31
Figura 2.5. Obtención de suelo rizosférico mediante cepillado de raíces.	32
Figura 3.1. Gel de agarosa al 1 %.	41
Figura 3.2 Curva de rarefacción de OTUs a nivel de orden de las muestras de procariontas.	43
Figura 3.3. OTUs procariontas a nivel de <i>Phylum</i>	45
Figura 3.4 Mapa de calor de la estimación del coeficiente de similitud de Jaccard de los phyla procariontas en los que se apreció un patrón de comportamiento en las abundancias relativas.	48
Figura 3.5. OTUs procariontas a nivel de Orden con abundancia relativa superior a 1%. .	49
Figura 3.6 Mapa de calor de la estimación del coeficiente de similitud de Jaccard de los órdenes procariontas en los que se apreció un patrón de comportamiento en las abundancias relativas.	51
Figura 3.7 Curva de rarefacción de OTUs a nivel de orden de las muestras de eucariotas.	53

Figura 3.8. OTUs eucariotas a nivel de Phylum..... 55

Figura 3.9 Mapa de calor de la estimación del coeficiente de similitud de Jaccard de los phyla eucariotas en los que se apreció un patrón de comportamiento en las abundancias relativas.
..... 56

Figura 3.10. OTUs eucariotas a nivel de Orden con abundancia relativa superior a 1%.. 57

Figura 3.11 Mapa de calor de la estimación del coeficiente de similitud de Jaccard de los órdenes eucariotas en los que se apreció un patrón de comportamiento en las abundancias relativas.
..... 59

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1 Orden, codificación y leyenda de las librerías de trabajo	34
Cuadro 3.1 Propiedades de las muestras de suelo	38
Cuadro 3.2 Concentración del ADN extraído de las muestras compuestas.....	41
Cuadro 3.3 Resumen del tratamiento de las secuencias de procariontes.....	42
Cuadro 3.4 #OTUs encontrados e índices ecológicos asociados a las muestras de procariontes	44
Cuadro 3.5. Resumen de la variación de la abundancia relativa de los phyla procariontes con abundancia relativa mayor a 1% al interior de las muestras.....	47
Cuadro 3.6. Resumen de la variación de la abundancia relativa de los órdenes procariontes con abundancia relativa mayor a 1% al interior de las muestras.....	50
Cuadro 3.7 Resumen del tratamiento de las secuencias de eucariotes.....	52
Cuadro 3.8 #OTUs encontrados y los índices ecológicos asociados a las muestras de eucariotes	53
Cuadro 3.9. Resumen de la variación de la abundancia relativa de los phyla eucariotes con abundancia relativa mayor a 1% al interior de las muestras.....	56
Cuadro 3.10. Resumen de la variación de la abundancia relativa de los órdenes eucariotes con abundancia relativa mayor a 1% al interior de las muestras.....	59

RESUMEN

Se han reportado diferencias en las características fenológicas y morfológicas de árboles de *Cordia dodecandra* crecidos en dos ecosistemas distintos, zonas de selva poco perturbada del estado de Yucatán y huertos familiares rurales. Además, se ha reportado que uno de los principales factores que afectaron el desarrollo de árboles de ciricote es la condición de riego, en especial en temporada seca. Dado que la microbiota de las plantas está íntimamente asociada al desarrollo vegetal, se hipotetizó que existirían diferencias en las comunidades de hongos y bacterias de la rizósfera de estos árboles crecidos en dos condiciones diferentes, con riego y sin riego, y también entre las temporadas de secas y lluvias.

No se observaron diferencias significativas en cuanto a las propiedades del suelo entre temporadas de muestreo, pero sí se observaron niveles de sodio, potasio, conductividad, calcio, carbonatos, carbono orgánico total, nitrógeno total y fósforo, superiores en suelos “con riego” con respecto al grupo “sin riego”. Ambos suelos resultaron similares en el potencial REDOX (siendo ambos suelos reducidos) y pH (de neutro a medianamente alcalinos).

Los principales hallazgos encontrados en este trabajo en cuanto a los microorganismos procariotas, fueron: i) una mayor abundancia relativa de los órdenes Rhizobiales y Bacillales en la rizósfera con respecto al suelo; ii) en las muestras “sin riego”, mayor abundancia relativa de Gaiellales y Pirinomadales, estando el primero en una abundancia bastante mayor a lo reportado previamente en otros estudios metagenómicos de rizósferas.

Para hongos, a nivel de phylum, se observó mayor abundancia relativa de Ascomycota en el grupo “con riego” que en el grupo “sin riego” y, por el contrario, Basidiomycota estuvo en mayor proporción en “sin riego” que en “con riego”. Ascomycota fue dominante en todas las muestras, mas fue Basidiomycota el que presentó diferencias significativas en el análisis de similitud del coeficiente de Jaccard. A nivel de orden, hubo una mayor abundancia relativa de Agaricales en temporada seca que en lluvias.

Se logró clasificar el 53% de los OTUs identificados hasta nivel de orden. Los cuales, han sido previamente reportados en estudios de suelo, rizósfera y endosfera de plantas, desde árboles hasta césped, así como en ecosistemas tanto templados como tropicales. Sin embargo, se encontraron interesantes diferencias en la abundancia relativa de taxones poco abundantes en otros estudios, los cuales necesitan ser evaluados con más profundidad.

ABSTRACT

Differences have been reported in the phenological and morphological characteristics of *Cordia dodecandra* trees grown in two different ecosystems, the slightly disturbed forest areas of the state of Yucatán and rural home gardens or farms. In addition, it has been reported that one of the main factors that affected the development of ciricote trees is the irrigation condition, especially in the dry season. Since the plant's microbiota is closely associated with plant development, it was hypothesized that there would be differences in the communities of fungi and bacteria in the rhizosphere of these trees grown under in two different conditions, with and without irrigation, and also between the dry and rainy seasons.

No significant differences were observed in terms of soil properties between sampling seasons, but levels of sodium, potassium, conductivity, calcium, carbonates, total organic carbon, total nitrogen and phosphorus were observed, higher in soils "with irrigation" with respect to the group "without irrigation". Both soils were similar in REDOX potential (both soils being reduced) and pH (from neutral to moderately alkaline).

The main findings in this work regarding prokaryotic microorganisms were: i) a greater relative abundance of the Rhizobiales and Bacillales orders in the rhizosphere with respect to the soil; ii) in the "without irrigation" samples, greater relative abundance of Gaiellales and Pirinomonadales, the former being in a much higher abundance than previously reported in other metagenomic studies of rhizospheres.

For fungi, at the phylum level, a greater relative abundance of Ascomycota was observed in the group "with irrigation" than in the group "without irrigation" and, on the contrary, Basidiomycota was in greater proportion in "without irrigation" than in "with irrigation". Ascomycota was dominant in all samples, but it was Basidiomycota that presented a significant difference in the similarity analysis of the Jaccard coefficient. At the order level, there was a greater relative abundance of Agaricales in the dry season than in the rainy season.

It was possible to classify 53% of the OTUs identified up to the order level. Which have been previously reported in studies of soil, rhizosphere and endosphere of plants, from trees to grass, as well as in both temperate and tropical ecosystems. However, interesting differences in the relative abundance of rare taxa were found in other studies, which need to be further evaluated.

INTRODUCCIÓN

Los árboles de ciricote (*Cordia dodecandra*) se consideran multipropósito, por lo que son muy apreciados por los pobladores de la península yucateca. Son originarios de América, desde el sur de México hasta el norte de Guatemala y Belice. Son reconocidos por su dura madera, sus hojas ásperas, su fruto comestible y sus bellas flores anaranjadas. El ciricote, es un miembro notable de las selvas medianas caducifolias así como de los tradicionales huertos familiares maya de la región (Canché-Collí & Canto, 2014; Morales & Herrera, 2009; Jankiewicz *et al.*, 1986). Esta dicotomía en la situación de crecimiento ha sido ya señalada desde hace más de 30 años y las observaciones de varios estudios apuntan a un “proceso de domesticación” o una “domesticación parcial” (Ferrer *et al.*, 2019; Grajales Puc, 2018; Palomo Buenfil, 2017; Jankiewicz *et al.*, 1986).

Importantes avances tecnológicos en muchos campos de la ciencia (principalmente en las áreas de secuenciación de genomas e informática) han permitido el desarrollo de una nueva rama de la ciencia, conocida como metagenómica. En esta, se estudian conjuntos de genomas microbianos para investigar algunas características de sus comunidades, como por ejemplo su composición, variabilidad, índices ecológicos y genes particulares. El ADN metagenómico puede extraerse de comunidades que habitan un determinado medio natural o alterado. La comunidad de un cierto ambiente ha sido denominada como su microbiota (en este trabajo definida como: la comunidad ecológica de microorganismos comensales, simbióticos y patogénicos encontrados en (sobre y/o dentro) un espacio determinado). Estas microbiotas pueden ser encontradas desde fondos marinos y charcos de agua estanca, pasando por intestino y piel de animales (incluyendo a los seres humanos) hasta las plantas (sobre y dentro de estas) y el suelo. Gracias a las herramientas microbiológicas clásicas principalmente, se han descrito relaciones de ocurrencia y patrones reconocibles de presencia/ausencia de miembros de estas microbiotas en los medios que estos habitan. La microbiota asociada a las plantas no escapa a este hecho y se ha descrito que tiene gran influencia en el desarrollo vegetal, y participa en los ciclos geológicos de todos los macronutrientes y micronutrientes esenciales para el desarrollo vegetal.

Se ha observado que la microbiota de la rizósfera suele verse fuertemente afectada por las condiciones de la planta hospedera (Compant *et al.*, 2019), por lo que al presentarse situaciones de desarrollo disimilares *e.g.* el riego de estas, es de esperar que la estructura de estas microbiotas también se modifique. Es tal la importancia de esta relación planta-microbiota que no pocos autores consideran a las plantas y sus microbiotas asociadas como un todo cuyo

estudio debe ser abordado como tal; Simon y colaboradores (2019) los definen como un **holobionte** y a sus genomas (los genes del hospedero y el metagenoma de la microbiota) como el **hologenoma** o genoma del holobionte.

En el presente estudio, la discusión se ha abordado desde una perspectiva de dinamismo y constantemente cambiante, más concretamente en los términos de árboles crecidos en dos condiciones: “con riego y sin riego” y se han evaluado las diferencias que pudieran existir en la conformación de las comunidades rizosféricas asociadas a éstos, así como las propiedades de los suelos en los que se desarrollan. Finalmente, se han propuesto explicaciones para la presencia y ausencia de taxa microbianos clave y para su posible interacción con los parámetros medidos y la temporalidad de muestreo.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 CIRICOTE

Ciricote, Cupapé y Cómpite (castellano), *chak k'oopte'* y *k'an k'oopte'* (maya), son los nombres comunes con los que se conoce a *Cordia dodecandra* A.DC., planta originaria de América, desde el sur de México hasta el norte de Guatemala y Belice (CONABIO, 2020; Duno *et al.*, 2010; Jankiewicz *et al.*, 1986). En México se le encuentra de manera natural en los estados de Veracruz, Chiapas, Tabasco, Campeche, Quintana Roo y Yucatán (Cámara Romero *et al.*, 2016). Perteneció a la familia Boraginaceae, a la cual pertenecen árboles, arbustos y hierbas de gran variedad; entre sus cien géneros se encuentra el *Cordia* el cual tiene su nombre en homenaje al farmacéutico y botánico alemán Valerius Cordus (1515-1544) (Quattrocchi, 2000).

Es un árbol caducifolio de porte mediano, cuyas frutas son comestibles, aunque ácidas, por lo que se preparan y consumen en almíbar o conserva dulce. Es una especie de gran valor biológico y cultural, por ser importante en la composición florística de las selvas mayas y por proporcionarles a los habitantes de la zona además de sus frutos, hojas ásperas para ser usadas como lija y para la limpieza de materiales de cocina, así como sus vistosas flores, que se usan como ornato. Su madera dura, pesada y veteada es utilizada para la fabricación de muebles y artesanías, lo cual ha dado lugar a severas reducciones en las poblaciones silvestres; sin embargo no es raro encontrarlo aún en ciudades y en huertos familiares mayas (Canché-Collí & Canto, 2014; Morales & Herrera, 2009; Jankiewicz *et al.*, 1986).

Normalmente, los árboles de *C. dodecandra* alcanzan una altura de 10 a 20 metros, su tronco es de un diámetro de 40 a 60 cm, con crecimiento recto, cilíndrico con pequeñas gambas y ramas ascendentes, presenta copa redondeada o piramidal, muy densa en árboles jóvenes, menos densa en árboles maduros (mayores de 15 años); su corteza externa es fisurada, ligeramente escamosa con piezas longitudinales, color grisácea o blanquecina y lisa; sus hojas son simples, de color verde oscuro en el haz y verde pálido en el envés, muy ásperas ya que tienen tricomas muy duros (Campos *et al.*, 2015; Canché-Collí & Canto, 2014; Morales & Herrera, 2009). Sus flores son hermafroditas de un color naranja brillante. Las inflorescencias son panículas cimosas, axilares y terminales,

pubescentes, con un cáliz amarillo verdoso y ovario ínfero. La floración se produce durante la estación seca, entre los meses de febrero a mayo (Canché-Collí & Canto, 2014; Jankiewicz *et al.*, 1986) figura 1.1.



Figura 1.1. Árbol de ciricote presente en un parque de la ciudad de Mérida.

1.1.1. ESTUDIOS SOBRE EL CIRICOTE

Grajales Puc (2018) realizó un análisis para determinar los estados fenológicos de *Cordia dodecandra* (floración, fructificación y foliación) en dos condiciones de crecimiento, las cuales fueron, por un lado ambientes silvestres, y por otro huertos familiares; encontrando diferencias entre estos dos grupos. En cuanto a la foliación, ésta fue menor en árboles presentes en huertos familiares cuando estaban ya en estadio senil y observaron lo contrario en árboles de estadio juvenil. En cuanto a la floración, describe que el periodo de floración fue más prolongado en la población ubicada en huertos familiares y lo mismo fue registrado para la fenofase de fructificación figura 1.2.

ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
<i>Sin Follaje</i>				<i>Con Follaje</i>							
<i>Floración Abundante</i>				<i>Floración Escasa</i>							
<i>Fruto Verde Abundante</i>				<i>Fruto Verde Escaso</i>							
<i>Fruto Maduro Abundante</i>				<i>Fruto Maduro Escaso</i>							

Figura 1.2. Ciclo Fenológico Reproductivo del ciricote (Morales & Herrera, 2009)

Palomo-Buenfil (2017) describe, en un estudio realizado con las mismas condiciones de crecimiento que Grajales Puc (árboles crecidos en ambientes silvestre vs árboles crecidos en huertos familiares), que aquellas plantas crecidas en huertos familiares presentan hojas con un área foliar de mayor tamaño en comparación con aquellas crecidas en estado silvestre y concluye que esto podría deberse al manejo en los huertos familiares. Entendiendo el manejo como el riego y desecho de materia orgánica (que serviría de abono), aunque estos no sean intencionados y la poda de los mismos o de otros árboles competidores de espacio y nutrientes.

Recientemente, Ferrer y colaboradores (2019) analizaron y describieron variaciones entre poblaciones de tres especies de árboles nativos de la región yucateca, entre ellos el ciricote, y concluyen que las variaciones entre las poblaciones silvestres y las de huertos familiares podrían deberse al manejo que están recibiendo estos árboles y a que probablemente haya un proceso de domesticación en curso, ya que mediante el uso de marcadores ISSR (en inglés, *inter simple sequence repeat*, secuencia interna simple repetida) han demostrado que las variaciones en las características botánicas están asociadas a la prevalencia de diferentes grupos genéticos entre las dos poblaciones.

Con base en todo lo anterior, es importante destacar que el ciricote no debe ser visto como una especie estática, sino al igual que todos los seres vivos, como una especie en continua transformación. En este caso una transformación estrechamente relacionada con los seres humanos pobladores del área maya.

1.1.2. PROYECTO CIRICOTE

El presente trabajo se enmarca dentro de un proyecto más amplio que se titula “Efecto de la domesticación en árboles multipropósito de la Península de Yucatán: Ecología y

genómica funcional de *Cordia dodecandra*”. Además del estudio de las comunidades microbianas asociadas a la rizósfera que se enfoca en el presente trabajo, acompañarán al macro proyecto aspectos como la evaluación morfológica de hojas y flores de estas poblaciones, así como el análisis de la producción de compuestos fitoquímicos. Estos últimos, pueden tener profundos efectos en las poblaciones microbianas como lo describieron Karamanoli y colaboradores (2005) en un estudio donde compararon la colonización bacteriana en hojas de plantas aromáticas y no aromáticas y evaluaron el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de las plantas aromáticas. Por ello, es de esperar que haya diferencias entre poblaciones silvestres y aquellas crecidas en solares, ya que, en las segundas, las hojas que caen son removidas generalmente y aprovechadas para alimentar a animales que suelen compartir el hábitat con estos árboles.

Por último, el proyecto contempla estudiar la variación en la disponibilidad de carbono, nutrientes y compuestos fitoquímicos en el suelo y la hojarasca, ya que, de estos, los nutrientes son reciclados y afectan tanto a la microbiota rizosférica como la microbiota edáfica general de la zona.

1.2. DOMESTICACIÓN DE PLANTAS

1.2.1. GENERALIDADES

La Domesticación, del latín “*domesticus*”, perteneciente a la casa, es una relación mutualista sostenida por varias generaciones en la que, un organismo asume un significativo grado de influencia sobre la reproducción y cuidado de otro organismo, con el fin de asegurar de modo predecible el acceso a un recurso de interés y mediante la cual, el segundo gana ventaja sobre organismos que quedan fuera de la relación, por lo tanto beneficiando y generalmente, aumentando la conveniencia para ambos (Zeder, 2015).

Las plantas domesticadas normalmente difieren de sus parientes silvestres en varios aspectos. Entre ellos, tienen una distribución geográfica más amplia, presentan conversión de perennes a anuales, pérdida de dormancia en las semillas, falta de mecanismos de dispersión de semillas, semillas más pequeñas y con menor éxito en ambientes hostiles, adaptaciones defensivas reducidas (pelos, espinas), mayor palatabilidad de los frutos, partes comestibles más grandes y fáciles de separar de las no comestibles (Zeven & De Wet, 1982).

1.2.2. DOMESTICACIÓN DE PLANTAS Y SU RELACIÓN CON SU MICROBIOTA

La domesticación de plantas y la revolución agrícola terminaron proveyendo una fuente alimenticia más continua para los pueblos cazadores y recolectores y resultaron esenciales para dejar el estilo de vida nómada (Purugganan & Fuller, 2009). A la domesticación la han acompañado progresivos cambios en el hábitat y prácticas de cultivo, con el fin de incrementar los rendimientos y proteger a las plantas del estrés (Pérez-Jaramillo *et al.*, 2016). Pero esto no solamente afecta rasgos fenotípicos, sino que además reduce la diversidad genética. La forma en que este llamado síndrome de domesticación (Doebley *et al.*, 2006) afecta a la microbiota de la planta se está abordando actualmente para varias especies de plantas para obtener información sobre los mecanismos potenciales que subyacen al ensamblaje y la actividad de la microbiota (Cordovez *et al.*, 2019). Se ha reportado que la resistencia de la comunidad microbiana a la invasión de patógenos está asociada a la composición de esta comunidad (Berg *et al.*, 2017).

Interesantemente, Cook y colaboradores (1995) han postulado que, ya que en pocas ocasiones la selección natural ha conferido a las plantas resistencia genética a patógenos de suelo, las plantas, en mayor o menor medida dependen de la defensa provista por microorganismos de la rizósfera. Asumiendo esta situación cabe esperar que los cultivos modernos hayan perdido cierta capacidad para reclutar microorganismos huésped específicos en comparación con aquellos en estado silvestre, los cuales son genéticamente más diversos y adaptados a suelos pre-agrícolas (Pérez-Jaramillo *et al.*, 2016).

1.3. SUELO

1.3.1. GENERALIDADES

La microbiota del suelo constituye la fuente principal de donde los vegetales perfilan las comunidades microbianas con las que conviven (Gopal & Gupta, 2016), y resulta ser el principal factor alogénico que modula el inóculo microbiano y los nutrientes disponibles (Cordovez *et al.*, 2019). Por ello se hace indispensable estudiar las comunidades microbianas asociadas a la rizósfera definir las características del suelo circundante a estas comunidades.

El suelo es una mezcla de materia orgánica, minerales, gases, líquidos y organismos, los cuales juntos sostienen la vida como la conocemos (FAO., 2021.). Entre sus principales funciones está el de ser un medio para el crecimiento vegetal y un hábitat para otros diversos organismos y microorganismos, quienes a su vez modifican al suelo (Dominati *et al.*, 2010).

El suelo es producto de 5 factores: la influencia del clima, el relieve, los organismos y los minerales que interactúan con el tiempo (Gilluly *et al.*, 1975). Dada su complejidad, los ecólogos de suelo lo consideran como un ecosistema.

La “Ciencia del Suelo” es la ciencia encargada del estudio del suelo como recurso natural, incluyendo su formación, clasificación y mapeo; sus propiedades físicas, químicas, biológicas y de fertilidad; y la relación de estas propiedades y su uso y explotación (Neuendorf *et al.*, 2011). Sus principales ramas son; la pedología, que se enfoca en la formación, química, morfología y clasificación de suelos; y la edafología que se centra en cómo los suelos interactúan con seres vivos, en especial plantas.

1.3.2. SUELOS EN YUCATÁN

Bautista y colaboradores (2015) han publicado una actualización del mapa de suelos del estado de Yucatán relacionando los ambientes geomorfológicos con los tipos de suelo hallados. En la zona cercana a la ciudad de Mérida (que es donde se realizó el muestreo para este trabajo) se reportó un ambiente kárstico, el cual, según describen, constituye una gran zona de transición entre los lomeríos con la zona costera y domina la mayor parte del estado. En el mismo predominan Leptosols, los cuales según la Base Referencial Mundial (WRB por sus siglas en inglés), comprenden suelos muy delgados (< 25cm) sobre roca continua o suelos más profundos que son extremadamente ricos en fragmentos gruesos (FAO, 2016).

Esta clasificación resulta muy general para los propósitos de este estudio, por lo que un análisis más fino de la zona de muestreo es necesario para determinar factores como el contenido de materia orgánica y el pH. Fierer y Jackson (2006) sugieren que el pH del suelo es uno de los principales factores que afecta la riqueza, diversidad y composición general de la comunidad bacteriana. Por otro lado, se ha reportado que los árboles tienen un

impacto específico en el pH del suelo y por ello, estos deberían tener un rol diferenciador en las comunidades microbianas asociadas a estos (Pfeiffer *et al.*, 2013).

Es por esto que, como se menciona previamente, el proyecto contempla la caracterización edáfica de los puntos de muestreo.

1.3.3. INTERACCIÓN PLANTA-SUELO

Para entender cómo los árboles regulan las propiedades del suelo es importante definir el órgano encargado de interactuar con el suelo, es decir: la raíz. La raíz es el primer órgano embrionario que se desarrolla durante la germinación de la semilla. La raíz como órgano de las plantas vasculares, generalmente crece hacia el interior del suelo por presentar geotropismo positivo y fototropismo negativo. La estructura de la raíz tiende a ser más simple que la del tallo, además se observa la ausencia de clorofila, yemas, y nudos entre otras estructuras (Quer, 2000).

Entre las principales funciones de la raíz están la absorción de agua y minerales del suelo y la de sostén estructural; en algunas especies las raíces también desempeñan funciones de almacenamiento de reservas alimenticias (Stevens, 2019; Strasburger & Sitte, 2004).

Entre otras funciones de la raíz destacamos la de soporte de asociaciones simbióticas con los microorganismos con los que co-habita en el suelo; algunos de los cuales, ayudan a disolver el fósforo y a la fijación del nitrógeno atmosférico (Strasburger & Sitte, 2004). Se destaca también la capacidad secretora de la raíz de enzimas y moléculas como potentes ácidos orgánicos que disuelven las piedras calizas y liberan los minerales presentes en las mismas, participando en la creación de suelo (Strasburger & Sitte, 2004).

De las especies de plantas y de su genotipo depende en gran medida el reclutamiento de microorganismos del ambiente del suelo, donde la morfología de las raíces, los exudados y el tipo de rizodepósitos juegan un papel importante en el reclutamiento de la microbiota vegetal (Compant *et al.*, 2019).

La variación genética de la planta afecta las características morfológicas, como el crecimiento de la raíz, la arquitectura y la composición del exudado, que a su vez afectan el ensamblaje de la microbiota. Por ejemplo, Legay y colaboradores (2014) demostraron

que el diámetro, el contenido de materia seca y la relación C/N (Carbono/Nitrógeno) de la raíz fueron predictores significativos de la variación en la composición de la microbiota en pastizales.

1.3.3.1. LA RAÍZ DEL CIRICOTE

En una búsqueda de referencias que describan la estructura radicular de *Cordia dodecandra*, no fue posible hallar una que describa cómo crece o el tipo de excreciones que la caracterizan.

No obstante, Reuter y colaboradores (2008) han descrito que el ciricote crece de manera rápida en Leptosols negros y Cambisols rojos encontrados en la zona norte, denominada en el estudio como “zona henequenera” del norte de la península yucateca. Destacan el significativo efecto del riego esporádico en el crecimiento de las plántulas de ciricote en especial en la temporada seca.

Está claro que la actividad humana tiene un efecto positivo en las plantas de ciricote crecidas en solares mayas a pesar de que esta actividad humana no sea directamente intencionada a generar los efectos descritos. Aun así, queda por responder cuál es el efecto, si este existiese, sobre la microbiota que acompaña a este árbol en su gradual transformación como consecuencias de la convivencia cercana con humanos.

1.4. MICROBIOTA VEGETAL

1.4.1. GENERALIDADES

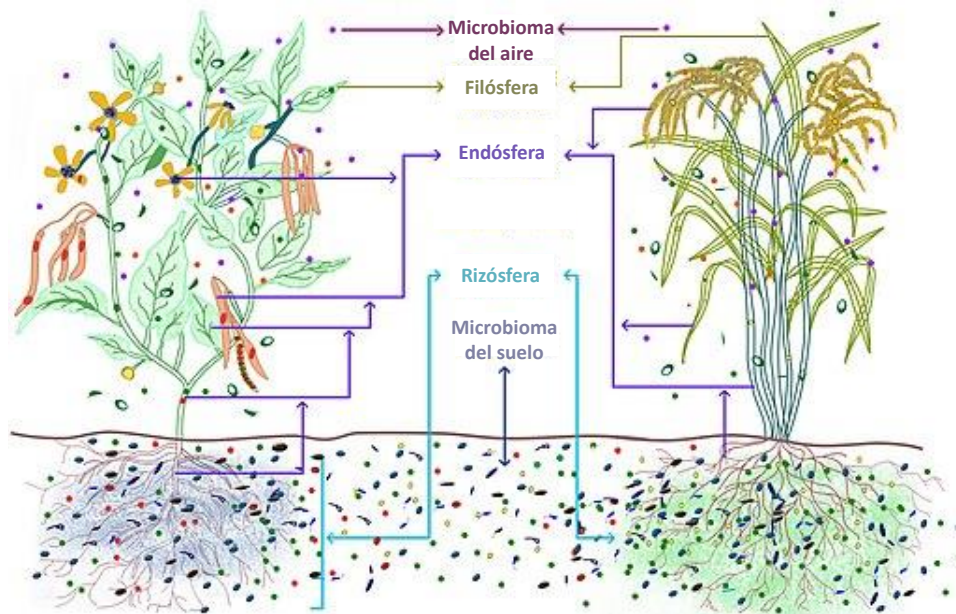


Figura 1.3. Representación esquemática de la compartimentalización de la microbiota vegetal en una planta dicotiledónea y una monocotiledónea. Traducido de: Gopal & Gupta, 2016.

Gopal y Gupta (2016) definen tres principales compartimentos de las plantas en donde la microbiota vegetal se puede desarrollar; la **filósfera**, son todas las partes vegetales que se encuentran por arriba del nivel suelo en donde habitan microorganismos, en ésta habitan los **epífitos**; la **endosfera**, que son los compartimientos al interior de los tejidos vegetales, los habitantes en estos compartimentos son los **endófitos**; y la **rizósfera**, que es el hábitat microbiano por debajo de la superficie del suelo y comprende una fina capa de suelo que rodea y está altamente influenciada por la raíz vegetal y los microorganismos que allí se desarrollan. A su vez, la microbiota vegetal está rodeada por aquellos del aire y del suelo figura 1.3 (Gopal & Gupta, 2016).

1.4.2. RIZÓSFERA

La **rizósfera** es la zona del suelo directamente adyacente a la raíz y cuya composición química y microbiana se encuentran influenciadas por el crecimiento de la planta, la respiración y el intercambio de nutrientes y compuestos entre la raíz y el suelo (Bulgarelli *et al.*, 2013). Algunos autores han definido estructuras como el Rizoplano (Rhizoplane), como la superficie externa de la raíz que incluye partículas de suelo firmemente adheridas

a la misma y estudiándola por separado de la rizósfera y la endosfera (Edwards *et al.*, 2015). Debido a la dificultad técnica evidente para definir los perímetros de estas regiones, como lo plantean Vandenkoornhuyse y colaboradores (2015), se ha tendido en general a estudiar como rizósfera a la región de transición entre el suelo y la superficie radicular.

En la literatura se reconocen dos modos o vías de transmisión de las comunidades microbianas en las plantas (i) vertical o transmisión parental, que es la microbiota que se encuentra y se trasmite por la semilla que da origen al nuevo organismo, esta microbiota de semilla puede hallarse tanto en la superficie como al interior de la misma; y (ii) horizontal o transmisión ambiental, que es la microbiota que se trasmite por el aire, por medio de insectos, el polen, polvo etcétera, a la filósfera vegetal y debajo del suelo, por medio de insectos, nematodos y otros animales relacionados con la raíz, además de la microbiota preexistente en el suelo mismo y/o restos vegetales que entran en contacto con la rizósfera (Cordovez *et al.*, 2019). En general se reconoce que la microbiota de la filósfera es una comunidad más dinámica y dependiente de los factores ambientales (luz, temperatura, lluvia, etc.) que aquella de la rizósfera (Cordovez *et al.*, 2019), ya que en la medida en que las características edáficas particulares mantengan el micro clima al interior, éste difícilmente se verá afectado de manera pronunciada. En este sentido, por ejemplo se ha reportado en un estudio, que un incremento en 4°C en la temperatura del suelo no tuvo influencia en la composición y biomasa de la comunidad microbiana pero incrementó significativamente su actividad metabólica (Schindlbacher *et al.*, 2011).

En la rizósfera, se han descrito diversos procesos y mecanismos de selección de microorganismos en contacto con la raíz vegetal. El mecanismo principal está mediado por el hospedero, y es definido como rizodeposición (Gopal & Gupta, 2016). Involucra una amplia variedad de sustancias; desde iones, pasando por ácidos grasos y fenoles, que median la captación de nutrientes para las plantas y participan en su relación con la microbiota, así como la modulación del pH y las condiciones oxidoreductoras; compuestos que fungen como señales específicas para el desarrollo de arqueas, bacterias y hongos i.e. fitoalexinas, fitohormonas y/o fitotoxinas; compuestos inhibidores así como agonistas de QSs (***Quorum sensing signals***); hasta azúcares y aminoácidos que permiten y estimulan el crecimiento y desarrollo microbiano. Estas sustancias y los procesos asociados a ellas

son recopilados en trabajos como el de Dakora y Phillips (2002) y el de Hartmann y colaboradores (2009).

Es evidente que ante la complejidad del micro-hábitat que significa la rizósfera, resulta éste un ambiente un tanto hostil por un lado (por la necesidad de la planta de eliminar o controlar el avance y crecimiento de patógenos), como atractivo por otro (por la secreción de azúcares y aminoácidos que la planta genera para favorecer el desarrollo de microorganismos simbiotes) para microorganismos, y estos tienden a competir y autorregularse por la consecución de los recursos, y es este otro modo de selección para la conformación de la microbiota que habita e interacciona estrechamente con las plantas (Hartmann *et al.*, 2009).

1.4.3. EVOLUCIÓN Y FUNCIÓN DE LAS MICROBIOTAS EN PLANTAS

Muchos estudios han enfocado el análisis de las microbiotas asociadas a las plantas desde una perspectiva holística (*i.e.* analizando al hologenoma y su evolución), y se han definido ciertos microorganismos con funciones específicas tanto a nivel inmunológico como nutricional. En esta sección se describen los fenómenos asociados a los términos: Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal, “*cry for help*” (llamado de ayuda), suelo supresivo, microbiota “*core*”, microbiota “*core*” funcional y taxones raros.

Entre los miembros de la microbiota vegetal se encuentran microorganismos benéficos, neutros y patógenos. Las **Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal**, por sus siglas en inglés **PGPB (*Plant growth-promoting bacteria*)**, pueden promover el crecimiento por métodos directos e indirectos. Ya sea por la producción de fitohormonas promotoras del crecimiento como auxinas, citoquininas y giberelinas; secretando la enzima, 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasa, la cual reduce los niveles de etileno, una hormona de estrés en plantas; o por propiedades de solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno y la combinación de todos los mecanismos mencionados; las PGPB mejoran la disponibilidad de nutrientes, el crecimiento y la tolerancia al estrés (Compant *et al.*, 2019).

Las plantas son capaces de reclutar microorganismos que pueden aliviar el estrés biótico vegetal tanto arriba como debajo del suelo (Van Dam & Heil, 2011; Dicke, 2009). El fenómeno es conocido como llamado de ayuda (“*cry for help*”). En un estudio, Rasman y

colaboradores (2005) demostraron como las raíces del maíz emitían el compuesto volátil (E)- β -cariofileno, el cual atrae nematodos entomopatógenicos. Este sería para la planta un método indirecto de biocontrol que se activa ante el ataque de insectos perjudiciales al maíz.

Existen numerosos ejemplos de actividades de biocontrol contra la invasión de patógenos y enfermedades, por producción de antibióticos, enzimas líticas, compuestos volátiles inhabilitantes de patógenos entre otros (Compant *et al.*, 2019).

Chapelle y colaboradores (2016) observaron que cuando las raíces de remolacha fueron enfrentadas a hongos patógenos, algunos genes relacionados con el estrés oxidativo fueron regulados positivamente en familias bacterianas que se encontraban significativamente en mayor proporción en las raíces de plantas en suelos que resultaron supresivos ante la infección del hongo patógeno *Rhizoctonia solani*. Basados en estos hallazgos, los autores postularon que el hongo invasor activaría, directamente o vía la planta, respuestas de estrés en la microbiota de la rizósfera. Esta regulación positiva, según discuten los autores podría haber mediado respuestas antagónicas a la infección y podría ser uno de los mecanismos que median en suelos supresivos de enfermedades vegetales.

Baker y Cook (1974) definieron por primera vez el término “suelo supresivo” como “El suelo en el cual el patógeno no puede establecerse o persistir; si se establece causa poco o ningún daño; o se establece y la enfermedad dura poco tiempo y luego de la misma, ésta es menos importante aun cuando el patógeno persista en el suelo”. Por otro lado, aquellos suelos en los que la enfermedad se desarrolla normalmente son denominados no supresivos o conductivos.

Las propiedades fisicoquímicas del suelo pueden modular el comienzo y extensión de la supresión de enfermedades, pero la supresión que opera en suelos supresivos es en la mayoría de los casos de naturaleza microbiológica (Cordovez *et al.*, 2019; Expósito *et al.*, 2017)

El uso continuo de suelos agrícolas puede generar presión en patógenos y desarrollarse así suelos supresores de enfermedades, conteniendo microorganismos que median esta supresión (Compant *et al.*, 2019).

En particular, géneros como *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Burkholderia* y *Paraburkholderia* han sido reportados por su rol en la supresión de patógenos (Expósito *et al.*, 2017).

Los microorganismos que están estrechamente relacionados con ciertas especies o genotipos vegetales, independientemente del suelo y las condiciones medio ambientales en que se encuentren las plantas, son definidos como **microbiota “core”** de la planta (Compant *et al.*, 2019). Toju y colaboradores (2018) proponen una serie de criterios/características que la microbiota “core” debe reunir y por las cuales podría ser identificada y en casos ulteriores diseñada/elegida para obtener una situación particular deseada. Estos criterios son: que esta microbiota pueda reclutar otras especies microbianas que le sean funcionales/benéficas; que esta microbiota bloquee a patógenos y pestes; y que estos microorganismos se auto refuercen o se retroalimenten para persistir en la rizósfera.

Lemanceau y colaboradores (2017) definen una **microbiota “core” funcional** de la planta que comprende taxones microbianos que le son clave para su viabilidad y se establecen a través de mecanismos evolutivos de selección y enriquecimiento de taxones microbianos que contienen genes de funciones esenciales al holobionte. En otras palabras, la planta reclutaría los microorganismos en función de sus funciones benéficas, en la comunidad microbiana. Y es esta, como lo definen van der Heijden y Hartman (2016) la frontera a ser abordada por los estudios metagenómicos, conectar la composición de la microbiota con su función.

Con todo esto, es importante, además de estudiar mediante las secuencias 16S (y las ITS para hongos) a los microorganismos presentes en rizósfera, definir la microbiota “core” y con ella inferir en la medida de lo posible las funciones que desempeñan los distintos microorganismos hallados y las interacciones de estos microorganismos con la planta y entre sí.

Los **taxones raros**, pueden ser definidos con base en su baja abundancia relativa, especificidad del hábitat y distribución geográfica, concepto extendido al mundo microbiológico y desarrollado en extensión por Jousset y colaboradores (2017). Su importancia radica en que su presencia podría modular la invasión de microorganismos

perjudiciales para las plantas en comunidades microbianas del suelo, así como participar en procesos o situaciones muy particulares como recirculación de nutrientes acompañada de la degradación de contaminantes (Compant *et al.*, 2019). Numerosos estudios señalan que algunos de estos taxones raros desempeñan funciones críticas que son desproporcionadas a su abundancia (Jousset *et al.*, 2017).

En un meta-análisis reciente llevado a cabo por Perez-Jaramillo y colaboradores (2018), estos buscaron evaluar, si ese fuera el caso, cómo **la domesticación** de diversas especies de plantas afecta la composición de la microbiota bacteriana asociada a la raíz de estas plantas. Estos investigadores evaluaron 6 experimentos independientes que abordaban 9 especies de plantas cultivables y sus parientes silvestres. Se recuperaron las secuencias crudas del 16S rDNA de las comunidades microbianas de estos estudios y se les aplicó el mismo procesamiento informático con los mismos parámetros. Sin embargo, como mencionan los autores, hay que tener en cuenta que esto no elimina completamente los sesgos que los métodos de muestreo, extracción de ADN y secuenciación y los tipos de suelo, entre estos estudios, pudiendo afectar el meta-análisis. A pesar de todo esto cabe destacar que se reportan variaciones en la composición procariota de las microbiotas de raíz y rizósfera, de las plantas silvestres y sus contrapartes domesticadas, con una significativa abundancia superior de Bacteroidetes en raíces de las especies silvestres y de Actinobacterias y Proteobacterias en las especies domesticadas.

Por todo esto no pocos autores consideran a las plantas y las microbiotas asociadas como un todo cuyo estudio debe ser abordado como tal; Simon y colaboradores (2019) definen al organismo hospedero y su microbiota asociada como un **holobionte** y a sus genomas (los genes del hospedero y el metagenoma) como el **hologenoma** o genoma del holobionte.

1.4.4 PRINCIPALES PHYLA PROCARIOTAS Y EUCARIOTAS PRESENTES EN SUELOS Y RIZÓSFERAS

Las comunidades procariotas de suelo y rizósfera normalmente se encuentran dominadas por los phyla bacterianos Actinobacteria, Acidobacteria, Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes, sin importar de qué ecosistema se trate (Trivedi *et al.*, 2020; Compant *et al.*, 2019; Bulgarelli *et al.*, 2013). Además, cabe señalar que aunque en menor proporción, es frecuente la presencia de miembros del dominio Archea; principalmente del phylum

Thaumarchaeota (Fierer, 2017; Lemanceau *et al.*, 2017). Se puede decir que todos estos phyla resultan ubicuos en suelos y rizósferas.

En cuanto a los phyla eucariotas, las comunidades microbianas de suelo y rizósfera, usualmente se encuentran dominadas por Ascomycota y Basidiomycota. Esto ha sido ampliamente reportado en muchas especies vegetales (Trivedi *et al.*, 2020; Hacquard *et al.*, 2017). El phylum Glomeromycota, aunque no en todos los trabajos es reportada su presencia, resulta particularmente interesante por su capacidad de formar asociaciones endomicorrízicas, las cuales proporcionan importantes ventajas al desarrollo vegetal, principalmente para el acceso a recursos nutricionales (Terhonen *et al.*, 2019; Zeilinger *et al.*, 2016; Veneault-Fourrey *et al.*, 2013).

1.4.4.1 PROCARIOTAS

El phylum **Actinobacteria**, está compuesto principalmente de bacterias Gram-positivas que habitan en el suelo, jugando un importante papel en la agricultura y los sistemas forestales mediante la descomposición de materia orgánica (Kopecky *et al.*, 2011). Ha sido ampliamente descrito entre los phyla dominantes en suelo y rizósfera tanto en ambientes templados (Zuo *et al.*, 2021; Praeg & Illmer, 2020; Debnath *et al.*, 2016), como en ambientes tropicales (Ortiz *et al.*, 2020; Rivera-Rivera & Cuevas, 2020; Rojas-Herrera *et al.*, 2014), en donde se describió mayor abundancia en sitios con muy altas temperaturas y con baja elevación geográfica (Ortiz *et al.*, 2020; Rivera-Rivera & Cuevas, 2020; Fitzpatrick *et al.*, 2018). Además, es un phylum altamente variable y con alta capacidad para la producción de metabolitos, por lo que las Actinobacterias son muy importantes por su producción de metabolitos secundarios bioactivos, como por ejemplo antibióticos y antifúngicos (van Bergeijk *et al.*, 2020).

Acidobacteria, es un phylum cuyos miembros son fisiológicamente diversos y ubicuos, presentes especialmente en suelos (Kielak *et al.*, 2016; Janssen, 2006; Barns *et al.*, 1999). Sin embargo, pocos representantes han sido cultivados (Janssen, 2006; Hugenholtz *et al.*, 1998) por lo que se conoce poco aún de su rol en el medio ambiente (Kielak *et al.*, 2016). Se ha sugerido que sus miembros son oligótrofos, además de ser heterótrofos versátiles. Esto, sumado a la presencia de Acidobacteria en suelos alrededor del mundo, sugiere

significantes contribuciones al ciclo del carbono en el suelo (Griffiths *et al.*, 2011; Ward *et al.*, 2009).

Proteobacteria, su nombre es debido a la gran diversidad de formas de los miembros de este phylum y hace referencia al dios griego del mar Proteus, capaz de tomar muchas formas diferentes; aunque todas son Gram-negativas y algunas Gram-variables (Stackebrandt *et al.*, 1988). Proteobacteria ha sido repetidamente descrito entre los phyla dominantes tanto en suelo como en rizósfera (e.g. Terhonen *et al.*, 2019; Rojas-Herrera *et al.*, 2014; Pfeiffer *et al.*, 2013) y como parte de la microbiota core en raíz de muchas especies vegetales (Compant *et al.*, 2019). Se ha descrito que varios miembros del Phylum Proteobacteria presentarían mayor predilección por fuentes de carbono relativamente simples o de poco peso molecular (Pérez-Jaramillo *et al.*, 2018; Bulgarelli *et al.*, 2013). Y posiblemente es esta una de las razones por las que este phylum presentaría mayor abundancia relativa en la rizósfera de cultivos modernos que en la de sus parientes silvestres (Pérez-Jaramillo *et al.*, 2018).

Firmicutes, del latín: *firmus*: fuerte o firme y *cutis*: piel (en este caso pared celular), la mayoría de bacterias pertenecientes a este phylum son Gram-positivas y se caracterizan por su capacidad de formar endoesporas resistentes a la desecación y a condiciones extremas

(<https://www.oxfordreference.com/view/10.1093/oi/authority.20110803095819878>, 2021).

El phylum Firmicutes ha sido descrito tanto en endosferas como en rizósferas de muchas especies vegetales (e.g. Coleman-Derr *et al.*, 2016; Edwards *et al.*, 2015; Zarraonaindia *et al.*, 2015). Y ha sido ampliamente descrito como uno de los phyla dominantes en diversos fitobionomas, *i.e.*, compartimentos vegetales como hojas, tallo, flores, raíces, etc. (Hacquard *et al.*, 2017; Bulgarelli *et al.*, 2013). En un trabajo hecho con suelos tropicales se reportó mayor abundancia relativa de este phylum durante la temporada seca que en la temporada de lluvia (Rivera-Rivera & Cuevas, 2020). Y se ha reportado mayor abundancia relativa en rizósfera de varias especies vegetales vs suelo no rizosférico (Trivedi *et al.*, 2020; Müller *et al.*, 2016). Todo lo cual sugiere que varios de sus miembros tienen una relación cercana con las plantas.

Bacteroidetes, este phylum se compone de bacterias Gram-negativas, no formadoras de esporas y que están ampliamente distribuidas en varios ambientes. Se ha reportado que

Bacteroidetes posee atributos copiotróficos (es más abundante en ambientes ricos en nutrientes) y es relativamente más abundante en suelos con elevada disponibilidad de Carbono (Fierer *et al.*, 2007). Además, se ha descrito que presenta mayor abundancia relativa en asociación con variedades silvestre de plantas comparadas con sus parientes modernos. Se especula que esto se debe a que es metabólicamente capaz de degradar biopolímeros complejos y carbohidratos complejos como fuente de carbono (Pérez-Jaramillo *et al.*, 2018). Ya que se ha reportado que las variedades modernas de trigo exudan 3 a 4 veces más azúcares "simples" comparados con variedades silvestres bajo condiciones de estrés (Pérez-Jaramillo *et al.*, 2018).

Thaumarchaeota, phylum del dominio Archaea, aunque se ha descrito en suelo y en rizósfera de muchas especies vegetales (Trivedi *et al.*, 2020; Fonseca-García *et al.*, 2016; Hardoim *et al.*, 2015), poco se conoce de su desempeño en la naturaleza (Trivedi *et al.*, 2020; Berg *et al.*, 2017), pero se ha descrito que miembros de este phylum oxidan amonio y participan en la nitrificación de los suelos *i.e.*, oxidación del amonio a nitrito (Lemanceau *et al.*, 2017; Stein & Klotz, 2016; Legay *et al.*, 2014).

1.4.4.2 EUCARIOTAS

El phylum **Basidiomycota**, incluye hongos productores de basidios (*i.e.*, estructuras microscópicas productoras de esporas sexuales) y que poseen hifas dicarióticas septadas. Entre sus miembros se describen patógenos vegetales (*e.g.*, Jaber *et al.*, 2014) y simbiontes ectomicorrízicos y endófitos (Hui *et al.*, 2016; Hardoim *et al.*, 2015; F. Martin *et al.*, 2008). Miembros de este phylum han sido reconocidos por su gran capacidad de degradar lignina (Dimitrios *et al.*, 2012).

Ascomycota es un phylum de hongos con micelio tabicado, productores de ascosporas (estructura similar a una bolsa desarrollada en la fase sexual), pueden ser unicelulares o talófitos. Han sido aislados en una gran diversidad de lugares y ambientes. Entre sus miembros se describen patógenos vegetales (*e.g.*, Baldwin *et al.*, 2014) y simbiontes tanto ectomicorrízicos como endófitos (Terhonen *et al.*, 2019; Hardoim *et al.*, 2015; Parniske, 2008).

Se ha descrito que hongos del phylum Basidiomycota presentan mayor abundancia relativa en suelo mientras que los del phylum Ascomycota son más abundantes en compartimentos vegetales *i.e.*, rizósfera y endófitos; esto en ambientes templados (Terhonen *et al.*, 2019; Hui *et al.*, 2016). Por el contrario, se ha descrito dominio de Ascomycota en varias especies vegetales en ambientes semiáridos, y se ha propuesto que esta sea una característica diferenciadora en estos ambientes (Coleman-Derr *et al.*, 2016; Fonseca-García *et al.*, 2016; Porras-Alfaro *et al.*, 2011).

Glomeromycota es descrito como un phylum “fósil” ya que ha permanecido asociado con plantas y morfológicamente inalterado por más de 400 millones de años (Hartmann *et al.*, 2009; Parniske, 2008). Se ha señalado que cerca del 80% de las plantas en nuestro planeta hoy en día están asociadas a hongos endomicorrízicos del phylum Glomeromycota (Schlaeppli *et al.*, 2016; Zeilinger *et al.*, 2016). *Cordia dodecandra*, tal vez sea un árbol endomicorrízico (capaz de formar asociaciones tipo VAM, Vesicular Arbuscular Micorrizae) *i.e.*, las hifas fúngicas son intracelulares y la asociación simbiótica, como ha sido señalado por Huante y colaboradores (1993) para *Cordia alliodora*. Ha sido sugerido por Reuter (2005) que debido a la cercanía filogenética, muy probablemente estas especies compartirían esta característica.

1.5. METAGENÓMICA

1.5.1. GENERALIDADES

Mientras que la microbiología tradicional se sostiene en el cultivo de microorganismos, el desarrollo de potentes herramientas de secuenciación ha permitido ampliar el espectro y alcance de los análisis pudiendo abarcar a aquellos microorganismos que en condiciones de laboratorio no son, o no han podido, ser cultivados. Analizando las secuencias sobre todo de los genes 16S rRNA y 18S rRNA para procariotas y las regiones ITS para hongos, se ha observado una enorme biodiversidad que permanecía oculta mediante las técnicas microbiológicas estándar (Hugenholtz *et al.*, 1998).

El término metagenómica (“*metagenomics*” en inglés) fue utilizado por primera vez en 1998 y el mismo hace referencia a la idea de que analizar la colección de genes secuenciados de un medio ambiente podría ser análogo a un genoma único. En 2005, Chen y Pachter definieron la metagenómica como “la aplicación de técnicas genómicas modernas al estudio

de comunidades microbianas, sin la necesidad de aislamiento y cultivo en laboratorio de especies individuales de microorganismos” (Chen & Pachter, 2005).

Estos genes utilizados en la identificación de especies han sido descritos como “barcodes” haciendo alusión a un código identificador común en aquello de lo cual se quiera conocer sus características (e.g. el precio de un producto). Son secuencias de ADN estandarizadas que permite discernir la identidad de un amplio espectro de especies gracias a primers aplicables a estas especies. Y con respecto a una “base de referencia” generada por expertos, depositada en colecciones biológicas y asociada a metadatos validados por cromatogramas de secuencias disponibles en línea. Se entiende que el código de barras es óptimo cuando una secuencia es constante y única para una especie (Schoch *et al.*, 2012).

1.5.2. SECUENCIACIÓN

La principal herramienta en los estudios de metagenómica computacional es la secuenciación del ADN ambiental (*eDNA*). Dicho proceso resultaba extremadamente costoso y engorroso y por tanto inaccesible para la gran mayoría de los laboratorios interesados. Mas con el desarrollo de las secuenciaciones de nueva generación NGS (*Next Generation Sequencing*) lo que tomaba realizar 10 años (secuenciar por ejemplo el genoma humano) (Noble, 2003) hoy es posible lograrlo en menos de un día. Todo esto acompañado, además de la secuenciación propiamente más eficiente y de poderosas herramientas bioinformáticas, que hacen posible la limpieza, el ensamblado y anotación de las secuencias obtenidas (Rodríguez-Santiago & Armengol, 2012).

Miseq, de Illumina, hoy en día se ha convertido en una de las plataformas de secuenciación más ampliamente utilizadas debido principalmente a la enorme cantidad de información que es posible obtener en una corrida (hasta 15 Giga bases de información) y al muy bajo costo por base secuenciada (Ravi *et al.*, 2018).

La plataforma Miseq acoplada a una PCR previa para amplificar secciones particulares del genoma de todos y cada uno de los miembros del conjunto de microorganismos ha sido una de las principales estrategias en los estudios metagenómicos, ya que con la amplificación de secuencias del gen 16S rRNA en procariontas, así como ITSs en eucariotas,

es posible aumentar la visibilidad de aquellos microorganismos que sin la mencionada amplificación no sería posible observar.

Las secuencias 16S rRNA (el RNA ribosomal 16S es uno de los componentes de la subunidad ribosomal **procariótica** 30S, la cual se une a la secuencia Shine-Dalgarno, AGGAGG) ha sido utilizada como reloj molecular, ya que por su particular naturaleza, presenta secciones en su secuencia de distinta velocidad de cambio evolutivo, desde regiones muy conservadas a muy variables entre especies y ha facilitado relacionar filogenéticamente los microorganismos estudiados (Pace *et al.*, 1986). Hoy en día es posible definir estas secuencias utilizando la analogía con el código de barras.

El estudio del gen 16S rRNA es hoy en día el “*Gold Standar*” en los estudios microbiológicos-ecológicos, principalmente por el amplísimo banco de datos con secuencias de él con que se cuenta y a su comportamiento preciso como reloj molecular.

Por otro lado, tenemos a las ITS, (por sus siglas en inglés *Internal transcribed spacers*) que son secuencias espaciadoras situadas entre las subunidades cortas y largas de ADN ribosomal. La ITS es la región de ADN más ampliamente secuenciada en ecología molecular de hongos (Peay *et al.*, 2008) y ha sido recomendada como la secuencia “*barcode*” fúngica universal (Schoch *et al.*, 2012).

1.5.2.1. ILLUMINA

El método de secuenciación, generalmente referido como *barcoding* (código de barras) está basado en la tecnología Illumina y se puede dividir en 4 diferentes procesos; i) la preparación de las muestras; ii) la generación de *clusters*; iii) la secuenciación propiamente y; iv) el análisis de los datos. Toda la información en esta sección así como las figuras están disponibles en el curso ofrecido por la misma empresa illumina® (https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/courses/sequencing-illumina-technology-wbt-esp/story_html5.html?iframe, 2020).

La preparación de la muestra presenta variaciones con respecto al material particular de estudio y al fin del estudio. Pero esta preparación incluye amplificación por PCR de las regiones de interés (16S rDNA e ITS) en las muestras de ADN a secuenciar. Se agregan a estos fragmentos tres adaptadores, uno que se unirá a la celda de reacción, otro que hará

de código de barras para la identificación de la procedencia de la secuencia generada, es decir, para asociar la secuencia con la muestra analizada; y un último fragmento que servirá para unión de los cebadores al momento de la secuenciación. Las librerías generadas terminaran viéndose como se muestra en la figura 1.4.



Figura 1.4 Esquema de las bibliotecas de ADN al final de la preparación de las muestras. Fuente: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/courses/sequencing-illumina-technology-wbt-esp/story_html5.html?iframe

La generación de *clusters* es el proceso por el cual se generan miles copias de cada fragmento de la biblioteca generada en la preparación de las muestras ya en las celdas de reacción. Luego de este proceso las muestras están listas para la secuenciación.

La tecnología de secuenciación de illumina es conocida como SBS (por sus siglas en inglés *sequencing by synthesis*) o secuenciación por síntesis. Esto es, que se obtiene una señal cuando se agrega a la cadena de síntesis un nucleótido a la vez, esta señal es registrada y así se obtiene la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN.

En el paso final, el análisis de datos, se obtienen las secuencias propiamente de los fragmentos analizados con sus correspondientes valores de calidad para cada base y finalmente estos datos se exportan en diferentes formatos para el tratamiento e interpretación de los mismos por parte de los investigadores.

1.5.3. HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS

En el análisis de datos generados en la secuenciación de muestras medio ambientales se cuenta con la valiosa ayuda de herramientas bioinformáticas poderosas que permiten realizar diferentes análisis, como, por ejemplo, asignar OTUs (*binning*), calcular índices ecológicos, construir árboles filogenéticos entre otras. Los conjuntos de herramientas más importantes y utilizados para el análisis de secuencias metagenómicas obtenidas por *barcode* son la “*Ribosomal database project*” (RDP), MG-Rast y QIIME. Estos, además de contar con las herramientas mencionadas cuentan con tutoriales para facilitar su uso y son gratuitos, aunque dependiendo del tamaño de los archivos de datos ingresados y del tráfico en su página, los análisis pueden a ser relativamente tardados.

1.5.3.1. *Ribosomal database project* (RDP)

RDP, es una plataforma informática que cuenta con una base de datos especializada en secuencias ribosomales, servicio de análisis de datos y programas asociados (<https://rdp.cme.msu.edu/>; Maidak et al., 1997). Así también la mayoría de sus herramientas son modulares y “*open source*” lo cual permite descargarlos, modificarlos y utilizarlos en servidores propios.

1.5.3.2. QIIME

QIIME (en inglés, *Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) es una plataforma informática, también “*open source*”, que permite limpiar, analizar y procesar secuencias de ADN medio ambiental crudas. Ofrece una amplia gama de herramientas para limpieza de secuencias, asignación taxonómica, filogenética, análisis de diversidad y abundancia de especies entre otros. A igual que RDP es de uso gratuito mas no cuenta con una base de datos propia, pero existen y se actualizan constantemente bases de datos especializadas en secuencias ribosomales de arqueas, bacterias y hongos por la comunidad de usuarios (QIIME, n.d.; QIIME 2, n.d.).

JUSTIFICACIÓN

Se han reportado diferencias en las características fenológicas y morfológicas de árboles de *C. dodecandra* crecidos en dos ecosistemas distintos: (i) las zonas de selva poco perturbada del estado de Yucatán y (ii) los huertos familiares rurales, donde el impacto humano es fuerte, sobre todo porque con frecuencia se desechan desperdicios orgánicos e inorgánicos y agua residual directamente sobre el suelo, se llevan a cabo ocasionalmente prácticas de limpieza, así como de quema, pastoreo y riego.

A pesar de que no existe intencionalidad manifiesta en el riego y cuidado del ciricote en las poblaciones crecidas en huertos (i.e. limpieza de malezas de los patios y riego con agua del lavado de ropas y trastes de cocina), estas actividades parecen influenciar el desarrollo de los árboles crecidos en los huertos familiares, en comparación con aquellos crecidos en estado silvestre. Reuter y colaboradores (2008), en el contexto de un estudio de varios árboles importantes para los pobladores de Yucatán, sugieren que el riego es el factor más importante que determina las diferencias en el crecimiento y desarrollo del ciricote, y en cambio no reportan diferencias significativas relacionadas con el tipo de suelo, ni con el aporte externo de minerales como P, Mn y Zn, a pesar de ser reportados niveles bajos de estos en los suelos yucatecos estudiados.

La microbiota asociada a las plantas tiene gran influencia en el desarrollo vegetal, como se ha observado y descrito en los últimos años con el surgimiento de las poderosas herramientas metagenómicas. La microbiota de la rizósfera suele verse fuertemente afectada por las condiciones de la planta hospedera (Compant *et al.*, 2019), por lo que al ser estas distintas, es de esperar que su estructura también se modifique. Es tal la importancia de esta relación planta-microbiota que no pocos autores consideran a las plantas y sus microbiotas asociados como un todo cuyo estudio debe ser abordado como tal; Simon y colaboradores (2019) los definen como un **holobionte** y a sus genomas (los genes del hospedero y el metagenoma de la microbiota) como el **hologenoma** o genoma del holobionte.

Por lo comentado, resulta interesante conocer las posibles diferencias entre la estructura de la comunidad microbiana asociada a la rizósfera de árboles de ciricote crecidos en dos

condiciones: con riego y sin riego. Así como en las dos temporadas del año más disímiles en cuanto al agua de lluvia que cae.

El presente proyecto se enmarca en un proyecto más amplio, en el que también se analizarán los factores ecológicos y de genómica funcional, asociados al desarrollo de *C. dodecandra* en ecosistemas de selva y huerto, en el estado de Yucatán. Esto con el propósito de avanzar en el entendimiento de las características y plasticidad de los árboles multipropósito más importantes para los pobladores mayas de las zonas rurales del estado.

Los resultados de este proyecto ayudarán a avanzar en el entendimiento de la relación entre uno de los árboles multipropósito más importantes para los pobladores mayas de las zonas rurales de Yucatán y su microbiota rizosférica. Adicionalmente constituirán un marco de referencia para comparar estudios posteriores, en caso de que el proceso de domesticación de las poblaciones de huerto de *C. dodecandra* avance y con él se modifiquen sus comunidades microbianas. Cabe añadir que los análisis por *metabarcoding* de la microbiota rizosférica de árboles tropicales son aún muy escasos, al igual que los estudios que conjunten el análisis de las comunidades bacterianas y fúngicas, por lo que este proyecto también podrá ser útil en trabajos futuros para identificar si tienen características microbianas particulares.

PREGUNTAS PRINCIPALES

- I. ¿Existen diferencias en la estructura de la microbiota rizosférica de *C. dodecandra* entre (i) una población de árboles con riego y (ii) una población sin riego?
- II. ¿Hay una diferencia en la estructura de la microbiota rizosférica de los árboles de *C. dodecandra*, entre la temporada de lluvias y la de secas analizadas?

HIPÓTESIS

- I. Existen diferencias en la estructura y diversidad de la microbiota de rizósfera de árboles de ciricote con riego y sin riego.
- II. Las condiciones ambientales como son la disponibilidad de agua por la temporada de lluvias, ejercen cambios en la estructura de la microbiota de la rizósfera de árboles de *C. dodecandra* crecidos sin riego y no en la población crecida con riego.

OBJETIVO GENERAL

Analizar y comparar las comunidades bacterianas y fúngicas asociadas a la rizósfera de *Cordia dodecandra* en dos condiciones de crecimiento y en dos temporadas del año, para contribuir en el entendimiento del impacto que tienen estos factores en las comunidades microbianas de la rizósfera de los árboles.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar mediante un análisis por *metabarcoding*, la estructura, riqueza, equidad y diversidad de comunidades procariotas y microeucariotas presentes en la rizósfera de *C. dodecandra*, entre una población de árboles crecidos con riego y otra sin riego, ambas en dos temporadas del año (lluvias y secas).
- Analizar el posible papel de los OTUs más abundantes en la microbiota de la rizósfera de *C. dodecandra*, en función de los hábitats y temporadas del año.
- Analizar las características de las comunidades estudiadas en relación con las propiedades del suelo.

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 DESCRIPCIÓN DE LOS LUGARES Y TEMPORADAS DE MUESTREO

Se llevaron a cabo dos muestreos, uno en temporada de secas (abril) y otro en temporada de lluvias (octubre) del año 2020. Ambos muestreos se realizaron dentro de la demarcación del rancho “Los Juanes” (latitud 20°58′, longitud 89°38′), en la localidad de Xmatkuil, a aproximadamente 15.5 km al sur de la ciudad de Mérida en el estado de Yucatán, México figura 2.1.

Los sitios de estudio fueron dos plantaciones de ciricote, una “**sin riego**”: con mínima manipulación humana, sin limpieza de malezas y sin riego, el suelo fue clasificado como cambisol rojo (profundidad intermedia $\geq 25\text{cm}$), en donde no se apreciaron afloraciones rocosas; y “**con riego**”: árboles regados por el sistema de aspersión dos veces a la semana durante la temporada seca, sin limpieza de malezas, pero con siembra de pastos, donde eventualmente, entran borregos a pastorear, el suelo fue clasificado como leptosol negro (profundidad $< 25\text{cm}$), en donde eran observables las afloraciones rocosas en el terreno figura 2.2.

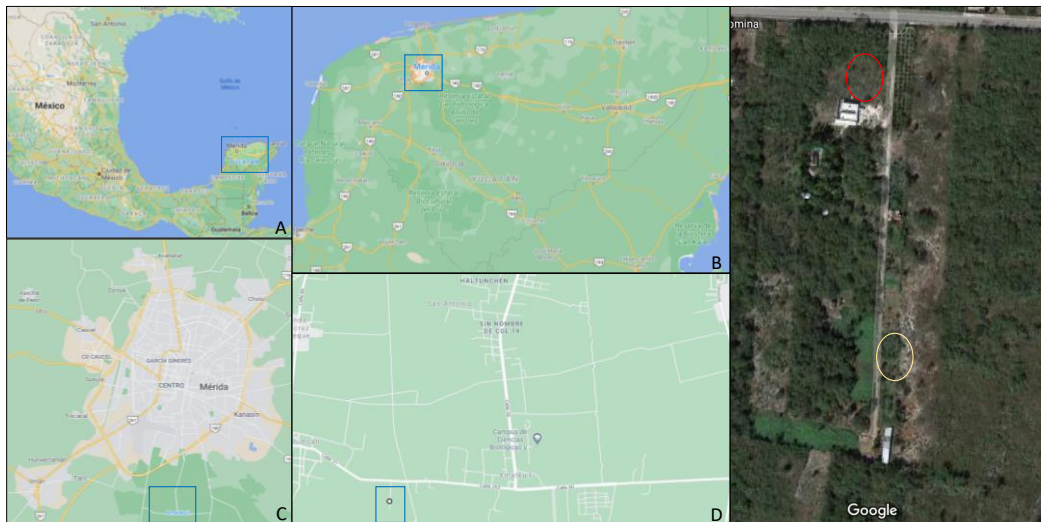


Figura 2.1 Punto de muestreo. A. México, se resalta el Estado de Yucatán. B. Estado de Yucatán, se resalta la ciudad de Mérida. C. Mérida, se resalta la comisaría de X´matkuil. D. X´matkuil, se resalta el punto de muestreo, Rancho “Los Juanes”. E. Imagen satelital del Rancho “Los Juanes”, en círculo rojo se señala el sitio de los árboles sin riego y en amarillo el sitio de los árboles con riego. Imágenes tomadas de Google maps.

Todos los árboles fueron plantados en el 2003, en el marco del proyecto de Reuter y colaboradores (2008), por lo que contaban con 17 años al momento de este estudio. Por lo que, ya habían sido previamente caracterizados en cuanto a su crecimiento y el efecto del riego, como parte de aquel estudio llevado a cabo por Reuter y colaboradores (2008).



Figura 2.2 Puntos de muestreo. A. Foto del sitio de muestreo de los árboles correspondientes al grupo “con riego”. B. Foto del sitio de muestreo de los árboles correspondientes al grupo “sin riego”.

2.2 COLECTA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SUELO Y RIZÓSFERA

Utilizando guantes, cubre bocas, gorras, así como materiales y herramientas previamente esterilizadas, se tomaron muestras de la rizósfera y el suelo circundante de árboles de ciricote crecidos “**con riego**” y “**sin riego**”

Se tomaron muestras de raíces finas de 5 árboles de ciricote, así como del suelo circundante, en cada condición.

Las muestras de suelo distaron del árbol de ciricote seleccionado no más de 1 metro de distancia y se colectaron a una profundidad de entre 5 y 10 cm. Primeramente se removió la capa superficial de materia orgánica (hojas, raíces, palos, etc.) que pudiera estar presente; se excavó con ayuda de una pala de mano y en algunas ocasiones de picos, a fin de ablandar el suelo y retirar las piedras que pudieran interferir en el muestreo.

Las muestras de raíces se tomaron cuidando que estas correspondieran efectivamente al árbol de ciricote en particular, ubicando la raíz principal, se excavó siguiendo la dirección de crecimiento hasta encontrar raíces tuvieran un diámetro menor a 5 mm, ya que estas

son las que se encuentran más activas en su interacción con la rizósfera figura 2.3 (Pregitzer, 2002).



Figura 2.3. Muestreo de raíces. Se señalan las raíces que nacen de una raíz principal proveniente del árbol de circote muestreado.

Las muestras de suelo y raíz colectadas fueron colocadas en bolsas plásticas herméticas, etiquetadas, como se observa en la figura 2.4 y transportadas al laboratorio en hieleras para mantenerlas a $\sim 4^{\circ}\text{C}$. En el laboratorio, las muestras fueron conservadas en refrigeración por no más de tres días, hasta su procesamiento.



Figura 2.4. Colecta de raíces y codificación de muestras

A fin de obtener la rizósfera, las raíces fueron sacudidas vigorosamente en el lugar de muestreo para así retirar toda la tierra que no estuviera firmemente adherida a ellas (y que por ello podría no tratarse de rizósfera). En el laboratorio, las raíces fueron cepilladas con cepillos nuevos a fin de retirar de la superficie de las raíces la rizósfera figura 2.5. Únicamente fue colectada la tierra que se desprendió del cepillado de las raíces colectadas, además, el suelo que quedó en las bolsas, una vez retiradas las raíces, fue también descartado.



Figura 2.5. Obtención de suelo rizosférico mediante cepillado de raíces.

Se preparó una muestra compuesta por cada condición con las 5 réplicas. Se obtuvieron muestras compuestas de suelo y de rizósfera, correspondientes a cada una de las cuatro condiciones a estudiar: con riego-temporada seca, sin riego-temporada seca, con riego-temporada de lluvias y sin riego-temporada de lluvias. Para la preparación de la muestra compuesta de suelo, se tomaron aproximadamente dos gramos de cada una de las cinco réplicas y se mezclaron. En el caso de las muestras compuestas de rizósfera, se mezcló la totalidad de la rizósfera obtenida en el cepillado de raíces de los cinco árboles muestreados de cada condición.

2.3 ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES DE LAS MUESTRAS DE SUELO

El análisis de las propiedades de las muestras de suelo se llevó a cabo en el “Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas y Agua (LASPA)” del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CCBA) de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY).

En estas muestras se midieron: concentración molar de los cationes, Sodio (Na cmol⁺/Kg), Potasio (K cmol⁺/Kg) y Calcio (Ca cmol⁺/Kg) por el método de la llama (Helmke & Sparks, 1996); conductividad eléctrica (CE dS/cm) por medición directa del sobrenadante de una solución suelo-agua 1:5 (Rhoades, 1996); porcentaje de carbonatos (Carbonatos %) por el método de disolución en ácido acético (Loeppert & Suarez, 1996); carbono orgánico total (C %) por el método de Walkley y Black (Nelson & Sommers, 1996); Nitrógeno total (N_{total} %) por el método de Kjendhal (Bremner & Sparks, 1996); Fósforo (P, mg/Kg) por el método de Olsen (Kuo, 1996); acidez (pH) por medición directa, con un potenciómetro, de la muestra en agua 1:2 (Thomas, 1996); potencial REDOX (mV) por medición directa, con un electrodo de calomelano, de la muestra en agua 1:2 (Patrick *et al.*, 1996); finalmente, el análisis de textura o análisis del tamaño de las partículas por el método Bouyocous o del densímetro (Gee & Bauder, 1986). Todas las metodologías utilizadas se detallan en el Manual de técnicas del Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas y Agua (LASPA) (ver anexo 1).

2.4 EXTRACCIÓN, CONTROL DE CALIDAD Y CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN

El ADN metagenómico de las muestras de suelo y rizósfera fue aislado a partir de 250 mg de la muestra correspondiente con un paso previo de hidratación con 400 µl de buffer TE (Tris-HCl, EDTA) pH 8. Una vez hidratadas, las muestras fueron centrifugadas a 10000rpm por 30 segundos y el sobrenadante fue removido y descartado. Utilizando el *PowerSoil™ DNA isolation kit* (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA) se procedió a extraer el ADN de las muestras de suelo siguiendo las indicaciones del fabricante; el paso final de elución del ADN se llevó a cabo con 100 µL de agua destilada estéril, incluida en el kit.

La concentración aproximada del ADN, así como su calidad fueron analizados por comparación de la intensidad de bandas en un gel de agarosa al 1 %, utilizando el marcador

de masa y peso molecular *Thermo Scientific™ O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus, ready-to-use* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA).

El gel de agarosa se preparó con 30 ml de buffer TAE 1x, 0.3 g de agarosa y 1 µl de Bromuro de Etidio. En cada pocillo se cargaron 10 µl de muestra y 5 µl del colorante de carga 6X *Thermo Scientific TriTrack DNA Loading Dye* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). Los geles se corrieron a 90 V por 40 minutos y fueron revelados en un transiluminador UV.

2.5 SECUENCIACIÓN DE AMPLICONES, TRATAMIENTO INFORMÁTICO, ÍNDICES ECOLÓGICOS Y CURVAS DE RAREFACCIÓN Y ASIGNACIÓN TAXONÓMICA

2.5.1 Secuenciación de amplicones

Se enviaron a secuenciar aproximadamente 200 ng del ADN metagenómico de cada una de las muestras compuestas. Los IDs se detallan en el cuadro 2.1.

Cuadro 2.1 Orden, codificación y leyenda de las librerías de trabajo		
#	Código	Nombre
1	SueCRSec-B	Bacteria Suelo Con Riego Temporada Seca
2	SueSRSec-B	Bacteria Suelo Sin Riego Temporada Seca
3	RizCRSec-B	Bacteria Rizósfera Con Riego Temporada Seca
4	RizSRSec-B	Bacteria Rizósfera Sin Riego Temporada Seca
5	SueCRLlu-B	Bacteria Suelo Con Riego Temporada Lluvia
6	SueSRLlu-B	Bacteria Suelo Sin Riego Temporada Lluvia
7	RizCRLlu-B	Bacteria Rizósfera Con Riego Temporada Lluvia
8	RizSRLlu-B	Bacteria Rizósfera Sin Riego Temporada Lluvia
9	SueCRSec-F	Hongo Suelo Con Riego Temporada Seca
10	SueSRSec-F	Hongo Suelo Sin Riego Temporada Seca
11	RizCRSec-F	Hongo Rizósfera Con Riego Temporada Seca
12	RizSRSec-F	Hongo Rizósfera Sin Riego Temporada Seca
13	SueCRLlu-F	Hongo Suelo Con Riego Temporada Lluvia
14	SueSRLlu-F	Hongo Suelo Sin Riego Temporada Lluvia
15	RizCRLlu-F	Hongo Rizósfera Con Riego Temporada Lluvia
16	RizSRLlu-F	Hongo Rizósfera Sin Riego Temporada Lluvia

La secuenciación de las muestras fue llevada a cabo en el laboratorio *RTL Genomics a division of Research and Testing Laboratories* ubicado en Lubbock, Texas, Estados Unidos de América. La secuenciación se llevó a cabo en la plataforma Illumina MiSeq *Pair End*-300pb. Las regiones amplificadas fueron; para procariotas (muestras identificadas por "-B" de bacteria), la región V3 y V4 del gen 16SrDNA, mediante el uso de los *primers* 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) y 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT); y para

eucariotas (muestras identificadas por “-F” de Fungi), la región ITS 2, mediante los *primers* ITS3F (GCATCGATGAAGAACGCAGC) y ITS4R (TCCTCCGCTTATTGATATGC).

2.5.2 Tratamiento informático

Las secuencias procarióticas (terminación -B) y eucarióticas (terminación -F) fueron analizadas bioinformáticamente por separado.

2.5.2.1 Procariotas

Entre los servicios ofrecidos, el laboratorio RTL facilita secuencias pre-procesadas *i.e.* retiradas las porciones de mala calidad y emparejados los archivos *forward* con su correspondiente *reverse* y finalmente retiradas las quimeras que se hubieran formado en el proceso de secuenciación. Fue éste el punto de partida del presente análisis para el grupo de procariotas.

Las secuencias procarióticas fueron demultiplexadas de acuerdo a los códigos de barra que identificaban cada muestra y seguidamente fueron removidos los códigos de barra utilizados en el servidor público Galaxy (<https://usegalaxy.eu/>) mediante la herramienta *split_libraries.py*, Galaxy Versión 1.9.1.0, de la *pipeline* QIIME1 (Caporaso *et al.*, 2010).

Posteriormente, a fin de facilitar la manipulación de las secuencias, estas fueron dereplicadas (proceso que consiste en agrupar todas las secuencias idénticas en una a fin de reducir el costo computacional de su manipulación) y clusterizadas (Las secuencias son agrupadas de acuerdo a un mínimo de similitud a fin de obtener los “OTUs”) por un lado al 97% y por otro al 80%, mediante las herramientas *vsearch dereplicate-sequences* y *vsearch cluster-features-closed-reference* del *pipeline* QIIME2 (qiime2-2019.10), e instaladas en el sistema de súper cómputo “Hobon” del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) (Bolyen *et al.*, 2019; Rognes *et al.*, 2016).

2.5.2.2 Eucariotas

En las muestras del grupo de eucariotas se obtuvieron porcentajes muy bajos de retención de secuencias con el procesamiento para procariotas (ver anexo 2). Esto podría deberse a la mayor retención de secuencias en el paso de detección y remoción de secuencias por errores de amplificación o formación de quimeras, ya que la región de los ITSs se

caracteriza por su gran variabilidad en las secuencias y en la longitud (y variaciones en la longitud) de homopolímeros presentes en la región amplificada, que podrían llevar a estos errores de secuenciación o de interpretación como errores por los softwares encargados de ello (Tedersoo *et al.*, 2018).

Por lo mencionado, las bibliotecas de eucariotas fueron manipuladas por un camino alternativo. En primer lugar, se evaluó la calidad de los archivos crudos usando el reporte que arroja QIIME2 (qiime2-2019.10) al importar las secuencias crudas (Bolyen *et al.*, 2019). Se determinaron los puntos de corte en las posiciones 289 para los *reads forward* y 219 para los *reverse* (con el objetivo que la calidad de Phred de las bases fuera superior a 25) (ver anexo 3).

De los *reads* crudos, fueron retiradas las porciones de mala calidad (Phred ≤ 25) y los *primers*; además fueron emparejados los archivos *forward* con sus correspondientes *reverse* y retiradas las quimeras. Todo ello con el programa DADA2 de la plataforma QIIME 2 (qiime2-2019.10) instalada en el sistema de súper cómputo “Hobon” del CICY (Bolyen *et al.*, 2019; Callahan *et al.*, 2016).

2.5.3 Índices ecológicos y curvas de rarefacción

Se calcularon los índices de riqueza (Chao_1), similitud (Pielou) y diversidad (Shannon H') para cada comunidad microbiana, con la herramienta *qiime diversity alpha* (Bolyen *et al.*, 2019; McDonald *et al.*, 2012). Las curvas de rarefacción se construyeron con la herramienta *qiime diversity alpha-rarefaction* (Kato & Standley, 2013; Price *et al.*, 2010).

2.5.4 Asignación taxonómica

Seguidamente, se realizó la asignación taxonómica de las secuencias con la base de datos SILVA (*SILVA ribosomal RNA gene database project*) en su versión 132, generada por miembros de la comunidad de usuarios de Qiime2, la cual es la más utilizada y es regularmente actualizada (Quast *et al.*, 2013).

Para eucariotas se utilizó el clasificador UNITE (*UNITE QIIME release for Fungi*) en su versión 8.2 20-02-2020 (Abarenkov *et al.*, 2020).

Esta asignación taxonómica fue visualizable en una tabla dinámica con la herramienta *qiime taxa barplot*, la cual fue descargada en formato “csv” y convertida en planilla Excel para facilitar su manipulación e interpretación (Bokulich *et al.*, 2018; Pedregosa *et al.*, 2011; McKinney, 2010).

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES DE LAS MUESTRAS DE SUELO

En el cuadro 3.1 se resumen los resultados de las propiedades de las muestras de suelo analizadas. Los análisis se realizaron en 5 muestras de suelo individuales y los valores obtenidos fueron promediados según el grupo correspondiente. Las tablas de datos completas (valores individuales de cada muestra, sus promedios y desviación estándar se detallan en la sección de anexo 4.

Cuadro 3.1 Propiedades de las muestras de suelo asociadas a dos plantaciones de *Cordia dodecandra* (con riego y sin riego) en dos temporadas del año (secas y lluvias).

Muestra	Sin Riego		Con Riego	
	Seca	Lluvia	Seca	Lluvia
Na (cmol ⁺ /Kg)	0.03±0.01	0.03±0.01	0.12±0.02	0.04±0.02
K (cmol ⁺ /Kg)	0.11±0.01	0.11±0.03	0.17±0.06	0.14±0.04
CE (dS/m)	0.17±0.03	0.19±0.11	0.49±0.18	0.35±0.15
Ca (cmol ⁺ /Kg)	10.7±1.1	11.2±2.5	17.3±5.9	14.0±3.6
Carbonatos (%)	2.8±0.3	3.0±0.4	13.7±9.3	11.8±7.2
C (%)	6.2±1.5	6.8±2.2	17.6±6.5	15.6±5.1
Ntotal (%)	0.7±0.13	0.7±0.19	1.7±0.67	1.6±0.66
Pi (mg/Kg)	0.0±0.0	0.0±0.0	154.3±257.8	217.3±281.1
pH	7.2±0.08	7.3±0.07	7.5±0.06	7.5±0.13
REDOX (mV)	100.6±48.3	84.6±39.0	69.3±13.9	63.0±10.0
Arcillas (%)	39.9±14.9	29.1±13.3	22.3±3.2	37.9±9.5
Limos (%)	26.8±8.2	19.2±7.4	12.4±2.2	19.2±3.9
Arenas (%)	33.3±23.0	51.7±20.6	65.3±5.0	42.9±13.0

Los valores son el promedio de cinco muestras analizadas independientemente.

Abreviaturas: cmol⁺/Kg, centimoles del catión por kilogramo de muestra; C, Carbono orgánico total; Na, Sodio⁺; K, Potasio⁺; Ca, Calcio; Ntotal, Nitrógeno total; Pi, Fósforo inorgánico.

Como se observa en el cuadro 3.1, dentro de un mismo ecosistema, los valores de los parámetros evaluados no presentaron diferencias significativas entre la época de secas y la de lluvias. Lo cual sugiere que la temporada de muestreo tiene poco impacto en las propiedades del suelo. Sin embargo, cuando se comparan los valores de las muestras con riego vs sin riego, se pueden apreciar diferencias significativas en varios de los parámetros.

Sobre la concentración de iones, todos los grupos presentaron niveles muy bajos de **sodio** (según la norma, Muy bajo ≤ 0.15 cmol⁺/Kg) y de **potasio** (según la norma, Muy bajo < 0.2 cmol⁺/Kg) (Bernier, 1999; NOM-021-SEMARNAT, 2002). Sin embargo, cabe hacer notar que la muestra CRSec presentó aproximadamente tres veces más sodio que las demás, aunque todos los valores se encuentran por debajo de los límites previamente reportados en suelo yucatecos (Rojas-Herrera *et al.*, 2014).

En cuanto a la **conductividad (CE)** de las muestras, todas resultaron con niveles bajos (según la norma, Bajo entre 0.1 y 0.5 dS/m) (NOM-021-SEMARNAT, 2002). Sin embargo, las del grupo con riego mostraron una CE aproximadamente dos veces mayor que las de sin riego. Esto probablemente es efecto de la mayor concentración de iones de sodio y potasio, presente en las muestras de suelo con riego.

En las cuatro muestras de suelo se encontraron altos niveles de **calcio** (según la norma, Alto > 10.0 cmol⁺/Kg) (Bernier, 1999; NOM-021-SEMARNAT, 2002). Los suelos sin riego, por su contenido en **carbonatos** resultaron moderadamente calcáreos (según la norma, Moderadamente calcáreo entre 2 y 10%), mientras que aquellos con riego contuvieron aproximadamente cuatro veces más carbonatos que aquellos sin riego, resultando fuertemente calcáreos (según la norma, Fuertemente calcáreo entre 10 y 25%) (FAO, 2009; NOM-021-SEMARNAT, 2002). Esto podría deberse a la mayor presencia de afloraciones rocosas en el grupo con riego (en suelos yucatecos, generalmente como carbonato de calcio, CaCO₃) como se aprecia en las imágenes de los sitios de muestreo (figura 2.2-A).

Todas las muestras de suelo presentaron un porcentaje de **carbono orgánico total** muy alto (según la norma, Muy alto > 6.0 %) (NOM-021-SEMARNAT, 2002). Análogamente, todas las muestras de suelo presentaron porcentajes de **nitrógeno total** muy altos (según la norma, Muy alto $> 0.25\%$) (NOM-021-SEMARNAT, 2002). Sin embargo, en las muestras con riego, en ambas temporadas, tanto los niveles de carbono orgánico total como de nitrógeno total, resultaron ser más del doble que aquellos de las muestras sin riego.

No se detectó **fósforo inorgánico** en las muestras de suelo sin riego, a diferencia del grupo con riego, en donde se encontraron niveles altos (según la norma, Alto > 11.0 mg/Kg) (NOM-021-SEMARNAT, 2002).

En la medida del **pH**, ambas muestras del grupos con riego resultaron ligeramente más alcalinos que las muestras sin riego, catalogándose los primeros como neutros (según la norma, Neutro entre 6.6 y 7.3) y los segundos como medianamente alcalinos (según la norma, Medianamente alcalino entre 7.4 y 8.5) (NOM-021-SEMARNAT, 2002).

La medida **REDOX** permite estimar el nivel de aireación de los suelos, así como qué especies químicas dominan en un ambiente. Ambos grupos resultaron ser suelos anaerobios (REDOX reducido) (según la norma, Reducido entre +50 y +100 mV), ambiente en el que dominan el Mn^{+2} y el N_2 ambiental (Patrick *et al.*, 1996).

Finalmente, en cuanto al análisis de texturas, según el triángulo de texturas de suelos (USDA, 1999), los suelos sin riego se clasificaron como franco-arcilloso en temporada seca y franco-areno-arcilloso en temporada de lluvia. Los suelos con riego por otro lado, se clasificaron como franco-areno-arcilloso en temporada seca y franco-arcilloso en temporada de lluvia. Donde el término franco hace referencia a un equilibrio entre las tres fracciones que conforman los suelos (arcilla, limo y arena).

3.2 CONTROL DE CALIDAD DE LA EXTRACCIÓN DEL ADN METAGENÓMICO

En el gel se observan las bandas del ADN metagenómico extraído de las muestras compuestas de suelo y rizósfera. Se evaluó cualitativamente la integridad de las bandas en los carriles 1 al 8, así como la presencia o ausencia de ADN retenido en el pocillo de carga y finalmente, por comparación de las intensidades de las bandas con el marcador de peso molecular, la concentración aproximada del ADN extraído figura 3.1.

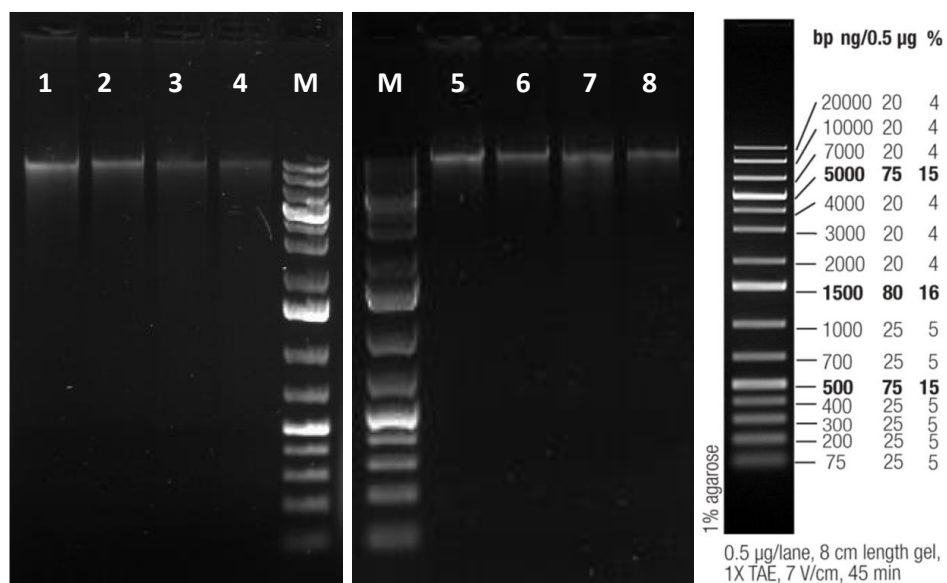


Figura 3.1. Gel de agarosa al 1 % de la extracción de ADN de las muestras de las muestras compuestas de suelo y rizósfera. Se observan las muestras: SueCRSec, 1; SueSRSec, 2; RizCRSec, 3; RizSRSec, 4; SueCRLlu, 5; SueSRLlu, 6; RizCRLlu, 7; RizSRLlu, 8; M: marcador *O'GeneRuler 1kb DNA Ladder*. Abreviaturas: Sue, Suelo; Riz, Rizósfera; CR, con riego; SR, sin riego; Llu, Temporada de lluvia; Sec, Temporada seca.

En la inspección visual del gel, se apreciaron bandas con una integridad aproximada mayor al 90% (de un tamaño aproximado de 20 kb), ya que no se observó material genómico adicional de las bandas principales, lo cual denotaría ADN degradado. No se observó material metagenómico retenido en los pocillos de carga, lo cual sería un signo de la presencia de impurezas en el ADN extraído. En cuanto a la concentración del ADN, se determinó que la intensidad de las bandas de ADN metagenómico fue similar a las bandas de entre 400 y 75 pb del marcador de masas y pesos moleculares, la intensidad corresponde a 25 ng de ADN, por lo que considerando que se cargaron 10 μ l (de los 100 μ l finales en los que se suspendió cada muestra), la concentración aproximada fue de 2.5 ng de ADN metagenómico por μ l de solución.

En el cuadro 3.2 se detalla la concentración estimada del ADN metagenómico obtenido en la extracción de las muestras de suelo y rizósfera

Cuadro 3.2 Concentración del ADN metagenómico extraído de las muestras compuestas de suelo y rizósfera de los grupos con riego y sin riego, en temporada seca y de lluvias.

Código	Muestra*	Condición de crecimiento	Temporada	Cantidad de muestra (g)	Concentración de ADN (ng/ μ l)+
--------	----------	--------------------------	-----------	-------------------------	-------------------------------------

1	Suelo	Con riego	Seca	0.2513	2.5
2	Suelo	Sin riego	Seca	0.2501	2.5
3	Rizósfera	Con riego	Seca	0.2605	2.5
4	Rizósfera	Sin riego	Seca	0.2662	2.5
5	Suelo	Con riego	Lluvia	0.2593	2.5
6	Suelo	Sin riego	Lluvia	0.2561	2.5
7	Rizósfera	Con riego	Lluvia	0.2641	2.5
8	Rizósfera	Sin riego	Lluvia	0.2607	2.5

*Muestra compuesta, +concentración aproximada

Para la secuenciación metagenómica se requiere una cantidad mínima de 190 ng de ADN por lo que, en todos los casos se obtuvo el ADN necesario, con una sola extracción.

3.3 TRATAMIENTO BIOINFORMÁTICO

Como resultado de la secuenciación metagenómica, se obtuvieron 32 archivos *raw* (crudos) en formato “fastq”, 16 para procariotas y 16 para eucariotas. En cada caso se tuvieron archivos 8 F (*forward*) y 8 R (*reverse*).

En estos archivos crudos se obtuvo un total de 458,607 lecturas crudas, de las cuales, 220,420 (con una longitud promedio de 260.0±1.9 pb) correspondieron a procariotas y 238,187 (con una longitud promedio de 325.9±35.2 pb) a eucariotas.

3.3.1 Procariotas

Cuadro 3.3 Resumen del tratamiento de las secuencias de procariotas

ID Muestra	#lecturas crudas	#Secuencias filtradas	Final (%)
SueCRSec-B	31,333	19,528	62.3
SueSRSec-B	25,710	16,199	63.0
RizCRSec-B	27,469	18,908	68.8
RizSRSec-B	34,745	23,037	66.3
SueCRLlu-B	27,780	18,023	64.9
SueSRLlu-B	14,799	8,867	59.9
RizCRLlu-B	24,400	16,290	66.8
RizSRLlu-B	34,184	26,150	76.5

Abreviaturas: ID Muestra, identificador de la muestra; #lecturas crudas, número de lecturas crudas recibidas; #Secuencias filtradas, número de secuencias después de la limpieza y de eliminar las secuencias correspondientes a cloroplastos y mitocondrias; Final (%), porcentaje de las secuencias crudas originales que pasaron todos los pasos del tratamiento. Sue, Suelo; Riz, Rizósfera; CR, con riego; SR, sin riego; Sec, Temporada seca; Llu, Temporada de lluvia; B, Procariotas.

En el cuadro 3.3 se resumen los resultados del tratamiento bioinformático de las secuencias de amplicones del gen 16S, desde el número de lecturas crudas recibidas en cada caso (#lecturas crudas), hasta el número de secuencias que quedaron después de la limpieza realizada por el laboratorio RTL, incluyendo el filtrado de mitocondrias y cloroplastos (#Secuencias filtradas) y el porcentaje de retención que esto representó (Final).

El porcentaje de secuencias que pasaron todos los pasos del procesamiento (Final), corresponde a los *reads* crudos útiles para el análisis. Como se puede apreciar en la tabla 3.3, en todos los casos, más de la mitad de las secuencias pasaron el control de calidad y el filtrado. El intervalo estuvo entre 59.9% (SueSRLlu-B) y el 76.5% (RizSRLlu-B). El número mínimo de secuencias por muestra que se usó para los análisis subsecuentes fue de 8,867 (SueSRLlu-B).

3.3.1.1 Curvas de rarefacción e índices ecológicos

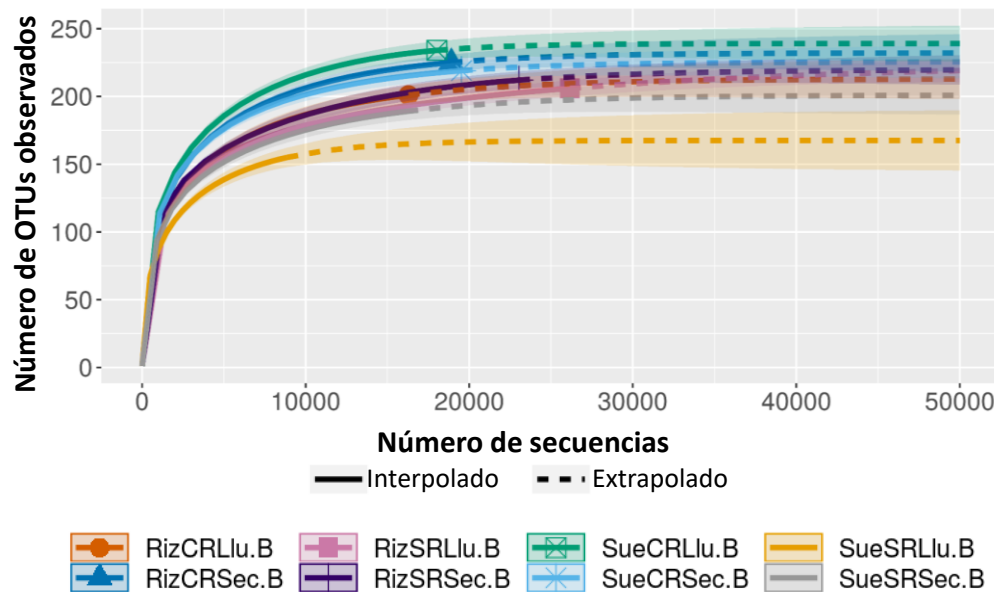


Figura 3.2 Curva de rarefacción de OTUs a nivel de orden de las muestras de procariotas. Abreviaturas: Riz, Rizósfera; Sue, Suelo; CR, con riego; SR, sin riego; Sec, Temporada seca; Llu, Temporada de lluvia; B, Procariotas.

En las muestras de procariotas, en la curva de rarefacción de OTUs a nivel de orden fue posible estimar la relación entre la profundidad de secuenciación realizada y el número de OTUs encontrados. Como se puede observar en la figura 3.2, en todas las muestras la pendiente de la curva mostró disminución; lo cual, aunado a la diferencia entre los OTUs a nivel de orden predicho por el índice de Chao 1 y los OTUs observados, al mismo nivel,

estiman que se pudo capturar más del 90% de los OTUs a nivel de orden presentes en todas las muestras.

Del proceso de clusterización (por un lado, a 75% y por otro, a 85 % de similitud), se calculó el número de OTUs observado y para cada muestra se estimó la riqueza (Índice de Chao1), la equidad (Índice de Pielou) y la diversidad (Índice de Shannon) cuadro 3.4.

Cuadro 3.4 #OTUs encontrados e índices ecológicos asociados a las muestras de procariotas								
Muestra	Phylum				Orden			
	#OTUs	Riqueza	Equidad	Diversidad	#OTUs	Riqueza	Equidad	Diversidad
SueCRSec-B	23	24±2.5	0.61	2.8	219	224.9±9.9	0.69	5.3
SueSRSec-B	20	20±1.7	0.62	2.7	189	200.0±12.4	0.66	5.0
RizCRSec-B	27	27.3±2.5	0.62	3.0	225	231.6±11.0	0.71	5.5
RizSRSec-B	25	25±2.0	0.61	2.8	212	219.2±9.6	0.70	5.4
SueCRLlu-B	24	24.5±2.8	0.62	2.8	234	238.6±9.1	0.70	5.5
SueSRLlu-B	17	17±0.3	0.67	2.7	155	166.5±13.2	0.66	4.8
RizCRLlu-B	23	23±2.1	0.62	2.8	201	212.0±11.2	0.64	4.9
RizSRLlu-B	24	24.5±1.2	0.65	3.0	206	222.7±8.8	0.69	5.3

Los índices ecológicos fueron calculados mediante los estimadores Chao 1 para la riqueza; Pielou para la equidad y Shannon (H') para la diversidad.

Abreviaturas: Sue, Suelo; Riz, Rizósfera; CR, con riego; SR, sin riego; Sec, Temporada seca; Llu, Temporada de lluvia; B, Procariotas..

En la Tabla 3.4 se observa que tanto a nivel de phylum como de orden, no se apreció un patrón de comportamiento entre las muestras de suelo vs rizósfera, con riego vs sin riego o temporada seca vs temporada de lluvia. Tanto la riqueza, la equidad y la diversidad de las muestras resultaron muy similares entre sí.

3.3.1.2 Asignación taxonómica y estructura de las comunidades

A fin de conocer la estructura de la microbiota asociada a las muestras estudiadas, se construyó una gráfica de abundancias relativas de OTUs procariotas, a nivel de phylum y de orden. Para facilitar su observación e interpretación, aquellos OTUs con abundancia relativa menor a 1% fueron agrupados y representados como "OTROS".

3.3.1.2.1 Análisis a nivel de *Phylum*

En la figura 3.3 se representan aquellos phyla (OTUs al 75% de similitud) con abundancia relativa superior a 1% al interior de cada muestra. Los porcentajes de cada OTU por muestra se muestran en anexo 5.

Como se puede observar en la figura 3.4, en las ocho muestras se identificaron los mismos 11 Phyla, aunque no en todas en proporción relativa mayor al 1%. Lo primero que llama la

atención es que no hubo diferencias evidentes en la estructura de la comunidad procariota entre las ocho muestras.

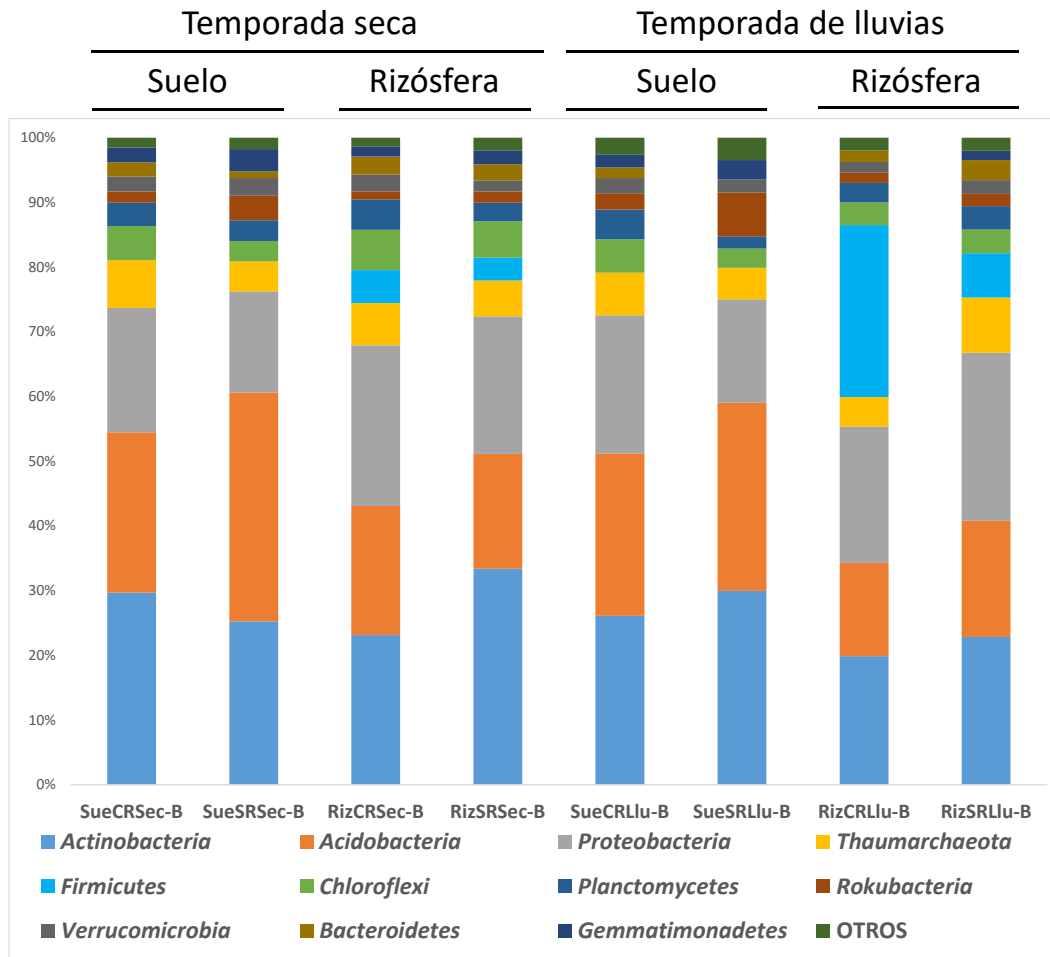


Figura 3.3. OTUs procariotas a nivel de *Phylum*. Aquellos OTUs con abundancia relativa menor a 1% se agrupan en OTROS.

Abreviaturas: Sue, Suelo; Riz, Rizósfera; CR, con riego; SR, sin riego; Sec, Temporada seca; Llu, Temporada de lluvia; B, Procariotas.

Los tres *phyla* más abundantes en las todas las muestras fueron Actinobacteria, Acidobacteria y Proteobacteria; con excepción de RizCRLlu-B, en donde Firmicutes fue el más abundante; aunque ninguno de estos, dominó en todas las muestras por igual. Estos 3 OTUs representaron más del 50% de la abundancia relativa en todas las muestras.

Cabe resaltar que se identificó la presencia del *phylum* Thaumarchaeota (representada por la banda amarilla), Thaumarchaeota pertenece al dominio *Archaea* y fue el 4to *phylum* en abundancia en todas las muestras.

No se apreció **algún patrón** distintivo del nicho (rizósfera vs suelo), ni de la condición de crecimiento (con riego vs sin riego), ni de la temporada (secas vs lluvias) en las abundancias relativas de los phyla Actinobacteria, Proteobacteria, Thaumarchaeota, Planctomycetes, Verrucomicrobia y Bacteroidetes.

Uno de los resultados más destacables fue que tanto el phylum Acidobacteria, como Firmicutes, presentaron un claro patrón distintivo entre las muestras de suelo y las de rizósfera. Acidobacteria, estuvo presente en mayor abundancia relativa en las muestras de **suelo** (entre 24.8% y 35.4%) en comparación con la **rizósfera** (entre 14.4% y 20.0%). Y Firmicutes (representados por la banda celeste clara ubicada entre las bandas amarilla y verde) por el contrario, presentó mucho mayor abundancia en las muestras de **rizósfera** (entre 3.5% y 26.6%), con respecto al contenido en **suelo** (entre 0.25% y 0.94%). Aunque la comparación de la microbiota entre las muestras de suelo y rizósfera no constituyó un objetivo planteado en este trabajo, el hecho de encontrar un patrón distintivo entre ellas no sólo es un “control técnico” que demuestra que la rizósfera de los árboles de ciricote fue correctamente separada del suelo circundante, sino que constituye un resultado interesante.

Además, es posible apreciar que, tanto en la condición con riego como sin riego, en **temporada seca** se registró una menor abundancia relativa de Firmicutes con respecto a la misma muestra en **temporada de lluvia**.

Por el contrario de Firmicutes, el Phylum Chloroflexi (banda de color verde) presentó mayor abundancia relativa en las muestras de **temporada seca** con respecto a aquellas de **temporada de lluvia**, particularmente en las muestras de **rizósfera** en las que es casi del doble, en RizCR 6.2% y 3.5 y en RizSR 5.6% y 3.7% (temporada seca y temporada de lluvia respectivamente).

Por otra parte, los Phylum Rokubacteria y Gemmatimonadetes presenta mayor abundancia relativa en las muestras **sin riego** con respecto a aquellas **con riego**.

En el cuadro 3.5 se resumen las principales diferencias encontradas en procariontes a nivel de Phylum:

Cuadro 3.5. Resumen de la variación de la abundancia relativa de los phyla procariotas con abundancia relativa mayor a 1% al interior de las muestras

Phylum	Suelo	Rizósfera	Con riego	Sin riego	T. Seca	T. de Lluvia
Actinobacteria						
Acidobacteria	+					
Proteobacteria						
Thaumarchaeota						
Firmicutes		+				+
Chloroflexi					+	
Planctomycetes						
Rokubacteria				+		
Verrucomicrobia						
Bacteroidetes						
Gemmatimonadetes				+		

Con fondo blanco y letras en gris se representan aquellos taxa que no presentaron patrón alguno de comportamiento. Con fondo gris y letras negras se representan los taxa que si presentaron un patrón de comportamiento. El signo + representa el grupo de muestra en el que existe mayor abundancia relativa de ese OTU en particular suelo vs rizósfera, con riego vs sin riego, y temporada. seca vs temporada de lluvias.

De estos 11 fila, 5 presentaron un patrón reconocible de comportamiento.

En el análisis de las abundancias relativas de OTUs a nivel de phylum, se apreciaron diferencias entre las muestras en todas las condiciones contrastadas (suelo vs rizósfera, con riego vs sin riego y temporadas seca vs de lluvia), como se aprecia en el cuadro resumen 3.7. Cabe destacar la mayor abundancia relativa del phylum Firmicutes en las muestras de rizósfera y en aquellas de temporada de lluvia.

3.3.1.2.1.1 Análisis de similitud

A fin de cuantificar la diferencia de abundancia relativa de estos phyla, se construyó un mapa de calor generado a partir de la estimación de similitud del coeficiente de Jaccard de las abundancias relativas figura 3.4.

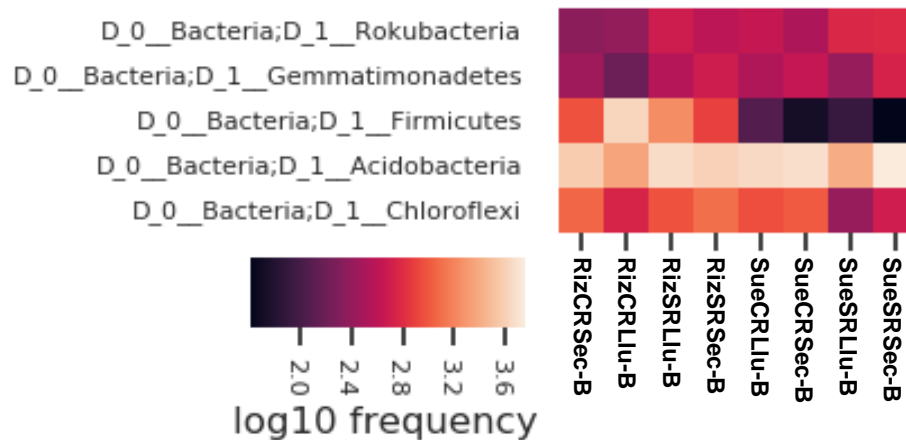


Figura 3.4 Mapa de calor de la estimación del coeficiente de similitud de Jaccard de los phyla procariontes en los que se apreció un patrón de comportamiento en las abundancias relativas.
Abreviaturas: Riz, Rizósfera; Sue, Suelo; CR, con riego; SR, sin riego; Sec, Temporada seca; Llu, Temporada de lluvia; B, Procariotas.

Cada phylum presentó ligeras diferencias entre las muestras, aunque la principal diferencia fue observada en el phylum Firmicutes entre las muestras de suelo vs rizósfera.

3.3.1.2.2 Análisis a nivel de Orden

En la figura 3.5, se representan los OTUs a nivel de orden (agrupados al 85% de similitud) con abundancia relativa superior al 1% en por lo menos una muestra. Los porcentajes de cada OTU en cada muestra se muestran en anexo 6.

Se identificaron los mismos 29 OTUs con abundancia relativa superior a 1% en todas las ocho muestras. De estos, 28 se pudieron clasificar hasta nivel de orden y solamente uno hasta nivel de clase.

Entre 22.4% y 30.8% de la abundancia relativa de cada muestra correspondió a OTUs con abundancia relativa menor al 1% (agrupados en "OTROS").

Al igual que a nivel de Phylum, lo primero que se puede apreciar es que la estructura de todas las comunidades fue similar entre sí, con excepción de RizCRLlu-B.

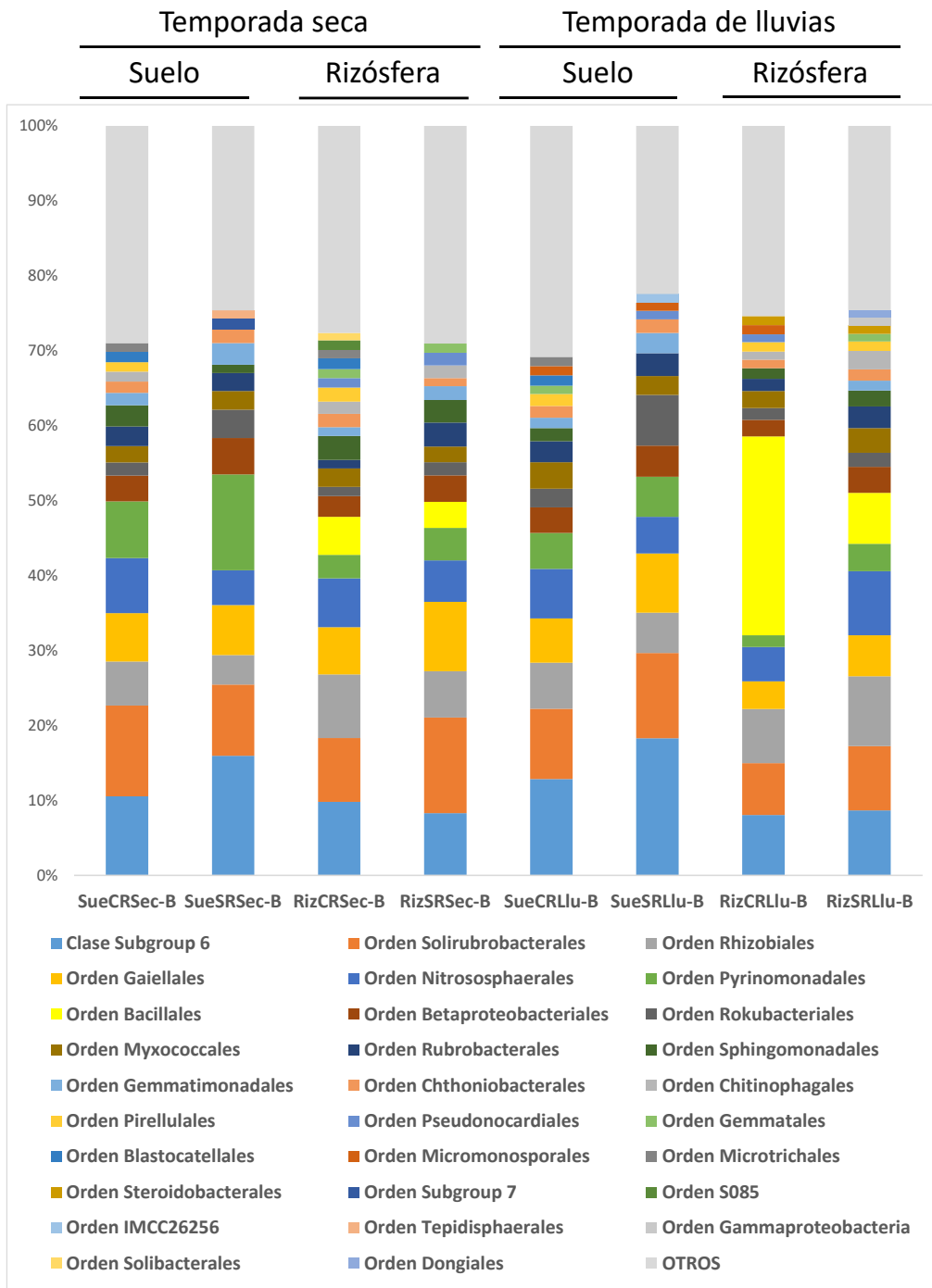


Figura 3.5. OTUs procariotas a nivel de Orden con abundancia relativa superior a 1%. Aquellos OTUs con abundancia relativa menor a 1% se agrupan en OTROS. El OTU “Clase Subgroup 6” no pudo ser definido a nivel de Orden. Abreviaturas: Sue, Suelo; Riz, Rizósfera; CR, con riego; SR, sin riego; Sec, Temporada seca; Llu, Temporada de lluvia; B, Procariotas.

En cuanto a las abundancias relativas de OTUs en las muestras, se compararon los porcentajes de abundancia a fin de reconocer patrones diferenciales entre las muestras estudiadas. Esto se llevó a cabo en los 9 OTUs más abundantes a fin de evitar falsos patrones que pudieran presentarse en secuencias de baja abundancia relativa.

No se apreció **algún patrón** en las abundancias relativas en los órdenes Solirubrobacterales y Nitrososphaerales, dos de los seis órdenes más abundantes.

Los OTUs “No asignado” (Clase Subgroup 6), Pyrinomonadales, Betaproteobacteriales y Rokubacteriales presentaron mayor abundancia relativa en las muestras de **suelo** con respecto a las de **rizósfera**. Por el contrario, los OTUs, Rhizobiales y Bacillales presentaron mayor abundancia relativa en las muestras de **rizósfera** con respecto a las de **suelo**.

El orden Gaiellales (banda amarilla) y Pyrinomonadales (banda verde), presentaron mayor abundancia relativa en las muestras **sin riego** vs **con riego**, 5.5 y 9.2% (sin riego) vs 3.7 y 6.5% (con riego) del primero; y 3.7 y 12.8% (sin riego) vs 1.6 y 7.6% (con riego).

El orden Pyrinomonadales también presentó mayor abundancia relativa en las muestras de **temporada seca** (7.6 y 12.8% en las muestras de suelo, y 3.1 y 4.3% en las muestras de rizósfera) con respecto a aquellas de **temporada de lluvia** (4.8 y 5.4% en las muestras de suelo, y 1.6 y 3.7% en las muestras de rizósfera).

El orden Bacillales (banda amarilla, arriba de la banda verde), presentó mayor abundancia relativa en las muestras de **temporada de lluvia** (6.8 y 26.5% en las muestras de rizósfera, y 0.64 y 0.91% en las muestras de suelo) con respecto a aquellas de **temporada seca** (3.5 y 5.1% en las muestras de rizósfera, y 0.25 y 0.26% en las muestras de suelo).

El cuadro 3.6 resume las principales diferencias encontradas entre las muestras procariotas a nivel de orden:

Cuadro 3.6. Resumen de la variación de la abundancia relativa de los órdenes procariotas con abundancia relativa mayor a 1% al interior de las muestras

Orden	Suelo	Rizósfera	Con riego	Sin riego	T. Seca	T. de Lluvia
No Asignado (Acidobacteria)	+					
Solirubrobacterales						
Rhizobiales		+				

Gaiellales			+	
Nitrososphaerales				
Pyrinomonadales	+		+	+
Bacillales		+		+

Con fondo blanco y letras en gris se representan aquellos taxa que no presentaron patrón alguno de comportamiento. Con fondo gris y letras negras se representan los taxa que si presentaron un patrón de comportamiento.

El signo + representa el grupo de muestra en el que existe mayor abundancia relativa de ese OTU en particular suelo vs rizósfera, con riego vs sin riego, y temporada. seca vs temporada de lluvias.

En dos de los 7 taxa más abundantes no se apreció patrón de distribución de OTUs pero en 5 sí, sobre todo en suelo vs rizósfera y con riego vs sin riego.

En el análisis de las abundancias relativas de OTUs a nivel de orden, las principales diferencias se observaron en las muestras de suelo vs rizósfera. Sin embargo, también se observó mayor abundancia relativa en 2 OTUs en las muestras sin riego con respecto a las muestras con riego.

3.3.1.2.2.1 Análisis de similitud

En la figura 3.6 se representa el mapa de calor generado a partir de la estimación de similitud del coeficiente de Jaccard de las abundancias relativas de los órdenes que presentaron un patrón diferencial en las muestras.

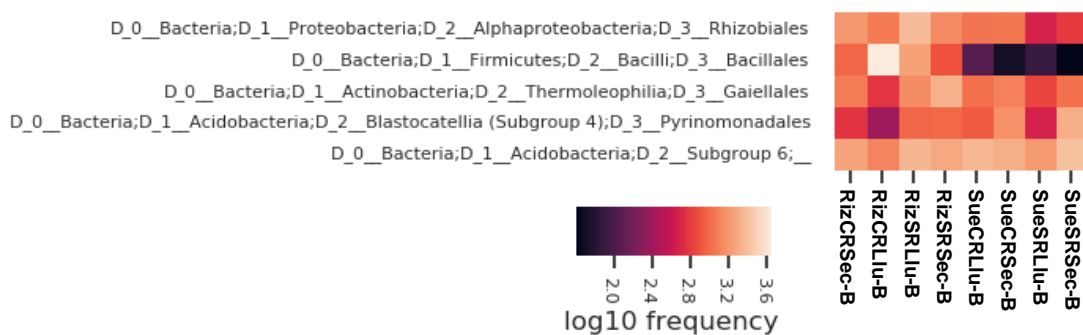


Figura 3.6 Mapa de calor de la estimación del coeficiente de similitud de Jaccard de los órdenes procariotas en los que se apreció un patrón de comportamiento en las abundancias relativas. Abreviaturas: Sue, Suelo; Riz, Rizósfera; CR, con riego; SR, sin riego; Sec, Temporada seca; Llu, Temporada de lluvia; B, Procariotas.

Cada orden presentó ligeras diferencias entre las muestras, aunque la principal diferencia fue observada en el orden Bacillales entre las muestras de suelo vs rizósfera. Lo cual concuerda con el análisis hecho a nivel de phylum, ya que el orden Bacillales pertenece al phylum Firmicutes, que fue el que presentó mayor contraste.

3.3.2 Eucariotas

Los análisis fueron similares a los descritos en la sección anterior. El cuadro 3.7 resume los resultados del tratamiento bioinformático de las secuencias de amplicones de ITS.

Cuadro 3.7 Resumen del tratamiento de las secuencias de eucariotas			
ID Muestra	#lecturas crudas	#Secuencia filtradas	Final (%)
SueCRSec-F	23,334	16758	71.8
SueSRSec-F	22,247	14166	63.7
RizCRSec-F	22,605	16552	73.2
RizSRSec-F	25,961	20292	78.2
SueCRLlu-F	34,980	23168	66.2
SueSRLlu-F	33,513	25645	76.5
RizCRLlu-F	33,544	19895	59.3
RizSRLlu-F	42,003	23105	55.0

Abreviaturas: ID Muestra, identificador de la muestra; #lecturas crudas, número de lecturas crudas recibidas; #Secuencias filtradas, número de secuencias después de la limpieza y filtrado de secuencias; Final (%), porcentaje de las secuencias crudas originales que pasaron todos los pasos del tratamiento; Sue, Suelo; Riz, Rizósfera; CR, con riego; SR, sin riego; Sec, Temporada seca; Llu, Temporada de lluvia; F, Eucariotas.

El porcentaje de secuencias que pasaron todos los pasos del procesamiento (Final), corresponde a los *reads* crudos útiles para el análisis. Como se puede apreciar en el cuadro 3.9, en todos los casos, más de la mitad de las secuencias pasaron el control de calidad y el filtrado. El intervalo estuvo entre 55.0% (RizSRLlu-F) y el 78.2% (RizCRSec-F). El número mínimo de secuencias por muestra que se usó para los análisis subsecuentes fue de 14,166 (SueSRLlu-B).

3.3.2.1 Curvas de rarefacción e índices ecológicos

En la figura 3.7, la pendiente de la curva mostró evidente disminución en todas las muestras; lo cual, aunado a la diferencia entre el número de órdenes predichos por el índice de Chao 1 y el de los órdenes observados, estiman que se pudo capturar más del 90% de los órdenes presentes en todas las muestras; aun cuando todavía existe aproximadamente un 10% de órdenes que no fueron capturados en este trabajo.

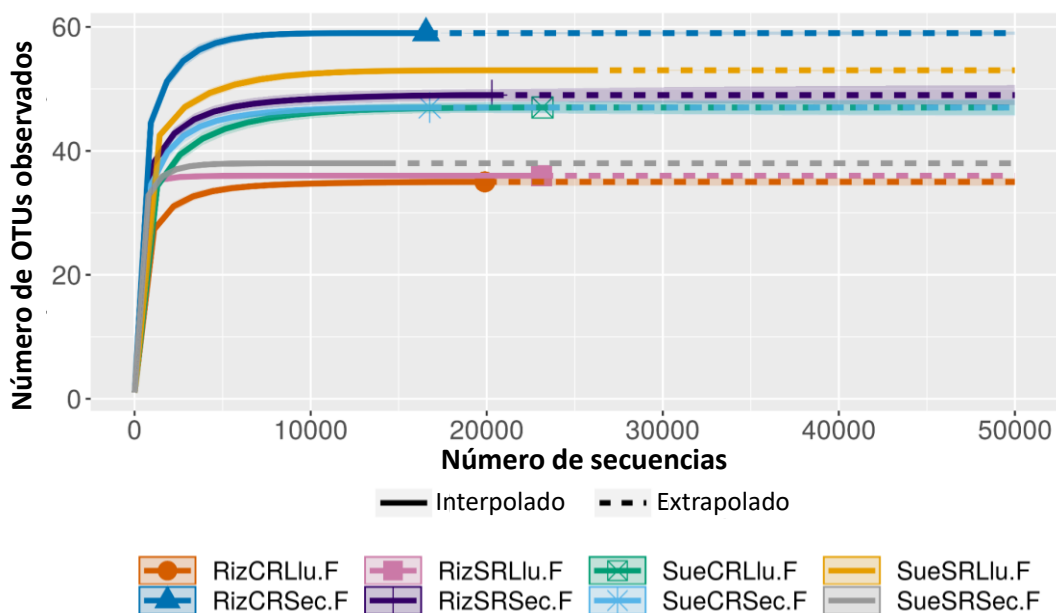


Figura 3.7 Curva de rarefacción de OTUs a nivel de orden de las muestras de eucariotas. Abreviaturas: Riz, Rizósfera; Sue, Suelo; CR, con riego; SR, sin riego; Sec, Temporada seca; Llu, Temporada de lluvia; F, Eucariotas.

Del proceso de clusterización (por un lado, a 75% y por otro, a 85% de identidad), se calculó el número de OTUs observados, la riqueza (Índice de Chao1), la equidad (Índice de Pielou) y la diversidad (Índice de Shannon) para cada muestra cuadro 3.8.

Muestra	Phylum				Orden			
	#OTUs	Riqueza	Equidad	Diversidad	#OTUs	Riqueza	Equidad	Diversidad
SueCRSec-F	11	11±0.1	0.20	0.68	47	47±1.2	0.51	2.8
SueSRSec-F	7	7±0.1	0.39	1.09	38	38±0.1	0.63	3.3
RizCRSec-F	14	14±0.1	0.40	1.54	59	59±0.4	0.71	4.2
RizSRSec-F	9	9±0.8	0.33	1.04	49	49±1.5	0.72	4.0
SueCRLlu-F	13	13±0.1	0.14	0.53	47	47±1.3	0.53	3.0
SueSRLlu-F	11	11±0.3	0.35	1.20	53	53±0.6	0.68	3.9
RizCRLlu-F	7	7±0.1	0.08	0.24	35	35±0.7	0.44	2.3
RizSRLlu-F	11	11±0.1	0.40	1.37	36	36±0.1	0.83	4.3

Los índices ecológicos fueron calculados mediante los estimadores Chao 1 para la riqueza; Pielou para la equidad y Shannon (H') para la diversidad.

Abreviaturas: Sue, Suelo; Riz, Rizósfera; CR, con riego; SR, sin riego; Sec, Temporada seca; Llu, Temporada de lluvia; F, Eucariotas.

En el cuadro 3.8 se observa que tanto a nivel de phylum como de orden, no se apreció un patrón de comportamiento distintivo entre las muestras de suelo vs rizósfera, con riego sin riego o temporada seca vs temporada de lluvia.

3.3.2.2 Asignación taxonómica y estructura de las comunidades

A fin de conocer la estructura de la microbiota asociada a las muestras estudiadas, se construyó una gráfica de abundancias relativas de OTUs eucariotas, a nivel de phylum y de orden. Para facilitar su observación e interpretación, aquellos OTUs con abundancia relativa menor a 1% fueron agrupados y representados como “OTROS”.

3.3.2.2.1 Análisis a nivel de *Phylum*

En la figura 3.8 se observan los phyla (OTUs al 75% de similitud) eucariotas identificados en las muestras. Los porcentajes de cada OTU por muestra se muestran en anexo 7.

Como se puede observar en la figura 3.8, en las ocho muestras se identificaron 18 Phyla, aunque únicamente los phyla fúngicos, Ascomycota y Basidiomycota representaron entre 90 y 99% de las abundancias relativas de las muestras. Todos los demás OTUs presentaron abundancias relativas muy bajas, por lo que no se les incluyó en los análisis de patrones de distribución entre las muestras.

En esta figura se aprecia, con excepción de la muestra SueSRSec-F, un claro dominio de los hongos del phylum Ascomycota (abundancia relativa >50%); seguido de hongos de phylum Basidiomycota. Se observaron ciertos OTUs presentes únicamente en una muestra (e.g., Phylum Arthropoda, 0.81%, presente únicamente en RizSRLlu-F) aunque en todos los casos en abundancia relativa menor al 1%.

Se pudo apreciar mayor abundancia relativa del phylum Ascomycota en las muestras **con riego** vs sin riego. Y, por el contrario, en las muestras **sin riego** se detectó mayor abundancia relativa del phylum Basidiomycota con respecto a aquellas con riego. Ascomycota presentó también mayor abundancia relativa en las muestras de temporada de **lluvia** respecto de la temporada seca.

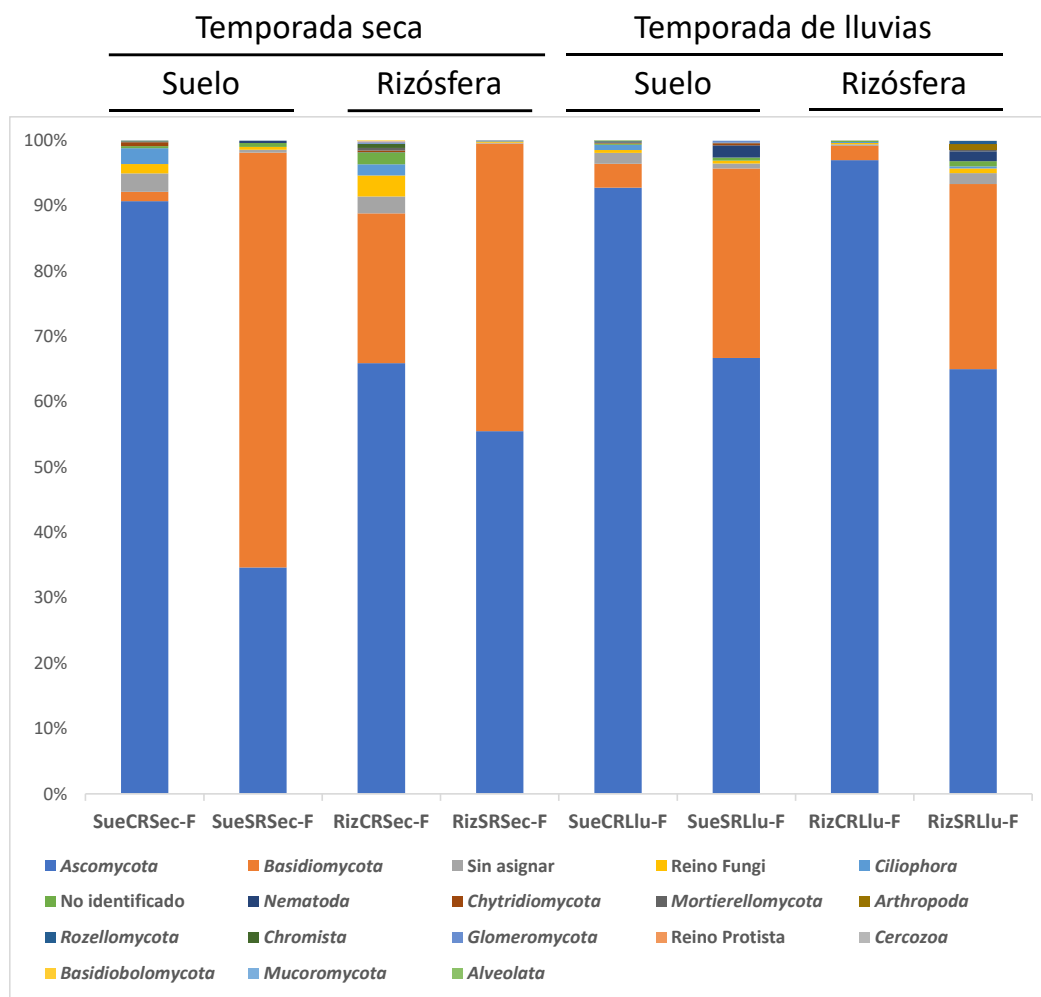


Figura 3.8. OTUs eucariotas a nivel de Phylum. Los OTUs “Sin asignar”, “Reino Fungi” y “No identificado” no pudieron ser identificados a nivel de Phylum. Abreviaturas: Sue, Suelo; Riz, Rizósfera; CR, con riego; SR, sin riego; Sec, Temporada seca; Llu, Temporada de lluvia; F, Eucariotas.

Cabe resaltar la presencia de OTUs del reino protista (e.g., phylum Ciliophora, entre 0 y 2.4%, banda celeste) y del animal (e.g., phylum Nematoda entre 0 y 1.9%, banda azul oscuro).

En el cuadro 3.9 se resumen las principales diferencias encontradas en eucariotas a nivel de phylum:

Ambos phyla presentaron patrones consistentes de abundancia relativa entre las muestras con riego vs sin riego, pero no entre las de suelo vs rizósfera, Ascomycota presentó mayor abundancia relativa en temporada de lluvia con respecto a la temporada seca.

Cuadro 3.9. Resumen de la variación de la abundancia relativa de los phyla eucariotas con abundancia relativa mayor a 1% al interior de las muestras

Phylum	Suelo	Rizósfera	Con riego	Sin riego	T. Seca	T. de Lluvia
Ascomycota			+			+
Basidiomycota				+		

El signo + representa el grupo de muestra en el que existe mayor abundancia relativa de ese OTU en particular. suelo vs rizósfera, con riego vs sin riego, y temporada. seca vs temporada de lluvias.

3.3.2.2.1 Análisis de similitud

En la figura 3.9 se representa el mapa de calor generado a partir de la estimación de similitud del coeficiente de Jaccard de las abundancias relativas únicamente de los phyla que presentaron un patrón de comportamiento en las muestras.

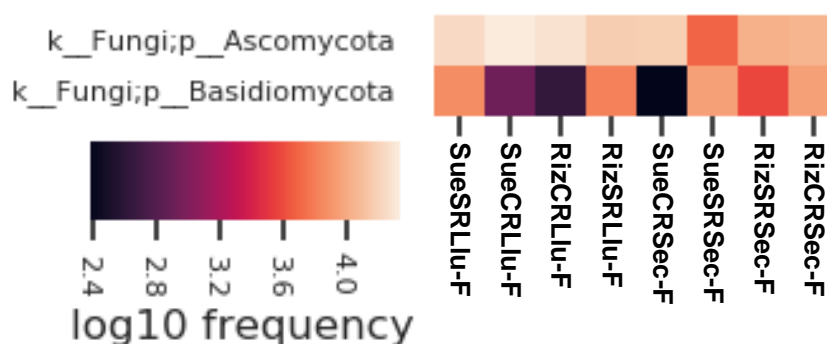


Figura 3.9 Mapa de calor de la estimación del coeficiente de similitud de Jaccard de los phyla eucariotas en los que se apreció un patrón de comportamiento en las abundancias relativas.

Abreviaturas: Sue, Suelo; Riz, Rizósfera; CR, con riego; SR, sin riego; Sec, Temporada Seca; Llu, Temporada de Lluvias; F, Eucariotas.

En este mapa se puede apreciar que entre los dos phyla fúngicos, Basidiomycota presentó mayor diferencia en las muestras con riego vs las muestras sin riego.

3.3.2.2.2 Análisis a nivel de Orden

En la figura 3.10, se representan los OTUs a nivel de orden (agrupados al 85% de similitud) con abundancia relativa superior al 1% en por lo menos una muestra. Los porcentajes de cada OTU en cada muestra se muestran en anexo 8.

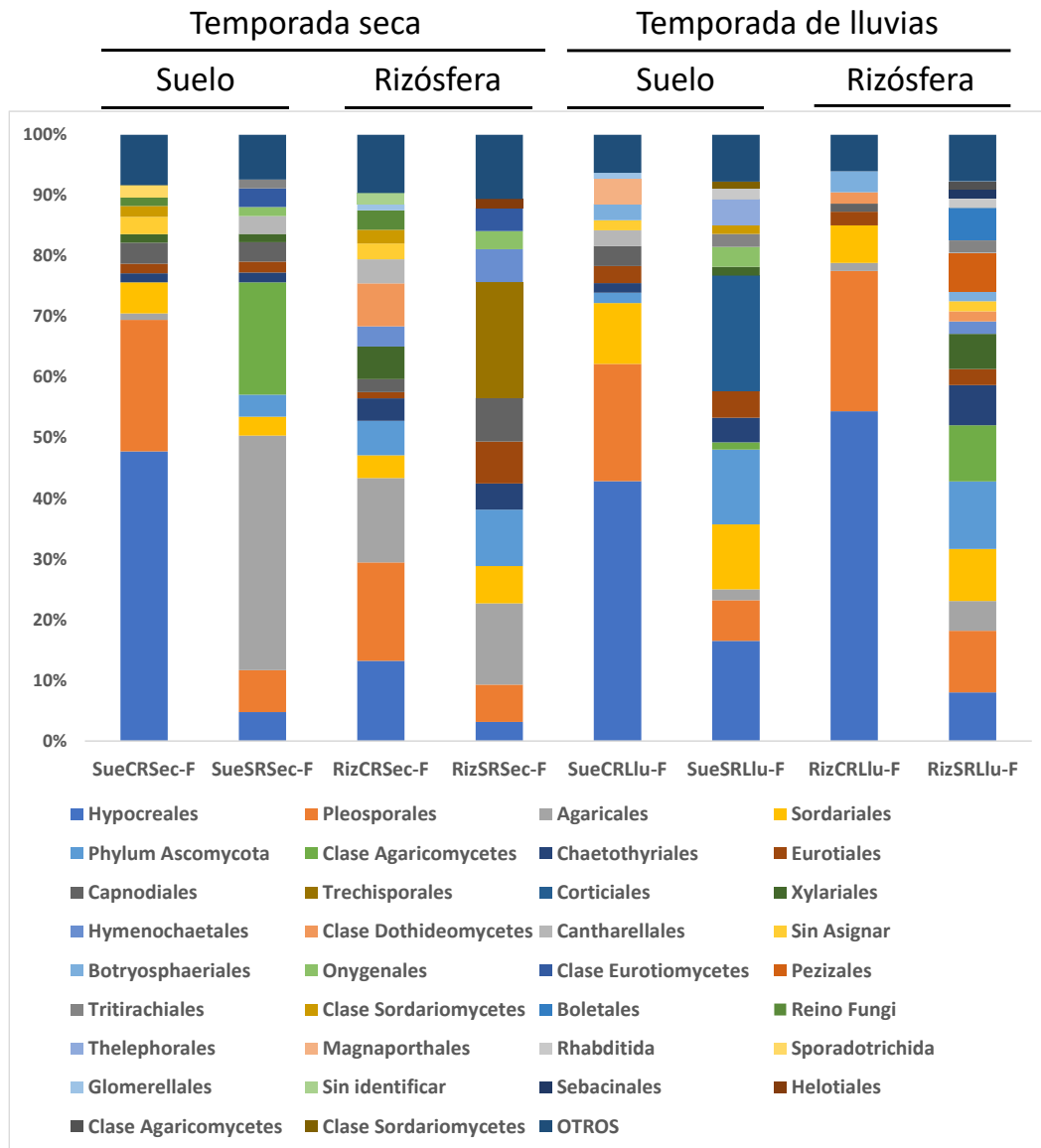


Figura 3.10. OTUs eucariotas a nivel de Orden con abundancia relativa superior a 1%. Aquellos OTUs con abundancia relativa menor a 1% se agrupan en "OTROS". Los OTUs "Phylum Ascomycota", "Clase Agaricomycetes", "Clase Dothideomycetes", "Sin asignar", "Clase Eurotiomycetes", "Clase Sordariomycetes", "Reino Fungi", "Sin identificar", "Clase Agaricomycetes" y "Clase Sordariomycetes", no pudieron ser definidos a nivel de Orden. Abreviaturas: Sue, Suelo; Riz, Rizósfera; CR, con riego; SR, sin riego; Sec, Temporada Seca; Llu, Temporada de lluvias; F, Eucariotas.

De las muestras estudiadas, se aislaron un total de 100 OTUs diferentes a nivel de Orden, de los cuales, 34 OTUs presentaron abundancia relativa mayor al 1%. De estos 34 OTUs, 24 fueron identificados a nivel de orden, 6 únicamente hasta nivel de clase, 1 a nivel de

phylum, uno a nivel de reino, uno no asignado y uno sin identificar. Cabe mencionar que no estuvieron todos presentes en todas las muestras.

Entre 6.0 y 10.6% de la abundancia relativa de cada muestra correspondió a OTUs con abundancia relativa menor al 1% (agrupados en "OTROS").

A diferencia del nivel de phylum, a nivel de orden la estructura de las comunidades es más compleja y disimilar entre las muestras.

En cuanto a las abundancias relativas de cada OTU, se compararon los porcentajes de abundancia en los 6 órdenes más abundantes a fin de evitar falsos patrones que pudieran presentarse en OTUs soportados por un número relativamente bajo de secuencias.

A diferencia de lo observado en las muestras de procariontas, en eucariotas no hubo algún orden que diferenciara las muestras de suelo vs las de rizósfera.

Los órdenes Hypocreales (banda celeste) y Pleosporales (banda naranja), presentaron mayor abundancia relativa en las muestras **con riego** vs **sin riego** 13.2 y 54.4% (con riego) vs 3.1 y 16.5% (sin riego) del primero; y 16.3 y 23.2% (con riego) vs 6.2 y 10.2% (sin riego) del segundo.

El orden Agaricales (banda gris), presentó mayor abundancia relativa en las muestras de **temporada seca** (1.1 y 38.7% en las muestras de suelo, y 13.9 y 13.4% en las muestras de rizósfera) con respecto a aquellas de **temporada de lluvia** (0.90 y 1.8% en las muestras de suelo, y 1.3 y 4.9% en las muestras de rizósfera).

El orden Sordariales (banda amarilla), presentó mayor abundancia en las muestras de **temporada de lluvia** (10.1 y 10.7% en las muestras de suelo, y 6.2 y 8.6% en las muestras de rizósfera) con respecto a aquellas de **temporada seca** (5.1 y 3.1% en las muestras de suelo, y 3.8 y 6.1% en las muestras de rizósfera).

El phylum Ascomycota (banda celeste oscuro), presentó mayor abundancia relativa en las muestras **sin riego** (entre 3.6 y 12.3%) con respecto a aquellas **con riego** (entre 0.63 y 5.7%).

La clase Agaricomycetes (banda verde), presentó mayor abundancia relativa en las muestras **sin riego** (entre 0.83 y 18.5%) con respecto a aquellas **con riego** (entre 0 y 0.18%).

En el cuadro 3.10 se resumen las principales diferencias entre las muestras encontrados en eucariotas a nivel de orden:

Orden	Suelo	Rizósfera	Con riego	Sin riego	T. Seca	T. de Lluvia
Hypocreales			+			
Pleosporales			+			
Agaricales					+	
Sordariales						+
No Asignado (Phylum Ascomycota)				+		
No Asignado (Clase Agaricomycetes)				+		

El signo + representa el grupo de muestra en el que existe mayor abundancia relativa de ese OTU en particular. Suelo vs rizósfera, con riego vs sin riego, y temporada. seca vs temporada de lluvias.

En los 6 taxa más abundantes analizados se apreció un patrón reconocible de comportamiento. La mayoría de estos en las muestras con riego vs sin riego.

3.3.2.2.1 Análisis de similitud

En la figura 3.11 se presenta el mapa de calor generado a partir de la estimación de similitud del coeficiente de Jaccard de las abundancias relativas de los órdenes eucariotas que presentaron un patrón de comportamiento en las muestras.

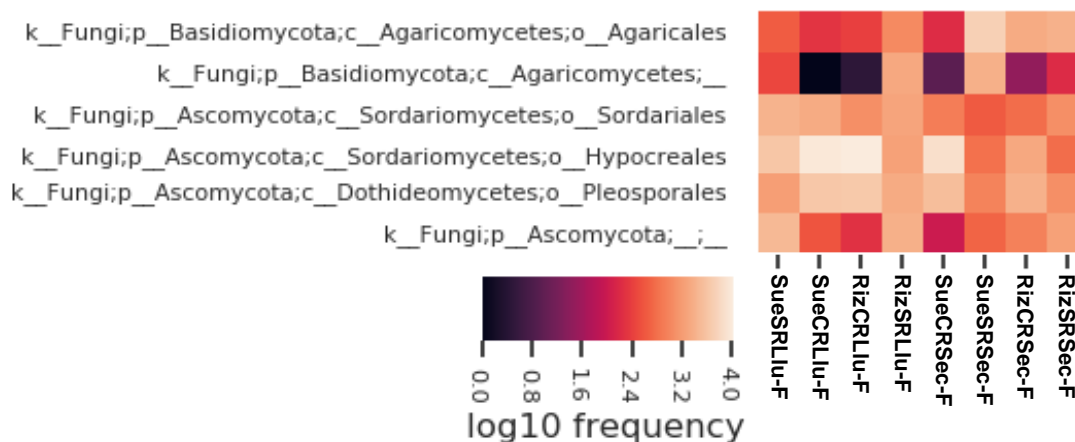


Figura 3.11 Mapa de calor de la estimación del coeficiente de similitud de Jaccard de los órdenes eucariotas en los que se apreció un patrón de comportamiento en las abundancias relativas. Abreviaturas: Sue, Suelo; Riz, Rizósfera; CR, con riego; SR, sin riego; Sec, Temporada Seca; Llu, Temporada de Lluvias; F, Eucariotas.

Se pudo apreciar en los OTUs Hypocreales, “No identificado” (clase Agaricomycetes), Pleosporales y “No identificado” (phylum Ascomycota), principalmente diferencias en sus abundancias entre las muestras con riego vs sin riego.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

4.1 SUELO

En términos generales, los resultados de los parámetros fisicoquímicos evaluados, sugieren que los suelos no se ven fuertemente modificados por la temporada del año, a pesar de la gran diferencia de precipitaciones, temperatura, radiación, entre otros factores, que suele existir entre estas dos temporadas climáticas en la Península de Yucatán (Ángeles-González *et al.*, 2021; Mardero *et al.*, 2012).

Los suelos estudiados se clasificaron como suelos “francos” i.e., compuestos de manera equilibrada entre fracciones de arcilla, limo y arena. Según la FAO estos serían suelos moderadamente permeables (FAO, 2021). Esto sumado a la poca profundidad de los suelos yucatecos, en forma de leptosols y cambisols (Bautista *et al.*, 2015) y al fondo rocoso calcáreo muy permeable (García Gil & Graniel Castro, 2010), podría causar drenaje interno excesivo (IUSS Working Group, 2015) y por ende el agua de lluvia tendría poca capacidad para modificar las características de los suelos estudiados. En cuanto a la condición de crecimiento (con riego y sin riego), debido a la permeabilidad de los suelos, se podría esperar que esta condición de crecimiento tuviera un menor efecto en la modificación de los parámetros del suelo que lo esperado, aunque se carecen de datos de humedad en los suelos estudiados

Por otro lado, los árboles presentes en las áreas muestreadas pueden actuar como escudo ambiental y evitar condiciones climáticas muy cambiantes. Este fenómeno ha sido señalado por Rao y colaboradores (1997) en una revisión sobre los efectos, en el cultivo y en las propiedades del suelo, de la presencia de árboles en sistemas agroforestales. En este sentido, en cuanto a las condiciones climáticas, suele haber menor intensidad lumínica, menor temperatura, menor velocidad del viento, mayor humedad relativa y menor evaporación bajo la copa de árboles que en áreas despejadas.

Los resultados obtenidos sugieren que las temporadas de muestreo ejercen pocos cambios en los parámetros de los suelos estudiados, a pesar de que estas variaciones climáticas tienen efectos en los árboles estudiados, como son la temporalidad de floración, fructificación y foliación/defoliación, los cuales son factores que afectan los suelos en los

que caen estas hojas, frutos y flores y de que la condición de crecimiento, podría ejercer cambios en esta fenología vegetal con lo cual diferenciar aún más los suelos donde estos árboles se desarrollan. Por ello, es de esperar que el microclima al interior de los suelos muestreados sea poco afectado por las temporadas seca y de lluvia de la zona, congruente con el hecho de que los parámetros fisicoquímicos no variaron con respecto a éstos.

Sodio, potasio, conductividad (Na, K, CE)

Todas las muestras presentaron niveles muy bajos de sodio (Na) y potasio (K). No obstante, las muestras con riego presentaron niveles más altos de ambos iones que aquellas sin riego. La concentración de iones en el suelo se ve reflejada en la conductividad, por lo que, en concordancia con ello, las muestras con riego presentaron el doble de conductividad con respecto a las muestras sin riego, aunque todas las muestras cayeron en la misma categoría de suelo no salino y CE bajo. A pesar de la congruencia entre ambos parámetros, estos no resultan congruentes con la condición de riego, ya que es de esperar que los suelos con riego, al tratarse de suelos con rápida filtración, resulten con contenidos de estos iones y CE, más bajos que aquellos sin riego.

Rojas-Herrera y colaboradores (2014) han reportado mayores niveles de Na y CE en suelos de huertos de comunidades maya en del estado de Yucatán, contaminados por el desecho de aguas residuales con detergentes y jabones del lavado de ropas y utensilios de cocina. La mayor concentración de iones y CE en las muestras de suelo con riego podría explicarse por este tipo de actividades humanas, aunque el nivel de contaminación sería bajo, comparado con lo reportado por estos autores (Na 16.4 ± 4.71 y CE 1.5 ± 1.02).

Sin embargo, por lo señalado previamente, la alta permeabilidad de los suelos estaría permitiendo que los parámetros de estos suelos se vieran poco afectados, tanto por la estacionalidad como por la condición de crecimiento, por lo que las incongruencias en la concentración de estos iones y la CE, podrían deberse a variaciones inherentes en los parámetros de estos suelos estudiados.

Carbonatos y Calcio

El suelo yucateco es suelo geológicamente joven, que surgió del lecho marino. Éste presenta una caliza muy dura de carbonato de calcio (García Gil & Graniel Castro, 2010),

que se va degradando por acción del medio ambiente así como por raíces que van penetrando en la roca, por medios físicos y químicos. Por ello, son congruentes las diferencias observadas en los niveles de calcio (Ca) y carbonatos (carbono inorgánico, diferente del carbono orgánico total) entre las muestras de suelos con riego y sin riego, ya que, los primeros son leptosols negros (profundidad < 25cm), en donde eran observables las afloraciones rocosas en el terreno y los segundos son cambisols rojos (profundidad intermedia \geq 25cm), en donde no se apreciaron afloraciones rocosas.

Los niveles de Ca en los suelos estudiados, aunque altos según la norma mexicana NOM-021 (11 cmol⁺/Kg para cambisols y entre 14 y 17 cmol⁺/Kg para leptosols), resultaron menores a lo reportado por Shang y Tiessen (2003) (entre 47 y 53 cmol⁺/Kg en cambisols y 66 y 70 cmol⁺/Kg en leptosols) en suelos yucatecos. No obstante, las muestras de suelo sin riego y con riego del presente estudio presentaron mayores niveles de carbonatos (aproximadamente, 3% en cambisols y 13% en leptosols) con respecto al otro estudio (1 y 1.6% en cambisols y 4 y 7% en leptosols). La presencia de los árboles de ciricote podría explicar parte de la diferencia en los niveles de calcio, ya que Shang y Tiessen (2003), describieron suelos utilizados en la milpa maya; en México, del náhuatl milpan de milli "parcela sembrada" y pan "encima de" (<https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/sistemas-productivos/milpa>, 2021); por lo que no contarían con la presencia de árboles; ya que el ciricote pudiera estar tomando el calcio del suelo, disminuyendo su concentración y acumularlo en sus tricomas duros de carbonato de calcio (De Silva et al., 1996). Otra posible explicación es que la diferencia se deba a la heterogeneidad natural de estos suelos como ha sido señalado por varios autores acerca de los suelos de la península (Álvarez-Rivera et al., 2021; Santillán et al., 2021).

Carbono orgánico, Nitrógeno total y Fósforo inorgánico

La mayor concentración de carbono orgánico total, aunada a mayor contenido de nitrógeno total (N) y de fósforo inorgánico (P) en las muestras con riego indica una mayor disponibilidad de nutrientes, lo cual es esperable en suelos que están siendo abonados por el pastoreo de animales de granja, como es el caso de los suelos con riego en el estudio. De igual modo, mayor N y P puede explicarse por mayores tasas de producción de biomasa de los árboles con riego, por lo tanto mayor extracción de nutrientes del suelo y una mayor tasa de descomposición por la humedad; lo cual fue señalado por Reuter y colaboradores

(mayor desarrollo de árboles de ciricote como consecuencia del riego de estos) (M. Reuter et al., 2008).

Todos los valores de materia orgánica y nitrógeno total se encuentran en el intervalo de los valores previamente reportados para suelos de Yucatán (Rojas-Herrera *et al.*, 2014; Shang & Tiessen, 2003). Además, Shang & Tiessen (2003) comentan una característica curiosa de los suelos yucatecos y es que estos presentan niveles bastante altos de materia orgánica, entre 5 y 25%, cuando lo común en suelos tropicales semiáridos es encontrar ~ 1% de materia orgánica.

Estudios previos en suelos yucatecos han reportado la presencia de P total e inorgánico, siendo este elemento un macronutriente en las plantas (Singh & Satyanarayana, 2011). En el presente trabajo se utilizó el método de Olsen para determinar la concentración de P en las muestras de suelo, pero este método no es sensible al P orgánico (Kuo, 1996). Es decir, la ausencia de P inorgánico en los suelos sin riego no indica que no esté presente éste elemento, sino más bien que no está biológicamente disponible para las plantas. Esto lleva a suponer encontrar taxa bacterianos y/o fúngicos que cumplieran la función de desdoblar las formas orgánicas de P en mayor abundancia relativa en selva que en huerto, de modo que las plantas, entre ellas el ciricote, lo pudieran utilizar (Singh & Satyanarayana, 2011).

Se refuerza la hipótesis de encontrar asociaciones microbianas en la rizósfera del ciricote que mineralicen el P para ser este aprovechado por esta planta.

pH y Redox

En el suelo, el pH y el potencial REDOX juegan un papel muy importante, ya que determinan la forma química en la que se encuentran los componentes, y son dos de los factores principales que afectan a las comunidades microbianas de suelo y rizósfera. Se sabe que en suelos con pH superior a 7.5, la disponibilidad de fosfatos, manganeso, zinc, cobre y hierro no es óptima (Jeffrey, 2012). Además, se ha descrito que el pH del suelo es uno de los principales factores que afectan la riqueza, diversidad y composición general de la comunidad bacteriana (Fierer, 2017; Griffiths *et al.*, 2011; Fierer & Jackson, 2006).

Los valores de pH encontrados concuerdan con lo reportado previamente en suelos yucatecos (valores entre 7.3 y 8.1 según Reuter y colaboradores y 7.7 y 7.4 según Zech y

colaboradores) (M. Reuter *et al.*, 2008; Zech *et al.*, 1991). Aunque otros autores también han reportado valores superiores (~8) (Rojas-Herrera *et al.*, 2014; Shang & Tiessen, 2003).

Igualmente, los valores del potencial REDOX son similares a los reportados por Rojas-Herrera y colaboradores (2014), apoyando que los suelos estudiados son típicos del estado. Se ha descrito que el estado de oxigenación de los suelos es, junto al pH y la calidad y cantidad de carbono orgánico, uno de los principales factores que influyen las comunidades bacterianas del suelo (Fierer, 2017).

Cabe suponer que los suelos estudiados presentan condiciones favorables para el desarrollo de una gran riqueza de microorganismos, gracias al pH neutro y bajos niveles de oxidación. Por esto es de esperar una gran riqueza en los análisis de los *metabarcodes* de procariontes y eucariotes.

4.2 PROCARIOTAS

Análisis general

El número inicial de lecturas (*reads* crudos) fue muy similar al comúnmente obtenido en otros trabajos (e.g. Özkurt *et al.*, 2020; Ozkurt *et al.*, 2019; Edwards *et al.*, 2015). Así también, el número final de secuencias utilizadas (luego de la limpieza y filtrado) fue similar al de otros trabajos (e.g. Lupatini *et al.*, 2017; Rojas-Herrera *et al.*, 2015). Lo cual señala que tanto el esfuerzo de secuenciación como el procesamiento de las secuencias otorgaron números de secuencias típicos en el estado del arte.

Índices ecológicos

En cuanto a los índices de diversidad, equidad y riqueza estudiados a nivel de phylum y orden, no se apreció ningún patrón distintivo que distinguiera las condiciones de crecimiento, con riego y sin riego, o temporada seca de temporada de lluvia. Esto sugiere que las diferentes características de suelo y las temporadas de muestreo no están alterando diferencialmente estas comunidades bacterianas a nivel de los índices ecológicos. En este trabajo se logró capturar a más del 90% de los OTUs a nivel de orden, en todas las muestras. Aun cuando, como es de esperarse en muestras metagenómicas de suelo y rizósfera (e.g. Edwards *et al.*, 2015; Yun *et al.*, 2014), no se alcanzó a capturar todos los órdenes.

Resultó llamativo observar una riqueza ligeramente mayor en 3 de las 4 muestras de rizósfera con respecto a las de suelo, aunque cabe enfatizar que la diferencia no resultó muy grande. Este fenómeno ya se ha observado en otros trabajos, como el de Fitzpatrick y colaboradores (2018), en el cual en dos de las tres locaciones estudiadas, las muestras de rizósfera presentaron mayor riqueza media con respecto a las de suelo, aunque sin ser esta diferencia estadísticamente significativa. Así también en el de Ortiz y colaboradores (2020), en donde si se observó, estadísticamente significativa, mayor riqueza de OTUs en rizósfera con respecto a suelo, e hipotetizan que la rizósfera ofrecería un ambiente con mayores niveles de nutrientes y humedad. Finalmente, sugieren que la mayor riqueza de rizósfera con respecto del suelo, sería una característica de suelos tropicales, los cuales, generalmente presentan carencias en ciertos nutrientes, lo cual ha sido descrito para suelos yucatecos (Santillán et al., 2021), en el presente estudio, como se observó en “sin riego”, el limitante sería el Fósforo.

Asignación taxonómica y coeficiente de similitud

A nivel de phylum y orden las comunidades microbianas fueron relativamente similares entre las muestras de rizósfera y suelo colectadas en los grupos con riego y sin riego. Esto es sorpresivo porque usualmente se observan cambios en las comunidades microbiana, como se describe más adelante. No obstante, si se aprecian ciertas diferencias en las estructuras de las comunidades microbianas estudiadas.

Todas las muestras estuvieron dominadas por los phyla Actinobacteria, Acidobacteria, Proteobacteria y Firmicutes, los cuales tuvieron abundancias relativas >25% en por lo menos una muestra. Esto coincide con revisiones recientes en cuanto a la conformación general de las comunidades bacterianas de suelo y rizósfera (Trivedi *et al.*, 2020; Bulgarelli *et al.*, 2013). A estos phyla le siguen, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Gematimonadetes, Planctomycetes y Chloroflexi, con abundancias entre 1% y el 7%. También se encontró el Phylum Thaumarchaeota del dominio Archea, el cual ha sido encontrado en suelo y rizósfera en otros trabajos, aunque suele estar presente en menor abundancia a la encontrada en este trabajo (Fierer, 2017). El phylum bacteriano Rokubacteria fue recientemente denominado, por lo que aún son pocos trabajos los que lo han mencionado; fue previamente identificado como SPAM (*Candidate phylum Spring Alpine Meadow*), descrito globalmente en suelo y rizósfera (Becraft *et al.*, 2017). Todos los phyla reportados

resultan ubicuos en suelo y rizósfera según varios trabajos; lo más destacable de las comunidades estudiadas es la ausencia del phylum Cyanobacteria que ha sido señalado por su capacidad para fijar nitrógeno y formar cyanolíquenes, se ha señalado además que su presencia en bosques tropicales está sujeta a factores climáticos, viéndose casi ausente en ambientes cálidos como es el caso del estado de Yucatán (Stanton et al., 2019).

Actinobacteria fue el que presentó mayor abundancia relativa en todas las muestras de este estudio, congruente con que es uno de los phyla bacterianos más abundantes. No se apreció algún patrón de abundancia asociado con algún tipo de muestras en particular, pero ha sido ampliamente descrito entre los phyla dominantes en suelo y rizósfera (e.g. Zuo et al., 2021; Praeg & Illmer, 2020; Debnath et al., 2016), y en ambientes tropicales (Ortiz et al., 2020; Rivera-Rivera & Cuevas, 2020; Hayden et al., 2012; Oh et al., 2012; Rojas-Herrera et al., 2014), en donde se describió mayor abundancia en sitios con muy altas temperaturas y con baja elevación geográfica (Ortiz et al., 2020; Rivera-Rivera & Cuevas, 2020; Fitzpatrick et al., 2018; Hayden et al., 2012). Por lo que podrían jugar un papel importante en la adaptación del ciricote al ecosistema yucateco, un ambiente karstico, caluroso y con elevados niveles de carbono orgánico en el suelo.

Acidobacteria, presentaron una mayor abundancia relativa en las muestras de suelo, con respecto a las de rizósfera, por lo que no parece ser un phylum favorecido por el ambiente rizosférico, además fue el segundo phylum de mayor abundancia relativa en el presente estudio. Se ha reportado mayor abundancia relativa de este phylum en suelo con respecto a la rizósfera de *Phaseolus vulgaris* (Pérez-Jaramillo et al., 2017), Agave (Coleman-Derr et al., 2016) entre otras (e.g. Bulgarelli et al., 2013; Da Rocha et al., 2013; Navarro-Noya et al., 2010). Rojas-Herrera y colaboradores (2014), reportaron miembros del phylum Acidobacteria entre los tres phyla más abundantes en suelos yucatecos.

Proteobacteria, Se ha descrito que este phylum sufre variaciones por efecto de la disponibilidad de agua, siendo mayor su abundancia relativa en temporada de lluvia con respecto a la seca (Rivera-Rivera & Cuevas, 2020; Fitzpatrick et al., 2018), por efecto de calentamiento (Hayden et al., 2012) y en rizósfera con respecto al suelo (Trivedi et al., 2020). Sin embargo, no se observó patrón diferencial de abundancia entre las épocas de muestreo ni en cuanto a la condición de crecimiento. Fue el tercer Phylum de mayor abundancia relativa y aunque a nivel de phylum no se observó algún patrón de

comportamiento y ya que este es un grupo metabólicamente diverso (Kielak *et al.*, 2016), es probable que a niveles taxonómicos más bajos se encuentren patrones reconocibles entre las muestras estudiadas.

Thaumarchaeota, fue el 4to Phylum más abundante (abundancia relativa promedio 6%) y al igual que en los casos anteriores no se apreció patrón de distribución en las muestras estudiadas. Miembros de este phylum han sido descritos en abundancias relativas menores a 1%, como endófitos (Fonseca-García *et al.*, 2016; Bulgarelli *et al.*, 2015; Hardoim *et al.*, 2015), así como en suelos (Fierer, 2017) y en mayor proporción (3%) en suelos tropicales (Fonseca-García *et al.*, 2016). Su elevada abundancia relativa y los niveles altos de nitrógeno descritos, sumado al reporte de la participación de miembros de este phylum en procesos de nitrificación, podría explicar su presencia y función en suelo y rizósfera del presente este estudio.

Firmicutes, en el presente estudio, este phylum presentó mayor abundancia relativa en rizósfera vs suelo y en temporada de lluvia con respecto a temporada seca. Se han descrito muchas características que lo hacen beneficioso para aquellas plantas a las que se encuentra asociado (como su papel en suelos supresivos de enfermedades y en la mineralización de restos vegetales, lo cual se comenta en la descripción del orden Bacillales). Por otro lado, en cuanto a la temporada de muestreo, se ha observado un comportamiento diferente al descrito en un estudio de suelos tropicales, una posible explicación, es la formación de endosporas debido a la falta de agua, lo cual dificultaría acceder a los genomas y por ende disminuir subestimar su abundancia relativa *i.e.* estos serían recalcitrantes a la extracción de ADN (Rivera-Rivera & Cuevas, 2020).

Como se ha comentado previamente, todos los demás phyla han sido previamente reportados en suelo y rizósfera de varias especies vegetales y en abundancias relativas similares. Entre estos phyla, Chloroflexi, Rokubacteria y Gemmatimonadetes presentaron patrones reconocibles en las abundancias relativas, aunque podrían ser simplemente artefactos, ya que están soportados por un menor número de secuencias que aquellos phyla dominantes descritos en los párrafos superiores.

Bacteroidetes si bien estuvo presente en todas las muestras con una abundancia >1%, no fue uno de los phyla dominantes, lo cual es de extrañar, ya que este ha sido repetidamente

descrito tanto en suelo como en rizósfera de varias especies vegetales junto a los ya descritos Actinobacteria, Acidobacteria, Proteobacteria y Firmicutes (Compant *et al.*, 2019; Bulgarelli *et al.*, 2013). Resulta un tanto extraño además que en nuestro trabajo no haya resultado más abundante en el ambiente con riego que en aquel sin riego, ya que el primero tiene un mayor contenido de carbono orgánico, y se ha reportado que Bacteroidetes posee atributos copiotróficos y son relativamente abundantes en suelos con elevada disponibilidad de Carbono (Fierer *et al.*, 2007).

A nivel de **orden**, 5 de los 7 con mayor abundancia relativa presentaron un patrón diferencial en las abundancias relativas.

Los taxa "**No asignado**" (clase Subgroup 6) y **Pyrinomonadales**, ambos pertenecientes al phylum **Acidobacteria**, presentaron mayor abundancia relativa en las muestras de suelo con respecto a aquellas de rizósfera. Cabe mencionar que el orden Pyrinomonadales, también presentó mayor abundancia relativa en las muestras sin riego con respecto a aquellas con riego; y en las de temporada seca con respecto a las de lluvia. Esto podría deberse al menor nivel de carbono orgánico en los suelos sin riego con respecto a aquellos con riego, ya que ha sido descrito que varios miembros del phylum son capaces de prosperar en estas condiciones (Kielak *et al.*, 2016).

A nivel de phylum, no se apreció patrón diferencial en las abundancias relativas de las **Proteobacterias**, aunque si se apreció en el orden Rhizobiales, perteneciente a este. Dentro del orden **Rhizobiales**, una Alfaproteobacteria, se hallan los géneros asociados al balance hormonal vegetal de auxinas (Spaepen & Vanderleyden, 2011) entre otras hormonas (Lemanceau *et al.*, 2017). Generalmente miembros de este orden están asociados a las raíces y su principal papel biológico suele ser la fijación de nitrógeno (Lee *et al.*, 2008). Por lo que no es raro encontrarlos en mayor abundancia en la rizósfera con respecto al suelo. Además, se ha propuesto (Smit *et al.*, 2001) y utilizado (Liu *et al.*, 2017), una razón entre las abundancias de Acidobacteria y Proteobacteria para determinar el estado general de los suelos; si este es bajo, indicaría suelos oligotróficos, y uno alto, sería señal de suelos copiotróficos.

Dentro del phylum **Actinobacteria**, el Orden **Gaiellales** generalmente es reportado en abundancia relativa menor a 1% (Müller *et al.*, 2016). En el presente trabajo este orden

alcanzó abundancias relativas de 5.5% y 9.2% en nuestras muestras sin riego y entre 3.7 y 6.5 en aquellas con riego. Al momento solo se conoce una especie cultivable de este orden, la cual fue aislada de un pozo profundo de agua mineral, es un bacilo Gram-positivo, aerobio estricto, catalasa positivo (descompone el agua oxigenada) y oxidasa positivo (produce citocromo c oxidasa) (Albuquerque & da Costa, 2014). Sin embargo, en general se desconoce la función ecológica de los miembros de este orden bacteriano.

Finalmente, en el análisis de similitud de los OTUs en los que se observaron patrones diferenciales de sus abundancias relativas, la diferencia más marcada se observó en el phylum **Firmicutes**, específicamente en el orden **Bacillales**. En este hubo una abundancia claramente mayor en las muestras de rizósfera vs suelo.

Miembros pertenecientes al orden Bacillales han sido descritos como responsables de la supresión de hongos causantes de “enfermedades transmitidas por suelo” (*Verticillium*, *Rhizoctonia* y *Fusarium*) y nemátodos parásitos de vegetales (*Meloidogyne* y *Pratylenchus*) mediante la producción de componentes antimicrobianos y toxinas formadoras de poros (proteínas cristal) (Trivedi *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2003). El orden Bacillales mostró mayor abundancia relativa en ambientes con elevado CO₂ y con ambiente cálido (Hayden *et al.*, 2012). Se sabe que miembros de este phylum juegan un papel importante en la mineralización de materiales derivados de plantas y humus del suelo.

Entre los géneros más abundantes identificados en el orden Bacillales estuvo el género *Bacillus* (ver anexo 9) cuyos miembros son aerobios estrictos o facultativos y viven en el suelo (Baron, 1996). Además, el género *Bacillus* ha sido previamente descrito en las microbiotas endosféricas de *A. tequilana*, quinoa, algunas cactáceas y cucurbitáceas (Wassermann *et al.*, 2019; Coleman-Derr *et al.*, 2016; Fonseca-García *et al.*, 2016). El género *Bacillus* ha sido asociado al balance hormonal vegetal de las auxinas y la síntesis de citoquininas; y la supresión de enfermedades/patógenos (Lemanceau *et al.*, 2017), por lo que probablemente desempeñen funciones benéficas en el ciricote.

Las comunidades procariotas de los suelos estudiados en el presente trabajo, presentan grandes coincidencias y patrones comunes con otros trabajos de suelos y rizósfera, tanto de ambientes tropicales como templados. Estos hallazgos sugieren la existencia de factores que empujan hacia su conservación, dando forma a la estructura de las microbiotas

procariotas asociadas a plantas y suelo a lo largo de una gran variedad de ambientes y especies hospedaderas (Coleman-Derr *et al.*, 2016).

4.3 EUCARIOTAS

Análisis general

El número inicial de lecturas (*reads* crudos) fue muy similar al comúnmente obtenido en otros trabajos (e.g. Özkurt *et al.*, 2020; Ozkurt *et al.*, 2019; Edwards *et al.*, 2015). Así también el número final de secuencias utilizadas (luego de la limpieza y filtrado) fue similar al de otros trabajos (e.g. Lupatini *et al.*, 2017; Rojas-Herrera *et al.*, 2015). Lo cual señala que tanto el esfuerzo de secuenciación como el procesamiento de las secuencias otorgaron números de secuencias típicos en el estado del arte.

Índices ecológicos

En este trabajo, se logró capturar a más del 90% de los OTUs predichos por el índice de Chao1 a nivel de orden, en todas las muestras. Aun cuando, como es de esperarse en muestras metagenómicas de suelo y rizósfera (e.g. Edwards *et al.*, 2015; Yun *et al.*, 2014), no se alcanzó a capturar todos los órdenes.

A nivel de phylum y orden, no se apreció ningún patrón distintivo que distinguiera con riego de sin riego o temporada seca de temporada de lluvias, en cuanto a los índices de diversidad, equidad y riqueza estudiados. Esto sugiere que, al igual que en procariotas, las diferentes características de suelo y las temporadas de muestreo no están alterando diferencialmente estas comunidades fúngicas a nivel de los índices ecológicos.

Interesantemente, se observó mayor riqueza en 2 de las 4 muestras de rizósfera, con respecto a las de suelo, aunque cabe señalar que la diferencia no resultó muy grande; no obstante, este fenómeno ya se observó en comparaciones de poblaciones de procariotas en otros trabajos (Ortiz *et al.*, 2020; Fitzpatrick *et al.*, 2018). En estos reportes sugieren que la mayor riqueza en la rizósfera con respecto del suelo fuese una característica de los suelos tropicales, los cuales, generalmente presentan carencias en ciertos nutrientes, lo cual ha sido descrito para suelos yucatecos (Santillán *et al.*, 2021). Santillán y colaboradores (2021), en un trabajo reciente, comentan que los suelos kársticos presentan deficiencia de fósforo (lo cual también se observó en el presente trabajo).

Asignación taxonómica y coeficiente de similitud

A nivel de phylum, las abundancias relativas de OTUs estuvieron dominadas por **Ascomycota** y **Basidiomycota**, lo cual ha sido ampliamente reportado en rizósfera y suelo de muchas especies vegetales (Trivedi *et al.*, 2020; Hacquard *et al.*, 2017), indicando que los suelos analizados no tuvieron particularidades en este aspecto. Además, se ha señalado que el establecimiento de las comunidades fúngicas en rizósfera se suele ver afectado por variaciones estocásticas, *i.e.* principalmente debidas a factores biogeográficos/ambientales (Trivedi *et al.*, 2020; Hacquard *et al.*, 2017). De hecho, a niveles taxonómicos inferiores (orden, familia y género) resulta más difícil observar patrones en la conformación de estas comunidades asociadas a las plantas. Esto coincide con los resultados obtenidos aquí, ya que a nivel de orden se observó mayor variabilidad entre las muestras en comparación de lo observado a nivel de phylum. Curiosamente, el phylum Glomeromycota estuvo ausente. Se estima que más de 6,000 especies vegetales (2% de las especies vegetales) forman asociaciones micorrízicas con 20,000 a 25,000 especies fúngicas (menos de 1% de las especies fúngicas), pertenecientes a los phyla Ascomycota, Basidiomycota y Glomeromycota, permitiendo a las plantas una más eficiente captación de nutrientes (Terhonen *et al.*, 2019; Zeilinger *et al.*, 2016; Veneault-Fourrey *et al.*, 2013). No obstante, su importancia se refleja en que los hongos micorrízicos, en cuanto a su biomasa, representan el mayor grupo fúngico en suelo (Olsson *et al.*, 1999).

Se ha descrito que hongos del phylum Basidiomycota presentan mayor abundancia relativa en suelo mientras que los del phylum Ascomycota son más abundantes en compartimentos vegetales *i.e.*, rizósfera y endófitos; esto en ambientes templados (Terhonen *et al.*, 2019; Hui *et al.*, 2016). Por el contrario, se ha descrito dominio de Ascomycota en varias especies vegetales en ambientes semiáridos, y se ha propuesto que esta sea una característica diferenciadora en estos ambientes (Coleman-Derr *et al.*, 2016; Fonseca-García *et al.*, 2016; Porras-Alfaro *et al.*, 2011). Esto podría explicar que no se haya observado mayor abundancia relativa de Basidiomycota en suelo y de Ascomycota en rizósfera lo cual ha sido mayormente reportado.

En el presente estudio, con excepción de una muestra de suelo, se apreció mayor abundancia relativa del phylum **Ascomycota** en todas las muestras. Al interior de las

muestras, se observó mayor abundancia en suelos **con riego** vs sin riego y en temporada de **lluvia** vs temporada seca.

El análisis de disimilitud permitió señalar que la mayor diferencia entre las abundancias relativas fue observada con respecto al phylum **Basidiomycota**, presentando mayor abundancia relativa en suelos **sin riego**.

La ausencia del phylum **Glomeromycota** en las muestras de este estudio podría deberse a que el presente trabajo no incluye el estudio de microorganismos al interior de la raíz *a.k.a.*, endófitos, entre estos se encuentran hongos endomicorrízicos AMF (*arbuscular mycorrhizal fungi*) siendo la mayoría miembros de este phylum (Schlaeppli *et al.*, 2016). Otra explicación es la existencia de un sesgo en los primers utilizados ya que se ha reportado que los denominados “primers fúngicos universales” fallan en amplificar miembros de este phylum (Schlaeppli *et al.*, 2016; K. J. Martin & Rygielwicz, 2005). Por lo cual la selección de primers específicos, así como investigar compartimentos endófitos, son necesarios para confirmar la razón de su ausencia en este estudio.

Los órdenes Hypocreales, Pleosporales, Sordariales y “No asignado” fueron los más abundantes en el phylum Ascomycota mientras Agaricales y “No asignado” (clase agaricomycetes) fueron los más abundantes en el phylum Basidiomycota.

Miembros del orden **Hypocreales** son reconocidos por sus colores brillantes, por lo general, amarillo, naranja y rojo además sus variados estilos de vida incluyendo saprófitos, endófitos y parásitos, de plantas, insectos y otros hongos (W. Zhang *et al.*, 2018; Berbee, 2001). Dentro del orden, podemos citar entre sus miembros a los importantes géneros *Trichoderma* y *Fusarium*, los cuales han sido encontrados a nivel de especie en el presente trabajo (ver anexo 10). Se ha descrito a *Trichoderma* como un biocontrolador de patógenos vegetales, así como un activador de ISR (*induced systemic resistance*, resistencia sistémica inducida) y de respuestas de captación de hierro en raíces, mediante componentes volátiles liberados localmente (Lemanceau *et al.*, 2017; Martínez-Medina *et al.*, 2017; Chandrashekara *et al.*, 2012). Y se ha asociado a la microbiota *core* de varias especies de plantas (Gopal & Gupta, 2016; Hartmann *et al.*, 2009). Por otro lado, *Fusarium* es un género común en muestras de suelo y en asociación con las plantas, con representantes patógenos vegetales, saprófitos oportunistas y productores de micotoxinas y hormonas vegetales

(Beacorn & Thiessen, 2021; Nett *et al.*, 2017; Coleman-Derr *et al.*, 2016; Baldwin *et al.*, 2014; Mazzola, 2002; Duijff *et al.*, 1999). Por todo esto se ha sugerido que Hypocreales se habría originado de un sistema de alimentación “basado en plantas” (Zhang *et al.*, 2018). Este orden presentó mayor abundancia relativa en el grupo con riego, el cual presentó niveles más altos de carbono orgánico, lo cual coincide con sus funciones en el decaimiento de materia orgánica vegetal.

El orden **Pleosporales** ha sido descrito desde suelo hasta endósfera en diversos trabajos incluyendo especies de *Agave* y especies de cactus (Coleman-Derr *et al.*, 2016; Fonseca-García *et al.*, 2016). Se ha descrito también como el orden dominante en compartimentos endosféricos de variedades silvestres y modernas de trigo (Özkurt *et al.*, 2020). Finalmente, se ha descrito mayor abundancia relativa del orden Pleosporales en rizósfera de variedades modernas de girasoles en comparación con sus parientes silvestres (Leff *et al.*, 2017). En este trabajo el orden Pleosporales, presentó mayor abundancia relativa en muestras con riego vs sin riego. La mayoría de sus miembros son saprotróficos, *i.e.*, para su nutrición dependen de los desechos de otros seres vivos, cadáveres, excrementos, hojas, etc (Zhang *et al.*, 2009). Esto explicaría la mayor abundancia relativa de este orden en las muestras con riego, las cuales presentaron mayor concentración de carbono orgánico, nitrógeno total y fósforo inorgánico con respecto de aquellas sin riego.

El orden **Agaricales** y el OTU “No asignado”, del phylum Basidiomycota y clase **Agaricomycetes** presentaron mayor abundancia relativa en las muestras sin riego con respecto de aquellas con riego.

Dentro del phylum Basidiomycota, la clase Agaricomycetes, se ha reportado que es la de mayor abundancia relativa en varios estudios de compartimentos endosféricos (Fonseca-García *et al.*, 2016; Hardoim *et al.*, 2015) además se ha sugerido que el ancestro más probable de este taxon sea un hongo saprotrófico descomponedor de la madera (Hibbett & Matheny, 2009). Se ha propuesto que la pérdida de ciertos genes (involucrados en la producción de toxinas vegetales y/o degradación de pared celular vegetal) ha permitido a estos hongos subsistir y desempeñar funciones simbióticas con las plantas, por lo que se le describe, así como a miembros del orden agaricales como hongos ectomicorrizicos (ECM) que generan asociaciones mutualistas con diferentes especies de árboles y permiten contrarrestar la limitación de nutrientes en bosques (Veneault-Fourrey *et al.*, 2013). Estas

asociaciones mutualistas simbióticas permitirían a los árboles acceder a fuentes de fósforo y nitrógeno (Veneault-Fourrey *et al.*, 2013). Elementos que en el análisis de las propiedades de suelo se encontraba en menor concentración en los suelos sin riego con respecto de aquellos con riego.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSIONES.

La interpretación de los resultados obtenidos, así como la bibliografía consultada apuntan a una alta permeabilidad de los suelos debido a su poca profundidad, esto sumado a la presencia de los árboles, actuando como “escudo”, estabilizan los parámetros del suelo medidos por lo que estos cambian poco entre las diferentes temporadas de muestreo.

Sí se observaron diferencias entre los sitios de muestreo en los parámetros de contenido de los iones Sodio, Calcio y carbonatos, en el contenido de carbono orgánico, nitrógeno y fósforo inorgánico, así como en los niveles de conductividad y pH. Las diferencias en los niveles de carbono orgánico total, nitrógeno total y fósforo inorgánico pueden explicar las diferencias en algunos órdenes de eucariotas y procariotas asociados con algunas de las muestras estudiadas.

No se observaron patrones diferenciales en la diversidad de las comunidades microbianas, comparando las muestras de suelo vs rizósfera, con riego vs sin riego y temporada de lluvia vs seca. Esto, contradice las hipótesis planteadas y sugiere que las comunidades microbianas estudiadas presentan gran resiliencia a los cambios, aunque no queda claro si esta resiliencia es consecuencia de la interacción con los árboles de ciricote o de un proceso de autoregulación de estas comunidades microbianas.

La estructura de las microbiotas de árboles de ciricote con riego y sin riego, así como los parámetros analizados de los suelos, fueron muy similares aunque no idénticos. Por ello es plausible concluir que esta condición tiene poco impacto en las comunidades microbianas asociadas a árboles de ciricote.

No obstante, fue posible observar y explicar (aunque sea hipotéticamente) patrones de comportamiento en cuanto a la estructura de las comunidades estudiadas (abundancias relativas de OTUs) a nivel de phylum y orden de las comunidades procariotas y eucariotas. Todos los taxa, hasta donde fueron identificados, han sido previamente reportados en estudios de suelo, rizósfera y endosfera de plantas, desde árboles a césped y en

ecosistemas templados y tropicales. Así como también se reporta la ausencia de importantes taxa en las muestras estudiadas (Cyanobacteria y Glomeromycota).

Lo más destacable en procariontes, resulta la elevada abundancia relativa del phylum Thaumarchaeota en todas las muestras. Y el phylum Firmicutes, el cual presentó marcadas diferencias en su abundancia relativa entre las muestras de suelo y rizósfera esta diferencia en abundancia relativa se mantuvo a nivel de orden para Bacillales. También a nivel de orden, se observó mayor abundancia relativa de Gaiellales a lo reportado previamente por otros autores (entre 5 a 9 veces mayor abundancia relativa). Se necesita confirmar estas diferencias y evaluar sus posibles funciones biológicas.

Para eucariotas, resulta destacable la presencia y mayor abundancia relativa en las muestras con riego del orden Hypocreales al cual pertenecen importantes especies de importancia biotecnológica. De igual modo, se necesita confirmar estas diferencias y evaluar su posible función biológica.

Resultan escasos los ejemplos de trabajos que utilizan el enfoque de muestreo que aquí se siguió, es decir, el estudio por separado de suelo y rizósfera en árboles nativos. En ese sentido, además del presente trabajo se pueden mencionar a Álvarez-Rivera y colaboradores (2021) con el estudio de la microbiota edáfica de *Brosimum alicastrum*, y Ortiz y colaboradores (2020) con *Tabebuia heterophylla*, por lo que estos tres trabajos ofrecen un aporte metodológico para este tipo de estudios. El presente trabajo sobre ciricote aporta el análisis de las relaciones y diferencias entre las comunidades de suelo y rizósfera de una especie vegetal importante de la zona maya en México, Guatemala y Belice.

5.2 PERSPECTIVAS

Cabe preguntarse si estas diferencias reportadas, principalmente en las abundancias de los OTUs del orden Bacillales y el phylum Firmicutes en suelo y rizósfera, y la relativamente elevada abundancia relativa del orden Gaiellales en las muestras estudiadas; están presentes en suelo y rizosferas de otros árboles de ciricote de la región, ya sea en regiones aún más conservadas y más perturbadas. Así como aislar y evaluar la función biológica de estos miembros de las comunidades microbianas.

Por otro lado, se ha propuesto que el estudio de comunidades microbianas (bacterianas y fúngicas), así como de los parámetros del suelo, en estado conservado son una guía para trabajos de restauración de ecosistemas afectados por diversos factores, naturales o por influencia humana (Fan *et al.*, 2019). Los resultados de este trabajo pueden ser la referencia de comunidades microbianas de árboles nativos de la región crecidos en condiciones controladas. El manejo de ciricote puede ser un ejemplo no sólo para el manejo de este cultivo, sino para el manejo de otros árboles de clima tropical.

Sería importante ampliar el estudio del ciricote a más puntos incluyendo áreas selváticas poco perturbadas, particularmente en sitios de crecimiento de estos árboles con fenología y botánica ya caracterizados (como es el caso de trabajos citados en este texto). Asimismo, incluir huertos familiares maya de la región, y comparar los efectos de la remoción de hojarasca y permanencia in situ de ésta. Esto permitirá concluir si el manejo del ciricote es sostenible, y de serlo, convertirse en un modelo de manejo para otros cultivos.

Asimismo, la información obtenida en este trabajo es importante para integrar a otros estudios que se están llevando a cabo sobre ciricote (relaciones con insectos, relaciones con otras plantas, los procesos de floración de la planta del ciricote, etc.), con lo cual se entenderá la compleja biología de esta planta.

BIBLIOGRAFÍA

Abarenkov, K., Zirk, A., Piirmann, T., Pöhönen, R., Ivanov, F., Nilsson, R. H., & Kõljalg, U. (2020). (2020): UNITE QIIME release for Fungi. Version 04.02.2020. UNITE Community. <https://doi.org/https://doi.org/10.15156/BIO/786385>

Albuquerque, L., & da Costa, M. S. (2014). The Family Gaiellaceae. In E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes: Actinobacteria* (Issue July, pp. 357–360). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30138-4_394

Álvarez-Rivera, O. O., Estrada-Medina, H., Jiménez-Osornio, J. J., O'Connor-Sánchez, I. A., Navarro-Alberto, J. A., Ferrer, M. M., Canto-Canché, B., & Tzec-Gamboa, M. del C. (2021). Differences in oxalate–carbonate pathway of *Brosimum alicastrum* in karst homegarden and forest soils. *Soil Science Society of America Journal*, 85(3), 691–702. <https://doi.org/10.1002/saj2.20228>

Ángeles-González, L. E., Martínez-Meyer, E., Yañez-Arenas, C., Velázquez-Abunader, I., López-Rocha, J. A., Torrejón-Magallanes, J., & Rosas, C. (2021). Climate change effect on *Octopus maya* (Voss and Solís-Ramírez, 1966) suitability and distribution in the Yucatan Peninsula, Gulf of Mexico: A correlative and mechanistic approach. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 260, 107502. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecss.2021.107502>

Baker, K. F., & Cook, R. J. (1974). Biological Control of Plant Pathogens. In *Biological control of plant pathogens*. W.H. Freeman. <https://books.google.com.mx/books?id=aJJ0vQEACAAJ>

Baldwin, T. T., Zitomer, N. C., Mitchell, T. R., Zimeri, A. M., Bacon, C. W., Riley, R. T., & Glenn, A. E. (2014). Maize seedling blight induced by *fusarium verticillioides*: Accumulation of fumonisin B1 in leaves without colonization of the leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(9), 2118–2125. <https://doi.org/10.1021/jf5001106>

Barns, S. M., Takala, S. L., & Kuske, C. R. (1999). Wide Distribution and Diversity of Members of the Bacterial Kingdom Acidobacterium in the Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1731–1737. <https://doi.org/10103274>

Baron, S. (1996). *Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.*

Bautista, F., Frausto, O., Ihl, T., & Aguilar, Y. (2015). Actualización del mapa de suelos del estado de Yucatán México: Enfoque geomorfopedológico y WRB. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 2(6), 303–315.

Beacorn, J. A., & Thiessen, L. D. (2021). First Report of *Fusarium lacertarum* Causing Fusarium Head Blight on Sorghum in North Carolina. In *Plant Disease* (Vol. 105).

Becraft, E. D., Woyke, T., Jarett, J., Ivanova, N., Godoy-Vitorino, F., Poulton, N., Brown, J. M., Brown, J., Lau, M. C. Y., Onstott, T., Eisen, J. A., Moser, D., & Stepanauskas, R. (2017). Rokubacteria: Genomic Giants among the Uncultured Bacterial Phyla. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2264. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02264>

Berbee, M. L. (2001). The phylogeny of plant and animal pathogens in the Ascomycota. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59(4), 165–187. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/pmpp.2001.0355>

Berg, G., Köberl, M., Rybakova, D., Müller, H., Grosch, R., & Smalla, K. (2017). Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(5). <https://doi.org/10.1093/femsec/fix050>

Bernier, R. (1999). Análisis de Suelo. Metodología e Interpretación. In *Instituto de Investigaciones Agropecuarias* (p. 13).

Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G. A., & Caporaso, J. G. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, 6(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Author Correction: Reproducible, interactive, scalable

and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(9), 1091. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0252-6>

Bremner, J. M., & Sparks, D. L. (1996). Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods. *Soil Science of America and American Society of Agronomy, SSSA Book Series Madison-USA*, 5.

Bulgarelli, D., Garrido-Oter, R., Münch, P. C., Weiman, A., Dröge, J., Pan, Y., McHardy, A. C., & Schulze-Lefert, P. (2015). Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host and Microbe*, 17(3), 392–403. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.011>

Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 807–838. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

Cámara Romero, J. L., Jiménez-Osornio, J., & Estrada-Medina, H. (2016). *Distribucion geográfica potencial del siricote (Cordia dodecandra A.DC) en la península de Yucatán, México*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México.

Campos B., S. M., Jiménez-Osornio, J. J., & Barrientos, R. (2015). Análisis dasométrico de plantaciones de siricote (*Cordia dodecandra* A. DC.) bajo tres tipos de manejo en Xmatkuil, Yucatán. *Madera y Bosques*, 21(3), 47–54.

Canché-Collí, C., & Canto, A. (2014). Distylous traits in *Cordia dodecandra* and *Cordia sebestena* (Boraginaceae) from the Yucatan Peninsula. *Botanical Sciences*, 92(2), 289–297.

Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., ...

Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>

Chandrashekara, C., Kumar, R., Bhatt, J. C., & Chandrashekara, K. N. (2012). Suppressive Soils in Plant Disease Management. *Eco-Friendly Innovative Approaches in Plant Disease Management, January 2012*, 241–256. <https://doi.org/10.13140/2.1.5173.7608>

Chapelle, E., Mendes, R., Bakker, P. A. H., & Raaijmakers, J. M. (2016). Fungal invasion of the rhizosphere microbiome. *ISME Journal*, 10(1), 265–268. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.82>

Chen, K., & Pachter, L. (2005). Bioinformatics for Whole-Genome Shotgun Sequencing of Microbial Communities. *PLOS Computational Biology*, 1(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010024>

Coleman-Derr, D., Desgarennes, D., Fonseca-Garcia, C., Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T., North, G., Visel, A., Partida-Martinez, L. P., & Tringe, S. G. (2016). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native Agave species. *New Phytologist*, 209(2), 798–811. <https://doi.org/10.1111/nph.13697>

Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, 19, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>

CONABIO. (2020). *Vecinos verdes*. Comisión Nacional Para El Conocimiento y Uso de La Biodiversidad.

[https://www.biodiversidad.gob.mx/Difusion/cienciaCiudadana/aurbanos/ficha.php?item=Cordia dodecandra](https://www.biodiversidad.gob.mx/Difusion/cienciaCiudadana/aurbanos/ficha.php?item=Cordia+dodecandra)

Cook, R. J., Thomashow, L. S., Weller, D. M., Fujimoto, D., Mazzola, M., Bangera, G., & Kim, D. S. (1995). Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10), 4197–4201. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4197>

Cordovez, V., Dini-Andreote, F., Carrión, V. J., & Raaijmakers, J. M. (2019). Ecology and evolution of plant microbiomes. *The Annual Review of Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)81046-9](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)81046-9)

Da Rocha, U. N., Plugge, C. M., George, I., Van Elsas, J. D., & Van Overbeek, L. S. (2013). The rhizosphere selects for particular groups of Acidobacteria and Verrucomicrobia. *PLoS ONE*, *8*(12), 16–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082443>

Dakora, F. D., & Phillips, D. A. (2002). Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. In *Food Security in Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants' Genetic Capabilities* (pp. 201–213). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1570-6_23

DE SILVA, D. L. R., HETHERINGTON, A. M., & MANSFIELD, T. A. (1996). Where does all the calcium go? Evidence of an important regulatory role for trichomes in two calcicoles. *Plant, Cell & Environment*, *19*(7), 880–886. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1996.tb00424.x>

Debnath, R., Yadav, A., Gupta, V. K., Singh, B. P., Handique, P. J., & Saikia, R. (2016). Rhizospheric bacterial community of endemic *Rhododendron arboreum* Sm. Ssp. *delavayi* along eastern Himalayan slope in Tawang. *Frontiers in Plant Science*, *7*(September), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01345>

Dicke, M. (2009). Behavioural and community ecology of plants that cry for help. *Plant, Cell and Environment*, *32*(6), 654–665. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01913.x>

Dimitrios, F., Manfred, B., Robert, R., Kerrie, B., A., B. R., Bernard, H., T., M. A., Robert, O., W., S. J., S., Y. J., Andrea, A., Isabelle, B., Alex, B., Alexis, C., Alex, C., M., C. P., P., de V. R., Patricia, F., Keisha, F., ... S., H. D. (2012). The Paleozoic Origin of Enzymatic Lignin Decomposition Reconstructed from 31 Fungal Genomes. *Science*, *336*(6089), 1715–1719. <https://doi.org/10.1126/science.1221748>

Doebley, J. F., Gaut, B. S., & Smith, B. D. (2006). The Molecular Genetics of Crops Domestication. *Cell*, *127*(7), 1309–1321. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.006> Ten

Dominati, E., Patterson, M., & Mackay, A. (2010). A framework for classifying and quantifying the natural capital and ecosystem services of soils. *Ecological Economics*, 69(9), 1858–1868. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2010.05.002>

Duijff, B. J., Recorbet, G., Bakker, P. A. H. M., Loper, J. E., & Lemanceau, P. (1999). Microbial antagonism at the root level is involved in the suppression of Fusarium wilt by the combination of nonpathogenic Fusarium oxysporum Fo47 and Pseudomonas putida WCS358. *Phytopathology*, 89(11), 1073–1079. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.11.1073>

Duno, R., Can, L. L., & Ancona Ayora, R. E. (2010). *Flora: Península de Yucatán*. Página Herbario CICY. [https://www.cicy.mx/sitios/flora digital/ficha_virtual.php?especie=1068](https://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha_virtual.php?especie=1068)

Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N. K., Bhatnagar, S., Eisen, J. A., Sundaresan, V., & Jeffery, L. D. (2015). Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(8), E911–E920. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414592112>

Expósito, R. G., de Bruijn, I., Postma, J., & Raaijmakers, J. M. (2017). Current insights into the role of Rhizosphere bacteria in disease suppressive soils. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02529>

Fan, Z., Lu, S., Liu, S., Guo, H., Wang, T., Zhou, J., & Peng, X. (2019). Changes in Plant Rhizosphere Microbial Communities under Different Vegetation Restoration Patterns in Karst and Non-karst Ecosystems. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44985-8>

FAO. (n.d.). *Definiciones | Portal de Suelos de la FAO | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Retrieved May 25, 2020, from <http://www.fao.org/soils-portal/about/definiciones/es/>

FAO. (2009). Guía para la descripción de suelos - Cuarta edición. Roma. In *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*. file:///C:/Users/Alina Belen Ortiz/Downloads/a0541s00 (1).pdf

FAO, O. D. L. N. U. P. L. A. Y. L. A. (2016). Base referencial mundial del recurso suelo 2014. Sistema internacional de clasificación de suelos y la creación de leyendas de mapas de suelos. In *Security* (Vol. 24, Issue 2). <https://doi.org/10.1002/9781119482819>

FAO, O. D. L. N. U. P. L. A. Y. L. A. (2021). *Permeabilidad del suelo*. http://www.fao.org/fishery/static/FAO_Training/FAO_Training/General/x6706s/x6706s09.htm

Ferrer, M. M., Montañez-Escalante, P. I., Ruenes-Morales, M. del R., Estrada-Medina, H., & Jiménez-Orsorio, J. J. (2019). Growing out of the tropical forests: domestication syndrome of native Mesoamerican trees in Mayan homegardens. *Genetic Resources and Crop Evolution*. <https://doi.org/10.1007/s10722-019-00833-2>

Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Publishing Group*, 15(10), 579–590. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87>

Fierer, N., Bradford, M., & Jackson, R. (2007). Toward an Ecological Classification of Soil Bacteria. *Ecology*, 88, 1354–1364. <https://doi.org/10.1890/05-1839>

Fierer, N., & Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3), 626–631. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507535103>

Firmicutes. (n.d.). <https://doi.org/10.1093/oi/authority.20110803095819878>

Fitzpatrick, C. R., Copeland, J., Wang, P. W., Guttman, D. S., Kotanen, P. M., & Johnson, M. T. J. (2018). Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(6), E1157–E1165. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717617115>

Fonseca-García, C., Coleman-Derr, D., Garrido, E., Visel, A., Tringe, S. G., & Partida-Martínez, L. P. (2016). The Cacti Microbiome: Interplay between habitat-filtering and host-specificity. *Frontiers in Microbiology*, 7(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00150>

García Gil, G., & Graniel Castro, E. (2010). Geología. In R. Durán & M. Méndez (Eds.), *Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán* (pp. 4–6). CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA.

Gee, G. W., & Bauder, J. W. (1986). Particle-size Analysis. In *Methods of Soil Analysis* (pp. 383–411). <https://doi.org/https://doi.org/10.2136/sssabookser5.1.2ed.c15>

Gilluly, J., Waters, A. C., & Woodford, A. O. (1975). *Principles of Geology*. W.H. Freeman. <https://books.google.com.mx/books?id=KDadtgEACAAJ>

Gopal, M., & Gupta, A. (2016). Microbiome Selection Could Spur Next-Generation Plant Breeding Strategies. *Frontiers in Microbiology*, 7(December), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01971>

Grajales Puc, J. A. (2018). *Fenología de Spondias purpurea L . (ANACARDIACEAE) y Cordia dodecandra A . DC . (BORAGINACEAE) en poblaciones silvestres y cultivadas*. Universidad Autónoma de Yucatán.

Griffiths, R. I., Thomson, B. C., James, P., Bell, T., Bailey, M., & Whiteley, A. S. (2011). The bacterial biogeography of British soils. *Environmental Microbiology*, 13(6), 1642–1654. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02480.x>

Hacquard, S., Spaepen, S., Garrido-Oter, R., & Schulze-Lefert, P. (2017). Interplay Between Innate Immunity and the Plant Microbiota. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), 565–589. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035623>

Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., & Sessitsch, A. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293–320. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00050-14>

Hartmann, A., Schmid, M., van Tuinen, D., & Berg, G. (2009). Plant-driven selection of microbes. *Plant and Soil*, 321(1–2), 235–257. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9814-y>

Hayden, H. L., Mele, P. M., Bougoure, D. S., Allan, C. Y., Norng, S., Piceno, Y. M., Brodie, E. L., Desantis, T. Z., Andersen, G. L., Williams, A. L., & Hovenden, M. J. (2012). Changes

in the microbial community structure of bacteria, archaea and fungi in response to elevated CO₂ and warming in an Australian native grassland soil. *Environmental Microbiology*, 14(12), 3081–3096. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02855.x>

Helmke, P. A., & Sparks, D. L. (1996). Lithium, sodium, potassium, rubidium, and cesium. *Methods of Soil Analysis: Part 3 Chemical Methods*, 5, 551–574.

Hibbett, D. S., & Matheny, P. B. (2009). The relative ages of ectomycorrhizal mushrooms and their plant hosts estimated using Bayesian relaxed molecular clock analyses. *BMC Biology*, 7(1), 13. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-13>

<https://rdp.cme.msu.edu/>. (n.d.). Retrieved January 13, 2020, from https://rdp.cme.msu.edu/https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/courses/sequencing-illumina-technology-wbt-esp/story_html5.html?iframe. (2020). Secuenciación: Tecnología de Illumina. https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/courses/sequencing-illumina-technology-wbt-esp/story_html5.html?iframe

Huante, P., Rincon, E., & Allen, E. B. (1993). Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae on seedling growth of four tree species from the tropical deciduous forest in Mexico. *Mycorrhiza*, 2(3), 141–145. <https://doi.org/10.1007/BF00203860>

Hugenholtz, P., Goebel, B. M., & Pace, N. R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, 180(18), 4765–4774. <https://doi.org/10.1128/jb.180.24.6793-6793.1998>

Hui, S., Eeva, T., Andriy, K., Hanna, T., Hongxin, C., O., O. A., Jussi, H., Annegret, K., Risto, K., Harri, V., O., A. F., & E., K. J. (2016). Dominant Tree Species and Soil Type Affect the Fungal Community Structure in a Boreal Peatland Forest. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(9), 2632–2643. <https://doi.org/10.1128/AEM.03858-15>

IUSS Working Group. (2015). Base referencial mundial del recurso suelo 2014 Sistema internacional de clasificación de suelos. In *Informes sobre recursos mundiales de suelos* 106, FAO, Roma (Vol. 24, Issue 2). <https://www.iec.cat/mapasols/DocuInteres/PDF/Llibre59.pdf>

Jaber, E., Xiao, C., & Asiegbu, F. O. (2014). Comparative pathobiology of *Heterobasidion annosum* during challenge on *Pinus sylvestris* and *Arabidopsis* roots: an analysis of defensin gene expression in two pathosystems. *Planta*, 239(3), 717–733. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-2012-z>

Jankiewicz, L. S., Colinas León, M. T., & Martínez Alboris, V. M. (1986). Cupapé (*Cordia dodecandra* DC., Boraginaceae) a fruit tree in the process of domestication in Mexico. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 55(1), 115–127. <https://doi.org/10.5586/asbp.1986.013>

Janssen, P. H. (2006). Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1719–1728. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1719>

Jeffrey, D. W. (2012). *Soil-Plant Relationships: An Ecological Approach*. Springer Netherlands. <https://books.google.com.mx/books?id=MlpgBgAAQBAJ>

Jousset, A., Bienhold, C., Chatzinotas, A., Gallien, L., Gobet, A., Kurm, V., Küsel, K., Rillig, M. C., & Rivett, D. W. (2017). Where less may be more: how the rare biosphere pulls ecosystems strings. *The ISME Journal*, 11, 853–862. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.174>

Karamanoli, K., Menkissoglu-Spiroudi, U., Bosabalidis, A. M., Vokou, D., & Constantinidou, H. I. A. (2005). Bacterial colonization of the phyllosphere of nineteen plant species and antimicrobial activity of their leaf secondary metabolites against leaf associated bacteria. *Chemoecology*, 15(2), 59–67. <https://doi.org/10.1007/s00049-005-0297-5>

Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

Kielak, A. M., Barreto, C. C., Kowalchuk, G. A., van Veen, J. A., & Kuramae, E. E. (2016). The ecology of Acidobacteria: Moving beyond genes and genomes. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAY), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00744>

Kopecky, J., Kyselkova, M., Omelka, M., Cermak, L., Novotna, J., Grundmann, G. L., Moenne-Loccoz, Y., & Sagova-Mareckova, M. (2011). Actinobacterial community

dominated by a distinct clade in acidic soil of a waterlogged deciduous forest. *FEMS Microbiology Ecology*, 78, 386–394. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01173.x>

Kuo, S. (1996). Phosphorus, Methods of Soil Analysis Part 3-Chemical Methods SSSA Book Series: 5 Soil. *Science Society of America, Madison, WI*.

Lee, K., Backer, P. De, Aono, T., Liu, C., Suzuki, S., Suzuki, T., Kaneko, T., Yamada, M., Tabata, S., Kupfer, D. M., Najar, F. Z., Wiley, G. B., Roe, B., Binnewies, T. T., Ussery, D. W., Haeze, W. D., Den, J., Gevers, D., Vereecke, D., ... Oyaizu, H. (2008). The genome of the versatile nitrogen fixer *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *BMC Genomics*, 9:271, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-271>

Leff, J. W., Lynch, R. C., Kane, N. C., & Fierer, N. (2017). Plant domestication and the assembly of bacterial and fungal communities associated with strains of the common sunflower, *Helianthus annuus*. *New Phytologist*, 214, 412–423. <https://doi.org/10.1111/nph.14323>

Legay, N., Baxendale, C., Grigulis, K., Krainer, U., Kastl, E., Schloter, M., Bardgett, R. D., Arnoldi, C., Bahn, M., Dumont, M., Pommier, T., Clément, J. C., & Lavorel, S. (2014). Contribution of above- and below-ground plant traits to the structure and function of grassland soil microbial communities. *Annals of Botany*, 114(5), 1011–1021. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu169>

Lemanceau, P., Blouin, M., Muller, D., & Moëgne-Loccoz, Y. (2017). Let the Core Microbiota Be Functional. *Trends in Plant Science*, 22(7), 583–595. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.04.008>

Liu, Y., Chang, Q., Guo, X., & Yi, X. (2017). Bacterial diversity and community structure in lettuce soil are shifted by cultivation time. *AIP Conference Proceedings*, 1864(1), 20094. <https://doi.org/10.1063/1.4992911>

Loeppert, R. H., & Suarez, D. L. (1996). Carbonate and gypsum. *Methods of Soil Analysis. Part, 3*, 437–474.

Lupatini, M., Korthals, G. W., de Hollander, M., Janssens, T. K. S., & Kuramae, E. E. (2017). Soil microbiome is more heterogeneous in organic than in conventional farming system. *Frontiers in Microbiology*, 7(JAN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02064>

Maidak, B. L., Olsen, G. J., Larsen, N., Overbeek, R., McCaughey, M. J., & Woese, C. R. (1997). The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Research*, 25(1), 109–110. <https://doi.org/10.1093/nar/25.1.109>

Mardero, S., Nickl, E., Schmook, B., Schneider, L., & Rogan, J. (2012). Sequias en el sur de la península de Yucatan: análisis de la variabilidad anual y estacional de la precipitación (Droughts in the Southern Yucatan Peninsula: analysis of the annual and seasonal precipitation variability). *Investigaciones Geográficas (Mx)*, 78, 19–33.

Martin, F., Aerts, A., Ahrén, D., Brun, A., Danchin, E. G. J., Duchaussoy, F., Gibon, J., Kohler, A., Lindquist, E., Pereda, V., Salamov, A., Shapiro, H. J., Wuyts, J., Blaudez, D., Buée, M., Brokstein, P., Canbäck, B., Cohen, D., Courty, P. E., ... Grigoriev, I. V. (2008). The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature*, 452(7183), 88–92. <https://doi.org/10.1038/nature06556>

Martin, K. J., & Rygiewicz, P. T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*, 5(1), 28. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-28>

Martínez-Medina, A., Van Wees, S. C. M., & Pieterse, C. M. J. (2017). Airborne signals from *Trichoderma* fungi stimulate iron uptake responses in roots resulting in priming of jasmonic acid-dependent defences in shoots of *Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum*. *Plant Cell and Environment*, 40(11), 2691–2705. <https://doi.org/10.1111/pce.13016>

Mazzola, M. (2002). Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 81(1–4), 557–564. <https://doi.org/10.1023/A:1020557523557>

McDonald, D., Clemente, J. C., Kuczynski, J., Rideout, J. R., Stombaugh, J., Wendel, D., Wilke, A., Huse, S., Hufnagle, J., Meyer, F., Knight, R., & Caporaso, J. G. (2012). The

Biological Observation Matrix (BIOM) format or: how I learned to stop worrying and love the ome-ome. *GigaScience*, 1(1), 7. <https://doi.org/10.1186/2047-217X-1-7>

McKinney, W. (2010). Data Structures for Statistical Computing in Python. In S. van der Walt & J. Millman (Eds.), *Proceedings of the 9th Python in Science Conference* (pp. 51–56).

Morales, E., & Herrera, L. (2009). Ciricote (*Cordia dodecandra* A. DC.). Protocolo para su colecta, beneficio y almacenaje. *Programa De Germoplasma Forestal Estado De Yucatán*, 1–21.

Müller, D. B., Vogel, C., Bai, Y., & Vorholt, J. A. (2016). The Plant Microbiota: Systems-Level Insights and Perspectives. *Annual Review of Genetics*, 50(1), 211–234. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-034952>

Navarro-Noya, Y. E., Jan-Roblero, J., González-Chávez, D. C., Hernández-Gama, R., & Hernández-Rodríguez, C. (2010). Bacterial communities associated with the rhizosphere of pioneer plants (*Bahia xylopoda* and *Viguiera linearis*) growing on heavy metals-contaminated soils. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 97(4), 335–349. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9413-9>

Nelson, D. W., & Sommers, L. E. (1996). Total carbon, organic carbon, and organic matter. *Methods of Soil Analysis: Part 3 Chemical Methods*, 5, 961–1010.

Nett, R. S., Montanares, M., Marcassa, A., Lu, X., Nagel, R., Charles, T. C., Hedden, P., Rojas, M. C., Peters, R. J., Carver, R. J., Chem, N., & Author, B. (2017). Elucidation of gibberellin biosynthesis in bacteria reveals convergent evolution HHS Public Access Author manuscript. *Nat Chem Biol*, 13(1), 69–74. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2232>.Elucidation

Neuendorf, K. K. E., Mehl, J. P. J., & Jackson, J. A. (2011). *Glossary of Geology*. Springer Berlin Heidelberg. <https://books.google.com.mx/books?id=LL43MAEACAAJ>

Noble, I. (2003, April 14). *BBC NEWS | Science/Nature | Human genome finally complete*. <http://news.bbc.co.uk/2/hi/science/nature/2940601.stm>

NOM-021-SEMARNAT. (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. In *Diario Oficial de la Federación* (p. 85).

Oh, Y. M., Kim, M., Lee-cruz, L., Lai-Hoe, A., Go, R., Ainuddin, N., Rahim, R. A., Shukor, N., & Adams, J. M. (2012). Distinctive Bacterial Communities in the Rhizoplane of Four Tropical Tree Species. *Microbial Ecology*, 64(July), 1018–1027. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0082-2>

Olsson, P. A., Thingstrup, I., Jakobsen, I., & Bååth, E. (1999). Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(13), 1879–1887. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00119-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00119-4)

Ortiz, Y., Restrepo, C., Vilanova-Cuevas, B., Santiago-Valentin, E., Tringe, S. G., & Godoy-Vitorino, F. (2020). Geology and climate influence rhizobiome composition of the phenotypically diverse tropical tree *Tabebuia heterophylla*. *PloS One*, 15(4), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231083>

Ozkurt, E., Hassani, M. A., Sesiz, U., Kunzel, S., Dagan, T., Ozkan, H., & Stukenbrock, E. H. (2019). Higher stochasticity of microbiota composition in seedlings of domesticated wheat compared to wild wheat. *BioRxiv*, 19(1), 76–83. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.1.76rus>

Özkurt, E., Hassani, M. A., Sesiz, U., Kunzel, S., Dagan, T., Özkan, H., Stukenbrock, E. H., & Pietro, A. Di. (2020). Seed-Derived Microbial Colonization of Wild Emmer and Domesticated Bread Wheat (*Triticum dicoccoides* and *T. aestivum*) Seedlings Shows Pronounced Differences in Overall Diversity and Composition. *MBio*, 11(6), e02637-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02637-20>

Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J., & Olsen, G. J. (1986). The Analysis of Natural Microbial Populations by Ribosomal RNA Sequences. In *Advances in Microbial Ecology* (pp. 1–55). https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0611-6_1

Palomo Buenfil, S. I. (2017). *Variación morfológica de la hoja de ciricote (Cordia dodecandra A. DC.) en poblaciones silvestres y huertos familiares de dos regiones de Yucatán*. Universidad Autónoma de Yucatán.

Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol*, 6, 763–775. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1987>

Patrick, W. H., Gambrell, R. P., & Faulkner, S. P. (1996). Redox Measurements of Soils. In *Methods of Soil Analysis* (pp. 1255–1273). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.c42>

Peay, K. G., Kennedy, P. G., & Bruns, T. D. (2008). Fungal Community Ecology: A Hybrid Beast with a Molecular Master. *BioScience*, 58(9), 799–810.

Pedregosa, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Michel, V., Thirion, B., Grisel, O., Blondel, M., Prettenhofer, P., Weiss, R., Dubourg, V., Vanderplas, J., Passos, A., Cournapeau, D., Brucher, M., Perrot, M., & Duchesnay, É. (2011). Scikit-learn: Machine learning in Python. *Journal of Machine Learning Research*, 12(Oct), 2825–2830.

Pérez-Jaramillo, J. E., Carrión, V. J., Bosse, M., Ferrão, L. F. V., De Hollander, M., Garcia, A. A. F., Ramírez, C. A., Mendes, R., & Raaijmakers, J. M. (2017). Linking rhizosphere microbiome composition of wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* to genotypic and root phenotypic traits. *ISME Journal*, 11(10), 2244–2257. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.85>

Pérez-Jaramillo, J. E., Carrión, V. J., de Hollander, M., & Raaijmakers, J. M. (2018). The wild side of plant microbiomes. *Microbiome*, 6(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0519-z>

Pérez-Jaramillo, J. E., Mendes, R., & Raaijmakers, J. M. (2016). Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. *Plant Molecular Biology*, 90(6), 635–644. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0337-7>

Pfeiffer, B., Fender, A. C., Lasota, S., Hertel, D., Jungkunst, H. F., & Daniel, R. (2013). Leaf litter is the main driver for changes in bacterial community structures in the rhizosphere of ash and beech. *Applied Soil Ecology*, 72, 150–160. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.06.008>

Porras-Alfaro, A., Herrera, J., Natvig, D. O., Lipinski, K., & Sinsabaugh, R. L. (2011). Diversity and distribution of soil fungal communities in a semiarid grassland. *Mycologia*, *103*(1), 10–21. <https://doi.org/10.3852/09-297>

Praeg, N., & Illmer, P. (2020). Microbial community composition in the rhizosphere of *Larix decidua* under different light regimes with additional focus on methane cycling microorganisms. *Scientific Reports*, *10*, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79143-y>

Pregitzer, K. S. (2002). Fine Roots of Trees: A New Perspective. *The New Phytologist*, *154*(2), 267–270. <http://www.jstor.org/stable/1513759>

Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PloS One*, *5*(3), e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>

Purugganan, M. D., & Fuller, D. Q. (2009). The nature of selection during plant domestication. *Nature*, *457*(7231), 843–848. <https://doi.org/10.1038/nature07895>

QIIME. (n.d.). Retrieved January 13, 2020, from <http://qiime.org/>

QIIME 2. (n.d.). Retrieved January 13, 2020, from <https://qiime2.org/>

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>

Quattrocchi, U. (2000). *CRC world dictionary of plant names: common names, scientific names, eponyms, synonyms, and etymology*. CRC Press.

Quer, P. F. (2000). *Diccionario de botánica*. Península. <https://books.google.com.mx/books?id=gyaJbwAACAAJ>

Rao, M. R., Nair, P. K. R., & Ong, C. K. (1997). Biophysical interactions in tropical agroforestry systems. *Agroforestry Systems*, *38*(1–3), 3–50. <https://doi.org/10.1023/a:1005971525590>

Rasmann, S., Köllner, T. G., Degenhardt, J., Hiltbold, I., Toepfer, S., Kuhlmann, U., Gershenson, J., & Turlings, T. C. J. (2005). Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*, 434(7034), 732–737. <https://doi.org/10.1038/nature03451>

Ravi, R. K., Walton, K., & Khosroheidari, M. (2018). Miseq: A next generation sequencing platform for genomic analysis. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1706, pp. 223–232). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_12

Reuter, M.-C. (2005). *Limiting factors for the establishment of Cordia dodecandra A. DC. and Bixa orellana L. on semi-arid calcareous soils in Yucatan, Mexico.* (Issue August). Rheinischen Friedrich Wilhelms Universität.

Reuter, M., Tiessen, H., Jimenez-Osornio, J. J., Pohlen, J., & Vlek, P. L. G. (2008). Establishment of *Cordia dodecandra* A.DC. with *Bixa orellana* L. on Calcareous Soils in Yucatán, Mexico. *ResearchGate*, 4(January 2015), 195–206. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6572-9_12

Rhoades, J. D. (1996). Salinity: Electrical conductivity and total dissolved solids. *Methods of Soil Analysis: Part 3 Chemical Methods*, 5, 417–435.

Rivera-Rivera, M. J., & Cuevas, E. (2020). First Insights into the Resilience of the Soil Microbiome of a Tropical Dry Forest in Puerto Rico. In M. Blumenberg, M. Shaaban, & A. Elgaml (Eds.), *Microorganisms*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90395>

Rodríguez-Santiago, B., & Armengol, L. (2012). Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnostico Prenatal*, 23(2), 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.diapre.2012.02.001>

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>

Rojas-Herrera, R. A., Ramos-Castillo, A. S., Estrada-Medina, H., De los Santos-Briones, C., Keb-Llanes, M. A., Barrientos-Medina, R. C., Peña-Ramírez, Y. J., & O'Connor-Sánchez, A. (2014). Living with detergents: pyrosequencing-based assessment of bacterial community

structures in soils subjected for decades to contamination by detergents. *Annals of Microbiology*, 65(3), 1313–1322. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0969-x>

Santillán, J., López-Martínez, R., Aguilar-Rangel, E. J., Hernández-García, K., Vásquez-Murrieta, M. S., Cram, S., & Alcántara-Hernández, R. J. (2021). Microbial diversity and physicochemical characteristics of tropical karst soils in the northeastern Yucatan peninsula, Mexico. *Applied Soil Ecology*, 165, 103969. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103969>

Schindlbacher, A., Rodler, A., Kuffner, M., Kitzler, B., Sessitsch, A., & Zechmeister-Boltenstern, S. (2011). Experimental warming effects on the microbial community of a temperate mountain forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(7), 1417–1425. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.03.005>

Schlaeppli, K., Bender, S. F., Mascher, F., Russo, G., Patrignani, A., Camenzind, T., Hempel, S., Rillig, M. C., & Heijden, M. G. A. Van Der. (2016). High-resolution community profiling of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 212, 780–791. <https://doi.org/10.1111/nph.14070>

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V. A., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., & Consortium, F. B. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241–6246. https://www.google.co.in/search?q=its1+region&biw=1366&bih=635&source=lnms&sa=X&ved=0ahUKEwilme-PwfTKAhWRCY4KHXL3BX8Q_AUIBSgA&dpr=1#q=nuclear+ribosomal+internal+transcribed+spacer+1+and+Candida

Shang, C., & Tiessen, H. (2003). Soil organic C sequestration and stabilization in karstic soils of Yucatan. *Biogeochemistry*, 62(2), 177–196. <https://doi.org/10.1023/A:1021123728639>

Simon, J. C., Marchesi, J. R., Mougel, C., & Selosse, M. A. (2019). Host-microbiota interactions: From holobiont theory to analysis. *Microbiome*, 7(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0619-4>

Singh, B., & Satyanarayana, T. (2011). Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17(2), 93–103. <https://doi.org/10.1007/s12298-011-0062-x>

Smit, E., Leeflang, P., Gommans, S., van den Broek, J., van Mil, S., & Wernars, K. (2001). Diversity and Seasonal Fluctuations of the Dominant Members of the Bacterial Soil Community in a Wheat Field as Determined by Cultivation and Molecular Methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2284–2291. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2284>

Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3, 1–13.

Stackebrandt, E., Murray, R. G. E., & Truper, H. G. (1988). Proteobacteria classis nov., a Name for the Phylogenetic Taxon That Includes the “Purple Bacteria and Their Relatives.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(3), 321–325.

Stanton, D. E., Batterman, S. A., Von Fischer, J. C., & Hedin, L. O. (2019). Rapid nitrogen fixation by canopy microbiome in tropical forest determined by both phosphorus and molybdenum. *Ecology*, 100(9), 1–8. <https://doi.org/10.1002/ecy.2795>

Stein, L. Y., & Klotz, M. G. (2016). The nitrogen cycle. *Current Biology*, 26(3), R94–R98. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.021>

Stevens, H. M. D. (2019). *Biotechnology and Plant Biology*. EDTECH. <https://books.google.com.mx/books?id=Y-fEDwAAQBAJ>

Strasburger, E., & Sitte, P. (2004). *Tratado de botánica*. Ed. Omega. <https://books.google.com.mx/books?id=EDveAAAACAAJ>

Tedersoo, L., Tooming-Klunderud, A., & Anslan, S. (2018). PacBio metabarcoding of Fungi and other eukaryotes: errors, biases and perspectives. *New Phytologist*, 217(3), 1370–1385. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.14776>

Terhonen, E., Blumenstein, K., Kovalchuk, A., & Asiegbu, F. O. (2019). Forest tree microbiomes and associated fungal endophytes: Functional roles and impact on forest health. *Forests*, 10(1), 1–32. <https://doi.org/10.3390/f10010042>

Thomas, G. W. (1996). Soil pH and Soil Acidity. In *Methods of Soil Analysis* (pp. 475–490). <https://doi.org/https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.c16>

Toju, H., Peay, K. G., Yamamichi, M., Narisawa, K., Hiruma, K., Naito, K., Fukuda, S., Ushio, M., Nakaoka, S., Onoda, Y., Yoshida, K., Schlaeppli, K., Bai, Y., Sugiura, R., Ichihashi, Y., Minamisawa, K., & Kiers, E. T. (2018). Core microbiomes for sustainable agroecosystems. *Nature Plants*, *4*(5), 247–257. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0139-4>

Trivedi, P., Delgado-Baquerizo, M., Trivedi, C., Hamonts, K., Anderson, I. C., & Singh, B. K. (2017). Keystone microbial taxa regulate the invasion of a fungal pathogen in agroecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, *111*, 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.03.013>

Trivedi, P., Leach, J., Tringe, S., Sa, T., & Singh, B. (2020). Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology*, *18*, 607–621. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>

USDA. (1999). *Guía para la Evaluación de la Calidad y Salud del Suelo. Traducción al español por el Instituto de Suelos CRN – CNIA – INTA.*

van Bergeijk, D. A., Terlouw, B. R., Medema, M. H., & van Wezel, G. P. (2020). Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(10), 546–558. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0379-y>

Van Dam, N. M., & Heil, M. (2011). Multitrophic interactions below and above ground: En route to the next level. *Journal of Ecology*, *99*(1), 77–88. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2010.01761.x>

van der Heijden, M. G. A., & Hartmann, M. (2016). Networking in the Plant Microbiome. *PLoS Biology*, *14*(2), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002378>

Vandenkoornhuyse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, *206*(206), 1196–1206. <https://doi.org/10.1111/nph.13312>

Veneault-Fourrey, C., Plett, J. M., & Martin, F. (2013). Who is Controlling whom within the Ectomycorrhizal Symbiosis: Insights from Genomic and Functional Analyses. In *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere* (Vol. 1, pp. 501–512). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118297674.ch47>

Ward, N. L., Challacombe, J. F., Janssen, P. H., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Wu, M., Xie, G., Haft, D. H., Sait, M., Badger, J., Barabote, R. D., Bradley, B., Brettin, T. S., Brinkac, L. M., Bruce, D., Creasy, T., Daugherty, S. C., Davidsen, T. M., Deboy, R. T., ... Kuske, C. R. (2009). Three Genomes from the Phylum Acidobacteria Provide Insight into the Lifestyles of These Microorganisms in Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(7), 2046–2056. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-08>

Wassermann, B., Adam, E., Cernava, T., & Berg, G. (2019). Understanding the Indigenous Seed Microbiota to Design Bacterial Seed Treatments. *Seed Endophytes*, 83–99. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10504-4_5

Wei, J., Hale, K., Carta, L., Platzer, E., Wong, C., Fang, S., & Aroian, R. V. (2003). Bacillus thuringiensis crystal proteins that target nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(5), 2760–2765.

Yun, J., Ju, Y., Deng, Y., & Zhang, H. (2014). Bacterial Community Structure in Two Permafrost Wetlands on the Tibetan Plateau and Sanjiang Plain, China. *Microbial Ecology*, *68*(2), 360–369. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0415-4>

Zarraonaindia, I., Owens, S. M., Weisenhorn, P., West, K., Hampton-Marcell, J., Lax, S., Bokulich, N. A., Mills, D. A., Martin, G., Taghavi, S., van der Lelie, D., & Gilbert, J. A. (2015). The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *MBio*, *6*(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.02527-14>

Zech, W., Drechsel, P., & Neugebauer, B. (1991). Mineral deficiencies of forest trees in Yucatan (Mexico) and consequences for land-use. *Turrialba*, *41*(2), 230–236.

Zeder, M. A. (2015). Core questions in domestication research. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(11), 3191–3198. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1501711112>

Zeilinger, S., Gupta, V. K., Dahms, T. E. S., Silva, R. N., Singh, H. B., Upadhyay, R. S., Gomes, E. V., Tsui, C. K. M., & Chandra Nayak, S. (2016). Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiology Reviews*, *40*(2), 182–207. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv045>

Zeven, A. C., & De Wet, J. M. J. (1982). *Dictionary of cultivated plants and their regions of diversity: excluding most ornamentals, forest trees and lower plants*. Centre for Agricultural Pub. and Documentation.

Zhang, W., Zhang, X., Li, K., Wang, C., Cai, L., Xiang, M., & Liu, X. (2018). Introgression and gene family contraction drive the evolution of lifestyle and host shifts of hypocrealean fungi. *Mycology*, *9*(3), 176–188. <https://doi.org/10.1080/21501203.2018.1478333>

Zhang, Y., Schoch, C. L., Fournier, J., Crous, P. W., Gruyter, J. De, Woudenberg, J. H. C., Hirayama, K., Tanaka, K., Pointing, S. B., Spatafora, J. W., & Hyde, K. D. (2009). Multi-locus phylogeny of Pleosporales: a taxonomic, ecological and evolutionary re-evaluation. *Studies in Mycology*, *64*, 85–102. <https://doi.org/10.3114/sim.2009.64.04>

Zuo, J., Zu, M., Liu, L., Song, X., & Yuan, Y. (2021). Composition and diversity of bacterial communities in the rhizosphere of the Chinese medicinal herb *Dendrobium*. *BMC Plant Biology*, *21*(127), 1–13.

ANEXOS

- 1. Manual de técnicas del Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas y Agua (LASPA)**

2. Resumen del tratamiento de las secuencias de eucariotas

En el cuadro 7.1 se aprecian el resumen del tratamiento de las secuencias de eucariotas, este procedimiento fue modificado debido al bajo porcentaje final de retención de secuencias.

Cuadro 7.1 Resumen del tratamiento de las secuencias de eucariotas				
Muestra	#reads crudos	Tratamiento RTL	Clusterización	%final
SueHueSec-F	23334	12228	6442	27.6
SueSelSec-F	22247	11513	4219	19.0
RizHueSec-F	22605	11369	5338	23.6
RizSelSec-F	25961	13699	5626	21.7
SueHueLlu-F	34980	18303	10939	31.3
SueSelLlu-F	33513	4531	2601	7.8
RizHueLlu-F	33544	17552	10846	32.3
RizSelLlu-F	42003	16071	8333	19.8

La pérdida de secuencias en el segundo tratamiento se debe, principalmente al proceso de clusterización de secuencias, ya que este se lleva a cabo con una base de secuencias como referencia. Esto parece tener un fuerte impacto en las bibliotecas de eucariotas a diferencias de aquellas de procariontas

3. Calidad de los archivos crudos usando el reporte que arroja QIIME2

Usando el reporte que arroja QIIME2 figura 7.1 se determinaron los puntos de corte de las secuencias eucariotas a fin de retirar las porciones de baja calidad. Se determinaron los puntos de corte en las posiciones 289 para los *read forward* y 219 para los *reverse* (con el objetivo que la calidad de Phred de las bases sea superior a 25)

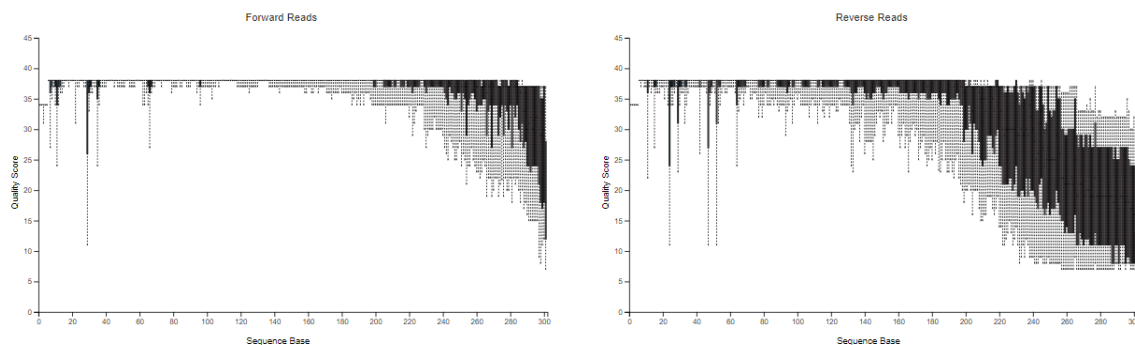


Figura 7.1 Reporte FASTQC de las secuencias eucariotas

4. Tablas de datos de propiedades de las muestras de suelo analizadas (valores individuales de las muestras, sus promedios y desviación estándar)

Cuadro 7.2 Tabla de datos desglosados de las propiedades de las muestras de suelo de temporada seca

	Temporada Seca											
	Selva						Huerto					
	Sel1	Sel2	Sel3	Sel4	Sel5	Prom±DesvEst	Hue1	Hue2	Hue3	Hue4	Hue5	Prom±DesvEst
Na*	0.03	0.04	0.03	0.03	0.04	0.03±0.007	0.12	0.09	0.13	0.15	0.11	0.12±0.022
K*	0.10	0.12	0.11	0.09	0.11	0.11±0.01	0.11	0.16	0.25	0.22	0.13	0.17±0.06
Ca*	10.13	12.31	10.64	9.36	11.15	10.7±1.1	11.03	15.90	25.00	21.67	12.69	17.3±5.9
carbonatos (%)	3.18	2.75	2.56	2.55	3.18	2.8±0.3	28.07	4.55	15.80	13.51	6.74	13.7±9.3
C (%)	5.74	7.19	4.94	4.77	8.12	6.2±1.5	20.96	10.72	25.49	19.63	10.99	17.6±6.5
Ntotal (%)	0.70	0.87	0.55	0.56	0.66	0.7±0.13	2.59	0.81	2.01	1.54	1.40	1.7±0.67
P (mg/Kg)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0±0.0	58.94	0.00	612.98	68.04	31.72	154.3±257.8
pH	7.18	7.03	7.16	7.23	7.19	7.2±0.08	7.53	7.47	7.40	7.53	7.44	7.5±0.06
REDOX (mV)	178.70	101.50	101.70	57.60	63.60	100.6±48.3	93.60	62.20	63.70	59.80	67.10	69.3±13.9
CE (dS/m)	0.16	0.21	0.17	0.12	0.19	0.17±0.03	0.64	0.23	0.63	0.59	0.35	0.49±0.18
Arcillas (%)	48.30	30.30	50.30	52.30	18.30	39.9±14.9	18.30	20.30	22.30	24.30	26.30	22.3±3.2
Limos (%)	32.00	20.00	34.00	32.00	16.00	26.8±8.2	12.00	10.00	12.00	12.00	16.00	12.4±2.2
Arenas (%)	19.70	49.70	15.70	15.70	65.70	33.3±23.0	69.70	69.70	65.70	63.70	57.70	65.3±5.0
Clase textural	Franco arcilloso						Franco arenoso arcilloso					

Cuadro 7.3 Tabla de datos desglosados de las propiedades de las muestras de suelo de temporada de lluvia

	Temporada de Lluvia											
	Selva						Huerto					
	Sel1	Sel2	Sel3	Sel4	Sel5	Prom±DesvEst	Hue1	Hue2	Hue3	Hue4	Hue5	Prom±DesvEst
Na*	0.02	0.04	0.02	0.02	0.03	0.03±0.007	0.07	0.02	0.03	0.07	0.03	0.04±0.024
K*	0.13	0.11	0.08	0.09	0.14	0.11±0.03	0.10	0.14	0.19	0.16	0.11	0.14±0.04
Ca*	12.56	11.41	8.33	9.10	14.49	11.2±2.5	10.13	13.72	18.97	16.03	11.15	14.0±3.6
carbonatos (%)	2.99	3.18	2.55	2.93	3.53	3.0±0.4	20.32	4.93	11.52	17.78	4.46	11.8±7.2
C (%)	6.68	8.51	4.19	5.12	9.30	6.8±2.2	16.89	11.64	15.44	23.53	10.60	15.6±5.1
Ntotal (%)	0.67	0.83	0.75	0.42	0.89	0.7±0.19	2.56	0.98	1.58	1.95	1.03	1.6±0.66
P (mg/Kg)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0±0.0	10.62	0.00	550.57	498.08	27.13	217.3±281.1
pH	7.35	7.16	7.26	7.30	7.23	7.3±0.07	7.71	7.46	7.39	7.61	7.52	7.5±0.13
REDOX (mV)	150.70	87.00	71.60	57.00	56.80	84.6±39.0	68.20	74.80	66.60	54.10	51.20	63.0±10.0
CE (dS/m)	0.38	0.20	0.11	0.11	0.16	0.19±0.11	0.55	0.20	0.39	0.39	0.19	0.35±0.15
Arcillas (%)	52.30	28.30	22.30	20.30	22.30	29.1±13.3	48.30	30.30	48.30	32.30	30.30	37.9±9.5
Limos (%)	32.00	18.00	14.00	14.00	18.00	19.2±7.4	24.00	18.00	22.00	14.00	18.00	19.2±3.9
Arenas (%)	15.70	53.70	63.70	65.70	59.70	51.7±20.6	27.70	51.70	29.70	53.70	51.70	42.9±13.0
Clase textural	Franco arenoso arcilloso						Franco arcilloso					

5. Porcentajes de abundancias relativas de los OTUs a nivel de phylum, para procariotas, utilizados en la construcción de las gráficas de abundancias relativas

Cuadro 7.4 Porcentaje de abundancia relativa de OTUs procariotas a nivel de *Phylum* con abundancia relativa superior a 1%.

index	SueHueSe c-B	SueSelSe c-B	RizHueSe c-B	RizSelSe c-B	SueHueLI u-B	SueSelLI u-B	RizHueLI u-B	RizSelLI u-B
<i>Actinobacteria</i>	29.7	25.3	23.1	33.4	26.1	30.0	19.9	22.8
<i>Acidobacteria</i>	24.8	35.4	20.0	17.7	25.1	29.1	14.4	17.9
<i>Proteobacteria</i>	19.2	15.6	24.8	21.3	21.4	16.0	21.1	26.0
<i>Thaumarchaeota</i>	7.4	4.6	6.5	5.5	6.6	4.9	4.6	8.5
<i>Firmicutes</i>	0.27	0.25	5.1	3.5	0.66	0.94	26.6	6.8
<i>Chloroflexi</i>	5.3	3.2	6.2	5.6	5.2	3.0	3.5	3.7
<i>Planctomycetes</i>	3.6	3.2	4.7	2.9	4.6	1.9	3.0	3.6
<i>Rokubacteria</i>	1.7	3.8	1.2	1.7	2.5	6.8	1.6	1.9
<i>Verrucomicrobia</i>	0.0	2.7	2.6	1.7	2.3	2.0	1.7	2.1
<i>Bacteroidetes</i>	2.2	1.0	2.8	2.5	1.6	0.46	1.8	3.1
<i>Gemmatimonadetes</i>	2.3	3.5	1.5	2.2	1.9	3.0	0.98	1.4
OTROS	1.5	1.8	1.4	1.9	2.6	3.5	2.0	2.0

6. Porcentajes de abundancias relativas de los OTUs a nivel de orden, para procariotas, utilizados en la construcción de las gráficas de abundancias relativas

Cuadro 7.5 Porcentaje de abundancia relativa de OTUs procariotas a nivel de Orden con abundancia relativa superior a 1%.

index	SueCRSec -B	SueSRSec- B	RizCRSec -B	RizSRSec -B	SueCRLlu -B	SueSRLlu -B	RizCRLlu -B	RizSRLlu -B
Clase Subgroup 6	10.5	16.0	9.8	8.3	12.8	18.3	8.1	8.7
Orden Solirubrobacterales	12.1	9.5	8.5	12.8	9.4	11.4	6.9	8.6
Orden Rhizobiales	5.9	3.9	8.5	6.2	6.1	5.4	7.2	9.3
Orden Gaiellales	6.5	6.7	6.3	9.2	5.9	7.9	3.7	5.5
Orden Nitrososphaerales	7.4	4.6	6.5	5.5	6.6	4.9	4.6	8.5
Orden Pyrinomonadales	7.6	12.8	3.1	4.3	4.8	5.4	1.6	3.7
Orden Bacillales	0	0	5.1	3.5	0	0	26.5	6.8
Orden Betaproteobacterales	3.4	4.9	2.8	3.6	3.4	4.2	2.2	3.5
Orden Rokubacterales	1.7	3.8	1.2	1.7	2.5	6.8	1.6	1.9
Orden Myxococcales	2.2	2.5	2.5	2.1	3.5	2.5	2.3	3.3
Orden Rubrobacterales	2.6	2.4	1.1	3.2	2.8	3.0	1.6	2.9
Orden Sphingomonadales	2.8	1.1	3.2	3.0	1.7	0	1.4	2.1
Orden Gemmatimonadales	1.6	2.9	1.2	1.9	1.4	2.7	0	1.3
Orden Chthoniobacterales	1.5	1.9	1.8	1.1	1.6	1.8	1.1	1.5
Orden Chitinophagales	1.3	0	1.6	1.7	0	0	1.1	2.5
Orden Pirellulales	1.3	0	1.9	0	1.6	0	1.2	1.2
Orden Pseudonocardiales	0	0	1.2	1.7	0	1.2	1.0	0
Orden Gemmatales	0	0	1.2	1.2	1.1	0	0	1.0
Orden Blastocatellales	1.4	0	1.5	0	1.4	0	0	0
Orden Micromonosporales	0	0	0	0	1.2	1.1	1.2	0
Orden Microtrichales	1.2	0	1.1	0	1.2	0	0	0
Orden Steroidobacterales	0	0	0	0	0	0	1.2	1.2
Orden Subgroup 7	0	1.4	0	0	0	0	0	0
Orden S085	0	0	1.3	0	0	0	0	0
Orden IMCC26256	0	0	0	0	0	1.2	0	0
Orden Tepidisphaerales	0	1.1	0	0	0	0	0	0
Orden Gammaproteobacteria	0	0	0	0	0	0	0	1.0
Orden Solibacterales	0	0	1.0	0	0	0	0	0
Orden Dongiales	0	0	0	0	0	0	0	1.0
OTROS	29.0	24.6	27.6	29.1	30.8	22.4	25.4	24.6

7. Porcentajes de abundancias relativas de los OTUs a nivel de phylum, para eucariotas, utilizados en la construcción de las gráficas de abundancias relativas

Cuadro 7.6 Porcentaje de abundancia relativa de OTUs eucariotas a nivel de Phylum con abundancia relativa superior a 1%. Ver **Figura 3.6**

index	SueHueSe c-F	SueSelSe c-F	RizHueSe c-F	RizSelSe c-F	SueHueLI u-F	SueSelLI u-F	RizHueLI u-F	RizSelLI -F
Ascomycota	89.7	34.6	57.9	55.2	91.1	66.7	86.1	64.4
Basidiomycota	1.4	63.5	20.1	43.8	3.6	29.0	1.9	28.1
Anthophyta	1.1	0.09	12.2	0.62	1.8	0.01	11.3	0.92
Ciliophora	2.4	0	1.5	0.02	0.78	0	0.12	0.32
Nematoda	0	0.33	0.06	0.06	0	1.9	0	1.5
OTROS	5.4	1.5	8.3	0.38	2.7	2.4	0.61	4.8

8. Porcentajes de abundancias relativas de los OTUs a nivel de orden, para eucariotas, utilizados en la construcción de las gráficas de abundancias relativas

Cuadro 7.8 Porcentaje de abundancia relativa de OTUs eucariotas a nivel de Orden con abundancia relativa superior a 1%.

index	SueCRSec -F	SueSRSec -F	RizCRSec -F	RizSRSec -F	SueCRLlu -F	SueSRLlu -F	RizCRLlu -F	RizSRLlu -F
Hypocreales	47.8	4.8	13.2	3.1	42.9	16.5	54.4	8.0
Pleosporales	21.7	6.9	16.3	6.2	19.3	6.7	23.2	10.2
Agaricales	1.1	38.7	13.9	13.4	0.0	1.8	1.3	4.9
Sordariales	5.1	3.1	3.8	6.1	10.1	10.7	6.2	8.6
Phylum Ascomycota	0.0	3.6	5.7	9.3	1.7	12.3	0.0	11.1
Clase Agaricomycetes	0.0	18.5	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0	9.3
Chaetothyriales	1.5	1.6	3.7	4.3	1.6	4.1	0.0	6.6
Eurotiales	1.6	1.8	1.0	6.9	2.8	4.4	2.2	2.6
Capnodiales	3.5	3.2	2.1	7.2	3.3	0.0	1.3	0.0
Trechisporales	0.0	0.0	0.0	19.1	0.0	0.0	0.0	0.0
Corticiales	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	19.0	0.0	0.0
Xylariales	1.4	1.4	5.4	0.0	0.0	1.5	0.0	5.8
Hymenochaetales	0.0	0.0	3.3	5.4	0.0	0.0	0.0	2.1
Clase Dothideomycetes	0.0	0.0	7.1	0.0	0.0	0.0	1.9	1.7
Cantharellales	0.0	2.9	4.0	0.0	2.6	0.0	0.0	0.0
Sin Asignar	2.8	0.0	2.6	0.0	1.7	0.0	0.0	1.7
Botryosphaerales	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	0.0	3.5	1.6
Onygenales	0.0	1.5	0.0	3.0	0.0	3.3	0.0	0.0
Clase Eurotiomycetes	0.0	3.1	0.0	3.8	0.0	0.0	0.0	0.0
Pezizales	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.4
Tritirachiales	0.0	1.5	0.0	0.0	0.0	2.1	0.0	2.1
Clase Sordariomycetes	1.8	0.0	2.3	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0
Boletales	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.3
Reino Fungi	1.4	0.0	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Thelephorales	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.3	0.0	0.0
Magnaporthales	0.0	0.0	0.0	0.0	4.1	0.0	0.0	0.0
Rhabditida	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	0.0	1.5
Sporadotrichida	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Glomerellales	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0
Sin identificar	0.0	0.0	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Sebacinales	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6
Helotiales	0.0	0.0	0.0	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0
Clase Agaricomycetes	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3
Clase Sordariomycetes	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0
OTROS	8.3	7.4	9.6	10.6	6.3	7.7	6.0	7.7

9. Género Bacillus

Cuadro 7.9 Porcentaje de abundancia relativa de OTUs procariotas al menor nivel taxonómico identificado con abundancia relativa superior a 1%. Ver **Figura 3.5**.

Taxón	SueHueSe c-B	SueSelSe c-B	RizHueSe c-B	RizSelSe c-B	SueHueLI u-B	SueSelLI u-B	RizHueLI u-B	RizSelLI u-B
Nitrososphaera spp	1.17	0.83	0.56	1.37	1.08	0.65	0.74	2.62
Orden Solirubrobacterales	0.68	1.59	0.14	1.76	0.47	2.19	0.31	0.99
Nitrocosmicus spp uncultured	1.24	0.25	1.52	0.59	1.12	0.36	0.84	0.76
Actinomycetales bacterium	0.68	0.59	0.29	1.17	0.65	0.50	0.43	1.15
Bacillus spp	0.02	0.04	0.84	0.80	0.06	0.20	2.17	0.76
Familia Pyrinomonadaceae	1.07	1.39	0.65	0.53	0.50	0.43	0.15	0.18
uncultured Rubrobacteria bacterium	0.78	0.39	1.08	0.39	0.57	0.65	0.39	0.36
Familia Nitrososphaeraceae	0.74	0.77	0.42	0.43	0.48	1.12	0.23	0.49
Phylum Acidobacteria	0.32	1.06	0.15	0.49	0.33	1.34	0.17	0.71
Orden Solirubrobacterales	1.00	0.22	0.57	0.41	0.59	0.44	0.48	0.33
Orden Bacillales	0.02	0	0.52	0.23	0.02	0.05	2.60	0.53
Nitrocosmicus spp	0.56	0.18	1.17	0.10	0.63	0.17	0.45	0.16
Orden Rokubacterales	0.19	0.90	0.05	0.36	0.32	1.51	0.20	0.34
Bacillus spp	0.01	0.02	0.56	0.37	0.05	0.05	1.24	0.67
Bacillus spp	0.04	0.01	0.77	0.20	0.01	0.01	5.62	0.60
Familia Pyrinomonadaceae	0.45	1.15	0.35	0.21	0.24	0.58	0.06	0.21
Orden Rokubacterales	0.14	0.69	0.03	0.33	0.17	1.43	0.12	0.39

10. Géneros Trichoderma y Fusarium

Cuadro 7.10 Porcentaje de abundancia relativa de OTUs eucariotas al menor nivel taxonómico identificado con abundancia relativa superior a 1%. Ver **Figura 3.7**.

Taxón	SueHueS ec-F	SueSelS ec-F	RizHueS ec-F	RizSelS ec-F	SueHueL lu-F	SueSelL lu-F	RizHueL lu-F	RizSelL lu-F
<i>Fusarium lacertarum</i>	19.8	0.55	0.22	0.16	17.7	0	29.8	0
<i>Fusarium solani</i>	5.5	2.1	6.1	1.3	10.9	11.9	6.6	4.6
<i>Fusarium spp</i>	9.9	0	1.3	0	6.8	2.5	6.3	0
(Familia Corticiaceae)	0	0	0	0	0	18.71	0.18	0
<i>Tragia paxii</i>	0.12	0.04	10.67	0.01	1.58	0	10.33	0
(Familia Agaricaceae)	0	30.2	0	0	0	0	0	0
<i>Trechispora spp</i>	0	0	0	19.0	0	0	0	0
<i>Acrocallymma spp</i>	0.94	2.26	7.31	1.92	1.11	1.43	1.44	0.60
<i>Chaetomium spp</i>	0	0.61	1.54	0	4.53	3.30	0	3.65
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3.01	1.35	1.50	4.98	2.17	0	0.80	0
(Orden Pleosporales)	0	0	0	0	3.86	0	5.83	0
<i>Oxyporus millavensis</i>	0	0	2.84	5.41	0	0	0.16	2.04
<i>Acrocallymma spp</i>	2.76	0.37	0.86	0.19	0.93	0.06	4.32	0.48
<i>Aspergillus tamarii</i>	1.09	0	0	0.85	2.52	1.58	1.78	0.33
(Orden Pleosporales)	3.10	0	0.63	0.03	3.22	0.16	0.30	0.54
<i>Trichoderma_longibrachiatum</i>	<1	<1	<1	<1	0	<1	0	<1