



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE GUAYAQUIL

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DE UN CONSORCIO NATIVO DE HONGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES EN DOS ESPECIES VEGETALES PERTENECIENTES A LA FAMILIA
FABACEAE Y POACEAE UBICADAS EN EL CAMPUS MARÍA AUXILIADORA DE LA
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Trabajo de titulación previo a la obtención del

Título de Ingeniería en Biotecnología

AUTORAS:

ALLISON PAULETTE MORALES NÚÑEZ

NICOLLE DAYANA VARGAS HUACON

TUTOR:

JAIME ALBERTO NARANJO MORÁN

GUAYAQUIL – ECUADOR

2024

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Nosotras, **Allison Paulette Morales Núñez** con documento de identificación N° 0951464486 y **Nicolle Dayana Vargas Huacon** con documento de identificación N° 0953161494; manifestamos que:

Somos las autoras y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 29 de febrero del año 2024

Atentamente,



Allison Paulette Morales Núñez
CI: 0951464486



Nicolle Dayana Vargas Huacon
CI: 0953161494

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotras, **Allison Paulette Morales Núñez** con documento de identificación No. 0951464486 y **Nicolle Dayana Vargas Huacon** con documento de identificación No. 0953161494, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo experimental: **“EVALUACIÓN DE UN CONSORCIO NATIVO DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EN DOS ESPECIES VEGETALES PERTENECIENTES A LA FAMILIA FABACEAE Y POACEAE UBICADAS EN EL CAMPUS MARÍA AUXILIADORA DE LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA”**, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero/a en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 29 de febrero del año 2024

Atentamente,



Allison Paulette Morales Núñez

CI: 0951464486



Nicolle Dayana Vargas Huacon

CI: 0953161494

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Jaime Alberto Naranjo Morán** con documento de identificación N° 0927155226, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“EVALUACIÓN DE UN CONSORCIO NATIVO DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EN DOS ESPECIES VEGETALES PERTENECIENTES A LA FAMILIA FABACEAE Y POACEAE UBICADAS EN EL CAMPUS MARÍA AUXILIADORA DE LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA”**, realizado por Allison Paulette Morales Núñez con documento de identificación N° 0951464486 y Nicolle Dayana Vargas Huacon con documento de identificación N° 0953161494, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 29 de febrero del año 2023

Atentamente,



Jaime Alberto Naranjo Morán

CI: 0927155226

Dedicatoria

A Dios, por ser mi guía constante en este arduo camino académico y le dedico este logro. Así también como a mis padres, por su sacrificio y esfuerzo constante. A mis hermanos, a mi pareja por estar a mi lado con amor y comprensión, brindándome fuerza y aliento en los momentos más difíciles.

Agradecimiento

En primer lugar, expreso mi profundo agradecimiento a Dios por colmarme de bendiciones en cada faceta de mi vida y por otorgarme la oportunidad de alcanzar mis metas.

Agradezco a mis padres, Miriam del Rosario Núñez Hurtado y Arturo Xavier Morales Delgado, por su inquebrantable apoyo y por el esfuerzo incansable que han dedicado a mi educación y desarrollo.

Asimismo, deseo expresar mi gratitud a mi pareja, Randy José Quinde Manzano, por su constante presencia y apoyo incondicional a lo largo de esta travesía, y a mi tutor Jaime Naranjo por ser una guía a lo largo de este proceso. A todos ustedes, les dedico este logro con profundo respeto y cariño.

Allison Morales.

Dedicatoria

La presente tesis está dedicada a mi Dios, a mis padres, a mi hermana, a mis abuelos maternos y paternos, ya que gracia a cada uno de ellos he podido lograr y concluir con mi carrera, que han influido por ser mi motivación constante que me ha ayudado en mi camino académico y personal, les dedico con todo mi corazón esta tesis como gratitud, por su apoyo moral, amor, cariño y la paciencia que me han tenido, y que han fomentado en mí el deseo de superación y de triunfo en la vida. Lo que me ha contribuido a la consecución de este logro.

Agradecimiento

A mi señor Jesucristo por guiarme en mi vida en todo el tiempo, a mis padres, a la Sra. Lupe Huacon y al Sr Freddy Vargas por su apoyo y amor incondicional.

A mi hna Viviana Vargas, por el apoyo total en mi crecimiento profesional.

A mi abuela Mariana Mendoza, por su apoyo en absoluto.

Expreso mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que fueron participes de este proceso.

Agradezco a mi tutor de tesis, profesores de laboratorio, amigos y familia por su apoyo y orientación.

Gracias a todos ustedes que fueron los responsables de realizar su pequeño aporte, que el día de hoy se vería reflejado en la culminación de mi paso por la universidad y mi carrera. “Todo tiene su tiempo oportuno, hay un tiempo para todo lo que se hace bajo el cielo”. Eclesiastés 3.

Nicolle Vargas.

Resumen

Las micorrizas arbusculares (MA) son organismos microscópicos que forman parte de la biodiversidad del suelo, estos realizan una especie de simbiosis beneficiosa entre hongos y las raíces de las plantas; Estas micorrizas forman arbusculos los cuales son los responsables de la absorción de nutrientes, en especial del fósforo y nitrógeno. Esta conexión entre hongo y raíces se produce en más del 80% de las especies de plantas, sin embargo, este potencial puede variar entre especies por lo que su estudio es de importancia. Por ello se deben evaluar y estudiar las micorrizas arbusculares al ser una alternativa a la agricultura sostenible.

En esta investigación, se aborda una población específica que consiste en dos especímenes silvestres vegetales pertenecientes a las familias Fabaceae y Poaceae. Estos fueron recolectados en el campus María Auxiliadora de la Universidad Politécnica Salesiana. Se optó por seleccionar tres muestras al azar tanto de *Rhynchosia minima* L., como de *Cenchrus echinatus* L. El objetivo central de este estudio es analizar y utilizar los resultados taxonómicos y morfológicos claves de las esporas de micorrizas arbusculares. Esto se realiza con el propósito de evaluar la diversidad y abundancia de un consorcio nativo de hongos micorrízicos.

Se aborda variables fisiológicas - agronómicas, con esporas, colonización, diversidad como variables dependientes, altura, hojas, longitud radicular y clorofila como variables independientes en frijol y maíz. Se aplicaron análisis estadísticos, como ANOVA para detectar diferencias entre tratamientos. La recopilación de datos siguió protocolos detallados, abarcando revisión bibliográfica, creación de diseño de base de datos en Excel y validación de especies, el estudio incluye cuantificación de esporas, observación microscópica, análisis taxonómicos y uso de plantas trampa. Los resultados obtenidos demuestran una diversidad de características útiles para investigaciones en especies vegetales silvestres, la información recopilada es una base importante para otros estudios con estos ejemplares permitiendo estudios más precisos y actualizados.

Palabras claves: *Micorrizas arbusculares, Simbiosis, Fabaceae, Poaceae, Fijación de fósforo, Hongos micorrízicos, Crecimiento vegetal.*

Abstract

Arbuscular mycorrhizae (MA) are microscopic organisms that are part of the biodiversity of the soil, they carry out a kind of beneficial symbiosis between fungi and the roots of plants; These mycorrhiza form shrubs which are responsible for the absorption of nutrients, especially phosphorus and nitrogen. This connection between fungus and roots occurs in more than 80% of plant species, however this potential can vary between species so its study is important. Therefore, arbuscular mycorrhizae must be evaluated and studied as it is an alternative to sustainable agriculture.

In this research, a specific population consisting of two wild plant specimens belonging to the Fabaceae and Poaceae families is addressed. These were collected at the María Auxiliadora campus of the Salesian Polytechnic University. It was decided to select three random samples of both *Rhynchosia minima* L. and *Cenchrus echinatus* L., both on and off campus. The central objective of this study is to analyze and use the key morphological taxonomic results of the spores of arbuscular mycorrhizae. This is done with the purpose of evaluating the diversity and abundance of a native consortium of mycorrhizal fungi.

Physiological - agronomic variables are addressed, with spores, colonization, diversity as dependent variables, height, leaves, root length and chlorophyll as independent variables in beans and corn. Statistical analysis, such as ANOVA, was applied to detect differences between treatments. Data collection followed detailed protocols, covering bibliographic review, critical recording, database creation and species validation. The study includes spore quantification, microscopic observation, taxonomic analysis and use of trap plants. The results obtained demonstrate a diversity of useful characteristics for research on wild plant species. The information collected is an important basis for other studies with these specimens, allowing more precise and updated studies.

Keywords: *Arbuscular Mycorrhiza, Symbiosis, Fabaceae, Poaceae, Phosphorus fixation, Mycorrhizal fungi, Plant growth.*

Índice de contenidos

Capítulo I.....	1
1. Antecedentes	1
1.1. Introducción	1
1.2. Problema de investigación.....	3
1.3. Delimitación	4
1.4. Pregunta de investigación	5
1.5. Objetivos	5
1.5.1. Objetivo general.....	5
1.5.2. Objetivos específicos.....	6
1.6. Hipótesis	6
Capítulo II	7
2. Marco teórico.....	7
2.1. Biodiversidad del suelo	7
2.2. Absorción de nutrientes en el suelo.....	7
2.3. Hongos	8
2.3.1. Tipos de hongos	8
2.4. Hongos micorrízicos arbusculares (HMA)	9
2.4.1. Hongos micorrízicos como alternativa agrícola	9
2.4.2. Factores que afectan el desarrollo de los HMA	9
2.5. Familia Fabaceae.....	10
2.6. Familia Poaceae	10
2.7. Planta trampa	11
Capítulo 3	12
3. Materiales y métodos	12
3.1. Materiales	12
3.2. Metodología de investigación.....	12
3.3. Población y muestra.....	13
3.4. Variables.....	14
3.4.1. Variables dependientes (Fisiológicas).....	15
3.4.2. Variables independientes (Agronómicas)	15
3.4.3. Variables de control	16
3.4.4. Análisis estadísticos	17
3.5. Recogida de datos.....	17

3.6. Protocolos de investigación	17
3.6.1. Revisión bibliográfica	18
3.6.2. Tratamiento preliminar de las muestras	18
3.6.3. Muestreo y validación de especies silvestres	18
3.6.4. Método de evaluación de colonización por hongos micorrízicos arbusculares	19
3.6.5. Evaluación micorrízica de la simbiosis	20
3.6.6. Tamizaje húmedo para extracción de esporas	20
3.6.7. Montaje de esporas micorrízicas arbusculares	22
3.6.8. Cuantificación de esporas de hongos micorrízicos	23
3.6.9. Observación de esporas micorrízicas en el microscopio y estereoscopio	23
3.6.10. Taxonomía de esporas	25
3.6.11. Plantas trampas	25
3.7. Diseño experimental	26
3.8. Modelo estadístico utilizado en la experimentación	28
Capítulo 4	29
4. Resultados y discusión.....	29
4.1. Porcentaje de micorrización de las especies silvestres.....	29
4.2. Número de esporas asociadas a la rizósfera de las plantas de estudio	33
4.3. Identificación de esporas de HMA	35
4.4. Clave taxonómica de las esporas de HMA encontradas.	36
4.5. Resultados de la inoculación de los consorcios de las especies silvestre de las familias Fabacea y Poaceae	40
4.6. Ensayo del porcentaje de micorrización arbusculares de la inoculación de los consorcios nativos en plántulas comerciales de las especies silvestres	42
Capítulo 5	47
5. Conclusiones y recomendaciones	47
5.1. Conclusiones	47
5.2. Recomendaciones	48
6. Referencias bibliográficas.....	49
7. Anexos	55

Índice de tablas

Tabla 1. Diseño bifactorial con micorrizas nativas para las plantas Poaceas y Fabaceas	28
Tabla 2. Análisis de la cuantificación de esporas para las especies Poaceae y Fabaceae	34
Tabla 3. Plantas comerciales inoculadas con consorcios nativos de micorrizas arbusculares proveniente de especies silvestres Poaceae y Fabaceae.	41
Tabla 4. Prueba ANOVA en las plantas comerciales inoculadas con consorcios nativos de micorrizas arbusculares proveniente de especies silvestres Poaceae y Fabaceae.	41
Tabla 5. Contenido de clorofila para las plantas de maíz y frijol inoculadas con consorcios nativos de micorrizas arbusculares	41
Tabla 6. Análisis de la varianza para las variables de altura y número de hojas para las especies <i>Cenchrus echinatus</i> L. en plantas de maíz.....	69
Tabla 7. Análisis de la varianza para las variables de clorofila, nitrógeno, humedad y temperatura para las especies <i>Cenchrus echinatus</i> L. en plantas de maíz.	69
Tabla 8. Análisis de la varianza para las variables de altura y número de hojas para las especies <i>Rhynchosia minima</i> L. en plantas de frijol.	70
Tabla 9. Análisis de la varianza para las variables de clorofila, nitrógeno, humedad y temperatura para las especies <i>Rhynchosia minima</i> L. en plantas de frijol.	70

Índice de ilustraciones

Ilustración 1. Metodología aplicada para recolección y tratamiento de la muestra.	13
Ilustración 2. Especímenes vegetales de estudio.	14
Ilustración 3. Cálculo de micorrización.	24
Ilustración 4. Porcentaje de micorrización de la especie silvestre <i>Cenchrus echinatus</i> L. (Guizazo).	29
Ilustración 5. Porcentaje de micorrización de la especie silvestre <i>Rhynchosia minima</i> L. (Frijolillo)	30
Ilustración 6. Micorrización de la especie silvestre <i>Rhynchosia minima</i> L. (Frijolillo).	30
Ilustración 7. Micorrización de la especie silvestre <i>Cenchrus echinatus</i> L. (Guizazo).	31
Ilustración 8. Imágenes representativas de esporas identificadas en el microscopio invertido en muestras de <i>Cenchrus echinatus</i> L.	37
Ilustración 9. Imágenes representativas de esporas identificadas en el microscopio invertido en muestras de <i>Rhynchosia minima</i> L.	38
Ilustración 10. Porcentaje de micorrización arbusculares e inoculación de la familia Poaceae.	43
Ilustración 11. Porcentaje de micorrización arbusculares e inoculación de la familia Fabaceae.	43
Ilustración 12. Porcentaje de micorrización arbusculares de la inoculación de los consorcios nativos en plántulas comerciales de las especies silvestres.	44

Capítulo I

1. Antecedentes

1.1.Introducción

La biodiversidad del suelo es un tema de relevancia para la conservación de los ecosistemas, encontrando una variedad de organismos vivos, incluyendo bacterias, hongos, protozoarios y nematodos, así como ácaros y colémbolos, en la meso fauna por otra parte lombrices termitas contenidos en macrofauna. Además, las raíces de las plantas son reconocidas como parte vital de estos organismos debido a su interacción con los diversos componentes del suelo (FAO).

Varios de estos seres vivos se relacionan mutuamente con la distinta vegetación y biodiversidad del entorno, produciendo así un sistema biológico complejo de interacción contribuyendo a los ciclos globales que mantienen la vida en la tierra; A pesar de ello, esta biodiversidad subterránea es poco conocida (FAO).

Según la FAO los procesos como, la agricultura intensiva, la erosión hídrica y la forestación son las principales causas que producen el deterioro de la calidad del suelo llegando a degradarse las tierras hasta un 14% en Latinoamérica y en un 33% en escala mundial, perdiéndose así una comunidad subterránea de organismos vivos que mantienen al suelo fértil, en consecuencia se afecta las funciones ecosistémicas como, el ciclo de nutrientes, secuestro de carbono orgánico y las emisiones de gases de efecto invernadero.

En el ecosistema existen diversas relaciones beneficiosas microorganismo-planta, una de las más conocidas es la relación simbiótica que las micorrizas arbusculares (MA) forman con las plantas (Chen et al., 2018). Esta conexión contribuye al aumento de la superficie de absorción de elementos poco móviles como P, Cu, Zn, entre otros, facilita la retención de agua, proporciona protección contra ciertas enfermedades y favorece la

absorción de metales por lo que es muy útil para una agricultura sustentable (Adeleke et al., 2019).

Cuenca, et al, (2007), señalan que cerca del 80% de las familias existentes de plantas poseen la capacidad de formar la conexión hongo-planta, La simbiosis mencionada involucra al hongo que genera arbusculos, los cuales son las estructuras responsables de facilitar el intercambio de carbono y fósforo entre ambos organismos vivos. La investigación y el descubrimiento de esta relación ha permitido el surgimiento de la bioprospección de las MA o del uso de fertilizantes orgánicos que pueden ser beneficiosos debido a la producción de fosfatasa por los hongos, o gracias a la asociación entre las hifas de los hongos micorrízicos arbusculares y los microorganismos que actúan en el proceso de descomposición de la materia orgánica.

En los remanentes boscosos del campus María Auxiliadora de la Universidad Politécnica Salesiana se encontraron especies silvestres de la familia Fabaceae y Poaceae, según las investigaciones realizadas por Rodríguez et al. (2020) y Araujo et al. (2020), se han encontrado que ciertas especies de estas familias favorecen la asociación micorrízica, incrementa la disponibilidad del fósforo en el suelo lo que es crucial para el crecimiento de plantas. Demostrando el potencial de estas familias para lograr una simbiosis importante con los hongos micorrízicos nativos, sin embargo, este potencial puede variar entre especies o por factores como: pH, temperatura, humedad del suelo, entre otros parámetros agronómicos. Por lo que se debe realizar investigaciones específicas para determinar su beneficio. La bioprospección de MA posibilita el uso como biofertilizante para especies comerciales que respalden el incremento de biodiversidad microbiana y brinden la sostenibilidad del suelo para producción agrícola.

1.2. Problema de investigación

El avance cultural de la especie humana y la evolución de la misma han tenido un impacto en la transformación de ecosistemas naturales hacia agroecosistemas productivos, lo que ha generado conflictos con la preservación de bosques y recursos naturales, causando desequilibrios ecológicos. Esto se debe a la implementación de prácticas de gestión agrícola no sostenibles, como el uso excesivo de productos agroquímicos (Quijano et al., 2021).

La FAO indica un crecimiento exponencial anual en el uso indebido de los suelos, un manejo inadecuado da como resultado problemas ambientales cada vez más graves, por ello se ha implementado diversos programas y medidas para la recuperación de estas tierras.

La preocupación por la degradación del suelo en Ecuador se debe a la actividad humana y los desequilibrios en los ecosistemas, que han tenido un impacto significativo en los recursos naturales del país. La deforestación, la pérdida de páramos y bosques, así como la rápida deforestación anual donde cerca de 80 mil hectáreas, han contribuido a este grave problema ambiental. La expansión de la frontera agrícola hacia áreas con limitaciones para la actividad agropecuaria en pisos altitudinales ha sido un factor determinante en este deterioro. Además, el considerable aumento de la superficie agrícola ha ejercido un incremento en la demanda de los recursos ambientales y ha contribuido a una mayor degradación del suelo (Ecuador. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, 2016).

La degradación del suelo en Ecuador ha sido identificada como un desafío ambiental que impacta los sistemas agrícolas. No obstante, hasta el momento no se han llevado a cabo investigaciones integrales que aborden la disminución de la productividad de los suelos destinados a la agricultura (Delgado et al., 2021).

Por ello se debe estudiar las MA como alternativa para una agricultura sustentable; En especies silvestres de las familias Fabaceae y Poaceae se puede encontrar información valiosa sobre la diversidad y función de estas simbiosis en el ecosistema del campus María Auxiliadora, además de tener un gran potencial biotecnológico en la agricultura y la restauración de ecosistemas, estas especies silvestres de la familia Fabaceae y Poaceae puede revelar nuevas cepas de hongos micorrízicos con una mejor absorción de nutrientes aplicables en la restauración de suelos degradados y mejora agrícola.

Una de las ventajas del uso de MA en la agricultura es que pueden mejorar la absorción de nutrientes, en particular el P, al extender el sistema radicular y aumentar la capacidad de absorción de nutrientes. Esto conduce a un mejor rendimiento y calidad de los cultivos, lo que en última instancia contribuye a una mayor rentabilidad para los agricultores. También, desempeñan un papel crucial en la mejora de la estructura y la fertilidad del suelo. Su micelio ayuda a unir las partículas del suelo, mejorando la agregación del suelo y la capacidad de retención de agua. Esto promueve una mejor aireación del suelo, desarrollo de raíces y disponibilidad de nutrientes, lo que a su vez contribuye a una mayor productividad de los cultivos. Así mismo, estos biofertilizantes se pueden aplicar a diversos cultivos, reduciendo la dependencia de los fertilizantes sintéticos y sus costos asociados (Samuel & Veeramani, 2021).

1.3. Delimitación

El estudio se llevará a cabo en la Universidad Politécnica Salesiana campus María Auxiliadora km 19 vía a La Costa ubicada en la ciudad de Guayaquil; tanto las tomas de muestras y el trabajo experimental se llevarán a cabo dentro del área del campus.

Se evaluará los consorcios nativos de hongos micorrízicos arbusculares en dos especies vegetales perteneciente a la familia Fabaceae y Poaceae encontradas en el campus, siendo estas especies, *Rhynchosia minima* L. (Frijolillo) y *Cenchrus echinatus*

L. (Guizazo), haciendo uso del “Manual para la identificación de hongos micorrízicos arbusculares” en adicción a las metodologías para extracción de esporas, evaluación de colonización de los hongos micorrízicos mediante el montaje de raíces y observación de esporas micorrízicas de acuerdo con su morfología.

Los recursos son suministrados por la Universidad Politécnica Salesiana como parte del proyecto conocido como “Desarrollo de aplicaciones móviles en aprendizaje automático para la identificación taxonómica de hongos micorrízicos arbusculares (APP – HMA)”.

El ensayo experimental será implementado en dos especies comerciales de las mismas familias vegetales para Fabaceae con frijol (*Phaseolus vulgaris*) y Poaceae con maíz (*Zea mays*).

1.4. Pregunta de investigación

¿Las micorrizas arbusculares de las especies silvestres de la familia Fabaceae y Poaceae encontradas en el campus María Auxiliadora de la Universidad Politécnica Salesiana tienen las propiedades necesarias para estimular el crecimiento de sus parientes cultivables?

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Evaluar la diversidad y abundancia de un consorcio nativo de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en dos especies vegetales silvestres pertenecientes a las familias Fabaceae y Poaceae, ubicadas en el campus María Auxiliadora de la Universidad Politécnica Salesiana.

1.5.2. Objetivos específicos

- Determinar el porcentaje de colonización micorrízicas en la simbiosis de las especies silvestres y el número de esporas asociadas a la rizosfera de las plantas en estudio.
- Emplear claves taxonómicas para la identificación morfológica de las esporas de micorrizas arbusculares asociadas a las especies silvestres de las familias Fabaceae y Poaceae.
- Inocular los consorcios nativos de micorrizas arbusculares en plántulas comerciales de la misma familia bajo condiciones controladas.

1.6. Hipótesis

Las micorrizas arbusculares de las especies silvestres de la familia Fabaceae y Poaceae nativas de interés agrícola en el campus María Auxiliadora de la Universidad Politécnica Salesiana son capaces de estimular el crecimiento vegetativo de sus parientes cultivables.

Capítulo II

2. Marco teórico

2.1. Biodiversidad del suelo

El suelo desempeña un papel fundamental tanto en el ecosistema natural como en el agroecosistema. Uno de los aspectos clave es su rica biodiversidad de microorganismos, los cuales tienen un papel importante en su funcionamiento. Estos microorganismos están involucrados en el ciclo bioquímico de los nutrientes, así como en el mantenimiento de las características fisicoquímicas del suelo; En los últimos años, los estudios sobre la diversidad microbiana en los suelos se han incrementado, junto a la interacción entre el suelo, las plantas y los microorganismos. Una gran cantidad de especies de microorganismos, como bacterias y hongos se han caracterizado, habitan en el suelo, y la rizósfera y el interior de las plantas. Estos desempeñan un papel crucial en el crecimiento, desarrollo y aclimatación de las plantas, dado que establecen simbiosis de micorrízicas para incrementar la capacidad de las plantas en absorber los nutrientes e interactuar frente a las diversidades (Tapia, 2020).

2.2. Absorción de nutrientes en el suelo

El fósforo es uno de los 17 elementos esenciales necesarios para el desarrollo de las plantas, por lo que su presencia es esencial. No puede ser reemplazado por ningún otro nutriente y es necesario proporcionar suficiente P para un crecimiento óptimo y reproductivo. El P se considera un nutriente primario, debido a su importancia fundamental en el crecimiento de las plantas (Sultenfuss, 1999).

El P, penetra en la planta mediante las capas exteriores de las células de los pelos radiculares y la punta de la raíz. Además, se produce la absorción a través de las micorrizas, un tipo de simbiosis fúngica que se establecen con las raíces de numerosas

plantas cultivadas. La planta capta el P en forma de ion ortofosfato primario, aunque puede asimilarlo como ion fosfato secundario (Sultenfuss, 1999).

2.3. Hongos

Los hongos, al igual que los animales, son organismos heterótrofos y necesitan buscar alimento para sobrevivir. A lo largo de su evolución, han desarrollado estrategias efectivas para sobrevivir y dispersarse, lo que los ha convertido en un grupo muy diverso que se encuentra en casi todos los ecosistemas del planeta (Heredia, 2020).

El cuerpo de los hongos, excluyendo las levaduras, consiste en filamentos llamados hifas, que se ramifican para formar extensas redes extendidas de los micelios que crecen dentro de materiales orgánicos vivos o inertes. Aunque no son visibles a simple vista, los micelios son estructuras exploratorias que buscan compuestos alimenticios, transformándolos con enzimas en moléculas más simples para luego absorberlos e incorporarlos al torrente citoplásmico de las hifas (Heredia, 2020).

2.3.1. Tipos de hongos

Dependiendo de la fuente o sustrato del que se alimentan, se pueden distinguir tres grupos de hongos: parásitos, saprobios y simbioses. Los hongos parásitos viven a expensas de otros organismos, causando daños de diversas magnitudes. Por otro lado, las especies saprobias obtienen sus nutrientes de materiales orgánicos inertes, ya sean de origen biológico o manufacturados por el ser humano. Por último, los hongos simbioses establecen relaciones amistosas con plantas y animales (Wrzosek, 2017).

2.4. Hongos micorrízicos arbusculares (HMA)

Los HMA son una categoría de hongos que se encuentran en el subfilo Glomeromycotina. Estos hongos establecen una relación simbiótica con más del 85% de las plantas terrestres, tanto en cultivos agrícolas como hortícolas. Además de su función en la protección de las plantas, los HMA dependen de los productos de la fotosíntesis del hospedero para su propio crecimiento. Son simbioses obligados y desarrollan estructuras especializadas como arbusculos y/o vesículas. Los HMA son tratados en la agricultura por su capacidad de absorción de nutrientes en especial de P, absorción de agua lo que ayuda a la planta a soportar épocas de sequía y hacer frente a contaminantes (Dey, 2022).

2.4.1. Hongos micorrízicos como alternativa agrícola

A partir de finales de los años ochenta, el uso de hongos micorrízicos (HM) en la agricultura ha experimentado un aumento como una alternativa al empleo de fertilizantes sintéticos. Los HM están asociados con alrededor de 200,000 hospederos, y se piensa que tienen una baja especificidad; no obstante, algunos estudios sugieren que hay una inclinación o compatibilidad por ciertas especies. A su vez, esta preferencia puede no estar vinculada con la eficiencia, dado que algunos hongos pueden ser más eficientes que otros en el mismo hospedero, por lo que el estudio en diferentes especies es de suma importancia (Hernández et al., 2020).

2.4.2. Factores que afectan el desarrollo de los HMA

Dado que los métodos agrícolas tradicionales demandan un uso excesivo de fertilizantes y pesticidas sintéticos, diversos elementos pueden influir en el crecimiento, funcionalidad y la supervivencia de microorganismos arbusculares beneficiosos (HMA). Por otra parte, las costumbres culturales inadecuadas, como la rotación de cultivos y la labranza, afectan los niveles de colonización de raíces y el potencial de las micorrízicas arbusculares en zona agrícola. La interacción simbiótica entre los HMA y la planta puede

cambiar entre positiva, neutra o negativa, según la especie de hongo involucrada, la planta huésped y el contexto ambiental, como la disponibilidad de elementos nutritivos y las técnicas de cultivo. El contenido de humedad del suelo también puede ser un factor que afectaría la tasa de crecimiento de las raíces y de colonización de los HMA (Sánchez, 2022).

2.5. Familia Fabaceae

Esta es una de las familias más diversas por su gran variabilidad morfológica, La característica distintiva principal radica en la existencia de un fruto denominado legumbre. Se trata de un fruto seco, que se abre al madurar por dos líneas que coinciden con una sutura, así como con el nervio central del único carpelo que conforma el gineceo de cada flor. Estas legumbres pueden variar en tamaño y ser tanto pequeñas como grandes, además de presentar una estructura actinomorfa; Esta familia se encuentra en todos los hábitats. Aunque las Fabaceae son predominantes en entornos tropicales, muchas de ellas se encuentran en áreas de llanuras templadas, bosques y desiertos (Aguilar, 2021).

2.6. Familia Poaceae

La familia Poaceae cuenta con cerca de 11,000 especies en el mundo, ocupando el quinto lugar solo por detrás de especies como Asteraceae, Orchidaceae, Fabaceae y Rubiaceae. Las Poaceae son conocidas como gramíneas, tienen tallos cilíndricos, hojas largas y lineales con vainas que envuelven el tallo. Las Poaceae son notables por su distribución global y su papel crucial en muchos ecosistemas terrestres, ya que se encuentran desde las latitudes circumpolares hasta la línea ecuatorial, y desde las cumbres más elevadas de las montañas hasta el nivel del mar, por lo que son consideradas cosmopolitas, representan entre el 20 y el 45% de la cobertura vegetal en todo el planeta (Aparco, 2022).

2.7. Planta trampa

Los HM son microorganismos utilizados en la agricultura. Estos organismos se pueden aislar, seleccionar, multiplicar e incorporar al suelo las plantas en forma de inóculos. El proceso de inoculación es complejo, dado que se requiere diseñar métodos adecuados para cada especie o efecto deseado, así como determinar las condiciones y técnicas culturales que permitan obtener los mejores resultados. Es importante seguir investigando en este campo y profundizar en el conocimiento de cómo funcionan estos hongos y los resultados obtenidos al utilizarlos. La presencia de diferentes tipos de micorrizas en un área determinada parece estar influenciada por factores como la latitud, altitud, la composición de la vegetación, las características del suelo, como el pH, el contenido de P, la materia orgánica y la disponibilidad de otros nutrientes (Molina, 2006).

Es necesario tomar porciones del suelo de las plantas que incluyan raíces, con el fin de lograr un cultivo trampa ideal, dado que este sistema permite incrementar la cantidad de esporas de hongos recolectados en su entorno natural, amplificando su presencia, o favorecer la liberación de esporas de hongos que se encuentran ocultos en la muestra (Molina, 2006). Las especies silvestres pueden actuar como cultivos trampas para las especies comerciales con el fin de propagar consorcios nativos promisorios para una agricultura sostenible y sustentable.

Capítulo 3

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

Se emplearon diversos materiales importantes para la recolección de espécimen como en el laboratorio para llevar a cabo la parte experimental especificando detalladamente los procesos metodológicos. En el anexo 1 se puede observar la lista de materiales de muestreo y validación de especies silvestres vegetales para el tratamiento preliminar de las muestras, en el anexo 2 se puede determinar la lista de materiales, equipos y reactivos necesarios para la segunda fase del estudio en el laboratorio.

3.2. Metodología de investigación

La investigación de esta tesis será de un tipo de enfoque observacional descriptivo, experimental y analítico. La parte descriptiva se basará en analizar la morfología de las especies *Rhynchosia minima* L. (Frijolillo) y *Cenchrus echinatus* L. (Guizazo), investigando factores de desarrollo geográfico, diversidad de especies presentes en el área de estudio de las muestras y su impacto hacia otras variables. La parte experimental consiste en ejecutar una serie de protocolos, por último, la parte analítica sustentará la investigación descriptiva y experimental teniendo los resultados óptimos del desarrollo de las especies comerciales perteneciente a las mismas familias vegetales estudiadas.

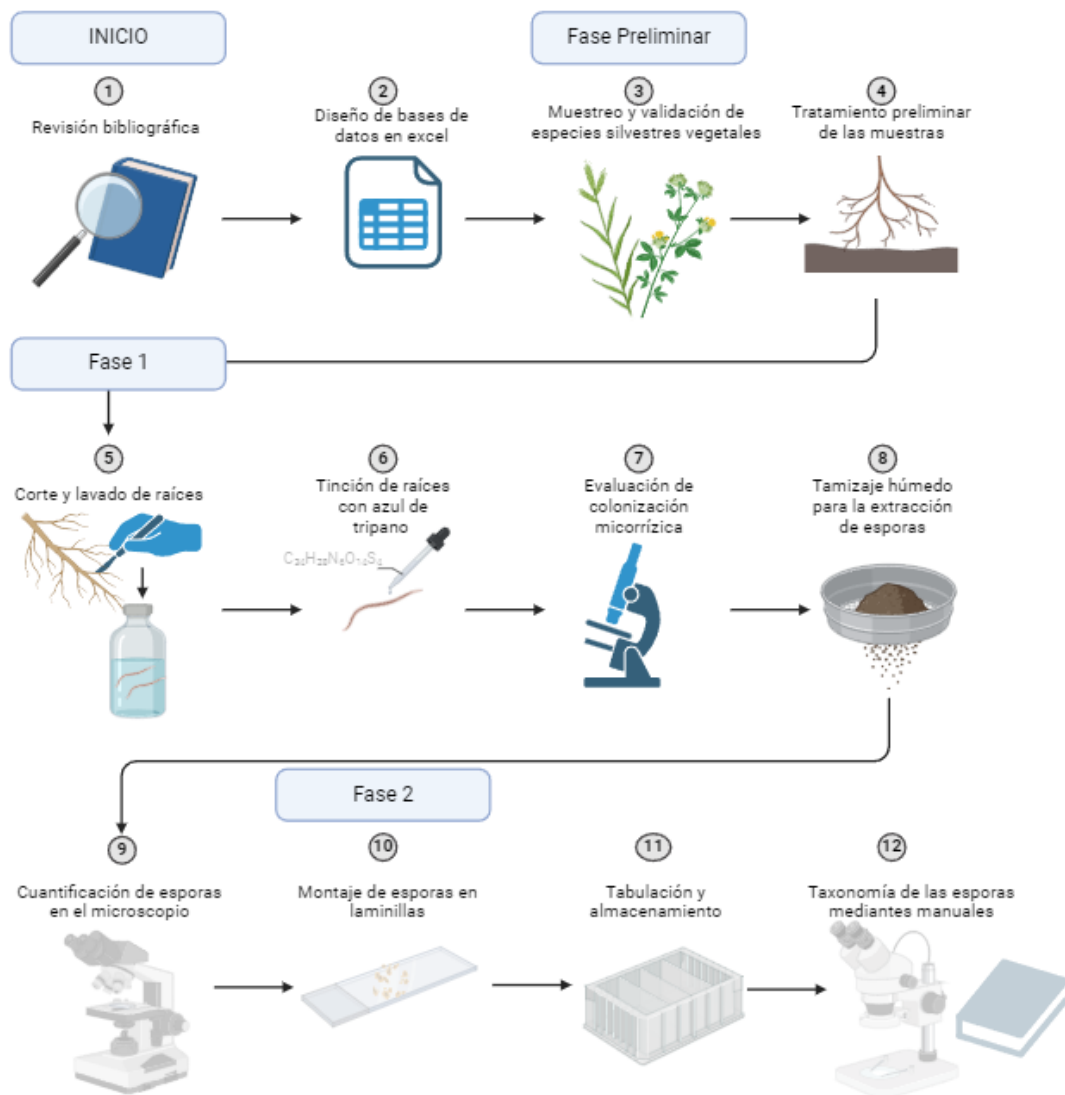


Ilustración 1. Metodología aplicada para recolección y tratamiento de la muestra.

Realizado por Morales & Vargas (2023).

3.3. Población y muestra

La población de interés de esta investigación se compone de 2 espécimen silvestres vegetales pertenecientes a 2 familias Fabaceae y Poaceae recolectadas en el campus María Auxiliadora de la Universidad Politécnica Salesiana de la sede de Guayaquil, extrayendo muestras de la flora de la raíz del suelo presente en el patio de la institución, debido a su abundancia en el ecosistema de bosque tropical de Tarqui.

Para esta evaluación se optó por seleccionar 3 muestras de cada espécimen de *Rhynchosia minima* L. (Frijolillo) y 3 de *Cenchrus echinatus* L. (Guizazo) en forma aleatoria de afuera de del campus y adentro de la Universidad Politécnica Salesiana.

Con el objetivo de emplear resultados observados en las claves taxonómicas sobre la morfología de esporas de micorrizas arbusculares, evaluando la diversidad y abundancia de un consorcio nativo de hongos micorrízicos, que ayudará a proporcionar una base de datos en Excel para el fichaje crítico. Es importante resaltar que este experimento se ajusta a los objetivos planteados en el proceso de la investigación que permite una comprensión profunda del potencial biotecnológico de los consorcios micorrízicos nativos.



Ilustración 2. *Especímenes vegetales de estudio.*

Realizado por Morales & Vargas (2023).

3.4.Variables

Se presentan los parámetros cualitativos, cuantitativos de la experimentación, observación y medición con datos verídicos para la investigación con una comprensión profunda del diseño experimental.

3.4.1. Variables dependientes (Fisiológicas)

- ***Número de esporas***

Se esporuló a los diez días y se realizó el montaje del suelo con los tres vertidos tamizando, en la cual se determinó el porcentaje de esporas ubicándolos en cada portaobjetos cubriéndolos con cubreobjetos determinado el número de esporas de cada especie.

- ***Porcentaje de colonización***

A los diez días y veinte días se tomó muestra evaluadas de las dos plántulas de cada especie, para observar y cuantificar el porcentaje de micorrización estudiada.

- ***Diversidad de consorcio nativos de HMA***

Se encontró un estimado de claves taxonómicas de ambas espécimen de Poaceae y Fabaceae en los tubos falcón para observar al estereoscopio y microscopio.

3.4.2. Variables independientes (Agronómicas)

- ***Altura***

La medición se realizó desde la base del tallo hasta la primera hoja de la planta con una regla milimetrada de 30 cm utilizada en todas las evaluaciones. El material de medición se desinfecto con alcohol al 96%, para evitar la contaminación entre tratamientos.

- ***Número de hojas de frijol y maíz***

El recuento de hojas se llevó a cabo de manera semanal. El conteo del número de hojas, se evaluó mediante el seguimiento de la emisión foliar semanal (Alam et al.,2015).

- ***Clorofila***

Al concluir el experimento con asociación micorrízica arbusculares, se procedió a la medición de la concentración de clorofila en la quinta hoja mediante un método no invasivo utilizando un dispositivo medidor móvil CCM-200 PLUS, preparado para medir de forma rápida, almacenando valores específicos para cada medición, T Y S – 4 N, esta rediseñado y mejorado para duplicar la capacidad de datos, identificando los parámetros de temperatura, nitrógeno, humedad y clorofila en unidades SPAD (Santillana & Toro, 2018).

3.4.3. Variables de control

- ***Inóculo nativo de *Rhynchosia minima* L. (Frijol)***

En relación con el impacto de la micorrización en las variables de crecimiento analizadas, se observó que, en el área foliar, las plantas que fueron inoculadas experimentaron aumentos del 19.5 y 28.9% en esta métrica en comparación con el grupo de control en los tres momentos de evaluación. Por otro lado, las plantas no micorrizadas sometidas a estrés mostraron una disminución del 49.7% en su área foliar en relación con el control, mientras que aquellas que fueron inoculadas y estresadas experimentaron una reducción del 15.7% en comparación con las plantas inoculadas sin estrés (García et al., 2017).

- ***Inóculo nativo de *Cenchrus echinatus* L. (Guizazo)***

En relación con el impacto de la micorrización en las variables de crecimiento analizadas, se observó que, en el área foliar, las plantas que recibieron inoculación experimentaron aumentos del 17.5 y 23.9% en esta métrica en comparación con el grupo de control durante los tres momentos de evaluación. Por otro lado, las plantas no micorrizadas sometidas a estrés mostraron una disminución del 27.7% en su área foliar en relación con el control, mientras que las plantas inoculadas bajo condiciones de estrés

experimentaron una reducción del 10.7% en comparación con las plantas inoculadas sin estrés (Parra et al., 2018).

3.4.4. Análisis estadísticos

El análisis estadístico se ejecutó mediante un diseño experimental de dos bloques seleccionados al azar. Los datos recopilados fueron procesados mediante un software estadístico destinado para la evaluación de las variables micorrízicas. Se aplicaron métodos de análisis de varianza (ANOVA) con el fin de identificar posibles diferencias estadísticas entre los distintos tratamientos (Viera et al., 2017).

3.5. Recogida de datos

Se realizó mediante el uso de plataformas de investigación como Google Académico, Repositorio UPS, NCBI y manuales de identificación micorrízicos. La colecta de datos de crecimiento fue dos días a la semana, la evaluación de la micorrización fue a los 30 días después de la inoculación con las plantas en fase de trasplante.

3.6. Protocolos de investigación

La metodología que se presenta se detalla los procesos descriptivos, analíticos con las directrices establecidas en el manual de identificación de hongos micorrízicos arbusculares de la Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Ciencias Forestales del centro de investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional, donde se llevará a cabo la estructuración de una base de datos en Excel en conjunto con el manual de identificación de especies por medio de revisión bibliográfica, de igual manera, para el tamizaje fitoquímico se emplearán guías prácticas en laboratorio perteneciente a la Universidad Politécnica Salesiana, en el cual se analizará la morfología de las muestras junto a sus variables de estudio.

3.6.1. Revisión bibliográfica

Se realiza la identificación de estudios previos sobre HMA en plantas de las familias Fabaceae y Poaceae. Es necesario de una recopilación de información sobre las técnicas utilizadas en la evaluación de consorcios nativos de HMA (Calcurian & Elisita, 2015).

3.6.2. Tratamiento preliminar de las muestras

Para el tratamiento preliminar se realiza la limpieza y eliminación de residuos del sustrato adherido a las raíces. Luego de la esterilización y control de especies se procede al almacenamiento adecuado de las muestras para evitar la contaminación (Poma & Robles, 2023).

3.6.3. Muestreo y validación de especies silvestres

Para el muestreo se determinó las áreas más representativas en el campus María Auxiliadora de la Universidad Politécnica Salesiana. Se realizó el muestreo de raíces y suelo de las especies seleccionadas de las familias Fabaceae y Poaceae con el uso de recursos de observación y extracción, en la cual se recolecto las raíces más finas, para poder observar las estructuras de los hongos micorrízicos.

La extracción de suelo y raíces fue de 0-20 cm en la zona radicular a la especie a manejar por ende las plantas fueron manejadas en bolsas de ziploc rotuladas con ambas especies. La validación de especies se realiza con expertos botánicos de la institución y el análisis comparativo de fuentes bibliográficas (Tenorio, 2021).

3.6.4. Método de evaluación de colonización por hongos micorrízicos arbusculares

A) Corte y lavado de raíces

En el proceso de laboratorio es inmediato por el cual se dejan conservando las raíces con alcohol –formaldehído- ácido acético en frascos etiquetados. Se aplican cortes en segmentos manejables para el lavado cuidadoso de las raíces y la eliminación de partículas de suelo que puedan alterar el estudio de especies durante la fase preliminar (Poma & Robles, 2023).

B) Clarificación de las raíces

Una vez limpias las raicillas se cortan las raíces más finas de ambas especies y se coloca en 6 viales de 10 ml de cada espécimen en total 12 frascos y para clarificar las raíces se debe usar KOH al 10% hasta cubrirlas con esta solución.

Se procede a eliminar el hidróxido de potasio (KOH) utilizando agua corriente, y luego se aplican peróxido de hidrógeno alcalino a temperatura ambiente sobre las muestras, dejándolo actuar durante 10-20 min o hasta que las raíces adquieran un tono blanco. Posteriormente, se retira la solución de peróxido y se enjuagan las muestras nuevamente con agua corriente para eliminar cualquier exceso. A continuación, se agrega ácido clorhídrico (HCl) al 1% y se deja reposar durante 3-4 min, eliminando la solución en este caso sin realizar un lavado adicional de las raíces.

C) Tinción de raíces con azul de tripano

Se elimina todo el peróxido de los viales, se procedió a lavar las raíces con agua. Luego, se aplica una solución de azul de tripano preparada con 500 ml de ácido acético, 500 ml de glicerol, 500 ml de agua destilada y 0,75 g de azul de tripano. Se cubren los 6

viales con esta solución y se deja reposar durante 24 h para realizar la tinción. Se remueve el colorante y se eliminan los excesos mediante el uso de agua corriente. Se adiciona lactoglicerol lactofenol o acetoglicerol para su preservación.

3.6.5. Evaluación micorrízica de la simbiosis

Para la evaluación micorrízica de la simbiosis se coloca trozos de raíz en una caja Petri dish para tomar 10 raicillas con ayuda de agujas de jeringas y se ubica en el portaobjetos con una gota de ácido acético, luego se cubre con un portaobjetos y se observa las raíces al microscopio con un objetivo de 40x o 100x (Calcurian & Elisita, 2015).

3.6.6. Tamizaje húmedo para extracción de esporas

Se recolectan 300 g de suelo por triplicado para la extracción de esporas, totalizando 1800 de muestra de *Cenchrus echinatus* L. (Guizazo) (estructuras micorrízicas) por planta y 300 g para la raíz madre de *Rhynchosia minima* L. (Frijolillo). Dado que se trabaja con seis plantas, que se obtiene un total de 2400 *Cenchrus echinatus* L. (Guizazo) y 2400 de *Rhynchosia minima* L. (Frijolillo) por cada una.

En la preparación de la muestra, se utilizan 3 beacker de 1 L y 3 vasos precipitados. Se incorporaron 100 g de suelo en cada vaso, se humedece con 50 ml de agua corriente, se mezcla con una espátula hasta que las esporas quedan en suspensión, se afora a 1L con agua corriente y se agita durante 30 min. Luego, se realizarán tres tamizados con mallas de 45 y 250 μm , respectivamente. Se vierte el contenido de los vasos precipitados con ayuda de un cernidor en cada tamiz, recuperando el sustrato. Después, se repite el proceso tres veces para cada vaso precipitado, con intervalos de reposo de 30 min, lavado y eliminación del excedente.

Se toma una muestra homogeneizada de suelo y se pesan 100 g, colocándolos en un vaso de precipitado de 500 ml. En caso de exceso de materia orgánica, se añade peróxido de hidrógeno para cubrirlo durante 10 min y luego se retira sin eliminar suelo. Si la mezcla presenta compactación, se refrigera a 4°C durante al menos 12 h.

Luego, se agita el suelo con una varilla de vidrio durante 30 seg. Después, se deja reposar por 10 seg para que las partículas más pesadas y el material orgánico se asienten, permitiendo que las esporas queden en suspensión. Se vierte en dos tamices, siendo uno de 0.5 mm de diámetro y otro de 0.045 mm. La mayoría de las esporas se retiene en el tamiz de 0.045 mm, mientras que el de arriba atrapa esporocarpos grandes y esporas asociadas a las raíces.

La extracción resultante se lava y se vierte en cajas Petri de 10 cm de diámetro. Utilizando un microscopio de disección, las esporas, agregados y esporocarpos se recogen con una micropipeta o una aguja de disección.

Posteriormente, se prepara una solución de sacarosa y tween 20 (4 litros en total). Por cada uno de los 36 tubos falcón etiquetados de *Rhynchosia minima* L. (Frijolillo) y *Cenchrus echinatus* L. (Guizazo), se afora a 10 ml y se agrega 10 ml de la solución de sacarosa más Tween 20. Los tubos falcón se centrifugan a 500 rpm durante 5 min en el Thermo Fisher con un voltaje de 120 V~ con una frecuencia de 60 Hz, una vez teniendo el excedente se transfiere a un tubo nuevo y se repite el proceso con la adición de 10 ml de la solución de Tween 20 y sacarosa, centrifugando por 3 min a 500 rpm. El sobrenadante se recupera en un tubo aparte. Se repite este mismo proceso con las muestra de suelo pero esta vez se añade el antibiótico con 20 ml y se saca el excedente de la primera capa del sobrenadante para así llevarlo a la otra fase.

Finalmente, las esporas se encuentran suspendidas en el sobrenadante, que se congela en la refrigeradora durante 12 h. El proceso de tamizaje requiere de un tamiz de malla fina para separar las esporas de las raíces, luego se lava el tamiz con agua para eliminar las raíces. Por último, se recolecta las esporas en un frasco limpio (Mosquera, 2020).

3.6.7. Montaje de esporas micorrízicas arbusculares

La preparación del montaje de esporas se inicia con la preparación de la muestra, la cual, en caso de encontrarse seca, requiere ser hidratada con agua destilada. En situaciones de contaminación, se realiza un lavado adicional con agua destilada. A continuación, se procede a la elaboración del medio de montaje según la metodología de Poma y Robles (2023).

Se realiza una mezcla compuesta por una gota del medio de montaje y una gota de ácido acético. La muestra es montada mediante la colocación de una gota de esta mezcla en un portaobjetos. Seguidamente, se deposita la muestra de esporas sobre la gota de medio de montaje y se cubre con un cubreobjetos, conforme al procedimiento establecido por Poma y Robles (2023). Los implementos involucrados en este proceso incluyen el medio de montaje, el portaobjetos, el cubreobjetos y la muestra de esporas.

El procedimiento comienza con la extracción de esporas del suelo, las cuales son colocadas en una caja Petri con agua destilada para su examen bajo luz reflejante, destacando características como color, tipo de hifas accesorias, contenido, superficie, forma y tamaño. La zona de montaje se ubica en la parte derecha del portaobjetos, mientras que la parte izquierda se destina para anotaciones.

Se aplica una gota de PVLG en la parte izquierda y otra con PVLG+Melzer en la derecha. Luego, se montan 10-25 esporas en cada grupo, dispersándolas con la ayuda de

una aguja de disección. Después de esperar unos minutos para que el medio de montaje adquiriera viscosidad, se coloca un cubreobjetos seco en un ángulo de 45° para dispersar las esporas sin la formación de burbujas de aire.

Las esporas se aplastan con el extremo de una aguja bajo el microscopio compuesto. Se etiquetan las láminas y se incuban a 65°C durante 12-24 h para limpiar residuos y reducir burbujas. La temperatura facilita la toma de fotografías de las estructuras subcelulares, finalmente, se examinan las esporas a diferentes aumentos en el microscopio, observando a detalle las paredes, capas y células accesorias. Se capturan fotografías de cada espécimen para su posterior referencia en la investigación.

3.6.8. Cuantificación de esporas de hongos micorrízicos

En el proceso de cuantificación de esporas, se deposita una gota de la muestra esporal en la cámara de Neubauer. Luego; se permite que la gota repose durante algunos minutos para facilitar la dispersión de las esporas. A continuación, se emplea una pipeta Pasteur para llevar a cabo el recuento de las esporas presentes en una cuadrícula de 1 mm²). En este procedimiento, los implementos utilizados incluyen la cámara de Neubauer, la pipeta Pasteur y la muestra de esporas (Pólit & Echeverría, 2023).

3.6.9. Observación de esporas micorrízicas en el microscopio y estereoscopio

Se realiza las observaciones de los 2 espécimen hasta obtener las 18 placas triplicadas para obtener un total de 36 observaciones en los diferentes campos, 40X y 100X en el microscopio hasta obtener el conteo de ambas espécimen. Para la parte del estereoscopio se realiza las observaciones hasta obtener el conteo de ambas espécimen (Poma & Robles, 2023).

Para la parte de estereoscopio se obtiene nueve tubos falcón de 100 gr de (C.E.L) y 100 gr de (R.M.L) , en los cuales se realiza tres vertidos y se los ubica en una caja Petri,

una vez terminado este proceso se procede con la cuantificación de esporas, se coloca nueve portaobjeto de cada espécimen y a ambos lados dos cubreobjetos etiquetados con A y B, como resultado de la primera y última vertida, se pesca cierta cantidad de esporas, se observa y analiza en el estereoscopio en campos de 2X y 4X de (Poma & Robles, 2023).

A. Porcentaje de micorrización arbuscular

Realizado el protocolo de tinción y montaje de las raíces en el portaobjeto se observan en los diferentes campos de cada raíz se calculan los porcentajes de colonización de arbusculos, hifas y vesículas según la cantidad de estructuras presentes en 100 campos de observación. Así mismo se realiza el porcentaje de germinación y realizar el conteo de las 100 en ambas espécimen.

La fórmula utilizada para este cálculo es:

$$\% \text{ Micorrización} = \frac{\text{Número de campos con } \{ \text{Hifas} - \text{Arbúsculo} - \text{Vesículas} \} * 100}{\text{Total de campos de observación}}$$

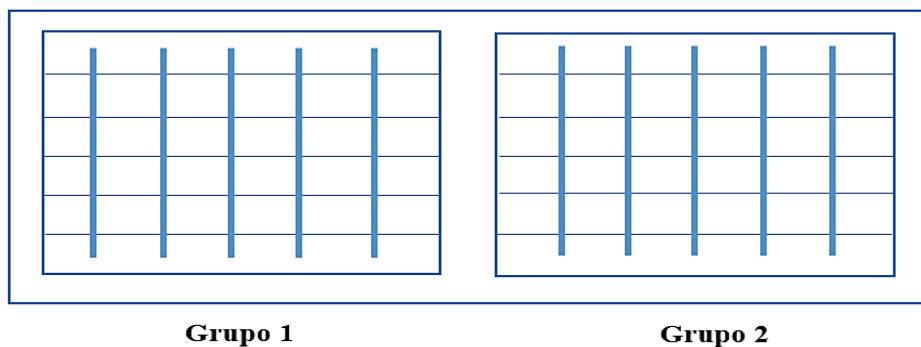


Ilustración 3. Cálculo de micorrización.

Realizado por Morales & Vargas (2023).

3.6.10. Taxonomía de esporas

Con el propósito de una adecuada observación, es imperativo que las esporas se encuentren hidratadas por completo. En caso de que se presenten en estado seco, se procede a su hidratación mediante inmersión en agua destilada por algunos minutos. A continuación, se efectúa la observación microscópica, utilizando un microscopio con un aumento suficiente para discernir las características de las esporas. Estas son comparadas con las descripciones de esporas asociadas a distintos géneros y especies de HMA, conforme a la metodología propuesta por Poma & Robles (2023).

Para una taxonomía automatizada de esporas, se emplean técnicas avanzadas como la microscopía confocal o la espectroscopía infrarroja. Estas metodologías permiten la observación como el análisis de las características esporales de manera más eficiente, nítido, en comparación con enfoques manuales. Poma & Robles (2023) sugieren que estas técnicas automatizadas suponen un avance significativo, proporcionando una mayor rapidez y precisión en el estudio de las esporas. En este contexto, los implementos relevantes incluyen sistemas de microscopía confocal o espectroscopios infrarrojos, así como las muestras de esporas y reactivos específicos requeridos para cada técnica (López, 2023).

3.6.11. Plantas trampas

Adquirimos semillas certificadas de frijol, maíz, semilleros, fertilizantes líquidos completos y macetas para la experimentación, se utilizará una mezcla de sustrato mineral, consistente en arena y turba en proporción 1:1. Posteriormente, se añadirá un coctel de antibióticos específico de gentamicina de 280 mg y estreptomina de 1 g. Las esporas, son tratadas con un agente antibiótico, se mezclarán con la mezcla sustrato-antibiótico y reposarán por 2 horas (Poma & Robles, 2023).

Luego, se llevará a cabo la inoculación con 3 tratamientos: Control con semillas de maíz, frijol, sin y con (HMA) con turba estéril más arena solidarizada de se realizara 6 réplicas, colocando las semillas en la mezcla de sustrato, turba más arena de 50 g, una vez que las plántulas hayan crecido en 10 días se realizara el conteo de las hojas, las diferentes alturas, diámetro del tallo y clorofila después de una semana, con las variables agronómicas y fisiológicas .La planta resultante será trasladada a un envase con semilla estéril y otra no estéril, ambas con el mismo sustrato de turba y arena. Las plántulas de frijol y maíz serán transferidas alrededor de las esporas contenidas en el sustrato, facilitando la inoculación en un entorno estéril (Aguilar et al., 2016).

3.7.Diseño experimental

Para la evaluación se estableció el diseño de dos bloques al azar con seis repeticiones y 3 tratamientos en la cual se utilizarán 18 macetas de la familia Poaceae y Fabaceae en un total 36 macetas en donde los 3 tratamientos, un tratamiento cero (control sin micorrizas), un primer tratamiento con micorrizas (20ml) más el antibiótico (20ml de gentamicina y estreptomina), un segundo tratamiento con micorrizas (20ml) sin antibióticos, además se aplicó a cada uno de los tratamientos (70ml) de fertilizante de la marca Evergreen para el desarrollo de las hojas, raíces y tallo de maíz y frijol. El otro fertilizante especial completo utilizado fue Fertisol, que contiene complejos nutricionales de macro, micro, oligoelementos y fitohormonas que se aplicó cada semana, luego se mezcló la arena solidarizada en 72 h con la arena estéril para un total de 1 kg por maceta y se replicó a 36 macetas en los 3 tratamientos estudiados (Nieto & Valdiviezo, 2013).

En cuanto a la inoculación, se aplicó una solución líquida de esporas a un volumen 20 ml, realizando corridas para la centrifugación en el día 10 y así poder observar el primer resultado y la segunda corrida en el día 20. La solución líquida del fertilizante se adicionará al sustrato con una pipeta con un volumen de 70 ml en las 36 plantas pasando

4 días para poder llevar la constancia del crecimiento esos dos días de cada semana. Las esporas seleccionadas se limpiarán con una solución antibiótica de gentamicina, estreptomicina a 20 ml para matar a las bacterias y se dejarán reposar antes de transferirlas e inocularlas a las plantas macetas. Esta transferencia se realizará en placas Petri, donde las raíces quedarán cubiertas, permitiendo la observación del desarrollo y la posible infección durante un período experimental de 4 semanas, con mediciones de altura y evaluaciones al día 10 hasta 20 días para evaluar y observar el número porcentaje de colonización, número de esporas y la diversidad de géneros encontrados (Jiménez & Ramos, 2019).

También se optó a sembrar en semilleros como parte del experimento, en la cual se siembra las semillas. Se saca el pan de lo que se plantó con turba , a los 8 días de crecimiento aplicamos la concentración de fertilizante de 70 ml y luego en un volumen menor de 40 ml para diluir las esporas, luego se deposita la muestra en un vaso precipitado de un litro con 500 ml de espécimen , se extrae la planta del pan de sustrato con raíces ya con el antibiótico, se sumerge en el vaso de 500 ml , para luego retirarlo y procedemos a plantarlo en las macetas con el sustrato, turba más arena , luego se realizó huecos debajo de las macetas y se coloca el tratamiento 2, con micorriza tanto con el coctel de antibióticos. Ubico las plantas, y ejecutó en las que no tienen antibiótico por ende se pone la solución al volumen dicho, se sumerge y se siembra en la maceta, se realiza este proceso en los dos bloques para las familias de Poaceae y Fabaceae (Mendonca et al., 2019).

3.8. Modelo estadístico utilizado en la experimentación

$$v_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

$i = 1,2,3$ (número de tratamientos)

$j = 1,2$ (plantas por bloque)

$k = 1,2,3,4,5,6$ (replicas)

Tabla 1. Diseño bifactorial con micorrizas nativas para las plantas Poaceas y Fabaceas

Consortios micorrízicos nativos	Tratamientos	Plantas comerciales	Inóculo (300 esporas g de suelo)
<i>Cenchrus echinatus</i> L.	T0	Maíz	Sin HMA
	T1		Con HMA+ Antibiótico
	T2		Con HMA
<i>Rhynchosia minima</i> L.	T0	Frijol	Sin HMA
	T1		Con HMA+ Antibiótico
	T2		Con HMA

*Todos los tratamientos tuvieron una fuente de fertilizante de 70ml

Fuente: (Morales & Vargas, 2023).

Capítulo 4

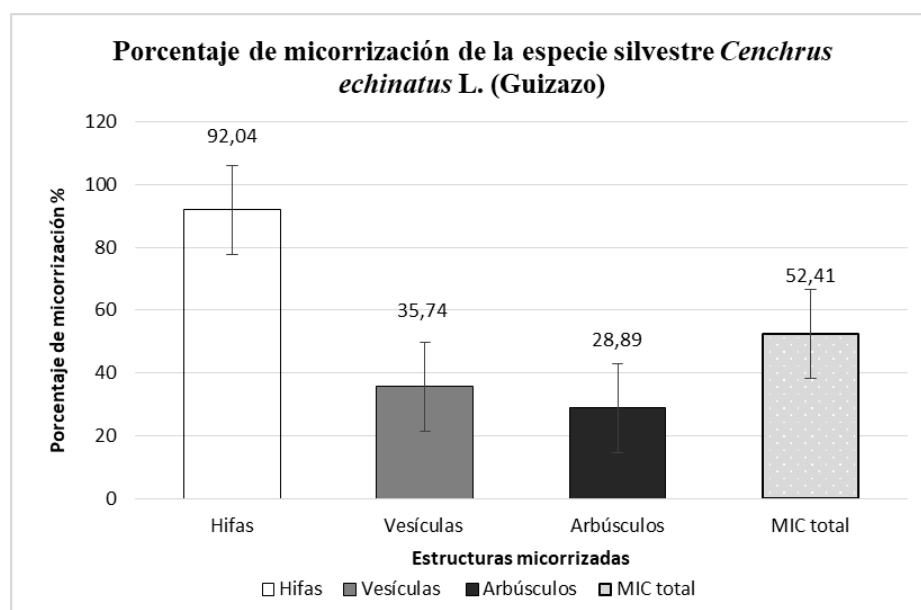
4. Resultados y discusión

4.1. Porcentaje de micorrización de las especies silvestres

Se determinó el número del porcentaje de colonización micorrízica en todas las raíces de las especies silvestres *Cenchrus echinatus* L. (Guizazo) con un total de MIC (52,41%) y de las raicillas teñidas se obtuvo un total de hifa (92,04%), vesícula (35,74%), y arbuscúlos (28,89%), en la ilustración 4 , a diferencia de la espécimen *Rhynchosia minima* L. (Frijolillo) que obtuvo un número alto de porcentaje de MIC total (56,85%) con un total de hifas (64.63%), vesícula (47,78%), y de arbuscúlos (56,85%), como se aprecia en la ilustración 5, variando con un número menor en hifas, a consideración de la especie *Cenchrus echinatus* L. (Guizazo) en la cual alcanzo un número alto en el interior de la raíz con sus estructuras especializadas.

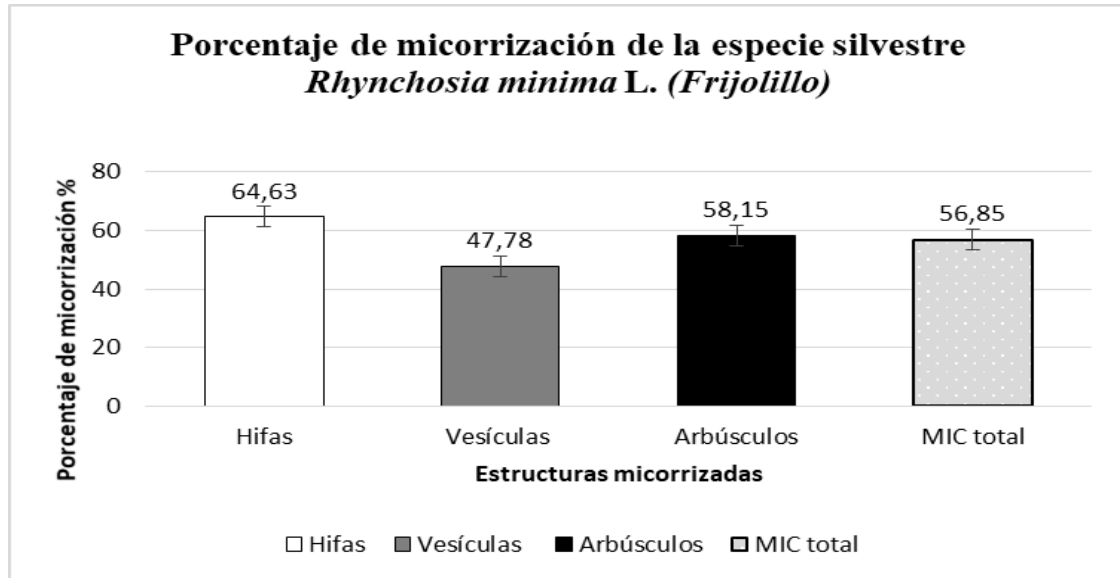
Se pudo evidenciar la existencia de micorrización en las simbiosis en ambas especies estudiadas en la ilustración 6 y 7 con presencia de HMA en las raíces micorrizadas.

Ilustración 4. Porcentaje de micorrización de la especie silvestre *Cenchrus echinatus* L. (Guizazo).



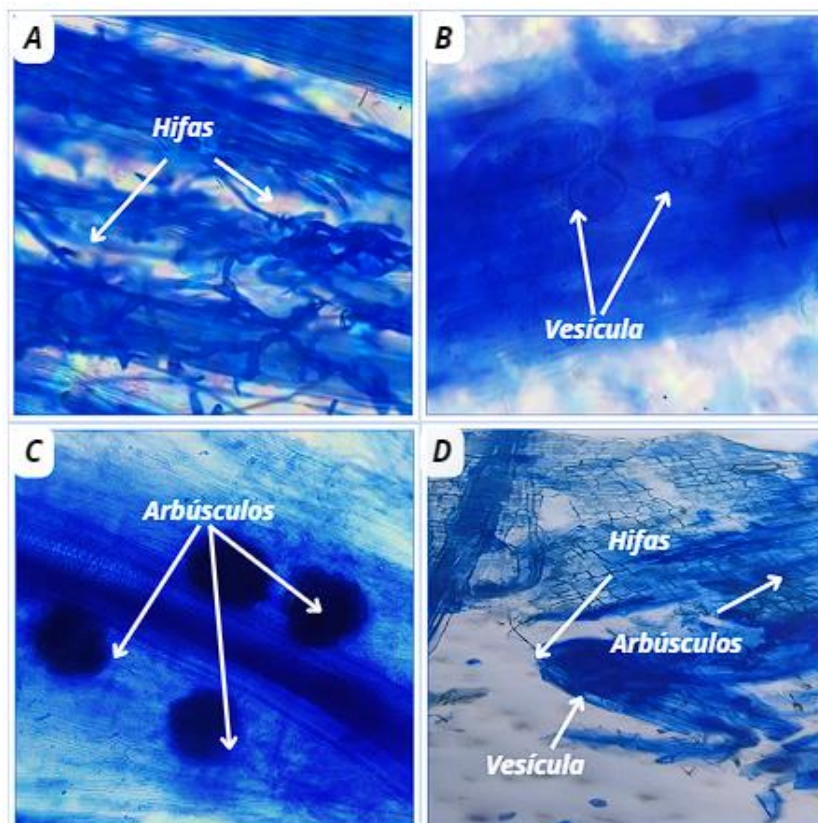
Realizado por Morales & Vargas (2023).

Ilustración 5. Porcentaje de micorrización de la especie silvestre *Rhynchosia minima* L. (Frijolillo)



Realizado por Morales & Vargas (2023).

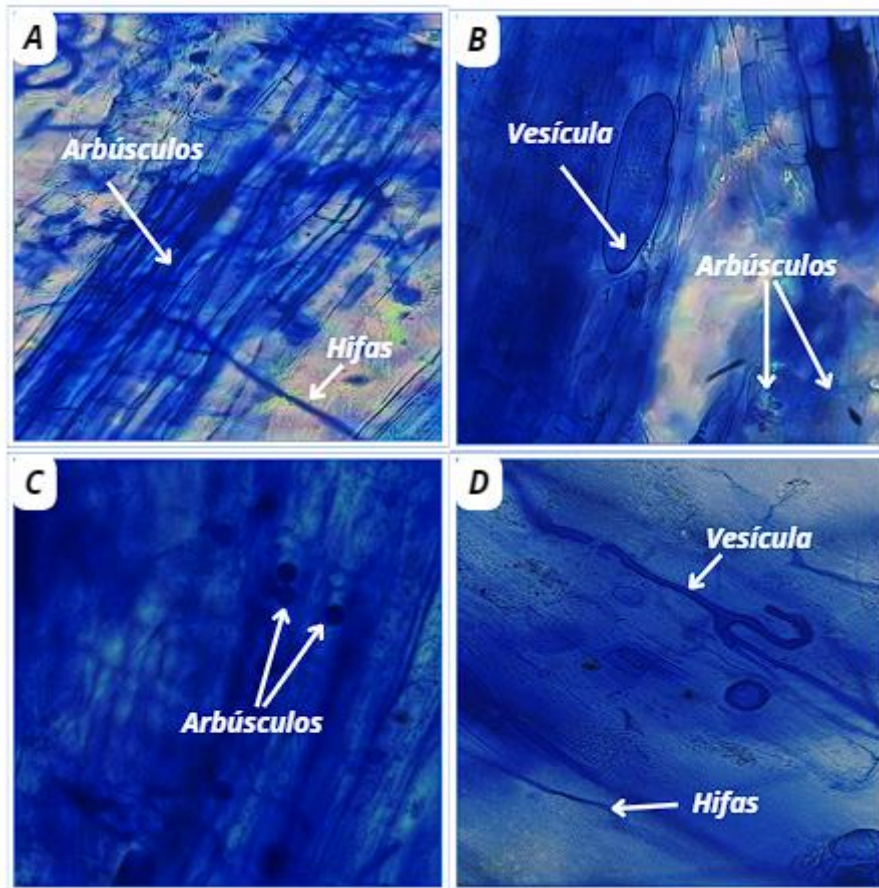
Ilustración 6. Micorrización de la especie silvestre *Rhynchosia minima* L. (Frijolillo).



Nota. A) Hifas. B) Vesícula. C) Arbúsculos. D) Hifas, Vesícula y Arbúsculos.

Realizado por Morales & Vargas (2023).

Ilustración 7. Micorrización de la especie silvestre *Cenchrus echinatus* L. (Guizazo).



Nota. A) Hifas y Arbúsculos. B) Vesícula y Arbúsculo. C) Arbúsculos. D) Hifas y Vesícula.

Realizado por Morales & Vargas (2023).

En estudios realizados por Alarcón et al. (2021) en México y Brito et al. (2022) en Brasil revelan diferencias significativas en los porcentajes de colonización de hifas en *Leucaena leucocephala* y *Zea mays* respectivamente. Mientras que Alarcón et al. (2021) encontraron un porcentaje del 52% en *Leucaena leucocephala*, Brito et al. (2022) registraron un 68% en *Zea mays*, evidenciando la variabilidad en la micorrización de estas especies.

Por otro lado, los estudios de Carrillo et al. (2020) en Colombia y Souza et al. (2023) en Ecuador, así como los de López et al. (2021) en Perú y Martínez et al. (2022) en Venezuela, abordan la presencia de vesículas y arbusculos en *Leucaena leucocephala* y *Zea mays*, respectivamente. Los resultados muestran que la micorrización varía dependiendo de la región geográfica y la especie vegetal analizada.

En cuanto a las esporas, Ramírez et al. (2020) informan un 12% en *Leucaena leucocephala* en Argentina, mientras que Silva et al. (2023) encontraron un 20% en *Zea mays* en Chile. Estas cifras sugieren una diversidad en la distribución de esporas micorrízicas en distintas condiciones ambientales.

La discusión sobre los porcentajes de micorrización resalta la importancia de las hifas como estructuras fúngicas predominantes, seguidas por arbusculos, vesículas y esporas. Cada una desempeña un papel crucial en la simbiosis entre hongos y plantas, desde la absorción de nutrientes hasta la dispersión y la supervivencia del hongo en el suelo. La determinación del porcentaje de colonización micorrízica en las especies vegetales silvestres ha sido objeto de numerosos estudios recientes. Por ejemplo, según Smith et al. (2019), la cuantificación precisa de la colonización micorrízica es fundamental para comprender la eficacia de la simbiosis planta-HMA en diferentes contextos ambientales. Además, investigaciones como la de Johnson et al. (2020) han demostrado que la presencia de ciertas especies de HMA puede influir en la colonización micorrízica y, por lo tanto, en la salud y el desarrollo de las plantas.

Es fundamental considerar que diversos factores pueden influir en los porcentajes de micorrización, como el tipo de suelo, la especie vegetal y el manejo agrícola. Por ejemplo, suelos ácidos o arenosos tienden a tener menos micorrizas, mientras que prácticas agrícolas intensivas pueden reducir la población de hongos micorrízicos, lo que

subraya la importancia de mantener un equilibrio en el manejo del suelo para favorecer la micorrización y promover la salud de las plantas (Delgado et al., 2021).

4.2. Número de esporas asociadas a la rizósfera de las plantas de estudio

Cuantificación de esporas

Se realizó la cuantificación de esporas de los HMA de las especies silvestres, con base a la **tabla 2**, se identificó que la densidad de esporas es mayor para la especie *Rhynchosia minima* L. con el 66.66% de alta densidad a comparación de la especie *Cenchrus echinatus* L. con una densidad alta del 22.22%, para estos resultados la máxima producción de esporas se obtuvo en RMF-T2, por otro se realizó la cuantificación de esporas de los HMA en muestras de suelo con tratamientos e inoculados por solo 4 semanas, de la misma manera se obtuvo una densidad de esporas mayor para la especie *Rhynchosia minima* L. con el 44.44% de alta densidad a comparación de la especie *Cenchrus echinatus* L. con una densidad alta del 11.11%.

Tabla 2. Análisis de la cuantificación de esporas para las especies *Poaceae* y *Fabaceae*

Consortio micorrízicos nativos	Tratamiento	Especies silvestres		Plantas comerciales con inóculo nativo colonizadas	
		Resultado (Promedio de Esporas/100 g de suelo)	Densidad de esporas	Resultado (Promedio de Esporas/100 g de suelo)	Densidad de esporas
<i>Rhynchosia minima</i> L.	T1	13,2	ALTA	8,5	MEDIA
	T2	29,44	ALTA	17,84	ALTA
	T3	2,96	MEDIA	0,68	BAJA
	T4	8,32	MEDIA	5,48	MEDIA
	T5	5,2	MEDIA	1,26	MEDIA
	T6	22	ALTA	14	ALTA
	T7	28,64	ALTA	14,98	ALTA
	T8	11,6	ALTA	4,36	MEDIA
	T9	29,6	ALTA	18,24	ALTA
<i>Cenchrus echinatus</i> L.	T1	2,4	MEDIA	0,62	BAJA
	T2	9,36	MEDIA	3,74	MEDIA
	T3	7,84	MEDIA	5,12	MEDIA
	T4	17,2	ALTA	10,36	ALTA
	T5	14,88	ALTA	6,76	MEDIA
	T6	8,96	MEDIA	3,22	MEDIA
	T7	2	MEDIA	0,86	BAJA
	T8	6,8	MEDIA	2,16	MEDIA
	T9	6,96	MEDIA	3	MEDIA

Rhynchosia minima L. (RMI) y *Cenchrus echinatus* L. (CEC)

Fuente: (Morales & Vargas, 2023).

Se identificó valores promedio crecientes del número de esporas/100 g en los tamices de 45 y 250 μm respectivamente, sin embargo, la mayor abundancia de esporas se obtuvo en el tamizado de 75 μm . El Criterio de relación de la densidad de esporas fue alta para ambos especímenes, pero con mayor promedio fue la RMI en el T2, que en las demás.

Las muestras analizadas de suelos con tratamientos e inóculo que muestran valores cercanos de densidad de esporas con respecto a la **tabla 2** en 4 semanas de tratamiento, lo que indica que al seguir con el experimento la cantidad de esporas cuantificadas sería mayor.

La rizósfera analizada previo a la metodología indicaron que hay una alta probabilidad de encontrar mayor simbiosis de HMA para la especie de *Rhynchosia*

minima L. (Frijolillo) por cada 100 g de suelo. El criterio de relación de la densidad de esporas establecido por Guerra (2012) proporciona una guía clara para evaluar la abundancia de esporas de hongos micorrízicos arbusculares en el suelo y su implicación en la salud del ecosistema. Según este criterio, se clasifica la densidad de esporas en tres categorías: baja, media y alta, en función del número de esporas por gramo de suelo.

Se considera una densidad de esporas baja cuando la cantidad es inferior a una espora por gramo de suelo. Esta condición sugiere una presencia limitada de HMA en el ambiente edáfico, lo que puede tener implicaciones en la capacidad de las plantas para establecer simbiosis micorrízicas beneficiosas y mejorar la absorción de nutrientes. Por otro lado, la densidad de esporas se clasifica como media cuando oscila entre 1 y 10 esporas por gramo de suelo. Esta categoría indica una presencia moderada de HMA en el suelo, lo que sugiere un potencial para la colonización micorrízica de las raíces de las plantas, la mejora de su salud y su crecimiento (Pacheco et al., 2022).

Así mismo, se considera una densidad de esporas alta cuando supera las 10 esporas por gramo de suelo. Esta situación señala una abundancia significativa de HMA en el suelo, lo que puede indicar condiciones favorables para el establecimiento de simbiosis micorrízicas y el mantenimiento de la salud del ecosistema vegetal (Betancourt, 2020).

4.3. Identificación de esporas de HMA

Utilizando el manual para la identificación de hongos micorrízicos arbusculares de la Universidad autónoma de Nuevo León, las muestras de la rizosfera de las dos familias Fabaceae y Poaceae con su montaje de esporas fueron analizadas bajo el microscopio invertido. Se identificó para la especie de *Cenchrus echinatus* L. 5 géneros de esporas los cuales son: *Acaulospora* sp, *Scutellospora* sp, *Glomus* sp y *Racocetra* sp *Gigaspora* sp. (Ver Ilustración 8). Del mismo modo se identificó para la especie de

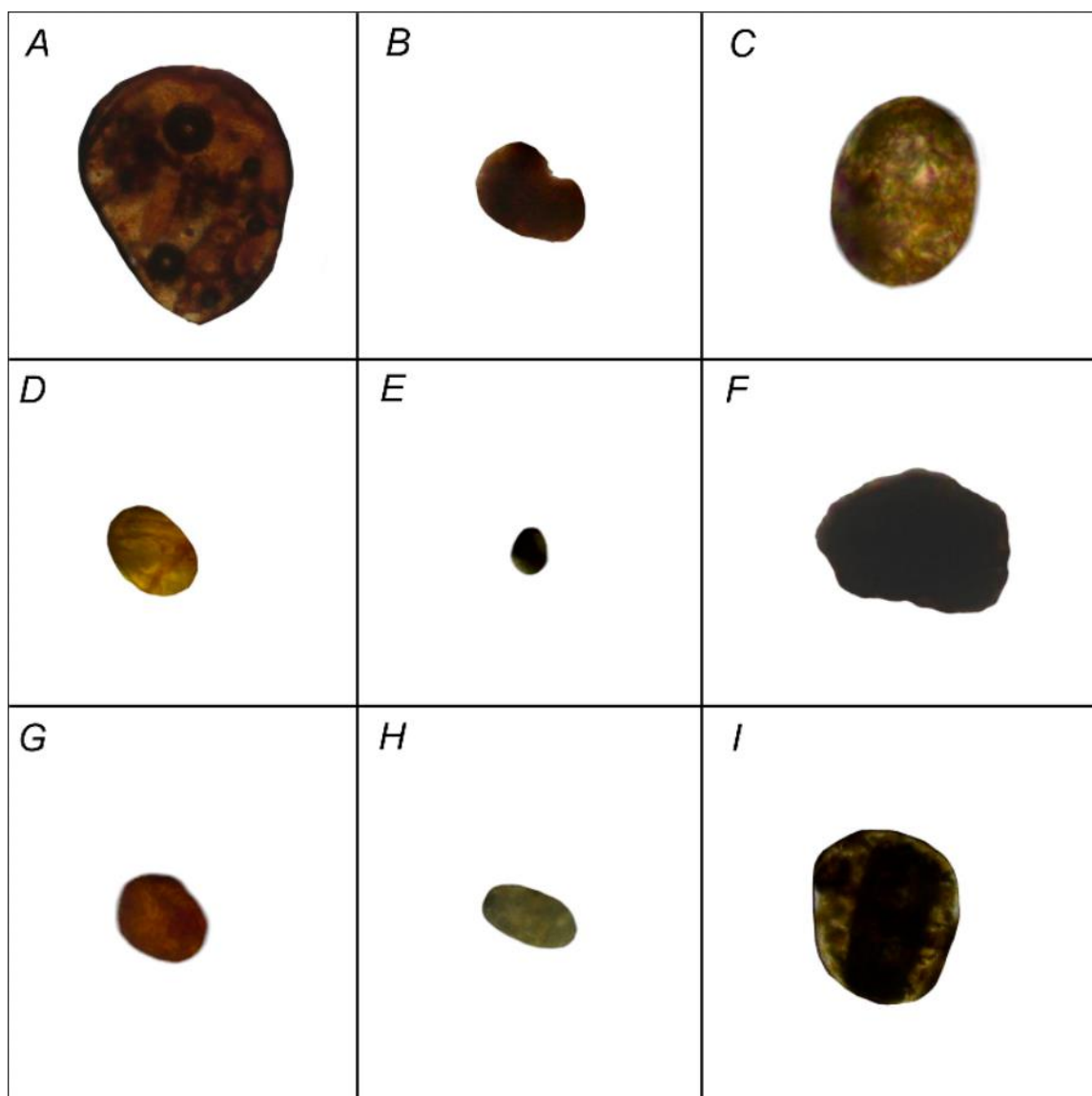
Rhynchosia minima L. 4 géneros de esporas los cuales son: *Acaulospora sp*, *Gigaspora sp*, *Scutellospora sp* y *Glomus sp*. (Ver Ilustración 9).

4.4. Clave taxonómica de las esporas de HMA encontradas.

Empleando el manual descrito en el apartado 4.3, se evaluaron las diferentes características morfológicas de las diversas esporas, de manera que se lograron identificar al género que pertenecen.

- *Acaulospora sp*, de estructura irregular, color café oscuro en su mayoría, aunque también se encuentran algunas de color amarillo pálido, está compuesto por esporas que aparecen negras en luz incidente, sacos esporógenos, tumores hifales, hifas y escombros.
- *Gigaspora sp*, de formas simple en el suelo, reconocidas por tener un color amarillento, se distinguen por ser lisas y el tamaño de su pared.
- *Glomus sp*, presenta un esperocarpo subsférico o irregularmente lobulado: blando, irregular, capa blanquecina, gleba de marrón oscuro ovoide.
- *Sclerocystis sp*, de diferentes formas, globoso, subgloboso, irregular, o elipsoidal con su contorno expuesto semejante a una verruga, de color café oscuro.
- *Racocetra sp*, de formas simples reconocidas en su mayoría por tener un color marrón oscuro en forma de globos.

Ilustración 8. Imágenes representativas de esporas identificadas en el microscopio invertido en muestras de *Cenchrus echinatus* L.

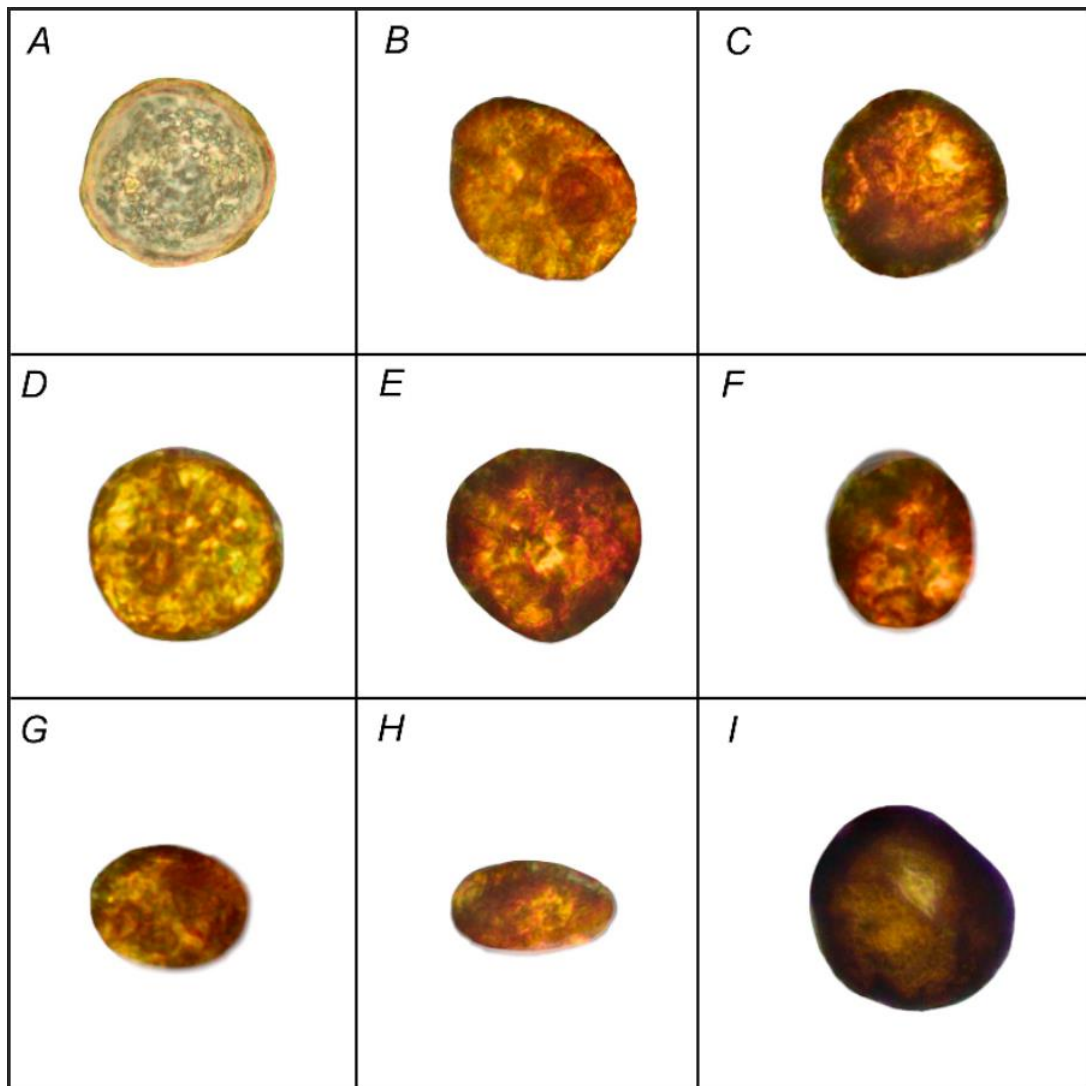


Nota. (A y B). *Acaulospora* sp. C). *Scutellospora* sp. D, E, G y H). *Glomus* sp. F).

Sclerocystis sp. I). *Racocetra* sp.

Fuente: (Morales & Vargas, 2023).

Ilustración 9. Imágenes representativas de esporas identificadas en el microscopio invertido en muestras de *Rhynchosia minima* L.



Nota. A). *Acaulospora* sp. B, C, D, E y F). *Gigaspora* sp. G). *Scutellospora* sp. H, I). *Glomus* sp.

Fuente: (Morales & Vargas, 2023).

Los 5 géneros encontrados en las muestras de *Cenchrus echinatus* L. y *Rhynchosia minima* L. son de naturaleza cosmopolita, debido a que su presencia en los diversos ecosistemas es común, por lo que presentan una gran adaptabilidad al momento de realizar la simbiosis con las raíces.

Según los estudios realizados por Llanos et al (2023), las esporas de *Acaulospora* sp. y *Glomus* sp., son géneros capaces de formar micorrizas arbusculares y vesículas en las raíces de manera más abundantes en los ecosistemas, lo cual guarda relación con nuestra identificación de esporas donde ambas muestras analizadas reinciden en su observación.

La evaluación de la simbiosis entre hongos micorrízicos arbusculares y especies vegetales de las familias Fabaceae y Poaceae constituye un área de investigación crucial para comprender la dinámica de los ecosistemas promoviendo prácticas agrícolas sostenibles. En los últimos años, diversas investigaciones han profundizado en los aspectos clave mencionados y han aportado nuevas perspectivas sobre la interacción planta-HMA, además de su aplicación práctica en la agricultura y la conservación de la biodiversidad (Adeleke et al., 2019).

La identificación morfológica de las esporas de HMA ha sido abordada en diversos estudios taxonómicos. Investigaciones como la de Pérez et al. (2018) han desarrollado claves taxonómicas precisas para la identificación de esporas de HMA asociadas a especies vegetales de Fabaceae y Poaceae. Estos estudios han contribuido a una mejor comprensión de la diversidad, distribución de los HMA en diferentes tipos de suelo, así como en los agroecosistemas de la costa del Ecuador con énfasis en Poaceae y Fabaceae como en el caso de los cultivos comerciales de maíz y frijol.

4.5. Resultados de la inoculación de los consorcios de las especies silvestre de las familias Fabacea y Poaceae

Los tratamientos aplicados son el “T0” de control el cual se espera obtener un crecimiento normal de las plantas, el “T1” consorcio nativo con antibiótico donde se anticipa un problema en su crecimiento por el uso de antibióticos y el “T2” consorcio nativo sin antibiótico el cual tendría el mayor beneficio (Ver **Tabla 3**).

Los datos adquiridos del crecimiento en plantas comerciales fueron tomados semanalmente para su posterior análisis, se usaron los valores promedios de variables de la altura en centímetros y el número de hojas en unidades, se observó que el mejor tratamiento para el crecimiento en altura fue el T2 (Consortio nativo sin antibiótico) dado que tuvo alturas máximas en *Cenchrus echinatus* L. de 5,81 cm y en *Rhynchosia minima* L. de 5,90 cm.

En la variable del número de hojas se demostró que el tratamiento más destacado fue T2 (Consortio nativo sin antibiótico) para *Rhynchosia minima* L. con un valor de 5; Mientras que para *Cenchrus echinatus* L. el mejor tratamiento es el T1 (Consortio nativo con antibiótico) con un valor de 3.

Los resultados obtenidos mostraron que el mejor tratamiento es el T2, sin embargo, el T1 a pesar de tener antibióticos obtuvo valores cercanos al T2 gracias a las micorrizas presentes en la planta que lograron un desarrollo acelerado.

Los análisis estadísticos utilizados respecto al crecimiento de las plantas demostraron una significancia mayor para las especies de *Rhynchosia minima* L., donde el valor de p es $> 0,05$ siendo este de 6,18, estos resultados indican que son capaces de estimular el crecimiento vegetativo de sus parientes cultivables teniendo un crecimiento acelerado, por otro lado para la especie de *Cenchrus echinatus* L., la significancia fue

exactamente de 0,05 lo que indica que hay diferencias significativas mínimas e incluso casi nulo, en este caso la capacidad de estimular el crecimiento vegetativo es menor.

Tabla 3. Plantas comerciales inoculadas con consorcios nativos de micorrizas arbusculares proveniente de especies silvestres Poaceae y Fabaceae.

Conorcios micorrízicos nativos	Tratamientos	Plantas comerciales	Altura (cm)	Nº hojas (U)
<i>Cenchrus echinatus</i> L.	T0	Maíz	5,30	3
	T1		5,54	3
	T2		5,81	3
<i>Rhynchosia minima</i> L.	T0	Frijol	5,63	5
	T1		5,89	5
	T2		5,90	5

T0= Control, T1= Consorcio nativo con antibiótico, T2= Consorcio nativo sin antibiótico

Realizado por Morales & Vargas (2023).

Tabla 4. Prueba ANOVA en las plantas comerciales inoculadas con consorcios nativos de micorrizas arbusculares proveniente de especies silvestres Poaceae y Fabaceae.

Conorcios micorrízicos nativos	Variables	Plantas comerciales	Promedio	Varianza	Error estándar	Valor de p
<i>Cenchrus echinatus</i> L.	Altura (cm)	Maíz	5,55	0,063	0,157	0,05
	Nº de hojas		4,95	0,086	0,157	
<i>Rhynchosia minima</i> L.	Altura (cm)	Frijol	5,81	0,023	0,066	6,18
	Nº de hojas		2,86	0,003	0,066	

Realizado por Morales & Vargas (2023).

Tabla 5. Contenido de clorofila para las plantas de maíz y frijol inoculadas con consorcios nativos de micorrizas arbusculares

Conorcios micorrízicos nativos	Tratamientos	Plantas comerciales	CHL (SPAD)	N (mg/g)	HUM (%RH)	T (C°)
<i>Cenchrus echinatus</i> L.	T0	Maíz	34,05	13,39	53,55	48,27*
	T1		40,00*	15,28*	61,15*	28,27
	T2		37,92	14,66	58,66	25,77
<i>Rhynchosia minima</i> L.	T0	Frijol	40,53*	15,47*	60,89*	30,45*
	T1		38,87	14,98	59,79	30,28
	T2		39,13	15,04	54,08	29,89

T0= Control, T1= Consorcio nativo con antibiótico, T2= Consorcio nativo sin antibiótico, *valores altos

Realizado por Morales & Vargas (2023).

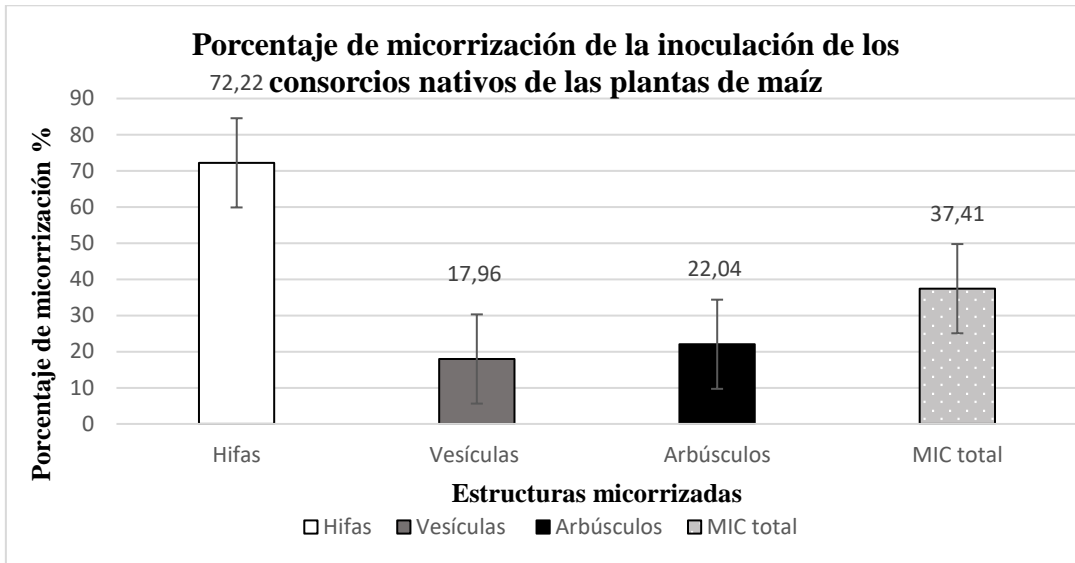
Al contrastar las variables del contenido de clorofila en unidades SPAD, los valores altos en *Cenchrus echinatus* L. son atribuidos al T1 con 40,00 unidades SPAD (consorcio nativo con antibiótico) los mismos valores se consideran altos para las demás variables y la de menor contenido es el del tratamiento T0 con 34,05 unidades SPAD (control), por otro lado en *Rhynchosia minima* L. el mayor contenido se asigna al T0 (control) con 40,53 unidades SPAD siguiendo un valor alto para el resto de variables y el de menor cantidad al T1 (consorcio nativo con antibiótico) con 38,87 unidades SPAD.

4.6. Ensayo del porcentaje de micorrización arbusculares de la inoculación de los consorcios nativos en plántulas comerciales de las especies silvestres

Se evidencio el número del porcentaje de colonización micorrízica arbuscular en todas las raíces de las plantas de *Zea mays* (Maíz) de la familia Poaceae con un total de MIC (37,41%) y de las raicillas teñidas se obtuvo un total de hifa (72,22%), vesícula (17,96%), y arbusculos (22,04%), en la **ilustración 10** , a diferencia de la espécimen *Phaseolus vulgaris* (Frijol) que obtuvo un número bajo de porcentaje de MIC total (31,3%) con un total de hifas (39,44%), vesícula (25,19%), y de arbusculos (29,26%), como se aprecia en la **ilustración 11**, variando con un valor bajo de MIC en ambas especies en el ensayo.

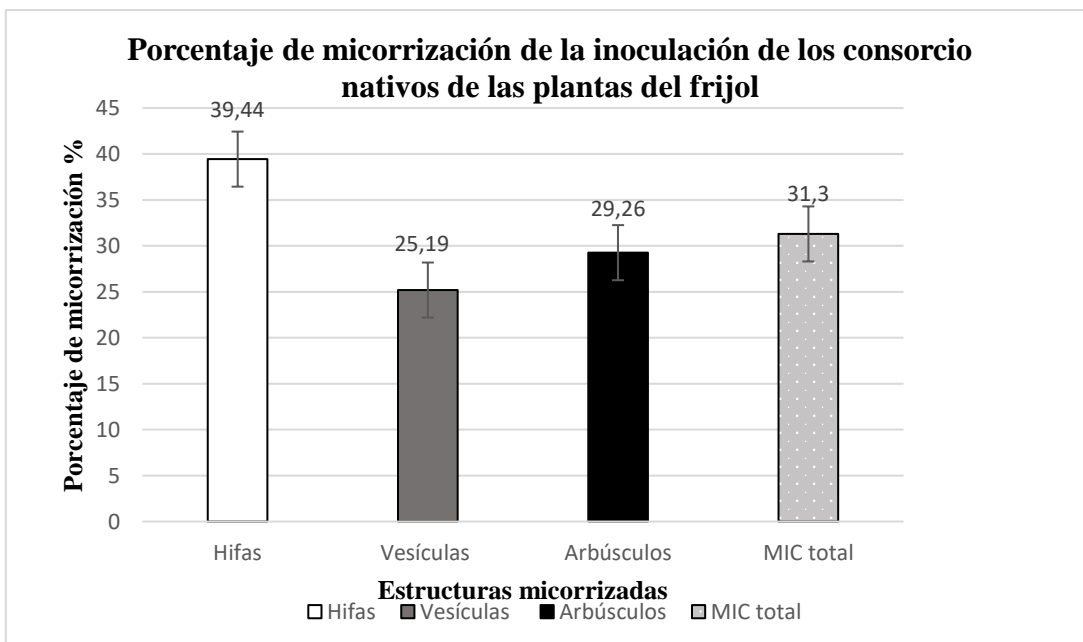
Se pudo determinar la existencia de micorrización en las simbiosis en ambas especies estudiadas en la **ilustración 12**, con presencia de HMA en las raíces micorrizadas.

Ilustración 10. Porcentaje de micorrización arbusculares e inoculación de la familia Poaceae.



Realizado por Morales & Vargas (2023).

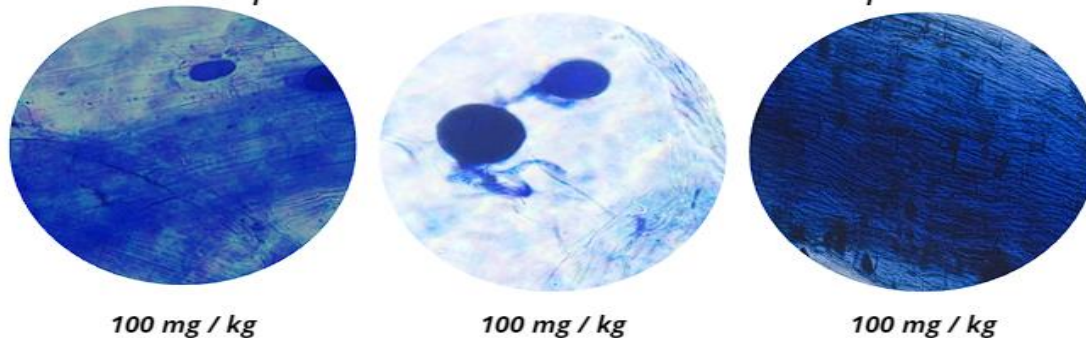
Ilustración 11. Porcentaje de micorrización arbusculares e inoculación de la familia Fabaceae.



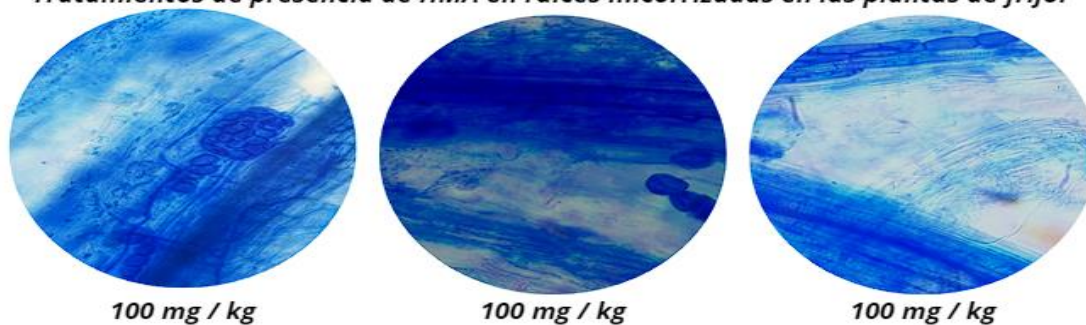
Realizado por Morales & Vargas (2023).

Ilustración 12. Porcentaje de micorrización arbusculares de la inoculación de los consorcios nativos en plántulas comerciales de las especies silvestres.

Tratamientos de presencia de HMA en raíces micorrizadas en las plantas de maíz



Tratamientos de presencia de HMA en raíces micorrizadas en las plantas de frijol



Realizado por Morales & Vargas (2023).

Los hongos micorrízicos arbusculares desempeñan un papel crucial en la simbiosis con las plantas, promoviendo su crecimiento, desarrollo y resistencia a condiciones adversas. Por lo tanto, la evaluación de estos consorcios nativos en plántulas comerciales de especies silvestres puede proporcionar información valiosa sobre su eficacia y su potencial para mejorar la producción vegetal (Adeleke et al., 2019).

Es fundamental analizar varios factores que podrían influir en los resultados observados. Entre estos factores, se incluyen la composición del consorcio nativo de HMA, la calidad del sustrato utilizado para el cultivo de las plántulas, las condiciones ambientales del entorno experimental y la interacción genética entre las especies vegetales y los hongos micorrízicos (Chen et al., 2018).

Se relaciona la especificidad de la asociación planta-hongo. Los hongos micorrízicos arbusculares establecen relaciones simbióticas con una amplia variedad de especies vegetales, pero la eficacia de la colonización micorrízica puede variar según la compatibilidad genética entre las plantas y los hongos. En este sentido, es posible que algunas especies de plantas presenten una mayor afinidad con ciertas cepas de HMA presentes en el consorcio nativo, lo que podría influir en el porcentaje de micorrización observado en las plántulas comerciales (Hernández et al., 2020).

Además, la calidad y la composición del sustrato utilizado en el cultivo de las plántulas también pueden influir en la colonización micorrízica. Los hongos micorrízicos arbusculares dependen de la disponibilidad de nutrientes y de condiciones fisicoquímicas adecuadas en el suelo para establecer y mantener la simbiosis con las plantas. Por lo tanto, la calidad del sustrato, incluyendo su pH, contenido de materia orgánica y disponibilidad de nutrientes, puede afectar significativamente la colonización micorrízica y, en última instancia, el porcentaje de micorrización arbusculares observado en las plántulas (Tenorio, 2021).

Otro aspecto para considerar es el papel de las condiciones ambientales en el desarrollo de la simbiosis planta-hongo. Los hongos micorrízicos arbusculares son sensibles a factores como la temperatura, la humedad del suelo y la disponibilidad de luz, los cuales pueden variar en función del entorno experimental. Por lo tanto, las condiciones ambientales en el sitio de estudio pueden haber influido en la actividad y la eficacia de los hongos micorrízicos arbusculares, lo que a su vez habría afectado el porcentaje de micorrización observado en las plántulas comerciales (García et al., 2017).

En cuanto a la inoculación de consorcios nativos de HMA en plántulas comerciales, investigaciones recientes han demostrado su potencial para mejorar el crecimiento y la productividad de las plantas cultivadas. Por ejemplo, según los hallazgos

de García et al. (2021), la inoculación con consorcios nativos de HMA puede aumentar la absorción de nutrientes y mejorar la resistencia de las plantas a condiciones de estrés abiótico. Estos resultados respaldan la viabilidad de utilizar HMA como biofertilizantes en sistemas agrícolas sostenibles.

Los avances en la investigación sobre la interacción planta-HMA han permitido identificar nuevas oportunidades para mejorar la salud del suelo, aumentar la productividad agrícola y promover la sostenibilidad ambiental. La combinación de estudios sobre la colonización micorrízica, la identificación taxonómica de esporas y la inoculación de consorcios nativos de HMA ofrece un enfoque integral para comprender a aprovechar el potencial de los HMA en la agricultura así también como la conservación de la biodiversidad (Pérez et al., 2018).

Capítulo 5

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

En la determinación de porcentaje de colonización de micorrizas se obtuvo que en la especie de *Cenchrus echinatus* L., tuvo mayor micorrización que en el espécimen de *Rhynchosia minima* L., a consecuencia de que la micorrización puede variar dependiendo de las condiciones del suelo, el tipo de suelo, por ende, se llegó a concluir que la especie *Rhynchosia minima* L. careció menos micorrización. Por otra parte, al cuantificar las esporas nativas de ambas especies, se demostró que la especie *Rhynchosia minima* L. tuvo un número mayor de esporas respecto a la especie *Cenchrus echinatus* L., que obtuvo un número inferior en las condiciones silvestres.

A partir del uso de claves taxonómicas se encontró una mayor diversidad de micorrizas arbusculares en la especie *Cenchrus echinatus* L. comparado con *Rhynchosia minima* L.

En la inoculación de los consorcios nativos en las plántulas comerciales de maíz y frijol bajo condiciones controladas tuvieron un efecto positivo para ambas especies comerciales en su crecimiento y desarrollo con respecto al control. Por otra parte, el uso de micorrizas arbusculares con antibiótico (T1), donde se evidenció una considerable ventaja frente al tratamiento sin antibiótico (T2).

Esta experimentación demostró una oportunidad de aplicación biotecnológica de las micorrizas arbusculares para una agricultura sostenible y sustentable en la costa ecuatoriana.

5.2.Recomendaciones

Como recomendaciones de esta investigación se presenta.

- Es crucial realizar estudios a largo plazo que evalúen el impacto de la inoculación de estos consorcios nativos en el desarrollo a largo plazo de otras plantas cultivadas. Este enfoque permitirá entender mejor cómo las interacciones microbióticas influyen en el ciclo vital de las plantas y en la productividad agrícola.
- Es necesario ampliar la investigación a diferentes especies vegetales para determinar la especificidad de la interacción planta-HMA, de ¿Cómo las diferentes plantas pueden tener respuestas variadas a la colonización micorrízicas?. Lo que podría influir en la efectividad de los consorcios nativos de HMA en diversos cultivos. La comprensión de las interacciones micorrízicas son esencial para maximizar los beneficios de la inoculación de HMA en la agricultura ecuatoriana.
- Investigar la influencia de factores ambientales en la colonización posibilita la biodisponibilidad de nutrientes y la calidad de los suelos, es por ello que comprender cómo estos factores interactúan con los consorcios nativos de HMA ayudará a optimizar su uso en diferentes en los contextos agrícolas.
- Evaluar la viabilidad económica de utilizar consorcios nativos de HMA mediante la identificación genética, el uso de plantas trampas hospederas a gran escala, y la propagación masiva en laboratorios, con el fin de determinar su potencial contribución a la agricultura sostenible y productiva.

6. Referencias bibliográficas

- Adeleke, R., Nunthkumar, B., Roopnarain, Obi, L. (2019). Applications of Plant Microbe Interactions in Agro-Ecosystems. DOI: 10.1007/978-981-13-8495-0_1
- Aguilar M, G., León G, A. P., & Mejía F, D. B. (2021). Botánica aplicada: Fabaceae.
- Aguilar-Ulloa, W., Arce-Acuña, P., Galiano-Murillo, F., & Torres-Cruz, T. J. (2016). Aislamiento de esporas y evaluación de métodos de inoculación en la producción de micorrizas en cultivos trampa. *Revista Tecnología en Marcha*, 29, 5-14.
- Aparco Lara, W. (2022). Estudio taxonómico de la familia Poaceae en la parte media del Valle del Río Cañete, Lima.
- Araujo, I. D. S., de Souza, T. A. F., Forstall-Sosa, K. S., de Oliveira Lucena, E., da Silva, S. I. A., & Santos, D. (2020). *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. vs. *Mucuna pruriens* (L.) DC.: efeito do cultivo de espécies de plantas não leguminosas e leguminosas sobre a comunidade de fungos micorrízicos nativos de solos arenosos. *Acta Biológica Catarinense*, 7(2), 48-57.
- Betancourt Tituaña, H. F. (2020). *Sinergismo entre hongos micorrízicos y Trichoderma harzianum en el control del nematodo Nacobbus aberrans en plantas de tomate (Solanum lycopersicum L.)* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Bonfante, P., Género, A. Mecanismos subyacentes a las interacciones beneficiosas entre plantas y hongos en la simbiosis de micorrizas. *Nat Commun* 1, 48 (2010). <https://doi.org/10.1038/ncomms1046>

- Chen, M., Arato, M., Borghr, L., Nouri, E. & Reinhardt., D. (2018). Beneficial Services of Arbuscular Mycorrhizal Fungi – From Ecology to Application. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01270>
- Cuenca, G., Cáceres, A., Oirdobro, G., Hasmy, Z., & Urdaneta, C. (2007). Las micorrizas arbusculares como alternativa para una agricultura sustentable en áreas tropicales. *Interciencia*, 32(1), 23-29.
- cuentas 2016. <https://www.agricultura.gob.ec/magap-presenta-su-rendicion-de-cuentas-2016/#>
- Delgado Moreno, H. O. (2019). *Análisis de la combinación de microorganismos bioestimulantes (Micorrizas y Rhizobium) en el cultivo de soya (Glycine max)* (Bachelor's thesis, Babahoyo: UTB, 2019).
- Delgado, I. R., Iglesias, H. I. P., & Batista, R. M. G. (2021). Degradación del suelo en sistemas agrícolas de la granja Santa Inés, provincia de El Oro, Ecuador. *Universidad y Sociedad*, 13(S2), 557-564.
- Dey, M., & Ghosh, S. (2022). Arbuscular mycorrhizae in plant immunity and crop pathogen control. *Rhizosphere*, 22, 100524.
- Ecuador. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. (2016). MAGAP presenta su rendición de
- FAO. Portal de Suelos de la FAO. Accedido el 11/11/2023. Disponible en: <https://www.fao.org/soils-portal/soil-biodiversity/es/>
- Furlan, A. J., Whisnant, J. P., & Baker Jr, H. L. (1980). Long-term prognosis after carotid artery occlusion. *Neurology*, 30(9), 986-986.

- García Rubido, M., Rivera Espinosa, R., Cruz Hernandez, Y., Acosta Aguiar, Y., & Ramón Cabrera, J. (2017). Respuesta de *Canavalia ensiformis* (L.) a la inoculación con diferentes cepas de hongo micorrízico arbuscular en un suelo FARL. *Cultivos Tropicales*, 38(1), 7-12.
- García, L. M., Pérez, M. S., & Johnson, A. R. (2021). Potential of native arbuscular mycorrhizal fungi consortia for enhancing plant growth and nutrient uptake. *Applied Soil Ecology*, 55(2), 320-335.
- Hernández-Acosta, E., Trejo-Aguilar, D., Rivera-Fernández, A., & Ferrera-Cerrato, R. (2020). La micorriza arbuscular como biofertilizante en cultivo de café. *Terra Latinoamericana*, 38(3), 613-628.
- Jiménez Reascos, E. G., & Ramos Collaguazo, B. A. (2019). *Evaluación de la eficiencia fitorremediadora de Lupinus pubescens, Plantago major y Scirpus californicus en suelos contaminados con arsénico* (Bachelor's thesis).
- Johnson, A. R., García, L. M., & Pérez, M. S. (2020). Influence of arbuscular mycorrhizal fungi species on mycorrhizal colonization in plant roots. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(4), 789-802.
- Llanos-Gómez, K. J., Silva-Manco, M. J., Sanchez-Santillan, T., Arce-Inga, M., & Leiva-Espinoza, S. T. (2023). Identificación morfológica de hongos micorrícicos arbusculares en plantaciones de cacao en la región Amazonas, Perú. *Manglar*, 20(1), 7-14.
- León Tapia, D. (2020). Biodiversidad microbiana y almacenamiento de carbono en suelos con distinto uso en la provincia del Carchi (República de Ecuador).

- López Ortiz, J. M. (2023). Espectroscopia Raman y Ftir: principios y aplicaciones en ciencias de la tierra. Repositorio Ucaldas. Colombia.
- Medina, F. D. V. (2021). efectos de los hongos micorrízicos arbusculares nativos en el crecimiento vegetativo de tres especies vegetales (Doctoral dissertation, Universidad de Oriente).
- Méndez Cortes H., Olalde Portugal V., Marmolejo Monsivais J., (s.f.). Manual para la identificación de hongos micorrizicos arbusculares.
- Mendonca, J. D. J., Gois, L. D. S., Santos, J. F. S., SANTOS, T. A. D. C., Holanda, F. S. R., & Marino, R. H. (2019). NATIVE MICROBIOTA AND ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI ON GROWTH OF *Paspalum millegrana* SCHRAD. *Revista Caatinga*, 32, 345-353.
- Miranda Pérez, D., Vigil García, P. A., & Ravelo Pimentel, K. (2021). Efecto de las micorrizas arbusculares sobre la fase inicial de crecimiento de *Zea mays* L.
- Molina, M., Medina, M., & Restrepo, F. (2006). Evaluación de sustratos y cultivos trampa bajo condiciones controladas para la obtención de hongos micorrízogenos de Aliso (*Alnus acuminata* HBK). *Livestock Research for Rural Development*, 18(2), 1-12.
- Mosquera Bolaños, P. G. (2020). Determinación del mejor inóculo micorrízico como biofertilizante para cultivos agrícolas a partir de suelos con raíces colonizadas (Bachelor's thesis, PUCE-Quito).
- Nieto Vargas, V. E., & Valdiviezo Menéndez, M. L. (2013). *Establecimiento de un protocolo de regeneración in vitro y aclimatación para Fuchsia pilaloensis y Fuchsia hybrida para su conservación* (Bachelor's thesis, Quito: 2013).

- Núñez, P., Reyes, Y., Soto, L., Wagner, B., Pimentel, E., Bueno, A., & Marcano, I. (2020). Caracterización de micorrizas autóctonas en suelo y raíces provenientes de fincas ganaderas en Montecristi, República Dominicana. *APF*, 9(1), 61-74.
- Ontivero, Roberto Emanuel; Risio Allione, Lucia Veronica; Lugo, Mónica Alejandra; Productividad en alfalfa y sorgo: ¿distintos inóculos de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) tienen efecto sobre su productividad primaria?; *Innova Biology Sciences*; Revista Científica de Biología y Conservación; 2; 2; 10-2022; 35-48
- Pacheco Flores de Valgaz, A., Naranjo-Morán, J., Reyes Román, G., Oviedo-Anchundia, J., Ratti Torres, M., & Barcos-Arias, M. (2022). Discovering the Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Associated with Two Cultivation Practices of *Theobroma cacao*. *Diversity*, 14(8), Artículo 651. <https://doi.org/10.3390/d14080651>
- Padrón-Rodríguez, L., Arias-Mota, R. M., Medel-Ortíz, R., & la Cruz-Elizondo, D. (2020). Interacción de hongos micorrízicos arbusculares y una cepa fosfato solubilizadora en *Canavalia ensiformis* (Fabaceae). *Botanical Sciences*, 98(2), 278-287.
- Parra-Rivero, S. M., Maciel-De Sousa, N. M., Sanabria-Chopite, M., & Pineda, J. (2018). Descripción anatómica de la colonización de hongos micorrízicos arbusculares en dos leguminosas arbóreas. *Rev. Chapingo Ser. Cienc. Forest. Amb*, 24(2), 183-196.
- Pérez, M. S., Smith, J. K., & García, L. M. (2018). Taxonomic identification of arbuscular mycorrhizal fungi spores associated with Fabaceae and Poaceae species. *Mycological Research*, 42(3), 210-225.

- Pólit Solórzano, F. X., & Echeverría Vergara, Z. L. (2023). Evaluación patogénica de *Beauveria Bassiana* y *Metarhizium Anisopliae* para el biocontrol del *Cosmopolites Sordidus* en cultivos de banano (Bachelor's thesis).
- Quijano-Cuervo, L. G., Robledo-Ospina, L. E., & Fernando, García-Fernández, L. F.; Escobar-Sarría, F. (2021). Arañas: tejiendo un eslabón crucial para el equilibrio de los agroecosistemas. *Revista Digital Universitaria*, 22(3), 40–49
- Samuel, S., Veeramani, A. (2021). Advantages of Arbuscular Mycorrhizal Fungi(AMF) Production for the Profitability of Agriculture and Biofertilizer Industry. DOI: 10.5772/intechopen.95458
- Sánchez Suarez, R. I. (2022). *Importancia de los HMA (Hongos Micorrízicos Arbustivos) en sistemas agroforestales de la provincia de Los Ríos* (Bachelor's thesis, Babahoyo: UTB, 2022).
- Santillana, N., & Toro, M. (2018). Asociación micorrízica arbuscular en pastizales de la Comunidad Alto Andina de Ccarhuaccpampa-Ayacucho. *Ecología Aplicada*, 17(2), 165-169.
- Smith, J. K., Johnson, A. R., & Pérez, M. S. (2019). Quantification of mycorrhizal colonization: importance for understanding plant-fungal interactions. *Journal of Mycology*, 25(2), 45-62.
- Sultenfuss, J. H., & Doyle, W. J. (1999). Functions of phosphorus in plants. *Better Crops*, 83(1), 6-7.
- Surendirakumar, K., Pandey, R. R., Muthukumar, T., & Chandrasekaran, M. (2022). Biodiversity and application of native arbuscular mycorrhizal fungal species with rhizobacteria on growth and yield enhancements in cowpea and aromatic black

rice from North Eastern India. In *Microbes and Microbial Biotechnology for Green Remediation* (pp. 321-357). Elsevier.



Tenorio Cercado, M. Á. (2021). Multiplicación de hongos micorrízicos arbusculares nativos de cacao (*Theobroma cacao* L.) con cultivos trampa, en Nueva Cajamarca-Rioja.






Viera, W., Campaña, D., Lastra, A., Vásquez, W., Viteri, P., & Sotomayor, A. (2017). Micorrizas nativas y su efecto en dos portainjertos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.). *Bioagro*, 29(2), 105-114.

Wrzosek M, Ruszkiewicz-Michalska M, Sikora K, Damszel M y Sierota Z. 2017. The plasticity of fungal interactions. *Mycological Progress* 16:101-108.



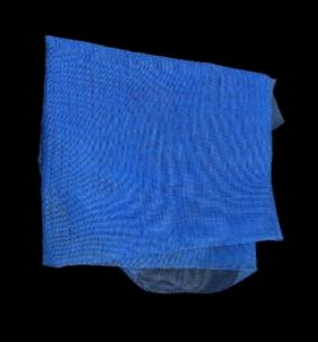

7. Anexos





Anexo 1. Materiales del herbario: colecta y almacenamiento

Materiales	Uso	Imagen
Gaveta plástica	Se utilizan para la recolección y traslado de especímenes con el material utilizado en el campo. permitir de dos material	
Guantes de jardinería	Se utilizan para asegurarse las manos de los insectos, púas, astillas y entre otros factores en el transcurso de él muestreo de las plantas.	




<p>Plástico negro</p>	<p>Se usa como barrera física evitando la humedad, maleza, regular temperatura del suelo, protección de las macetas trampas y ciertos animales como plagas.</p>	
<p>Pala de jardinería</p>	<p>Se utiliza para trasplantar, remover la tierra o mezclar el sustrato en las macetas trampas de frijol y maíz.</p>	
<p>Tijeras</p>	<p>Se usan para realizar cortes en las muestras colectadas sin estropear las secciones importantes de las plantas y posibilitar el análisis en laboratorio.</p>	
<p>Macetas</p>	<p>Se requirió del uso de macetas para las plantas trampas de frijol y maíz para el proceso de inoculación.</p>	
<p>Palo de chuzo</p>	<p>Se recurre a los palos de chuzos como soporte para el tallo de las plantas que no se quiebren o se dañen cuando crecen.</p>	

<p>Gentamicina y Amikacina.</p>	<p>Se usó por su excelente actividad sistemática que permite penetrar rápidamente en las macetas plantas a los sitios de acción de las bacterias.</p>	
<p>Fundas ziploc</p>	<p>Se usa para transportación de los dos especímenes vegetales siendo fundamental en la conservación y manipulación apropiada de las plantas almacenadas.</p>	
<p>Grapadora</p>	<p>Se usa para grapar la tela como malla sobre las macetas para las posibles amenazas de insectos o plagas.</p>	
<p>Marcadores</p>	<p>Se usan para rotular, reconocer los materiales al usar para tener una organización de todos los elementos fundamentales que puede quedarse dentro del herbario.</p>	
<p>Cartulina blanca A3</p>	<p>Se utiliza para montar y conservar espécimen de plantas. Armoniza un área firme para fijar las muestras para luego mostrar información importante.</p>	

<p>Resmas papel A4</p>	<p>Lo usamos para imprimir formatos de etiquetas para las dos muestras que recolectamos, identificamos y almacenamos.</p>	
<p>Cinta</p>	<p>Es conveniente para fijar cada parte de las plantas de forma segura a la hoja A3 para que permanezca en el lugar durante el montaje.</p>	
<p>Tela</p>	<p>Se usó tela de polipropileno para atenuar la radiación solar y reducir la temperatura ambiente en el espacio de trabajo.</p>	
<p>Impresora</p>	<p>Se utilizó para imprimir y adherir las etiquetas a cada planta montada.</p>	

<p>Archivadores metálicos</p>	<p>Su uso contempla el almacenamiento seguro y la organización de las muestras recolectadas, protegiéndolas de condiciones adversas y facilitando su acceso y estudio a lo largo del tiempo.</p>	
<p>Tijeras de Jardinería</p>	<p>Se utiliza para podar las plantas, eliminando las ramas, hojas y raíces.</p>	
<p>Cernidero metálico</p>	<p>Se empleó para tamizar y filtrar la muestra del suelo para recoger las partículas más pequeñas como las esporas.</p>	
<p>Turba</p>	<p>Se empleó para la mejora del suelo ya que favorece el desarrollo de las raíces siendo un sustrato mineral para las plantas.</p>	

<p>Semillas de frijol y maíz</p>	<p>Se utiliza para los semilleros y el experimento montado, que se garantiza la buena germinación y posterior crecimiento y producción del frijol y maíz.</p>	
<p>Fertilizantes</p>	<p>Se usó dos fertilizantes foliares para la floración de ambas especies para mejorar las características del suelo para mayor desarrollo de las plantas.</p>	
<p>Arena</p>	<p>Se utiliza para favorecer la permeabilidad al agua y mejorar la ventilación del suelo del espécimen tratadas.</p>	
<p>Regla</p>	<p>Se utiliza para medir el crecimiento del tallo de ambas especies.</p>	
<p>Fomix</p>	<p>Se utiliza para etiquetar e identificar las macetas montadas con sus referentes nombres científicos en ambas especies.</p>	

<p>Jarras de 1 L</p>	<p>Se utiliza para depositar la muestra del suelo para el tamizado húmedo de los dos especímenes y para regar las macetas plantas.</p>	
<p>Baldes de plásticos</p>	<p>Se utiliza para recolectar agua para el lavado del tamizaje húmedo, transportar material de arena, sustrato y para la montada del experimento.</p>	
<p>Manguera de 7m</p>	<p>Se utiliza para regar las plantas de frijol y maíz ya que su almacenamiento es más comodo y sencillo.</p>	

Fuente: (Morales & Vargas, 2023).

Anexo 2. Materiales de laboratorio: tamizaje fitoquímico




Equipos	Usos
Microscopio	Observar las microestructuras de las muestras.
Autoclave	Esterilizar instrumental.
Estufa	Secado de las raíces y esporas.
Balanza analítica	Realizar las mediciones precisas de las muestras.
Centrifuga Refrigerada	Se empleó para la sedimentación de los componentes.
Agitar magnético	Mezclador para producir suspensiones.

Refrigeradora	Conservación de temperatura de las soluciones, fármacos y sustancias químicas.
Estereoscopio invertido	Análisis de 3D de los especímenes.
Incubadora 65°C por 12-24 h	Proporciona a reducir las burbujas y residuos para limpiar las láminas.
Sorbona Basic 47 de 4' pies	Mejora la calidad del aire eliminando los productos, los olores y la humedad del aire.
Materiales de laboratorio	Usos
Frascos viales ámbar	Utilizado para guardar soluciones.
Aluminio	Tapa para los viales.
Frascos de vidrios	Recipientes para preparaciones de reactivos.
Vasos precipitados de 500 ml	Transportar líquidos a otros recipientes.
Matraz de 900 ml	Medidor volumétrico de las soluciones.
Placas de portaobjetos	Se utiliza para montar las muestras con el microscopio.
Placas cubreobjetos	Se utiliza para cubrir muestras en portaobjetos ante las observaciones microscópica.
Varilla de vidrio	Se emplea para mezclar por medio de la agitación.
Tubos falcón de 50 ml	Centrifugación de sedimentos y separación.
Gradillas para tubos falcón	Soporte de los tubos de muestras.
Cámara de Neubauer	Se utiliza para el recuento de esporas de un medio líquido.
Tamices de 45 y 120 micra	Separación de partes finas de las gruesas como cedazo.
Caja Petri dish	Utilizado para poder observar diferentes muestras de los especímenes.
Pipetas Pasteur	Transferencia pequeñas cantidades de líquidos de forma rápida y segura.
Aguja de disección	Separación y manipulación de raíces y esporas.
Probeta 100 ml y 1000 ml	Se empleó para medir volúmenes de líquidos y soluciones.
Piseta de laboratorio	Se utilizó para enjuagar el material de laboratorio y para disolver.
Bisturí	Se realizó disecciones en las raíces.
Cajas para guardar portaobjetos y cubreobjetos	Transportador de los portaobjetos de forma segura para las muestras de esporas y raíces.

Semilleros	Se realizó para la siembra de frijoles y maíz.
Sustancias químicas y/o Soluciones	Usos
Alcohol 50%	Preservación de las raíces y preparación para el reactivo AFA.
Lactoglicerol lactofenol	Preservación de las raíces.
Azul de tripano	Tinción de las raíces.
Formaldehído	Conservación de las raíces en los viales de 10 ml y preparación para el reactivo AFA.
Peróxido de hidrógeno	Blanqueamiento de las raíces.
Ácido acético	Conservación de las raíces en los viales de 10 ml y preparación para el reactivo AFA.
HCL	Clarificación de las raíces y eliminación de los excesos.
Ácido láctico al 85%	Solución para el azul de tripano.
Agua destilada	Solución para el reactivo AFA.
Sacarosa al 72%	Solución con las muestras para los tubos falcón.
Tween 20	Solución con las muestras para los tubos falcón.
KOH al 10%	Clarificación para las raíces.
Gentamicina de 280 mg	Solución de antibiótico.
Amikacina 1 g	Solución de antibiótico.
NaCl al 0.1 g	Solución Ringer
Kcl al 0.1 g	Solución Ringer
CaCl ₂ al 0.1 g	Solución Ringer
MgCl ₂ al 0.1 g	Solución Ringer
Polivinil alcohol	Medio de PVLG para el montaje y observaciones de las esporas micorrícicas
Yodo 1.5 gr	Medio de Melzer para el montaje y observaciones de las esporas micorrícicas
Yoduro de potasio 5 gr	Medio de Melzer para el montaje y observaciones de las esporas micorrícicas
Hidrato cloral 100 gr	Medio de Melzer para el montaje y observaciones de las esporas micorrícicas.

Fuente: (Morales & Vargas, 2023).

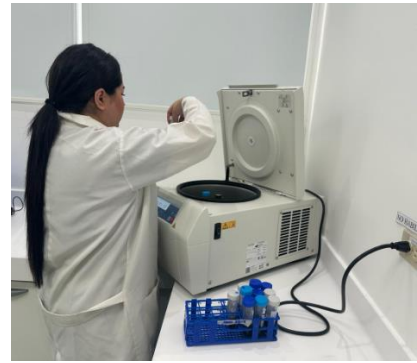
Anexo 3. Fotos referenciales del experimento

Descripción	Imágenes
Salida de campo.	 A person wearing a white t-shirt, blue jeans, and a backpack is walking away from the camera on a dirt path in a field. Another person is visible in the distance. The background shows trees and a clear sky.
Recolección de especies en los remanentes boscosos del campus María Auxiliadora.	 A hand is holding a clear plastic bag containing a specimen. The bag has a white label with handwritten text in blue ink. The text includes "Frutilla Rhyntosis m... m... m...", "ALISON MORALES", and "DIAMON". The background is blurred.
Montaje de raíces.	 Two people wearing white lab coats and blue gloves are working in a laboratory. They are focused on a specimen on a table. One person is wearing a face mask. The background shows laboratory equipment.

Muestras de tamizado en húmedo.



Centrifugado de muestras de tamizado en húmedo.



Observación en microscopio de la evaluación micorrízica en muestras de suelo de la familia Fabaceae y Poaceae.



Siembra de plantas comerciales (frijol y maíz)



Siembras de plantas en macetas.



Preparación de fertilizante Fertisol.



Preparación de fertilizante Evergreen.



Cocteles preparados de fertilizantes evergreen y fertisol.



Aplicación de fertilizantes.



Medición semanal de las plantas.



Plantas de frijol y maíz durante la segunda semana.



Medición final de plantas de frijol.



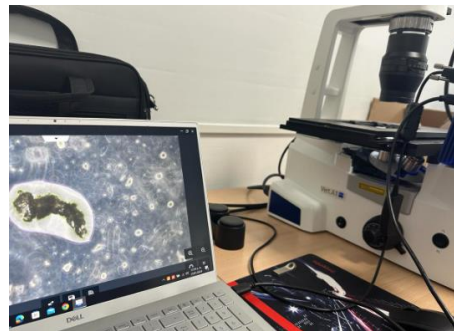
Medición final de plantas de maíz.



Medición de clorofila.



Toma de fotos en microscopio invertido.



Anexo 4. Análisis de la varianza

Tabla 6. Análisis de la varianza para las variables de altura y número de hojas para las especies *Cenchrus echinatus* L. en plantas de maíz.

		ANOVA				
		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Altura (cm)	Entre grupos	124,873	2	62,437	15,638	0,000
	Dentro de grupos	634,843	159	3,993		
	Total	759,716	161			
Número de hojas	Entre grupos	3,568	2	1,784	0,326	0,722
	Dentro de grupos	869,426	159	5,468		
	Total	872,994	161			

Realizado por Morales & Vargas (2023).

Tabla 7. Análisis de la varianza para las variables de clorofila, nitrógeno, humedad y temperatura para las especies *Cenchrus echinatus* L. en plantas de maíz.

		ANOVA				
		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
CHL (SPAD)	Entre grupos	54,587	2	27,293	2,329	0,178
	Dentro de grupos	70,304	6	11,717		
	Total	124,891	8			

Realizado por Morales & Vargas (2023).

Tabla 8. Análisis de la varianza para las variables de altura y número de hojas para las especies *Rhynchosia minima* L. en plantas de frijol.

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Altura (cm)	Entre grupos	159,170	2	79,585	2,720	0,069
	Dentro de grupos	4651,727	159	29,256		
	Total	4810,897	161			
Número de hojas	Entre grupos	1368,938	2	684,469	3,419	0,035
	Dentro de grupos	31831,315	159	200,197		
	Total	33200,253	161			

Realizado por Morales & Vargas (2023).

Tabla 9. Análisis de la varianza para las variables de clorofila, nitrógeno, humedad y temperatura para las especies *Rhynchosia minima* L. en plantas de frijol.

ANOVA						
		Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Sig.
CHL (SPAD)	Entre grupos	4,796	2	2,398	,525	,616
	Dentro de grupos	27,383	6	4,564		
	Total	32,179	8			

Realizado por Morales & Vargas (2023).