



UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE BIOLOGÍA

Comparación de tres métodos para el aislamiento de hongos micorrízicos arbusculares provenientes de cultivos trampa de plantaciones de café

Trabajo de integración curricular previo a la obtención del título de:

BIÓLOGA

Autor: Armijos Peñaranda, María Paula

Director: Loján Armijos, Paúl Diego

LOJA
2023



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2023

Aprobación del director del Trabajo de Integración Curricular

Loja, 15, de septiembre de 2023.

Doctor

Darío Javier Cruz Sarmiento

Director de la carrera de Biología

Ciudad. –

De mi consideración:

Me permito comunicar que, en calidad de director del presente Trabajo de Integración Curricular denominado: Comparación de tres métodos para el aislamiento de hongos micorrízicos arbusculares provenientes de cultivos trampa de plantaciones de café realizado por María Paula Armijos Peñaranda ha sido orientado y revisado durante su ejecución, así mismo ha sido verificado a través de la herramienta de similitud académica institucional, y cuenta con un porcentaje de coincidencia aceptable. En virtud de ello, y por considerar que el mismo cumple con todos los parámetros establecidos por la Universidad, doy mi aprobación a fin de continuar con el proceso académico correspondiente.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Director: Ph.D. Paúl Diego Loján Armijos

CI: 1103885396

Correo electrónico: pdlojan@utpl.edu.ec

Declaración de autoría y cesión de derechos

Yo, María Paula Armijos Peñaranda, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

Ser autor (a) del Trabajo de Integración Curricular denominado: Comparación de tres métodos para el aislamiento de hongos micorrízicos arbusculares provenientes de cultivos trampa de plantaciones de café, de la carrera de Biología, específicamente de los contenidos comprendidos en: Introducción, Capítulo 1. Marco Teórico, Capítulo 2. Metodología, Capítulo 3. Resultados y Discusión, Capítulo 4. Conclusiones y Recomendaciones, siendo Diego Paúl Loján Armijos, director del presente trabajo; también declaro que la presente investigación no vulnera derechos de terceros ni utiliza fraudulentamente obras preexistentes. Además, ratifico que las ideas, criterios, opiniones, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad. Eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual de este trabajo.

Que la presente obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTP, que establece: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad", en tal virtud, cedo a favor de la Universidad Técnica Particular de Loja la titularidad de los derechos patrimoniales que me corresponden en calidad de autor/a, de forma incondicional, completa, exclusiva y por todo el tiempo de su vigencia.

La Universidad Técnica Particular de Loja queda facultada para ingresar el presente trabajo al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

Autor: María Paula Armijos Peñaranda

C.I.: 1150700001

Correo electrónico: mparmijos6@utpl.edu.ec

Dedicatoria

Con todo mi amor, dedico este trabajo

A mi papi, Edward Armijos

A mi mami, Janeth Peñaranda

A mi hermano, Juan Diego

A mis abuelitos maternos, Lolita y Miguel

A mis abuelitos paternos, Betty y Jaime

A mi familia y amigos.

Agradecimiento

Agradezco a mis padres brindarme todo su amor y apoyo a lo largo de toda mi carrera. A mi papá y hermano, por hacerme reír cuando las presiones me agobiaban. A mi mamá, por apoyarme incondicionalmente en la decisión de estudiar biología. A mis abuelitos, por siempre estar conmigo y demostrarme todo su amor.

Agradezco al Dr. Paúl Loján por brindarme todo su conocimiento y apoyo a lo largo de la elaboración de este trabajo. A mis docentes Carolina Kalinhoff, Oscar Vivanco y Máximo Moreira; por toda la asesoría ofrecida a lo largo de este año.

Finalmente agradezco a mis amigas y amigos que han estado conmigo a lo largo de esta maravillosa y bonita carrera. Gracias por su apoyo, por sus palabras de ánimo, por los momentos bonitos que hemos pasado, por esas risas y especialmente, por haber hecho de la Universidad, la mejor etapa de mi vida.

Los quiero muchísimo, con todo mi corazón, mil gracias a todos.

Índice de contenido

Carátula.....	I
Aprobación del director del Trabajo de Integración Curricular.....	II
Declaración de autoría y cesión de derechos	III
Dedicatoria.....	V
Agradecimiento.....	VI
Índice de Contenido.....	VII
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción	3
Capítulo uno	5
Marco Teórico	5
1.1. El Reino Fungi	5
1.1.1. <i>Taxonomía y filogenia del Reino Fungi</i>	5
1.1.2. <i>Generalidades del Reino Fungi</i>	6
1.2. Los Hongos	6
1.2.1. <i>Generalidades de los hongos</i>	7
1.2.2. <i>Importancia de los hongos</i>	7
1.3. Las micorrizas	7
1.3.1. <i>Clasificación de las micorrizas</i>	7
1.4. Micorrizas arbusculares	7
1.4.1. <i>Características de los HMA</i>	8
1.4.2. <i>Especificidad de la asociación planta – HMA</i>	8
1.4.3. <i>Mecanismo de la asociación planta – HMA</i>	8
1.4.4. <i>Beneficios de la asociación planta – HMA</i>	9
1.4.5. <i>Principales especies de HMA</i>	9
1.4.6. <i>Ecología de los HMA</i>	12
1.4.7. <i>Usos actuales de los HMA</i>	12
2.1. Cultivos de café	12

2.1.1. <i>Origen del café</i>	12
2.1.2. <i>Generalidades del café</i>	13
2.1.3. <i>Importancia económica del café</i>	13
2.1.4. <i>Patógenos del café</i>	13
3.1. Aislamiento de hongos micorrízicos arbusculares	14
3.2. El futuro de los aislamientos	14
Capítulo dos	16
Metodología	16
2.1. Material biológico de partida	16
2.2. Tratamiento del suelo	16
2.3. Obtención de <i>Plantago lanceolata</i> libres de micorriza	16
2.4. Métodos de aislamiento de HMA usados en el estudio	16
2.4.1. <i>Método 1: Cultivo monospórico de esporas desnudas</i>	17
2.4.2. <i>Método 2: Cultivo monospórico de esporas encapsuladas en alginato</i>	18
2.4.3. <i>Método 3: Aislamiento por cultivos a partir de fragmento de raíz</i>	18
2.5. Toma de muestras	20
2.5.1. <i>Obtención de las raíces para procesar</i>	20
2.5.2. <i>Tinción y montaje de las raíces</i>	20
2.5.3. <i>Cuantificación de esporas viables y determinación de morfotipos de esporas de HMA del inóculo de café</i>	21
Capítulo tres	23
Resultados y discusión	23
3.1. Cuantificación de esporas presentes en el inóculo utilizado	23
3.2. <i>Identificación y caracterización de morfotipos</i>	24
3.3. <i>Evaluación de los métodos de aislamiento empleados</i>	28
Conclusiones	32
Recomendaciones	33
Referencias.....	34
Apéndice I	42

Apéndice II	43
-------------------	----

Índice de tablas

Tabla 1 Principales especies de HMA.....	9
Tabla 2 Caracterización morfológica de los morfotipos más abundantes obtenidos en los distintos aislamientos	25
Tabla 3 Fotografías de los diferentes morfotipos obtenidos	26

Índice de figuras

Figura 1 <i>Diagrama de Venn con los actuales esquemas de clasificación de phylum para el reino Fungi.....</i>	6
Figura 2 <i>Frecuencia de esporas aparentemente viables de HMA en 10 lotes de 100g de suelo</i>	23
Figura 3 <i>Número de aislamientos obtenidos con los tres métodos empleados</i>	30
Figura 4 <i>Fotografías de los aislamientos obtenidos por cada método empleado</i>	30

Resumen

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) al asociarse con las plantas incrementan su acceso al agua y nutrientes del suelo, favoreciendo su crecimiento. Por este motivo, es que los HMA representan una alternativa para el uso de agroquímicos convencionales. El objetivo de este estudio fue comparar entre tres métodos de aislamiento para evaluar cual es más eficiente y tiene mayor éxito. Se analizaron los métodos de cultivo monospórico de esporas desnudas, encapsulación con alginato y cultivo a partir de fragmentos de raíz. Adicionalmente, se determinó el número promedio de esporas presentes y los morfotipos más abundantes. Como resultado del ensayo, se determinó que el método más efectivo para aislamiento de HMA fue el cultivo a partir de fragmentos de raíz. También se observó que, por cada 100g de suelo existía un promedio de 49.8 esporas y que en general, los morfotipos más abundantes pertenecían a los géneros *Acaulospora* y *Glomus*.

Palabras clave: HMA, aislamiento, esporas, alginato, morfotipos

Abstract

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) by associating with plants increase their access to water and soil nutrients, improving their growth. For this reason, AMFs represent an alternative use to conventional agrochemicals. The objective of this study was to compare between three isolation methods to evaluate which one is more efficient and more successful. The analyzed methods were monosporic culture of naked spores, encapsulation with alginate and root fragment culture. Additionally, it was determined the average number of spores present and the most abundant morphotypes. As a result of the experiment, the most effective method for AMF isolation was root fragment culture. It was also shown that, for every 100g of soil, there was an average of 49.8 spores and the most abundant morphotypes belonged to the genera *Acaulospora* and *Glomus*.

Keywords: amf, isolation, spores, alginate, morphotypes

Introducción

Los hongos son organismos heterótrofos eucariotas, que también pueden ser biótrofos, saprótrofos o necrótrofos (Carris et al., 2012). Pueden dañar a otros organismos al vivir como parásitos, aprovecharse de ellos sin ningún daño aparente o vivir en simbiosis con ellos (Piepenbring, 2015). Dentro de este último grupo, tenemos al más claro ejemplo de simbiosis mutualista, los hongos formadores de micorrizas (Brundrett et al., 1996; Carris et al., 2012). En función de las estructuras formadas en las raíces éstos se clasifican en tres tipos: ectomicorrizas, ectoendomicorrizas y endomicorrizas (Webster & Weber, 2007). Dentro de este último grupo tenemos a los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) los que pertenecen al filum Glomeromycota (Schüßler et al., 2001). Son simbioses obligados, es decir que necesitan asociarse a un huésped para obtener carbohidratos y completar su ciclo de vida (Sun et al., 2016).

Los HMA se asocian a la planta huésped cuando ésta envía señales a los propágulos del hongo (esporas o raicillas colonizadas) particularmente si la planta se encuentra creciendo en un suelo deficiente en nutrientes como el fósforo (Nazareno Saparrat et al., 2020). En ese momento, el hongo coloniza el interior de las células radicales de la planta; produciendo algunas estructuras como vesículas, hifas y arbusculos (Brundrett et al., 1996). Al entrar en esta sociedad, las micorrizas incrementan el acceso de la planta al agua y nutrientes del suelo (principalmente fósforo, zinc y cobre) ya que funcionan como una extensión del sistema radicular de éstas, de tal manera que incrementa su crecimiento (Bever et al., 2001). Adicionalmente, los HMA les proveen resistencia frente a patógenos y aumentan su sanidad general (Bever et al., 2001; Selvakumar et al., 2018). Por otro lado, las plantas proveen a los HMA de carbohidratos que producen como resultado de la fotosíntesis (Sun et al., 2016).

En las últimas décadas los HMA han sido estudiados intensamente debido a su potencial de uso en el desarrollo de agricultura sustentable, no solo por sus conocidos beneficios para mejorar la nutrición de las plantas, sino por su contribución a la conservación del suelo (Saouy et al., 2011), al estabilizar sus agregados (Bever et al., 2001). Por estas

razones, los HMA son exitosamente aplicados como bio-inoculantes de cultivos agrícolas y representan una alternativa para reducir la aplicación de agroquímicos convencionales (Hernández-Acosta et al., 2020; Selvakumar et al., 2018).

Una importante limitación para utilizar estos hongos en la formulación de biofertilizantes en la agricultura moderna es su naturaleza de simbionte obligado, lo que hace necesario asociarlo a un hospedero adecuado para que este pueda completar su ciclo vital y producir un gran número de esporas (Sun et al., 2016). El procedimiento más utilizado para el establecimiento de cultivos monospóricos o puros es el establecimiento de “cultivos trampa” en macetas con un sustrato desinfectado y libre de micorrizas (Saouy et al., 2011), utilizando una sola espora de HMA colocada sobre la raíz de un hospedero adecuado que también debe estar libre de micorrizas (Nandan Meena & Mohan Naik, 2019). El rango de éxito de estos métodos oscila alrededor del 1% (Walker, 1999), es decir casi nulo. Está bien documentado en literatura que no todas las especies de HMA tienen la misma eficiencia para promover el crecimiento y salud de las plantas (Koide & Mosse, 2004) por lo que es necesario aislarlas para evaluar su efecto individual.

Además de los problemas mencionados, existen diversas dificultades al momento de generar cepas aisladas (Ijdo et al., 2011) como riesgo de contaminación cruzada, bajo grado de adaptación de los HMA a las condiciones y costos muy elevados (Akhtar & Abdullah, 2014). También se ha manifestado que esta producción se ha enfocado más en utilizar esporas, pero es posible utilizar otras fuentes como hifas, vesículas y fragmentos radiculares (Nandan Meena & Mohan Naik, 2019). A raíz de esto es necesario encontrar técnicas de aislamiento de HMA tanto eficientes como económicas, las cuales podrían incrementar el rango de éxito en la obtención de cultivos puros de HMA que son la base de una gran cantidad de aplicaciones prácticas.

El objetivo de este trabajo es realizar una comparación entre tres métodos de aislamiento para evaluar cual es más eficiente y tiene mayor éxito. Es importante identificar cual método puede permitirnos obtener una mayor cantidad de aislamientos que se puedan aplicar en diversos campos como por ejemplo en agricultura como biofertilizantes.

Capítulo Uno

Marco Teórico

1.1. El Reino Fungi

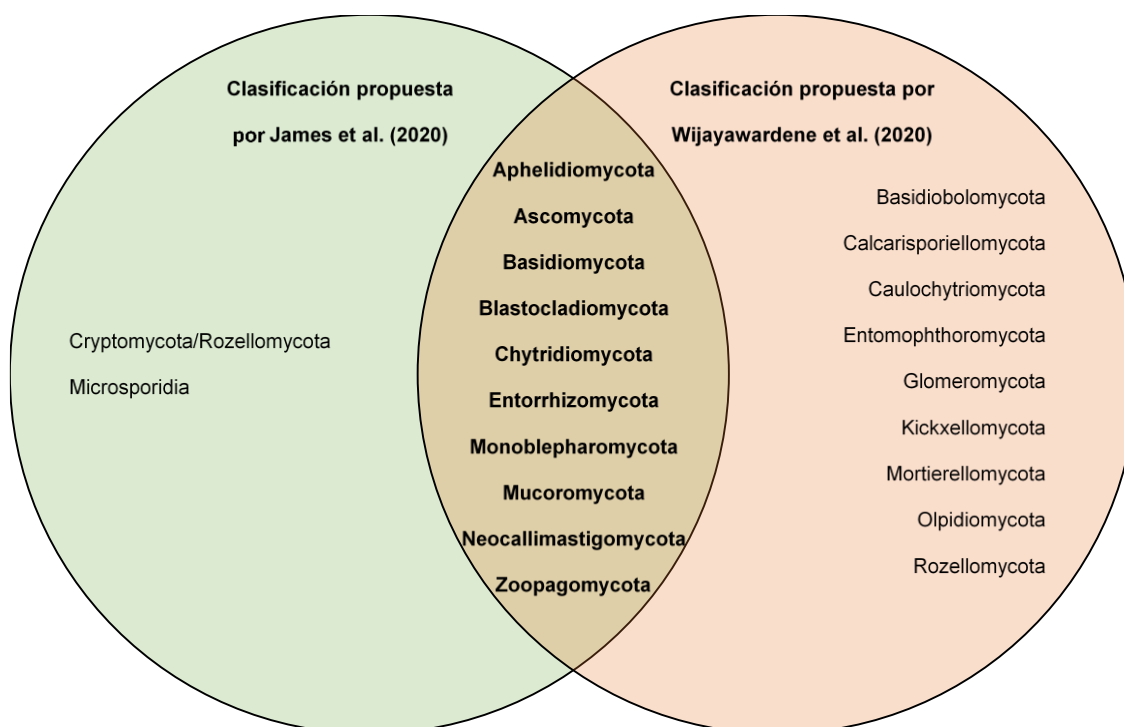
El Reino Fungi es el hogar de un numeroso grupo de organismos denominados hongos (Stajich et al., 2009). Es conocido como “ el reino de los hongos verdaderos” y el término “Fungi” proviene del latín “*fungus*” que significa “seta u hongo” (Piepenbring, 2015). Este reino es una de las ramas más antiguas y diversas del árbol de la vida (Li et al., 2021).

1.1.1. Taxonomía y filogenia del Reino Fungi

Filogenéticamente se encuentran más emparentados con animales (Carris et al., 2012) aunque históricamente fueron comparados con plantas e incluidos en el estudio de la botánica (Mueller et al., 2004). A nivel taxonómico, anteriormente fue clasificado en 4 grandes phylum: Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota; sin embargo estudios demostraron que esta clasificación no representa de forma precisa la filogenia de estos organismos (Mueller et al., 2004). Gracias a estudios moleculares, existen dos grandes esquemas de clasificación de phylum para este reino (**Figura 1**) (James et al., 2020; Wijayawardene et al., 2020).

Figura 1

Diagrama de Venn con los actuales esquemas de clasificación de phylum para el Reino Fungi



Nota. El primer círculo contiene los phylum de un esquema de clasificación, el segundo contiene los phylum del otro esquema y la intersección contiene los phylum que comparten los dos esquemas.

1.1.2. Generalidades del Reino Fungi

Se estima que todo el reino comprende alrededor de 2 a 5 millones de especies a nivel mundial, que juegan roles vitales en ecosistemas terrestres y acuáticos (Li et al., 2021). Los primeros fósiles de hongos datan del periodo del Ordovícico, aproximadamente entre 450 a 500 millones de años atrás (Margulis & Chapman, 2009; Webster & Weber, 2007). No obstante, datos moleculares sugieren que son más antiguos que lo indicado por los fósiles y que pudieron haber surgido hace más de mil millones de años (Carris et al., 2012).

1.2. Los hongos

Son organismos eucariotas, que a excepción de unos pocos, poseen cuerpos filamentosos (hifas) encerrados por paredes celulares que forman el cuerpo del hongo (talo), a través de las cuales absorben nutrientes (Carris et al., 2012; Mueller et al., 2004;

Piepenbring, 2015). Las hifas en conjunto forman lo que se conoce como micelio, el cual es la forma de crecimiento y alimentación de la mayoría de hongos (Margulis & Chapman, 2009).

1.2.1. Generalidades de los hongos

Poseen la capacidad de captar solutos inorgánicos y orgánicos presentes en soluciones altamente diluidas del medio ambiente (Webster & Weber, 2007). Digieren externamente su alimento y su principal manera para obtener de nutrientes es a partir de otros organismos (heterótrofos) (Mueller et al., 2004). Aunque otros los obtienen de organismos vivos (biótrofos), de organismos muertos (saprótrofos) o de células a las que infectan y matan (necrótrofos) (Carris et al., 2012; Piepenbring, 2015). La gran mayoría de hongos no presentan movilidad alguna y se reproducen tanto sexual como asexualmente por medio de esporas (Mueller et al., 2004).

1.2.2. Importancia de los hongos

Ecológicamente son primordiales porque reciclan nutrientes al ser los descomponedores estrella de compuestos complejos como celulosa, lignina, queratina y quitina (Kendrick, 2011). También son capaces de colonizar sustratos estériles como rocas; parasitan contribuyendo a mantener la biodiversidad y forman micorrizas con las raíces de las plantas (Piepenbring, 2015).

1.3. Las micorrizas

El término micorriza proviene del griego “mykos” y “rhiza” que significa hongo y raíz respectivamente (Bonfante & Genre, 2010; Nazareno Saparrat et al., 2020). Las micorrizas son una asociación simbiótica entre raíces de plantas y determinados hongos presentes en el suelo altamente evolucionada (Brundrett et al., 1996).

1.3.1. Clasificación de las micorrizas

De acuerdo con el organismo al que se asocia y la estructura que se forma, existen 4 grandes tipos: ectomicorrizas, micorrizas ericoides, micorrizas de orquídeas y micorrizas arbusculares (Soudzilovskaia et al., 2020; Webster & Weber, 2007).

1.4. Micorrizas arbusculares

Las micorrizas arbusculares aparentemente fueron descritas por primera vez en 1842 (Koide & Mosse, 2004) y son el producto de la asociación entre las raíces de las plantas y los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) (Sun et al., 2016). Los HMA filogenéticamente pertenecen al phylum Glomeromycota aunque en el pasado fueron agrupados dentro del antiguo phylum Zygomycota debido a un error observacional (Schüßler et al., 2001).

1.4.1. Características de los HMA

Los HMA son microorganismos del suelo que se encuentran distribuidos a nivel mundial (Selvakumar et al., 2018). Son capaces de colonizar ambientes como zonas agrícolas, pastizales, bosques tropicales, zonas boreales y alpinas (Bonfante & Genre, 2010). Biológicamente son organismos con reproducción asexual (Schüßler et al., 2001). Se propagan por medio de esporas, fragmentos de raíces colonizadas e hifas (Bever et al., 2001; Silvana et al., 2020). Son categorizados como biótrofos (Koide & Mosse, 2004) debido a que son simbioses obligados de aproximadamente el 90% de las plantas vasculares (Mueller et al., 2004; Saouy et al., 2011). Es decir, que necesitan asociarse a un huésped (planta) para obtener carbohidratos y completar su ciclo de vida (Sun et al., 2016).

1.4.2. Especificidad de la asociación planta - HMA

Los HMA carecen de mecanismos de reconocimiento para el establecimiento de la simbiosis con las plantas, por lo que pueden asociarse a una gran variedad de especies vegetales (Nazareno Saparrat et al., 2020). Sin embargo, los reportes más nuevos de la diversidad de especies de HMA en este phylum, mencionan un total de 343 especies (amphylogeny.com). Este número es considerablemente menor que la diversidad de plantas vasculares (283 556 especies) reportada (Neill, 2012) ya que se mencionan que los HMA se encuentran asociados a más del 80% de las plantas vasculares (Saouy et al., 2011). Pese a eso, se ha observado que no pueden asociarse a familias como *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae* y *Chenopodiaceae* (Nazareno Saparrat et al., 2020).

1.4.3. Mecanismo de asociación planta - HMA

La asociación inicia cuando los propágulos germinados de HMA responden a la presencia de una planta (Brundrett et al., 1996), la cual envía una señal química a los

propágulos (Nazareno Saparrat et al., 2020) particularmente cuando esta se encuentra con un déficit de fósforo (Saouy et al., 2011). A partir de este reconocimiento químico surge la colonización de la planta por el HMA, al momento que una hifa entre en contacto con la superficie de la raíz (Bonfante & Genre, 2010).

Las hifas penetran entre y por dentro de las células de la raíz (Nazareno Saparrat et al., 2020) formando estructuras conocidas como arbusculos (Silvana et al., 2020). Estos arbusculos se constituyen por una repetida ramificación de la hifa (Bever et al., 2001) y son considerados como el sitio de intercambio de nutrientes (Bonfante & Genre, 2010). A la par de este suceso, empieza el crecimiento del hongo y por ende el surgimiento de las hifas desde la planta hacia el medio donde se encuentra (Brundrett et al., 1996; Nazareno Saparrat et al., 2020).

Con la planta ya colonizada, las hifas empiezan la exploración del suelo para mejorar la captación de nutrientes de la planta (Jhonson & Gehring, 2007). Cabe destacar que esta asociación no es negativa para la planta, por el contrario, existen muchísimos beneficios producto de este proceso (Soudzilovskaia et al., 2020).

1.4.4. Beneficios de la asociación planta – HMA

Dado que esta es una relación simbiótica, la planta y el hongo se benefician mutuamente (Saouy et al., 2011). La planta provee al hongo los carbohidratos necesarios para su correcto funcionamiento a cambio de nutrientes como Fósforo (P), , Nitrógeno (N), Zinc (Zn) o Calcio (Ca) (Naranjo-Ortiz & Gabaldón, 2019; Seguel et al., 2015). Cabe acotar que los HMA actúan como fuente o reservorio de Carbono (C) para las plantas y les confieren otros beneficios (Jhonson & Gehring, 2007). Los HMA incrementan las tasas de crecimiento de las plantas, las protegen contra el ataque de patógenos (Webster & Weber, 2007) y aumentan su potencial para captar nutrientes y agua (Saouy et al., 2011).

1.4.5. Principales especies de HMA

Tabla 1

Principales especies de HMA

Familia	Género	Especie
Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i>	<i>A. birreticulata</i>
		<i>A. capsicula</i>
		<i>A. colombiana</i>
		<i>A. delicata</i>
		<i>A. denticulata</i>
		<i>A. dilatata</i>
		<i>A. elegans</i>
		<i>A. foveata</i>
		<i>A. kentinensis</i>
		<i>A. koskei</i>
		<i>A. lacunosa</i>
		<i>A. laevis</i>
		<i>A. mellea</i>
		<i>A. morrowiae</i>
		<i>A. myriocarpa</i>
		<i>A. rehmsii</i>
<i>A. rugosa</i>		
<i>A. scrobiculata</i>		
<i>A. spinosa</i>		
<i>A. sporocarpia</i>		
<i>A. tuberculata</i>		
Ambisporaceae	<i>Ambispora</i>	<i>A. leptoticha</i>
		<i>A. leptoticha GM</i>
		<i>A. leptoticha AM</i>
		<i>A. gerdemannii</i>
		<i>A. gerdemannii GM</i>
		<i>A. gerdemannii AM</i>
Archaeosporaceae	<i>Archaeospora</i>	<i>A. schenkii</i>
		<i>A. trappei</i>
Gigasporaceae	<i>Cetraspora</i>	<i>C. pellucida</i>
Claroideoglomeraceae	<i>Claideroglomus</i>	<i>C. claroideum</i>
		<i>C. etunicatum</i>
		<i>C. lamellosum</i>
		<i>C. luteum</i>

Gigasporaceae	<i>Dentiscutata</i>	<i>D. biornata</i> <i>D. erythropha</i> <i>D. heterogama</i> <i>D. rubra</i> <i>D. nigra</i> <i>D. reticulata</i>
Diversisporaceae	<i>Diversispora</i>	<i>D. ebúrnea</i> <i>D. epigaea</i> <i>D. globifera</i> <i>D. spurca</i> <i>D. tortuosa</i> <i>D. trimurales</i>
Acaulosporaceae	<i>Entrophospora</i>	<i>E. infrequens</i>
Glomeraceae	<i>Funneliformis</i>	<i>F. caledonius</i> <i>F. coronatus</i> <i>F. geosporus</i> <i>F. mosseae</i> <i>F. verruculosus</i>
Gigasporaceae	<i>Gigaspora</i>	<i>G. albida</i> <i>G. decipiens</i> <i>G. gigantea</i> <i>G. margarita</i> <i>G. rosea</i>
Glomeraceae	<i>Glomus</i>	<i>G. ambisporum</i> <i>G. clavisporum</i> <i>G. coremioides</i> <i>G. fistulosum</i> <i>G. hoy</i> <i>G. lacteum</i> <i>G. maculosum</i> <i>G. multicaule</i> <i>G. pansihalos</i>
Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>	<i>P. brasilianum</i> <i>P. occultum</i>
Gigasporaceae	<i>Racocetra</i>	<i>R. castanea</i> <i>R. coralloidea</i> <i>R. fulgida</i> <i>R. gregaria</i> <i>R. pérsica</i> <i>R. verrucosa</i>

Gigasporaceae	<i>Rhizophagus</i>	<i>R. aggregatus</i>
		<i>R. diaphanus</i>
		<i>R. clarus</i>
		<i>R. intraradices</i>
		<i>R. irregularis</i>
		<i>R. fasciculatus</i>
		<i>R. manihotis</i>
Gigasporaceae	<i>Scutellospora</i>	<i>R. sinuosus</i>
		<i>S. calospora</i>
		<i>S. cerradensis</i>
		<i>S. dipurpurascens</i>
Gigasporaceae	<i>Septoglomus</i>	<i>S. scutata</i>
		<i>S. constrictum</i>
		<i>S. deserticola</i>
		<i>S. viscosum</i>

Nota. Adaptado del INVAM <https://invam.ku.edu/species-descriptions>

1.4.6. **Ecología de los HMA**

Algunas especies segregan una glicoproteína de consistencia pegajosa llamada glomalina que favorece la formación de agregados estables al agua, aumentando la capacidad de retención hídrica y previniendo la erosión del suelo (Piepenbring, 2015). También cumplen roles como fuente de alimento para otros animales, transporte de Carbono desde las plantas hacia otros organismos (Brundrett et al., 1996) e influencia en composición diversidad y estabilidad de comunidades bióticas (Jhonson & Gehring, 2007).

1.4.7. **Usos actuales de los HMA**

Estos organismos pueden ser utilizados para la biorremediación, restauración de ecosistemas degradados, biotecnología y agricultura (Jhonson & Gehring, 2007; Nazareno Saparrat et al., 2020). Particularmente dentro de este último, se consideran clave para llevar a cabo prácticas agrícolas sustentables (Saouy et al., 2011). Debido a que por sus grandes beneficios se aceptan como bionóculos que representan una alternativa al uso de agroquímicos convencionales (Selvakumar et al., 2018).

2.1. **Cultivos de café**

2.1.1. **Origen del café**

Aparentemente las primeras referencias al origen del café surgen en el antiguo testamento y se cree que el inicio de su cultivo data del año 575 A.C. (R. F. Smith, 1985). No obstante, la palabra café como tal, surge aproximadamente entre los siglos V y VIII, cuando es cultivado por primera vez África tropical (específicamente en Etiopía) e introducido al mundo árabe (Ngo et al., 2011; Vieira, 2008). El término café se deriva de la palabra árabe “quahweh” que originalmente significaba vino, pero por costumbres musulmanas, se cambió a café (R. F. Smith, 1985).

2.1.2. Generalidades del café

El café pertenece a la familia Rubiaceae – subfamilia Ixoroideae, específicamente al género *Coffea* L. (Davis et al., 2006). Abarca entre 90 a 124 especies (Melese & Kolech, 2021). Las principales especies cultivadas con fines comerciales son *Coffea canephora* y *Coffea arabica* (Ngo et al., 2011; Vieira, 2008) siendo esta última la más importante (Davis et al., 2006).

Coffea arabica es una dicotiledónea que crece como arbusto o árbol perenne y alcanza una altura aproximada de entre 8 a 10 m (Melese & Kolech, 2021; Vieira, 2008). Se cultiva en aproximadamente 80 países tropicales, siendo para algunos su principal fuente de divisas (Ngo et al., 2011).

2.1.3. Importancia económica del café

El café segunda bebida mejor vendida a nivel mundial, por lo que es pilar fundamental de la economía de los países productores (Lu et al., 2022). La producción mundial de café ha incrementado en los últimos años (2012 – 2014) hasta alcanzar un valor de 8.9 millones de toneladas (Van der Vossen et al., 2015). Adicionalmente se prevé que la producción crezca anualmente, a una tasa de 1.2% hasta el año 2030 (Ngo et al., 2011).

A causa de este crecimiento, el comercio de café ha sido capaz de generar entre 10 a 12 billones de dólares al año, representando fuentes de ingresos y trabajo para 20 a 25 millones de personas aproximadamente (Melese & Kolech, 2021).

2.1.4. Patógenos del café

Mundialmente los cultivos de café se enfrentan a una amenaza muy grande, causada por patógenos que son un gran problema (Lu et al., 2022). Algunos ejemplos de estos, son *Corticium koleroga*, *Mycena citricolor*, *Xylella fastidiosa*, *Pseudomonas syringae*, entre otros (Van der Vossen et al., 2015). Sin embargo, los dos patógenos más serios y destructivos del café son *Hemileia vastatrix* y *Colletotrichum kahawai* que causan la “roya” y la “enfermedad de las cerezas del café” respectivamente (Melese & Kolech, 2021).

La roya fue responsable de la desaparición del café hace 150 años y es la principal amenaza para los cultivos de café en todo el mundo (Lu et al., 2022). Mientras que, la enfermedad de las cerezas del café es la mayor amenaza para los cultivos de Etiopía, Tanzania, Kenia y otros países africanos (Melese & Kolech, 2021). Debido a las pérdidas millonarias causadas por estos, la ciencia busca a través de recursos genéticos, encontrar huéspedes resistentes a estas enfermedades (Van der Vossen et al., 2015).

3.1. Aislamiento de hongos micorrízicos arbusculares

El aislamiento de HMA se ha convertido en una actividad que ha ganado relevancia en las últimas décadas (Trejo-Aguilar & Banuelos, 2020). Gracias a los beneficios que brindan estos organismos en la producción vegetal, se considera que la producción de cultivos puros de HMA puede ser clave para su uso en agricultura como biofertilizantes (Selvakumar et al., 2018).

La inoculación de HMA es beneficiosa en determinadas circunstancias, pero sus costos de producción son demasiado elevados en comparación al costo de los fertilizantes convencionales (Koide & Mosse, 2004). Adicionalmente, la producción en masa está limitada por la naturaleza biótrofa de los HMA, que dependen de un huésped para sobrevivir (Selvakumar et al., 2018). Cabe acotar que las técnicas para la obtención de cultivos puros se han enfocado principalmente en utilizar esporas, pero también se utilizan otras estructuras como vesículas, hifas y fragmentos de raíces (Nandan Meena & Mohan Naik, 2019).

Por todos los antecedentes mencionados, las investigaciones en esta área buscan proponer, desarrollar y/o perfeccionar técnicas de aislamiento que aumenten la pureza de los cultivos y disminuyan sus costos (Koide & Mosse, 2004).

3.2. El futuro de los aislamientos

Pese a que la ciencia ha logrado establecer técnicas de aislamiento funcionales, su rango de éxito es de aproximadamente 1% (Walker, 1999). Estas técnicas también se enfrentan a riesgo de contaminación cruzada y/o poca adaptación de los HMA a las condiciones que se establezcan (Akhtar & Abdullah, 2014). Se espera que en el futuro surjan nuevas técnicas que consideren estas dificultades, dado que estamos al inicio de una era, donde la utilización de HMA cobrará mayor interés (IJdo et al., 2011).

Capítulo dos

Metodología

2.1. Material biológico de partida

Se utilizó un inóculo (suelo+raíces colonizadas+esporas) proveniente de plantaciones de café de la provincia de Loja, Ecuador. Estos sitios fueron Lozumbe (Chaguarpamba), Malacatos, Chaguarpamba (centro) y El Valle (cantón Loja). Este material se recolectó en enero de 2020 y se multiplicó en plantas trampa en un sustrato desinfectado por un periodo de 24 meses. Luego de este tiempo el inóculo se almacenó por 3 meses a temperatura ambiente a la sombra hasta el establecimiento de los ensayos.

2.2. Tratamiento del suelo

Para dar inicio con el presente estudio, se trabajó con un sustrato estándar: tierra de jardín y arena de mina en proporción 1:1, v/v. Para eliminar la carga nativa de HMA, el sustrato se autoclavó (121°C, 1.1 kgf/cm², durante 15 min) en 3 ocasiones, dejando descansar el sustrato por un periodo de 24 horas entre cada sesión de autoclavado.

2.3. Obtención de *Plantago lanceolata* libres de micorriza

Se recolectaron semillas secas de *Plantago lanceolata*, las cuales fueron desinfectadas. Para ello, se colocaron en un tubo con agua y una gota de jabón líquido, para ser lavadas con agitación durante tres minutos. Después se realizaron tres enjuagues con agua y se descartaron las semillas que se encontraban flotando. Posteriormente, se lavaron con etanol al 70% durante un minuto e inmediatamente con una solución de cloro al 2% por 15 minutos con agitación constante, siendo en ambos pasos enjuagadas 3 veces con agua. Una vez transcurrido ese tiempo, las semillas se colocaron en un tubo con agua por 24 horas, para acelerar el tiempo de germinación.

Posterior a las 24 horas, se colocaron las semillas en macetas que contenían sustrato previamente autoclavado, dentro de fundas sunbag (Sigma-Aldrich). Se dejaron crecer por dos semanas con riego cada cuatro días, para luego utilizarse en los respectivos ensayos.

2.4. Métodos de aislamiento de HMA usados en el estudio

Se aplicaron tres métodos para el aislamiento de HMA: (1) cultivo monospórico de esporas desnudas, (2) cultivo monospórico de esporas encapsuladas y (3) cultivo de fragmento simple de raíz.

Para los métodos de cultivo monospórico de esporas desnudas y encapsuladas las esporas se extrajeron por medio de la técnica de tamizado húmedo y decantado propuesta por Gerdemann & Nicolson (1963), modificado por Sieverding (1983) para suelos tropicales y separación en gradiente de sacarosa. Cada muestra de 100 g de suelo se procesó a través de un colador normal (para eliminar fragmentos de materia orgánica grandes) y de un tamiz de 38 μ , en el cual se recolectaron las esporas.

Una vez lavado el material recolectado en el tamiz de 38 μ , este se colocó en tubos falcon de 50 ml de capacidad. Los tubos con agua hasta la marca de 30 ml se colocaron en la centrífuga a 3500 rpm durante 5 minutos (Walker, 1999). Una vez transcurrido el tiempo se descartó el sobrenadante y se le adicionó sacarosa al 70% hasta la marca de 30 ml, para luego centrifugar bajo los mismos parámetros. Finalizado el proceso de centrifugación, el sobrenadante se depositó en el tamiz de 38 μ para eliminar los restos de sacarosa con ayuda de agua y finalmente ser trasladado a una caja Petri para extraer las esporas con ayuda de una micropipeta de 0.5 a 10 μ .

2.4.1. Método 1: Cultivo monospórico de esporas desnudas

Bajo un estereoscopio y con ayuda de una micropipeta se seleccionaron 100 esporas de diferentes morfotipos. Se recolectaron únicamente esporas de HMA con apariencia viable: color brillante, contenido lipídico y ausencia de manchas en la pared externa de la espora. Posteriormente, se inoculó una única espora sobre la raíz de tres plántulas de *P. lanceolata* de 14 días de edad. Seguidamente, las plantas se colocaron en pequeños recipientes de plástico con sustrato autoclavado (macetas) con huecos en la base para eliminar exceso de agua.

Una vez sembradas las plantas, se les adicionó aproximadamente ~ 0.20g de un fertilizante de liberación lenta (Osmocote®) y las macetas se introdujeron en vasos domos

que se sellaron con ayuda de cinta masqui y plástico de envolver para evitar la contaminación cruzada con otros HMA. Se sembraron un total de 100 macetas utilizando este método.

2.4.2. Método 2: Cultivo monospórico de esporas encapsuladas en alginato

Para la evaluación de este método se preparó una solución de CaCl_2 0.1 M y otra de alginato al 2%, las cuales se sometieron a proceso de autoclavado. Posteriormente el alginato se dispensó en una caja Petri y con ayuda de una micropipeta de 0.5 a 10 μL se adicionaron 100 esporas de diferentes morfotipos extraídos al azar del inóculo y con apariencia viable. Adicionalmente, con ayuda de una micropipeta se tomó un volumen de aproximadamente 50 μL alginato conteniendo una sola espora, para luego polimerizar con ayuda de la solución de cloruro de calcio.

Posterior a la polimerización, se recuperaron las cápsulas polimerizadas de alginato con ayuda de un tamiz y se descartó la solución de CaCl_2 . Con ayuda del estereoscopio se verificó la presencia de una sola espora de HMA en cada una de las cápsulas de alginato, aquellas que no tuvieron esta característica se descartaron.

Finalmente, se utilizó una cápsula (con solo una espora de HMA) y tres semillas de *P. lanceolata* previamente desinfectadas para cada uno de los 100 intentos de aislamiento utilizando esta metodología. Las cápsulas y semillas se sembraron en sustrato autoclavado y humedecido dentro de un vaso de plástico pequeño (macetas) con huecos en la base para eliminar exceso de agua. Una vez hecha la siembra, se les adicionó ~ 0.20g de un fertilizante de liberación lenta (Osmocote®) y las macetas se introdujeron en vasos domos que se sellaron con ayuda de cinta masqui y plástico de envolver. Se sembró un total de 100 macetas y al momento de regar, se hizo por los alrededores de la maceta, con el fin de evitar lavar la espora.

2.4.3. Método 3: Aislamiento por cultivos a partir de fragmento de raíz

En este tercer método a diferencia de los anteriores (en los que se utilizaron esporas de un inóculo almacenado) se utilizaron raicillas colonizadas por HMA procedentes de cultivos trampa activos con inóculo de la misma procedencia. Estas raíces se lavaron con agua destilada para eliminar la tierra circundante. Una vez lavadas, las raíces se cortaron en

fragmentos de 0.5 cm de longitud con ayuda de un bisturí estéril y se depositaron en un tubo falcon para pasar al tratamiento de desinfección.

Para la desinfección se utilizó el protocolo propuesto por Cranenbrouck et al., 2005. El método consistió en la preparación de soluciones de Hipoclorito de Calcio al 6%, Cloramina T al 2% con una gota de jabón líquido, Estreptomicina al 0.02%, Gentamicina al 0.01% y Etanol al 75%. Adicionalmente se preparó agua desmineralizada (agua destilada dos veces) y medio de cultivo con Phytigel, los cuales se sometieron a proceso de autoclavado.

Bajo cabina de flujo laminar se dio inicio al tratamiento de desinfección. El tubo que contenía las raíces se llenó con agua desmineralizada y se colocó en una superficie flotante dentro del sonicador para terminar de remover el material que pudo haber quedado en las raíces. Luego se depositaron en una jeringa de 50 ml conservando la aguja, donde se lavaron 3 veces con agua desmineralizada. La función de la jeringa es ayudar a realizar los lavados eliminando el líquido utilizado a través de la aguja con ayuda del mecanismo propio del dispositivo y el sonicador para ayudarnos a remover todas las impurezas y los restos de soluciones utilizadas en la desinfección.

Posterior a los 3 enjuagues, las raíces se trataron con una solución de etanol al 75% por 10 segundos y se lavaron nuevamente tres veces con agua desmineralizada. Después se adicionó la solución de Hipoclorito de Calcio a las raíces durante dos minutos (un minuto en el sonicador y otro minuto fuera de este) y se enjuagaron 3 veces con agua desmineralizada. Enseguida se trataron con la solución de Cloramina T y jabón líquido por 10 minutos (mitad del tiempo en el sonicador y la otra mitad fuera de él) y enjuagaron 3 veces con agua desmineralizada.

Para el último paso de la desinfección se hizo una mezcla de la solución de Gentamicina y Estreptomicina, previamente purificadas con ayuda de filtros para jeringa con un tamaño de poro de 0.22 μm . La solución de antibióticos obtenida se utilizó para tratar las raíces durante 10 minutos (mitad del tiempo en el sonicador y la otra mitad fuera de él) y se enjuagó tres veces con agua desmineralizada. Las raíces ya tratadas se colocaron en una solución fresca de antibiótico y se mantuvieron ahí hasta el momento del sembrado.

Con ayuda de una pinza estéril se depositaron los fragmentos de raíces en cajas petri separados unos de otros y gracias a una micropipeta de 100 a 1000 μ se depositó una gota del medio con Phytigel sobre cada uno de los fragmentos de raíz presentes en las cajas petri. Estos cultivos se sellaron con papel Parafilm y plástico de cocina y se incubaron a 27° C por 7 días. Con ayuda de un estereoscopio se seleccionaron fragmentos de raíz con crecimiento de hifas a partir de ambos extremos de los cortes, los cuales se inocularon en tres plántulas de *P. lanceolata* de 14 días de edad. Esto se sembró en sustrato autoclavado y humedecido dentro de un vaso de plástico pequeño (macetas) con huecos en la base para eliminar exceso de agua.

Tras la siembra de las plantas, se les adicionó ~ 0.20g de un fertilizante de liberación lenta (Osmocote®) y las macetas se introdujeron en vasos domos que se sellaron con ayuda de cinta masqui y plástico de envolver. En total para este método, se sembraron 100 macetas. Las plantas se dejaron crecer en los sistemas anteriormente mencionados por un periodo de 3 meses antes de la evaluación de sus raíces para verificar colonización por HMA.

2.5. Toma de muestras

2.5.1. Obtención de las raíces para procesar

Con ayuda de unas pinzas se recolectaron al azar pequeños fragmentos de raíces que se encontraban en el sustrato utilizado, las raíces se almacenaron en tubos eppendorf de 1.5ml con alcohol al 70% hasta su procesamiento en el laboratorio. Las plantas se mantuvieron vivas hasta la verificación de colonización.

2.5.2. Tinción y montaje de las raíces

Las raíces se lavaron con agua tres veces para eliminar cualquier rastro de alcohol y se les adicionó KOH al 10%. Los tubos con KOH se introdujeron en una placa de calentamiento por 15 minutos, transcurrido este tiempo se descartó en KOH y se enjugaron tres veces con agua. Posteriormente se adicionó HCl al 10% durante un minuto, cuidando que no pase del tiempo establecido para evitar daños a la raíz e inmediatamente se adicionó azul de metileno a 0.05%. Los tubos con azul de metileno se introdujeron a la placa de calentamiento por 15 minutos.

Una vez teñidas las raíces, en portaobjetos etiquetados, con ayuda de una pinza se depositaron los fragmentos de raíces y con una pipeta Pasteur se adiciona una pequeña cantidad de PVLG para fijar las raíces. Con cubreobjetos se cubren las raíces y pasan a ser observadas en el estereoscopio, para evaluar si existe o no colonización. Fueron obtenidas una placa por cada maceta con aproximadamente 10 fragmentos de raíz cada una.

2.5.3. Cuantificación de esporas viables y determinación de morfotipos de esporas de HMA del inóculo del café

Se determinó la cantidad de esporas de HMA por cada 100g del sustrato utilizado para conocer su frecuencia en el inóculo proveniente de plantaciones de café. Adicionalmente, como complemento a los métodos de aislamientos 1 y 2, se realizó de forma paralela la determinación de los morfotipos de esporas encontrados. Para ello, las esporas extraídas del inóculo utilizado fueron clasificadas en morfotipos y montadas en placas portaobjetos con polyvinyl lactoglicerol (PVLG) y reactivo de Melzer. Con ayuda de una micropipeta se colocaron gotas de estos reactivos en dos lugares separados del portaobjeto, cinco esporas por cada sector. Se determinó las características morfológicas de las esporas utilizando los siguientes criterios: **(1) color**, se utilizó una cartilla presente en el libro de Brundrett et al. (1996) que define los colores como porcentajes de cian (C), amarillo (Y) y magenta (M). Esto con la finalidad de estandarizar la identificación del color de la espora y poder usar esa característica para su identificación; **(2) forma**, características morfológicas representativas y reacción a Melzer. Esta última se estableció observando si la espora en contacto con el reactivo adoptaba una coloración de tono rosado a lacre (según la intensidad de la reacción); **(3) tamaño** se determinó con ayuda de un microscopio con cámara, que permitió tomar las respectivas fotografías y medir el diámetro de la espora; **(4) presencia de hifa de suspensión**, que es la forma de conexión de la hifa con la espora, que es muy típica para cada género de HMA y **(5) ornamentación externa de la espora**. Con todas estas características identificadas se determinó cual es el género putativo al que pertenece cada uno de los morfotipos de esporas.

Capítulo tres

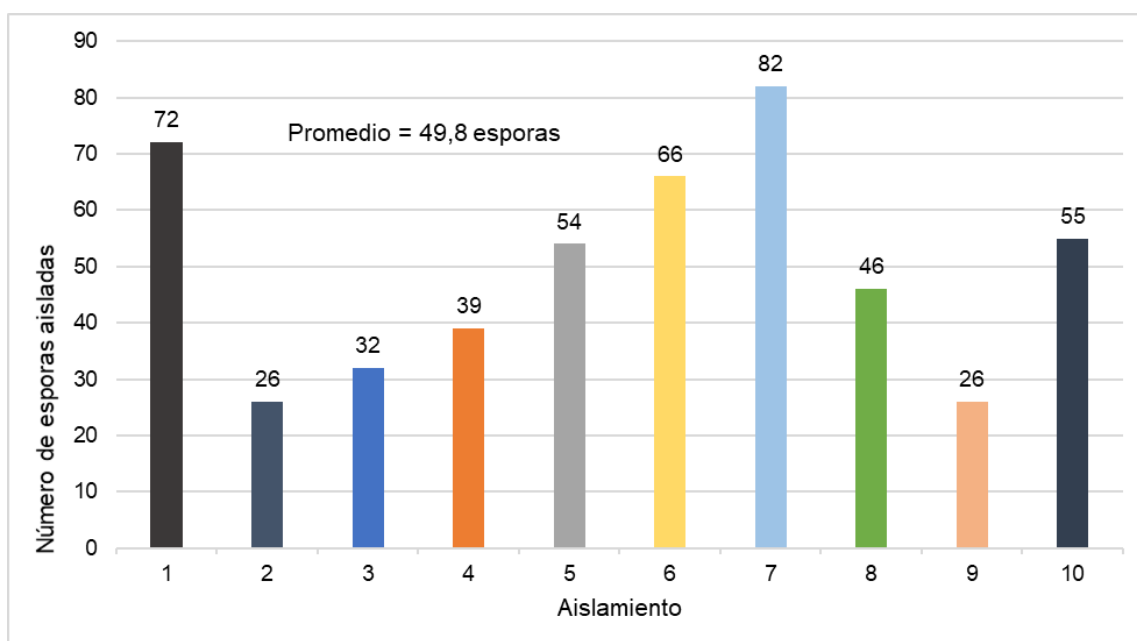
Resultados y Discusión

3.1. Cuantificación de esporas presentes en el inóculo utilizado.

Por cada 100g de suelo se aislaron en promedio 50 esporas (Figura 2). Estos resultados se sustentan con lo mencionado por Bertolini et al. (2018) que en algunas localidades se encontró entre 76 a 96 esporas por cada 100g de suelo, acotando que el sitio de estudio es en varios cafetales de México. Adicionalmente, Urgiles Gómez et al. (2019) menciona que obtuvieron entre 83 a 120 esporas por cada 100g y este estudio fue realizado en la zona de la provincia de Loja.

Figura 2

Frecuencia de esporas aparentemente viables de HMA en 10 lotes de 100g de suelo



Nota. El aislamiento de esporas se hizo con el método de tamizado húmedo y decantado propuesto por Gerdemann & Nicolson (1963), modificado por Sieverding (1983) para suelos tropicales y separación en gradiente de sacarosa. Cada barra representa una repetición (muestra de 100g de suelo).

No obstante, en un estudio realizado con suelo de las mismas localidades de las que se consiguió el material biológico de partida, se obtuvo un promedio de entre 284 a 598 esporas por cada 100g de suelo (Urgiles-Gómez et al., 2020). Estos resultados se apoyan con

lo presentado por Moína-Quimí et al. (2018) que en suelos ecuatorianos, hallaron un promedio de entre 140 a 340 esporas por 100g de suelo. Así mismo, cabe resaltar que Bertolini et al. (2018) expresa que la abundancia de esporas puede ser mayor en sistemas que no sean monocultivo o que tengan hospederos que promuevan la producción de esporas

3.2. Identificación y caracterización de morfotipos

Se identificaron cuatro morfotipos diferentes con sus características más destacadas (**Tabla 2**). Tres pertenecen al género *Acaulospora* y el otro al género *Glomus*. Urgiles-Gómez et al. (2020) en su trabajo realizado en las localidades de las cuales se extrajo el material biológico de partida para esta investigación, reporta que los géneros *Glomus* y *Acaulospora* fueron los dominantes. Se sustentan estos hallazgos gracias a lo obtenido por Bolaños-B et al. (2000) y Bertolini et al. (2018) al analizar cafetales colombianos y mexicanos respectivamente; sin embargo este último reportó la presencia de géneros adicionales como *Gigaspora* y *Sclerocystis*.

Adicionalmente, Urgiles Gómez et al. (2019) y Moína-Quimí et al. (2018) reportan que en los suelos de Loja y sistemas agroforestales del Ecuador también, existe la presencia de *Scutellospora* y *Gigaspora*, aparte de *Glomus* y *Acaulospora*. Sangabriel-Conde et al. (2017) manifiesta que tanto *Glomus* como *Acaulospora* son los géneros predominantes en todos estos tipos de suelo. Así mismo, Campo-Arana et al. (2015) afirma que *Glomus* y *Acaulospora* son muy frecuentes en suelos tropicales con pH de 3.3 a 8 y Urgiles-Gómez et al. (2020) expresa que la dominancia o prevalencia de *Glomus*, es gracias a la facilidad y rapidez con la que infecta las raíces.

Tabla 2

Caracterización morfológica de los morfotipos más abundantes obtenidos en los distintos aislamientos

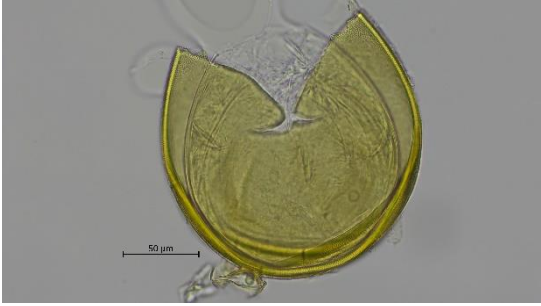
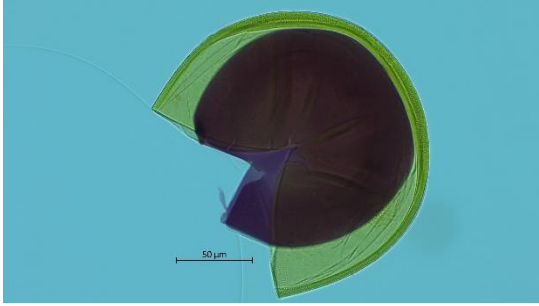



Morfotipo	Color	Forma	Característica morfológica	Género	Reactivo Melzer	Tamaño μm
1	0% C, 80% Y, 0% M	Globosa	No presenta hifa de suspensión	<i>Acaulospora</i>	++	171.43
2	0% C, 100% Y, 30% M	Globosa	Presenta hifa de suspensión, pero ninguna ornamentación	<i>Glomus</i>	Negativo	84.31
3	0% C, 80% Y, 10% M	Globosa	Presenta ornamentación reticulada con contenido lipídico abundante	<i>Acaulospora</i>	N/A	277.46
4	0% C, 90% Y, 40% M	Globosa	No presenta hifa de suspensión	<i>Acaulospora</i>	N/A	106.96

Nota. NA: No hay dato. +++: Positivo a Melzer muy pigmentado

Para el análisis con tinción de Melzer, únicamente el morfotipo uno presentó una reacción positiva; mientras que el número dos, reacción negativa y para los dos restantes no fue posible obtener ese dato. Finalmente, para evidenciar la morfología de cada morfotipo se construyó una tabla con fotografías detalladas tanto con tinción de Melzer como sin ella (**Tabla 3**).

Tabla 3

Fotografías de los diferentes morfotipos obtenidos

Morfotipo	Sin reactivo de Melzer	Con reactivo de Melzer
1		
2		
3		

4



3.3. Evaluación de los métodos de aislamiento empleados

En total entre los tres métodos empleados, se obtuvieron 38 aislamientos (**Figura 3**) los cuales fueron verificados por colonización micorrízica intraradicular (**Figura 4**). No obstante, mediante el primer método (cultivo monospórico de esporas desnudas) únicamente se obtuvo un total de 4 plantas colonizadas (4%) por HMA (**Figura 4A**). Un número similar de plantas con colonización efectiva de HMA fue reportado por Tapadar et al. (2017), quienes obtuvieron 5% plantas exitosamente colonizadas. Lo mencionado, coincide en parte con lo expresado por Walker (1999) acerca de los rangos de éxito sumamente bajos (alrededor de 1%) para este método de aislamiento. Sin embargo, sí se han presentado porcentajes de éxito mayores que van desde el 14% hasta el 100% (El Hilali et al., 2022; Fracchia et al., 2001; Paré et al., 2022; Tchabi et al., 2010). Es importante mencionar que tanto Fracchia et al. (2001) como Paré et al. (2022) utilizaron una variación del método original, haciendo germinar primero las esporas y luego adicionándolas a las raíces; esta técnica permite obtener cultivos monospóricos con mayor porcentaje de éxito.

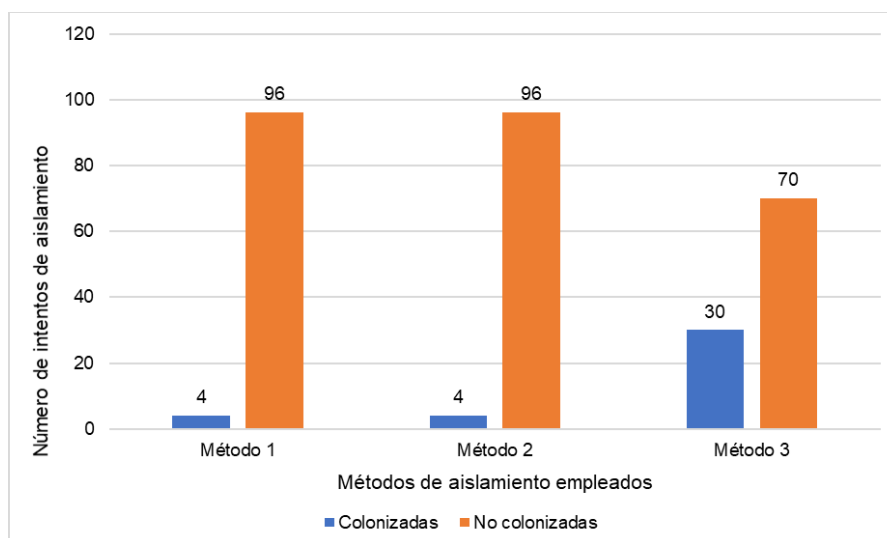
Con el segundo método (cultivo monospórico de esporas encapsuladas en alginato) se consiguieron 4 plantas colonizadas (4%) por HMA (cultivo por encapsulación con alginato) (**Figura 4B**). Similar a lo reportado por Declerck et al. (1996) que manifiesta que las cápsulas con una sola espora (metodología aplicada a este trabajo), poseen una menor capacidad de infección, al compararlas con las que tienen de 4 esporas en adelante. Esto es corroborado por De Jaeger et al. (2011) que inoculando cápsulas con grupos de más de una espora, demostraron que estas poseían una capacidad de infección muchísimo más alta con un rango de éxito de entre 25 a 32%. También se ha utilizado para cada planta 5 cápsulas con 200 esporas cada una, reportando un 100% de éxito en la colonización (Jaizme-Vega et al., 2003). Aunque nuestro porcentaje de éxito no fue alto, la encapsulación en alginato, tiene muchos beneficios para los HMA del género *Glomus* y *Acaulospora*, ya que incrementa la capacidad del hongo para colonizar raíces y la resistencia de la planta al estrés hídrico (Rojas-Sánchez et al., 2022), por eso consideramos que el método de pregerminar la espora podría aumentar

nuestro porcentaje de éxito. Para obtener estos aislamientos, los métodos que incluyen un mayor número de esporas de HMA por cápsula solo son efectivos cuando se conoce con certeza que todas las esporas pertenecen a una misma especie (Jaizme-Vega et al., 2003)

Con el tercer método aplicado (aislamiento por cultivos a partir de fragmentos de raíz) se consiguieron 30 plantas colonizadas (30%) por HMA (**Figura 4C**). Para esta técnica, Silvani et al. (2008) comentan que casi todas las plantas utilizadas en su estudio, fueron colonizadas por HMA. Por otro lado, Klironomos & Hart (2002) reportan que la capacidad infectiva de estos propágulos fue demasiado alta con hongos de los géneros *Glomus* y *Acaulospora*. Esto se debe a que los cultivos con fragmentos de raíz, presentan alta especificidad (Schalamuk & Cabello, 2010). Una desventaja del uso de fragmentos de raíz para la obtención de aislamientos es de que a pesar de que fue muy eficiente para colonizar las plántulas de *P. lanceolata*, no tenemos la certeza de que el fragmento de raíz contenga una sola especie de HMA por lo que deberán realizarse estudios posteriores (Silvani et al., 2008). Para estudios de obtención de comunidades de HMA el método más apropiado según nuestros resultados, es utilizando fragmentos pequeños de raíces desinfectadas, ya que la utilización de métodos de aislamiento centrados únicamente en esporas aumenta el sesgo de dejar otras especies de HMA que al momento no estaban esporulando o que rara vez producen esporas (Bever et al., 2001; Smith & Read, 2008) por lo que se sugiere la utilización de este método.

Figura 3

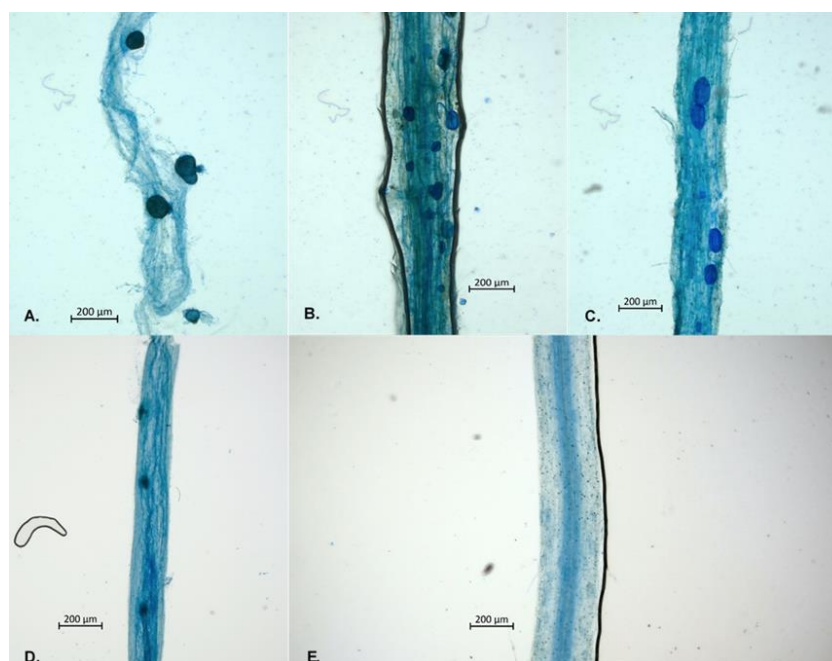
Número de aislamientos de HMA obtenidos con los tres métodos empleados



Nota. Cada método empleado tiene una barra azul y otra naranja. Las barras azules de todos los métodos representan los aislamientos exitosos y las naranjas los no exitosos.

Figura 4

Fotografías de los aislamientos obtenidos por cada método empleado



Nota. Aislamiento obtenido por el primer método (A), aislamiento obtenido por el segundo método (B), aislamiento obtenido por el tercer método (C), colonización por endófitos oscuros (D), raíz no colonizada (E).

Adicionalmente, se obtuvieron algunas plantas tanto del primer y tercer método que presentaban colonización por hongos endófitos oscuros, pero no por hongos micorrízicos arbusculares (**Figura 4D**). Al respecto, Zubek et al. (2011) reporta la presencia de endófitos oscuros en el 36% de todas las especies analizadas en su investigación y que al igual que los HMA, pueden mejorar el rendimiento de la planta, especialmente en aquellas que no pueden ser colonizadas por HMA.

Conclusiones

La baja cantidad de esporas y bajo número de morfotipos encontrados puede deberse a que nuestro material biológico de partida es pequeño en comparación al lugar de su proveniencia, haciendo que represente una mínima parte de la gran cantidad de esporas y la diversidad de estas, que poseen estos suelos.

Gracias a las condiciones del sitio del que proviene el material biológico de partida, los géneros *Acaulospora* y *Glomus* presentan una gran dominancia sobre los otros géneros; específicamente este último, gracias a la rapidez y facilidad con la que puede colonizar las raíces de las plantas.

De los tres métodos de aislamiento empleados, se obtuvieron plantas colonizadas; sin embargo, el mejor de todos fue el cultivo a partir de fragmentos de raíces, con el que se obtuvo el 30% de colonización.

Uno de los dilemas al usar el método de cultivo a partir de fragmentos de raíces la dificultad de obtener aislamientos puros, debido a que puede haber más de una especie de HMA; no obstante, este método otorga algo de especificidad porque estos propágulos presentan un potencial infectivo altísimo para los géneros *Glomus* y *Acaulospora*, pero igual se deben realizar estudios posteriores.

Recomendaciones

En caso de querer aumentar el éxito en la colonización para el método por cultivo monospórico, diversos autores recomiendan primero la pregerminación de las esporas en medio de cultivo y luego la inoculación de estas en las raíces de la planta hospedera.

En estudios de obtención de comunidades de HMA se recomienda el método por cultivo de fragmentos de raíz, debido a que utilizar métodos enfocados en esporas aumenta el sesgo de dejar por fuera otras especies que en ese momento no hayan estado presentes.

Se recomienda estudiar más a fondo la colonización por hongos endófitos oscuros y como estos pueden representar una alternativa para las plantas que no pueden asociarse con los HMA.

Referencias

- Akhtar, M. S., & Abdullah, S. N. A. (2014). Mass production techniques of arbuscular mycorrhizal fungi: Major advantages and disadvantages: A review. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 11(3), 1199–1204. <https://doi.org/10.13005/bbra/1506>
- amf-phylogeny.com. (2021). *Glomeromycota PHYLOGENY*. <http://www.amf-phylogeny.com/>
- Bertolini, V., Montaña, N. M., Sánchez, E. C., Fregoso, L. V., Ruiz, J. G., & Vázquez, J. M. M. (2018). Abundancia y riqueza de hongos micorrizógenos arbusculares en cafetales de Soconusco, Chiapas, México. *Revista de Biología Tropical*, 66(1), 91–105. <https://doi.org/10.15517/rbt.v66i1.27946>
- Bever, J. D., Schultz, P. A., Pringle, A., & Morton, J. B. (2001). Arbuscular mycorrhizal fungi: More diverse than meets the eye, and the ecological tale of why. *BioScience*, 51(11), 923–932. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0923:AMFMDT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0923:AMFMDT]2.0.CO;2)
- Bolaños-B, M. M., Rivillas-Osorio, C. A., & Suárez-Vásquez, S. (2000). Identificación De Micorrizas Arbusculares En Suelos De La Zona Cafetera Colombiana. *Cenicafé*, 51(4), 245–262.
- Bonfante, P., & Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant - Fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 1(4), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms1046>
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., Disclaimer, N. M., Neale, M. B., Grove, B. T., Malajczuk, N., Csiro, :, & Products, F. (1996). *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture* (P. Lynch (ed.); Issue June 1982). Australian Centre for International Agricultural Research.
- Campo-Arana, R. O., Paternina-González, V. L., García-Duque, R. M., & Barrera-Violet, J. L. (2015). Hongos micorrizicos arbusculares asociados a cultivos de plátano de San Juan de Urabá y Los Córdoba. *Fitopatología Colombiana*, 39(1), 5–10.

<https://www.researchgate.net/publication/309735585>

Carris, L. M., Little, C. R., & Stiles, C. M. (2012). *Introduction to Fungi*. The American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.2307/4117096>

Davis, A. P., Govaerts, R., Bridson, D. M., & Stoffelen, P. (2006). An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152(4), 465–512. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x>

De Jaeger, N., De la Providencia, I. . ., Rouhier, H., & Declerck, S. (2011). *Co-entrapment of Trichoderma harzianum and Glomus sp. within alginate beads : impact on the arbuscular mycorrhizal fungi life cycle*. 125–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05035.x>

Declerck, S., Strullu, D. ., Plenchette, C., & Guillemette, T. (1996). Entrapment of in vitro produced spores of *Glomus versiforme* in alginate beads: in vitro and in vivo inoculum potentials. *Journal of Biotechnology*, 48, 51–57. [https://doi.org/SO168-1656\(96\)01396-X](https://doi.org/SO168-1656(96)01396-X)

El Hilali, R., Symanczik, S., El kinany, S., Oehl, F., Ouahmane, L., & Bouamri, R. (2022). Cultivation, identification, and application of arbuscular mycorrhizal fungi associated with date palm plants in Drâa-Tafilalet oasis. *Rhizosphere*, 22. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100521>

Fracchia, S., Menendez, A., Godeas, A., & Ocampo, J. A. (2001). A method to obtain monosporic cultures of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(9), 1283–1285. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00014-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00014-1)

Gerdemann, J. W., & Nicolson, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46(2), 235–244. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(63)80079-0)

Hernández-Acosta, E., Trejo-Aguilar, D., Rivera-Fernández, A., & Ferrera-Cerrato, R. (2020). Arbuscular mycorrhiza as a biofertilizer in production of coffee. *Terra Latinoamericana*, 38(3), 613–628. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i3.659>

- IJdo, M., Cranenbrouck, S., & Declerck, S. (2011). Methods for large-scale production of AM fungi. *Mycorrhiza*, 21(1), 16. <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0337-z>
- Jaizme-Vega, M., Rodriguez-Romero, A., Marin Hermoso, C., & Declerck, S. (2003). Growth of micropropagated bananas colonized by root-organ culture produced arbuscular mycorrhizal fungi entrapped in Ca-alginate beads. *Plant Soil*, 254, 329–335.
- James, T. Y., Stajich, J. E., Hittinger, C. T., & Rokas, A. (2020). Toward a Fully Resolved Fungal Tree of Life. *Annual Review of Microbiology*, 74(1), 291–313. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-022020-051835>
- Jhonson, N. C., & Gehring, C. A. (2007). Mycorrhizas: Symbiotic Mediators of Rhizosphere and Ecosystem Processes. In Z. G. Cardon & J. L. Whitbeck (Eds.), *The Rhizosphere. An Ecological Perspective* (pp. 73–100). Academic Press. <https://doi.org/10.2307/4446136>
- Kendrick, B. (2011). *Fungi: Ecological Importance and Impact on Humans* (pp. 1–5). eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000369.pub2>
- Klironomos, J. N., & Hart, M. M. (2002). Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. *Mycorrhiza*, 12, 181–184. <https://doi.org/10.1007/s00572-002-0169-6>
- Koide, R. T., & Mosse, B. (2004). A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza*, 14, 145–163. <https://doi.org/10.1007/s00572-004-0307-4>
- Li, Y., Steenwyk, J. L., Chang, Y., Wang, Y., James, T. Y., Stajich, J. E., Spatafora, J. W., Groenewald, M., Dunn, C. W., Hittinger, C. T., & Shen, X.-X. (2021). A genome-scale phylogeny of the kingdom Fungi. *Current Biology*, 31, 1653–1665. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.01.074>
- Lu, L., Tibpromma, S., Karunarathna, S. C., Jayawardena, R. S., Lumyong, S., Xu, J., & Hyde,

- K. D. (2022). Comprehensive Review of Fungi on Coffee. *Pathogens*, 11(4), 1–17. <https://doi.org/10.3390/pathogens11040411>
- Margulis, L., & Chapman, M. J. (2009). Kingdom Fungi. *Kingdoms and Domains*, 379–409. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-373621-5.00004-0>
- Melese, Y. Y., & Kolech, S. A. (2021). Coffee (*Coffea arabica* L.): Methods, Objectives, and Future Strategies of Breeding in Ethiopia - Review. *Sustainability*, 13(19). <https://doi.org/10.3390/su131910814>
- Moína-Quimí, E., Oviedo-Anchundia, R., Nieto-Barcelona, S., Herrera-Samaniego, P., & Barcos-Arias, M. (2018). Evaluación de los Hongos Micorrízicos Arbusculares de zonas del trópico húmedo del Ecuador. *Bionatura*, 3(1), 531–536. <https://doi.org/10.21931/RB/2018.03.01.9>
- Mueller, G. M., Bills, G. F., & Foster, M. S. (2004). *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods* (K. Sonnack (ed.)). Elsevier Academic Press.
- Nandan Meena, S., & Mohan Naik, M. (2019). *Advances in Biological Science Research: A Practical Approach* (S. Nandan Meena & M. Mohan Naik (eds.); 1st Editio). Academic Press. <https://doi.org/10.2307/4448627>
- Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*, 94, 2101–2137. <https://doi.org/10.1111/brv.12550>
- Nazareno Saparrat, M. C., Ruscitti, M. F., & Arango, M. C. (2020). Micorrizas arbusculares. Biología y aplicaciones en el sector agro-forestal. In *Libros de Cátedra* (First, pp. 52–63). Editorial de la Universidad de La Plata. <https://doi.org/10.35537/10915/99599>
- Neill, D. A. (2012). ¿Cuántas especies nativas de plantas vasculares hay en Ecuador? *Revista Amazónica: Ciencia y Tecnología*, 1(1), 70–83. <https://www.uea.edu.ec/wp-content/uploads/2018/07/especies-nativas-plantas-ecuador-revista-cientifica-articulo-8->

vol-1-N-1.pdf

Ngo, H. T., Mojica, A. C., & Packer, L. (2011). Coffee plant – pollinator interactions : a review. *Canadian Journal of Zoology*, 89(8), 647–660. <https://doi.org/10.1139/Z11-028>

Paré, L., Banchini, C., Hamel, C., Bernier, L., & Stefani, F. (2022). A simple and low-cost technique to initiate single-spore cultures of arbuscular mycorrhizal fungi using a superabsorbent polymer. *Symbiosis*. <https://doi.org/10.1007/s13199-022-00878-5>

Piepenbring, M. (2015). *Introducción a la Micología en los Tropicos*. The American Phytopathological Society.

Rojas-Sánchez, B., Guzmán-Guzmán, P., Morales-Cedeño, L. R., Orozco-Mosqueda, M. del C., Saucedo-Martínez, B. C., Sánchez-Yáñez, J. M., Fadiji, A. E., Babalola, O. O., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2022). Bioencapsulation of Microbial Inoculants : Mechanisms, Formulation Types and Application Techniques. *Applied Biosciences*, 1, 198–220. <https://doi.org/10.3390/applbiosci1020013>

Sangabriel-Conde, W., Trejo-Aguilar, D., Soto-Estrada, A., & Alvarado-Castillo, G. (2017). Diversidad y funcionalidad de hongos micorrízico-arbusculares en plantaciones de Carica papaya L., con diferente manejo agronómico. *Agroproductividad*, 10(9), 90–94. <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/981>

Saouy, M., Pengchai, P., & Choonluchanon, S. (2011). Development of arbuscular mycorrhizal spore production in hydroponic culture on leaf lettuce (*Lactuca sativar var crispa* L.). *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences*, 10(1), 147–158.

Schalamuk, S., & Cabello, M. (2010). Arbuscular mycorrhizal fungal propagules from tillage and no-tillage systems: possible effects on Glomeromycota diversity. *The Mycological Society of America*, 102(2), 261–268. <https://doi.org/10.3852/08-118>

Schüßler, A., Schwarzott, D., & Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105(12), 1413–1421.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953756208620262>

- Seguel, A., Barea, J. M., Cornejo, P., & Borie, F. (2015). Role of arbuscular mycorrhizal symbiosis in phosphorus-uptake efficiency and aluminium tolerance in barley growing in acid soils. *Crop and Pasture Science*, *66*(7), 696–705. <https://doi.org/10.1071/CP14305>
- Selvakumar, G., Shagol, C. C., Kang, Y., Chung, B. N., Han, S. G., & Sa, T. M. (2018). Arbuscular mycorrhizal fungi spore propagation using single spore as starter inoculum and a plant host. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 124, Issue 6, pp. 1556–1565). <https://doi.org/10.1111/jam.13714>
- Sieverding, E. (1983). *Manual de metodos para la investigación de la micorriza vesículo - arbuscular en el laboratorio* (Issue I). CIAT.
- Silvana, V. M., Carlos, F. J., Lucía, A. C., Natalia, A., & Marta, C. (2020). Colonization dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in *Ilex paraguariensis* crops: Seasonality and influence of management practices. *Journal of King Saud University - Science*, *32*(1), 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.03.017>
- Silvani, V. A., Fracchia, S., Fernández, L., Pérgola, M., & Godeas, A. (2008). A simple method to obtain endophytic microorganisms from field-collected roots. *Soil Biology and Biochemistry*, *40*(5), 1259–1263. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.11.022>
- Smith, R. F. (1985). A History of Coffee. In M. N. Clifford & K. C. Willson (Eds.), *Coffee* (1st ed., pp. 1–12). Springer New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6657-1>
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis* (Third). Academic Press.
- Soudzilovskaia, N. A., Vaessen, S., Barcelo, M., He, J., Rahimlou, S., Abarenkov, K., Brundrett, M. C., Gomes, S. I. ., Merckx, V., & Tedersoo, L. (2020). Fungal Root: global online database of plant mycorrhizal associations. *New Phytologist*, *227*(3), 955–966. <https://doi.org/10.1111/nph.16569>
- Stajich, J. E., Berbee, M. L., Blackwell, M., Hibbett, D. S., James, T. Y., Spatafora, J. W., &

- Taylor, J. W. (2009). The Fungi. *Current Biology*, 19(18), 840–845. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.07.004>
- Sun, X., Hu, W., Tang, M., & Chen, H. (2016). Characterizing and handling different kinds of AM fungal spores in the rhizosphere. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 32, Issue 6). <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2053-0>
- Tapadar, S. A., Kalita, H., Hussain, A., Baro, D., & Jha, D. K. (2017). Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Associated with *Smilax perfoliata* Lour. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(7), 4501–4511. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.607.469>
- Tchabi, A., Coyne, D., Hountondji, F., Lawouin, L., Wiemken, A., & Oehl, F. (2010). Efficacy of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi for promoting white yam (*Dioscorea rotundata*) growth in West Africa. *Applied Soil Ecology*, 45(2), 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.03.001>
- Trejo-Aguilar, D., & Banuelos, J. (2020). Isolation and Culture of Arbuscular Mycorrhizal Fungi from Field Samples. In N. Ferrol & L. Lanfranco (Eds.), *Arbuscular Mycorrhizal Fungi* (pp. 1–18). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0603-2_1
- University of Kansas. (2022). *INVAM*. <https://invam.ku.edu/>
- Urgiles-Gómez, N., Guanchanamá-Sánchez, J., Granda-Mora, I., Robles-Carrión, Á., Encalada-Córdova, M., Loján-Armijos, P., Avila-Salem, M. E., Hurtado-Trejo, L., Poma-López, N., Collahuazo-Reinoso, Y., Araujo-Abad, S., & Quichimbo-Saraguro, L. (2020). Caracterización morfológica de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) asociados al café en sistemas agroforestales de la provincia de Loja, Ecuador. *Bosques Latitud Cero*, 10(2), 137–145. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/826> (Original work published 31 de diciembre de 2020)
- Urgiles Gómez, N., Lalangui Zhingre, C., Chamba Quiñonez, E., Loján Armijos, P., Poma

- López, L., Encalada Córdova, M., & Aguirre Mendoza, N. (2019). Aislamiento y caracterización morfológica de Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) de zonas riparias del Sur del Ecuador: un enfoque a la producción de biofertilizantes. *Revista Del Centro de Estudio y Desarrollo de La Amazonia*, 09(01), 1–7. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/700>
- Van der Vossen, H., Bertrand, B., & Charrier, A. (2015). Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): a review. *Euphytica*, 204, 243–256. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1398-z>
- Vieira, H. D. (2008). Coffee : The Plant and its Cultivation. In R. M. Souza (Ed.), *Plant-Parasitic Nematodes of Coffee* (1st ed., pp. 3–18). Springer Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8720-2>
- Walker, C. (1999). Methods for culturing and isolating arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza News*, 11(July), 2–4.
- Webster, J., & Weber, R. W. S. (2007). *Introduction to Fungi* (3rd ed.). Cambridge University Press.
- Wijayawardene, N. N., Hyde, K. D., Al-Ani, L. K. T., Tedersoo, L., Haelewaters, D., Rajeshkumar, K. C., Zhao, R. L., Aptroot, A., Leontyev, D. V., Saxena, R. K., Grossart, H. P., & Thines, M. (2020). Outline of Fungi and fungus-like taxa. *Mycosphere*, 11(1), 1060–1456. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/11/1/8>
- Zubek, S., Błaszowski, J., & Mleczko, P. (2011). Arbuscular mycorrhizal and dark septate endophyte associations of medicinal plants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 80(4), 285–292. <https://doi.org/10.5586/asbp.2011.033>

Apéndice I

Receta para preparar Polyvinyl-Lacto-Glycerol

Ingredientes:

- 100 ml de agua destilada
- 100 ml de ácido láctico
- 10 ml de glicerol
- 16.6 g de alcohol polivinílico (PVA)

Preparación:

1. Mezclar todos los ingredientes en un frasco ámbar **ANTES** de adicionarle el PVA.
2. El PVA debe estar hidrolizado al 99 o 100% y tener una viscosidad de entre 24 a 32 centipoise, en una solución acuosa al 4% y a 20°C.
3. Añadir el PVA a la mezcla de los demás ingredientes, en un baño de agua caliente, con temperatura de entre 70 a 80°C.
4. Aproximadamente luego de 4 a 6 horas, la solución estaría completamente clara y se la deja incubar en el baño de agua caliente toda la noche.

Fuente: Tomado del INVAM <https://invam.ku.edu/>

Apéndice II

Receta para preparar reactivo de Melzer

Ingredientes:

- 100 g de hidrato de cloral
- 100 ml de agua destilada
- 1.5 g de yodo
- 5.0 g de yoduro de potasio

Fuente: Tomado del INVAM <https://invam.ku.edu/>