



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TÍTULO

**Aislamiento e identificación morfológica de hongos micorrízicos
arbusculares (HMA) asociados al café en sistemas agroforestales en el sur
del Ecuador.**

Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo

Autor

José Agustín Guachanamá Sánchez

Director

Ing. Narcisa de Jesús Urgiles Gómez PhD.

Loja - Ecuador

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICADO

Dra. Narcisa de Jesús Urgiles Gómez PhD.
DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA:

Que luego de haber dirigido y revisado el trabajo de tesis titulado: “**Aislamiento e identificación morfológica de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) asociados al café en sistemas agroforestales en el sur del Ecuador**”, previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo, del egresado: **José Agustín Guachanamá Sánchez**, se autoriza su presentación debido a que el mismo se sujeta a las normas y reglamentos generales de graduación exigido para la Carrera de Ingeniería Agronómica

En mi calidad de Director de Tesis certifico que el trabajo de investigación realizado ha sido propio del egresado.

Loja 29 de junio de 2020



Firmado electrónicamente por:
NARCISA DE
JESUS URGILES
GOMEZ

Dra. Narcisa de Jesús Urgiles Gómez PhD.

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Una vez cumplida la reunión del tribunal de calificación del trabajo final de tesis titulado: **“Aislamiento e identificación morfológica de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) asociados al café en sistemas agroforestales en el sur del Ecuador”** de autoría del Sr. José Agustín Guachanamá Sánchez egresado de la carrera de Ingeniería Agronómica

En tal virtud nos permitimos certificar que el trabajo final consolidado de investigación está acorde con los requerimientos de la carrera de Ingeniería Agronómica de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, por lo tanto, se autoriza continuar con los trámites pertinentes.

Loja, 11 de septiembre de 2020



Firmado digitalmente por:
MARLENE LORENA
MOLINA MULLER

Dra. Marlene Lorena Molina Müller *PhD.*

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

MARIA NATALIA
MORALES PALACIO

Firmado digitalmente
por MARIA NATALIA
MORALES PALACIO
Fecha: 2020.10.05
08:34:43 -05'00'

Dra. Maria Natalia Morales Palacio *PhD.*

VOCAL



Firmado digitalmente por:
JORGE ISAAC
ARMIJOS
RIVERA

Dr. Jorge Isaac Armijos Rivera *PhD.*

VOCAL

AUTORÍA

Yo, **José Agustín Guachanamá Sánchez**, declaro ser el autor del presente TRABAJO DE TESIS y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja, y a sus representantes Jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma.

Declaro, que durante la investigación y elaboración de la tesis el uso de referencias publicadas por otros autores cumplió con las normas y regulaciones establecidas.

Adicionalmente, acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.”

Autor: **José Agustín Guachanamá Sánchez**

Firma:  JOSE AGUSTIN
GUACHANAMA
SANCHEZ
Firmado digitalmente por
JOSE AGUSTIN
GUACHANAMA SANCHEZ
Fecha: 2020.09.08 20:20:00
+05'00'

Cédula: 1105888836

Fecha: 06 octubre de 2020

CARTA DE AUTORIZACIÓN

Carta de autorización de tesis por parte del autor para la consulta, reproducción total o parcial y publicación electrónica del texto completo

Yo, José Agustín Guachanamá Sánchez, declaro ser el autor de la tesis titulada “**Aislamiento e identificación morfológica de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) asociados al café en sistemas agroforestales en el sur del Ecuador**” como requisito para optar al grado de INGENIERO AGRÓNOMO, por lo que autorizo al sistema bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido en el Repositorio Digital Institucional.

Los usuarios pueden hacer uso de este trabajo investigativo en las redes de información del país (RID) y del exterior, con las que mantenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja no se responsabiliza por el plagio de dicha tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja a los 12 días del mes de octubre del 2020, firma el autor:

Firma:  JOSE AGUSTIN GUACHANAMA SANCHEZ
Firma digitalmente por JOSE AGUSTIN GUACHANAMA SANCHEZ
Fecha: 2020.10.12 09:20:00

Autor: José Agustín Guachanamá Sánchez

Cédula: 1105888836

Dirección: Loja, Menfis Central

Correo electrónico: jaguachanamas@unl.edu.ec

Celular: 0981475330

DATOS COMPLEMENTARIOS

Director de tesis: Dra. Narcisa de Jesús Urgiles Gómez, *PhD*

Tribunal de grado:

Dra. Marlene Molina Müller *PhD.* PRESIDENTE

Dra. Natalia Morales Palacio *PhD.* VOCAL

Dr. Jorge Armijos Rivera *PhD.* VOCAL

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios por permitirme llegar a cumplir una meta más en mi vida

A la Universidad Nacional de Loja por ser mi centro de formación, de manera especial un agradecimiento a la Dra. Narcisa de Jesús Urgiles Gómez *PhD*. Docente investigadora de la UNL, quien con su calidad humana y profesional ha brindado dirección y apoyo en el trabajo investigativo. De igual manera al Dr. Paúl Loján *PhD*. Docente investigador de la UTPL por compartir su conocimiento y colaboración en el desarrollo del presente trabajo.

A mi madre quien ha sido mi inspiración y mi apoyo para lograr mis metas.

A mis hermanos Cecilia, Ángel, Víctor y Luis, quienes han sido mi apoyo fundamental. De manera especial un agradecimiento a mi hermano Víctor quien ha estado pendiente de mí apoyándome en todo momento, infinitas gracias mi hermano.

José Agustín Guachanamá Sánchez

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a mi madre Digna Margarita Sánchez, a mis hermanos, por la confianza depositada en mis metas y por su apoyo incondicional.

De manera especial a mis hermanos Ángel y Víctor por enseñarme que el sacrificio tiene su recompensa y por todo el apoyo que han brindado durante este proceso de formación y ayudarme a cumplir esta meta.

José Agustín Guachanamá Sánchez

ÍNDICE GENERAL

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS	ii
CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iii
AUTORÍA	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
RESUMEN	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivos	3
Objetivo General	3
Objetivos específicos	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Sistemas agroforestales asociados con el café	4
2.2. Microorganismos simbióticos	4
2.3. Generalidades de las micorrizas	6
2.3.1. Tipos de hongos micorrízicos.....	6
2.3.2. Clasificación taxonómica de los hongos micorrízicos arbusculares.....	6
2.4. Estudios de caracterización morfológica y principales géneros de HMA en el cultivo de café	7
2.5. Multiplicación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y su aplicación.....	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1. Localización de las zonas de estudio	10
3.2. Metodología para el primer objetivo	11
3.2.1. Muestreo y establecimiento de cultivos trampa.	11
3.2.1.1. <i>Colecta de sustrato o inóculo de HMA</i>	11
3.2.1.2. <i>Multiplicación de inóculo y/o biofertilizante de HMA (Cultivos trampa)</i>	11
3.2.1.3. <i>Extracción de esporas.</i>	12
3.2.1.4. <i>Observación de HMA en raíces de Plantago lanceolata.</i>	13
3.3. Metodología para el segundo objetivo	13

3.3.1. Caracterización morfológica de morfotipos de HMA.	13
3.3.2. Establecimiento del consorcio de HMA (biofertilizante).	14
4. RESULTADOS	15
5. DISCUSIÓN	18
6. CONCLUSIONES	20
7. RECOMENDACIONES	21
8. BIBLIOGRAFÍA	22
9. ANEXOS	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de colonización de los HMA.....	5
Figura 2. Clasificación taxonómica de HMA del Phylum Glomeromycota.	7
Figura 3. Inoculación de HMA en el cultivo de café	9
Figura 4. Mapa de ubicación de las zonas de estudio.	10
Figura 5. Caracterización morfológica de HMA.	17

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aislamiento de morfotipos de HMA en 100 g de suelo.....	15
Tabla 2. Características morfológicas de morfotipos de HMA asociados al café.....	16

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Muestreo de suelo y raicillas en los sistemas agroforestales asociados al café.....	25
Anexo 2. Establecimiento de cultivos trampa. Laboratorio de Fisiología Vegetal. FARNR	25
Anexo 3. Tamizado de muestras de suelo procedentes de los sistemas agroforestales. Laboratorio de Fisiología Vegetal. FARNR.....	26
Anexo 4. Extracción e identificación de esporas de las muestras de suelo provenientes de los sistemas asociados al café. Laboratorio de Sanidad Vegetal. FARNR	26
Anexo 5. Identificación morfológica de morfotipos de HMA. Laboratorio de Sanidad Vegetal. FARNR	27
Anexo 6. Observación de HMA en raíces de <i>Plantago lanceolata</i> L. Laboratorio de Microbiología. UTPL	27

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (HMA) ASOCIADOS AL CAFÉ EN
SISTEMAS AGROFORESTALES EN EL SUR DEL ECUADOR**

RESUMEN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son de importancia en la rizósfera, puesto que, establecen simbiosis con aproximadamente el 80 % de las plantas. Dicha asociación coadyuva a una mejor absorción de agua y nutrientes, así como, a proteger al sistema radicular de las plantas. Los HMA se encuentran en todos los tipos de suelo, por lo cual, el presente estudio se enfocó en el aislamiento y caracterización morfológica de hongos micorrízicos arbusculares procedentes de sistemas agroforestales asociados al cultivo de café de las zonas de Malacatos, Chaguarpamba y Lozumbe, de la provincia de Loja. Para ello, se recolectaron muestras de suelo y raicillas de alrededor de las plantas de café bajo sistemas agroforestales y se procedió con el aislamiento, extracción de esporas y caracterización de los morfotipos principales de HMA. En la zona de Malacatos (Hacienda Cristal), se encontró del género *Glomus*, tres morfotipos y 284 esporas/100 g suelo, mientras que en las zonas de Chaguarpamba y Lozumbe se determinó del género *Acaulospora* un morfotipo y de *Glomus* tres morfotipos. Además, para Chaguarpamba y Lozumbe se encontraron 313 y 598 esporas/100 g de suelo. El número de morfotipos y esporas se relacionan con la diversidad florística que posee el cultivo del café dentro de los sistemas agroforestales.

Palabras clave: HMA (hongos micorrízicos arbusculares), aislamiento, morfotipos, sistemas agroforestales, café.

Abstract

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are of importance in the rhizosphere, since they establish symbiosis with approximately 80% of plants. This association contributes to a better absorption of water and nutrients, as well as to protect the root system of the plants. AMF are found in all types of soil, therefore, the present study focused on the isolation and morphological characterization of arbuscular mycorrhizal fungi from agroforestry systems associated with coffee cultivation in the Malacatos, Chaguarpamba and Lozumbe areas of the province of Loja. For this, soil and rootlet samples were collected from around the coffee plants under agroforestry systems and proceeded with the isolation, spore extraction and characterization of the main AMF morphotypes. In the Malacatos (Hacienda Cristal) area, three morphotypes and 284 spores / 100 g soil were found of the genus *Glomus*, while in the areas of Chaguarpamba and Lozumbe, one morphotype of the genus *Acaulospora* and three morphotypes of *Glomus* were determined. In addition, for Chaguarpamba and Lozumbe 313 and 598 spores / 100 g of soil were found. The number of morphotypes and spores are related to the floristic diversity of coffee cultivation within agroforestry systems.

Key words: AMF (arbuscular mycorrhizal fungi), isolation, morphotypes, agroforestry systems, coffee.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de café representa un rubro importante para la economía del Ecuador. De acuerdo al MAG (2019) en el año 2018 el cultivo de café y sus derivados generaron aproximadamente 77 millones de dólares. El área dedicada a este cultivo oscila en alrededor de las 60000 ha, involucrando en el proceso aproximadamente 40000 familias. Tradicionalmente, el café se ha cultivado en sistemas agroforestales, sistemas que ofrecen condiciones adecuadas para conservar la biodiversidad y demás servicios del ecosistema (Jezeer y Verweij, 2015). Asegurando de esta manera la sostenibilidad del cultivo. A pesar de su importancia para el buen funcionamiento de los servicios ecosistémicos, no hay un gran conocimiento de las relaciones interespecíficas que se dan en estos sistemas agroforestales. Entre estas interrelaciones, destacan las que se dan en la rizósfera, fomentando el desarrollo radicular de la planta y una mayor productividad. En este contexto, los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son parte fundamental de la rizósfera, ya que tienen una relación mutualista con las raíces de muchas plantas, y de hecho, se ha encontrado mayor cantidad de esporas de HMA en sistemas agroforestales comparado con los sistemas convencionales (Durazzini *et al.*, 2017). Por lo tanto, la asociación de HMA con las plantas se puede encontrar tanto en los ecosistemas naturales como en los agroecosistemas (Ruiz *et al.*, 2011).

La importancia de estudiar a los HMA radica en que se encuentran asociados con más del 80 % de las plantas, cumpliendo diversas funciones, entre las cuales destacan la de proteger al sistema radicular del ataque de fitopatógenos, mejorar la nutrición mineral y absorción de agua en la planta hospedera, principalmente cuando estos recursos son escasos en el suelo (Bertolini *et al.*, 2018). Ante la relevancia que representa el café, y puesto que se sabe que este cultivo es altamente micotrófico, es decir, que proporciona condiciones para la simbiosis con los HMA (Sieverding, 1991). Es importante conocer y caracterizar morfológicamente los HMA que se encuentran en el cultivo del café asociado a sistemas

agroforestales, para conocer su diversidad biológica, así como también determinar las principales comunidades.

Es importante precisar que en Ecuador, y particularmente en la provincia de Loja, no existen estudios de la descripción de los HMA a través de caracterización morfológica en sistemas agroforestales asociados al café. Por lo tanto, en este aspecto, radica la importancia del presente trabajo, el mismo que se enfoca en realizar el aislamiento e identificación morfológica de morfotipos de HMA asociados al café en sistemas agroforestales del sur del Ecuador.

Para dicho propósito, en apartados posteriores, se abordan contenidos como: generalidades de las micorrizas, clasificación taxonómica, principales géneros asociados al café, multiplicación y aplicación de los HMA.

Este estudio es parte del macro proyecto de investigación de la Universidad Nacional de Loja “Aislamiento y caracterización de microorganismos benéficos de los sistemas agroforestales de cafetales en la región sur del Ecuador”, el cual está enfocado en la producción de biofertilizantes con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) y hongos micorrízicos arbusculares (HMA) para la aplicación en cafetales y en sistemas agroforestales que se establezcan en la región sur del Ecuador.

Los resultados de la investigación dan respuesta a la pregunta general de investigación ¿Qué géneros de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) predominan en los sistemas agroforestales de café en el sur del Ecuador?, y a las preguntas específicas ¿Cuáles son las principales características que presentan los aislados de HMA procedentes de los sistemas agroforestales? ¿Cuáles son las características morfológicas de los HMA procedentes de los sistemas agroforestales?

Finalmente, el trabajo aporta con parámetros morfológicos de los principales géneros de HMA en los sistemas agroforestales en el sur del Ecuador. Lo que permitirá en investigaciones futuras realizar la caracterización molecular, multiplicación o propagación y utilización de los HMA para el cultivo objeto de estudio.

1.1. Objetivos

Objetivo General

Identificar géneros de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) procedentes de sistemas agroforestales de café en el sur del Ecuador.

Objetivos específicos

Aislar hongos micorrízicos arbusculares asociados a sistemas agroforestales de café para establecer cultivos trampa.

Caracterizar morfológicamente hongos micorrízicos arbusculares asociados al café para describir los principales géneros.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Sistemas agroforestales asociados con el café

Tradicionalmente el café se ha cultivado en asociación con especies arbóreas, lo que se conoce como sistemas agroforestales, asociación que brinda condiciones adecuadas para conservar la biodiversidad (Bhagwat *et al.*, 2008). Por su parte, Farf y Baute (2009) señalan que los sistemas agroforestales ayudan a mejorar la fertilidad del suelo, proteger los cultivos de plagas y de condiciones climáticas adversas, así como facilitar el manejo. El cultivo de café generalmente se encuentra en asociación con leguminosas como guaba o faique, banano, árboles maderables y vegetación propia de la zona (INIAP, 2010).

2.2. Microorganismos simbióticos

En el suelo existe diversidad de microorganismos que pueden influir de manera positiva en el crecimiento y desarrollo de las plantas. De las múltiples interrelaciones que existen en el suelo, dentro de las que representan importancia económica, se encuentra la simbiosis que establecen las raíces de las plantas con los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), tanto en los ecosistemas agrícolas como naturales; siendo esta asociación simbiótica beneficiosa para llevar a efecto una agricultura sustentable (Mujica, 2012). En el cultivo de café, el efecto de la simbiosis se evidencia en el crecimiento de la planta e incremento del área foliar, puesto que los HMA colonizan en primera instancia las raíces de la planta hospedera, y posteriormente, el suelo circundante a través de sus estructuras llamadas hifas (Jansa *et al.*, 2013).

Las hifas de los HMA se desarrollan y forman el micelio, el cual, coloniza los tejidos de la raíz y las células corticales, donde los HMA forman ramificaciones intracelulares llamadas arbusculos, que llevan a cabo el intercambio de metabolitos entre el hongo y la planta (Molina *et al.*, 2005). Las hifas crecen desde la raíz hacia el suelo hasta 7 cm de la zona de crecimiento radical de la planta, incrementando el volumen de suelo de donde las plantas normalmente absorben los nutrientes y agua (Figura 1) (Peterson *et al.*, 2004).

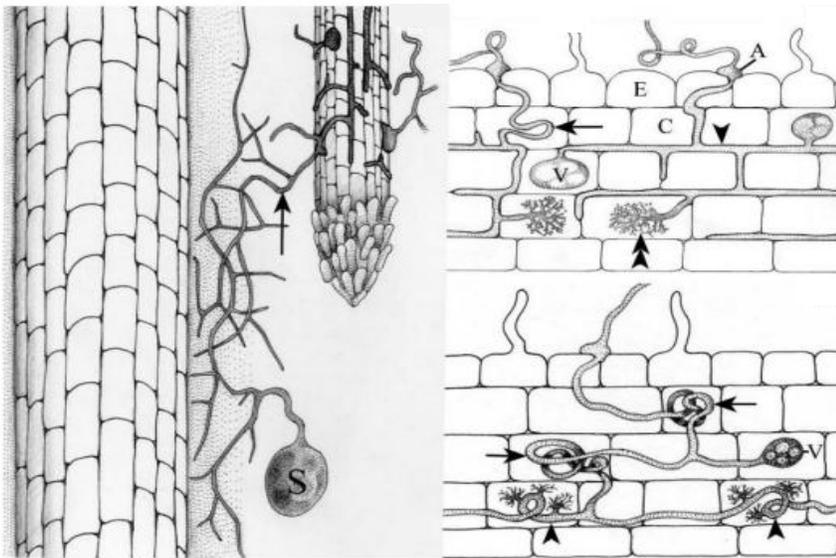


Figura 1. Proceso de colonización de los HMA (Peterson *et al.*, 2004).

Los HMA provocan cambios en la morfología de la raíz; ramificación y elongación, que construyen un mecanismo adicional para la absorción de elementos poco móviles como el fósforo, zinc, azufre, calcio, molibdeno y boro. La transferencia de fósforo inorgánico entre los HMA y la raíz huésped se produce en tres etapas: transporte activo dentro del hongo y el exterior de la raíz, transporte pasivo del hongo en la interfase raíz-hongo y transporte activo dentro de la raíz, esto se debe fundamentalmente a una aceleración de la disociación del fosfato insoluble (Velasco y Zambrano, 2000).

2.3. Generalidades de las micorrizas

Los hongos micorrízicos arbusculares son de distribución cosmopolita, y se encuentran formando simbiosis, aproximadamente, con 80 al 90 % de las plantas, sean herbáceas o leñosas. Además, ayudan a la absorción de agua y nutrientes, así como a incrementar la resistencia al estrés hídrico y salinidad (Van der Heijden *et al.*, 1998). Por lo tanto, existe una estrecha relación entre la comunidad de plantas y los HMA, ocasionando dependencia entre ambas comunidades para un desarrollo óptimo (Martínez y Pugnaire, 2009).

2.3.1. Tipos de hongos micorrízicos.

Existen varios tipos de hongos micorrízicos, los mismos que pueden ser: ectomicorrízicos, que se caracterizan por su penetración intercelular del micelio fúngico en la corteza radicular, produciendo la red de Hartig, que consiste en un manto fúngico alrededor de la raíz colonizada; los ecto-endomicorrízicos, de manera general, son ectomicorrizas que presentan penetración intracelular y existen diferencias anatómicas en función de la planta hospedera, diferenciando los subgrupos de las Pinaceae y de las Ericales (Torres-Arias *et al.*, 2002). Los hongos endomicorrízicos u hongos micorrízicos arbusculares son los más abundantes, se caracterizan por formar hifas en forma de arbusculos, de ahí su nombre de micorrizas arbusculares, además, presentan hifas que penetran en las células de las raíces forman estructuras de almacenamiento llamadas vesículas, que cumplen con la función de almacenadoras de lípidos (Martínez y Pugnaire, 2009).

2.3.2. Clasificación taxonómica de los hongos micorrízicos arbusculares.

Según Stürmer *et al.* (2013) los HMA pertenecen al Phylum *Glomeromycota* y son considerados como los eucariotas más antiguos dentro de su categoría. De acuerdo a la clasificación taxonómica, basada en características morfológicas y moleculares, los HMA

se distribuyen en 11 familias, dentro de las cuales abarcan 29 géneros, cuyas relaciones filogenéticas se representan en la Figura 2 (Redecker *et al.*, 2013).

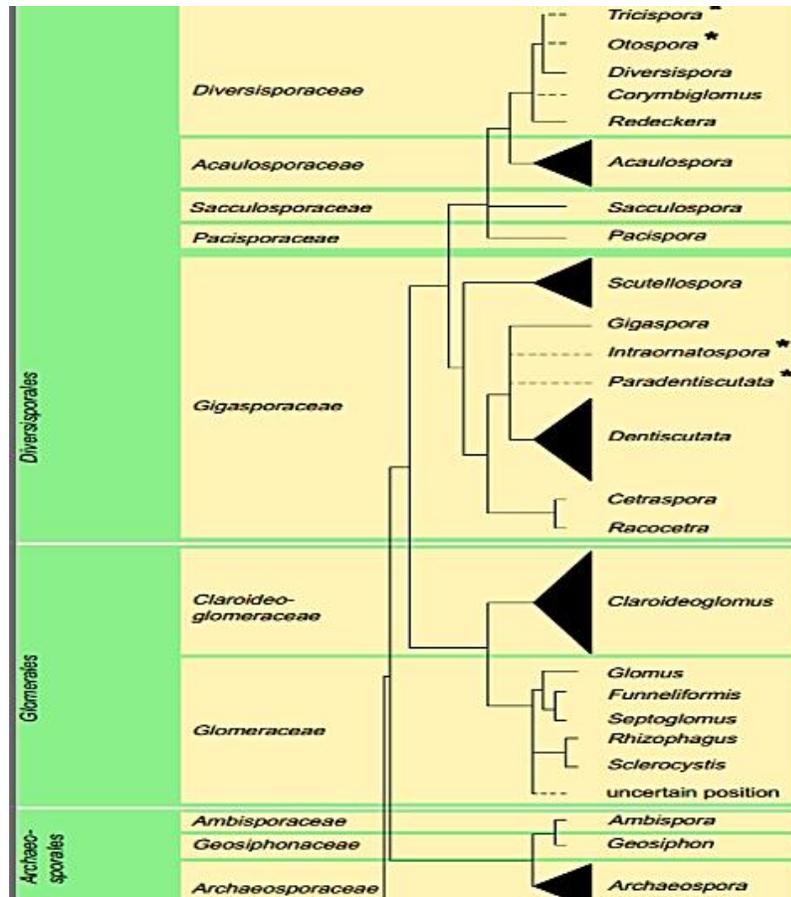


Figura 2. Clasificación taxonómica de HMA del Phylum Glomeromycota (Redecker *et al.*, 2013).

2.4. Estudios de caracterización morfológica y principales géneros de HMA en el cultivo de café

Estudios registran en México especies de HMA, tales como, *Diversispora trimurales*, *Gigaspora candiday* y *Glomus corymbiforme*, los mismos que fueron aislados de muestras de suelo (Sánchez *et al.*, 2016). Mientras que, el estudio realizado por Medina *et al.* (2010) en la identificación de morfotipos de HMA, señala que se han encontrado los géneros

Glomus, *Acaulospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*; el género *Glomus*, presentó 21 morfotipos, seguido del género *Acaulospora* con cinco morfotipos.

Según Bolaños *et al.* (2000) en los sistemas agroforestales de café se ha identificado la presencia de los géneros *Acaulospora* y *Glomus*, con valores más altos en cuanto a porcentaje de colonización y densidad de esporas por g de suelo. Por su parte, Bertolini *et al.* (2018) reportan en los cafetales la presencia de 20 morfotipos de HMA, que pertenecen a los géneros: *Acaulospora*, *Glomus*, *Gigaspora* y *Sclerocystis*, siendo los géneros dominantes *Acaulospora* con la presencia de diez morfotipos, y *Glomus* con siete morfotipos.

2.5. Multiplicación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y su aplicación

Los géneros de HMA, tales como *Gigaspora* o *Scutellospora*, necesitan una prolongada fase de colonización radical para alcanzar la fase de esporulación, mientras que, el género *Glomus* en la mayoría de sus especies no requiere de esporulación para realizar la colonización de nuevas raíces, por tal motivo, su colonización se da en mayor cantidad, la misma que puede ser iniciada por hifas, micelios o fragmentos de raíces en el suelo. Por ello, los HMA tienen un alto potencial para ser utilizados como biofertilizantes, en una producción amigable con el ambiente (Medina *et al.*, 2010).

En Perú, se ha estudiado la inoculación de consorcios micorrízicos arbusculares en *Coffea arabica* variedad Caturra, en la Región San Martín. De esta inoculación, se evidenció que las plantas superaron al testigo en un promedio de 10,65 % en altura de planta, área foliar entre 77,45 y 239,31 %, y biomasa radicular entre 77,16 y 203,22 % (Figura 3.) (Del Águila *et al.*, 2018).



Figura 3. Inoculación de HMA en el cultivo de café (Del Águila *et al.*, 2018).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio es de tipo exploratorio descriptivo, permitiendo mediante el aislamiento, obtener información de la diversidad de HMA en los sistemas agroforestales asociados al café en el sur del Ecuador, realizando la caracterización morfológica de acuerdo a su color, forma y tamaño.

3.1. Localización de las zonas de estudio

Los muestreos se llevaron a efecto en tres zonas de la provincia de Loja: Malacatos Chaguarpamba y Lozumbe (Figura 4). La Hacienda Cristal está ubicada en el barrio Tres Leguas, parroquia Malacatos del cantón Loja, a 2049 m.s.n.m donde se cultiva la variedad Caturra. En el cantón Chaguarpamba, barrio Chaguarpamba, la finca se encuentra a 1471 m.s.n.m, donde se cultiva la variedad Geisha. En el barrio Lozumbe, parroquia Santa Rufina del cantón Chaguarpamba, la finca se encuentra a 843 m.s.n.m, y se cultiva la variedad Caturra.



Figura 4. Mapa de ubicación de las zonas de estudio.

3.2. Metodología para el primer objetivo

Aislar hongos micorrízicos arbusculares asociados a sistemas agroforestales de café para establecer cultivos trampa.

3.2.1. Muestreo y establecimiento de cultivos trampa.

3.2.1.1. Colecta de sustrato o inóculo de HMA. Dentro de cada zona de muestreo, se recolectaron tres muestras representativas de suelo y raicillas de alrededor de la planta de café, a una profundidad entre 15 y 30 cm. Aproximadamente, se colectaron 2 kg de suelo por planta, muestreando en total tres plantas por zona de estudio. Dichas muestras se mezclaron homogéneamente para obtener una muestra representativa. El procedimiento de muestreo fue el mismo en todas las zonas de estudio (Anexo 1).

3.2.1.2. Multiplicación de inóculo y/o biofertilizante de HMA (Cultivos trampa). Para la multiplicación de inóculo de HMA, debido a su rápido crecimiento y por la ramificación de su raíz, se utilizó *Plantago lanceolata* L. (Llantén menor o siete venas) como planta hospedera (semillas obtenidas en la quinta experimental docente la Argelia de la Universidad Nacional de Loja). Se inocularon tres plántulas por maceta con 100 g de sustrato proveniente de cada zona de estudio de sistemas agroforestales, y 900 g de sustrato esterilizado en carretilla esterilizadora a 100 °C durante 4 horas (arena de mina y tierra agrícola 1:1). Cada maceta se mantuvo en fundas plásticas con filtro llamadas “Sunbags” (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), las cuales, permanecieron cerradas para evitar la contaminación de esporas de otros hongos, sean estos patógenos o simbióticos.

La siembra de los cultivos trampa se dejó crecer por un periodo de 4 a 5 meses a temperatura ambiente, en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad

Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de UNL. El riego se realizó cada 8 días con agua destilada. Se establecieron 20 réplicas por cada zona de estudio, con un total de 60 macetas de cultivos trampa, considerando las tres zonas de estudio (Anexo 2).

3.2.1.3. Extracción de esporas. Se realizó la extracción de las esporas utilizando la metodología de Gerdemann y Nicholson (1963) que consiste en:

A partir de las muestras representativas de las zonas de estudio, se pesó 100 g de suelo de cada zona. La muestra de suelo se colocó en un vaso precipitado y se agregó agua destilada en una cantidad mayor a la muestra de suelo, de tal manera que el suelo quede en suspensión. Se mezcló y agitó el suelo por varios minutos, hasta lograr disolver por completo la parte sólida. Se filtró la mezcla en tamices de 125 y 38 micras en orden de mayor a menor. Se recogió el contenido de cada tamiz, y se colocó en tubos Eppendorf (1,5 ml de volumen) con una solución de sacarosa al 70 %. Luego, los mismos fueron colocados en una centrífuga a 1500 revoluciones por minuto (rpm) durante 3 minutos (Anexo 3).

Se dejó reposar por varios minutos. Acto seguido, se tomó el sobrenadante de los tubos y se colocó en el tamiz de (38 μm), se enjuagó con agua destilada y se almacenó en tubos Eppendorf con alcohol al 70 % para conservar las esporas. La parte restante del suelo centrifugado de los tubos también se tamizó en el tamiz de 38 μm , y se enjuagó varias veces con agua destilada para almacenar en tubos Eppendorf con alcohol. Luego, se colocó el contenido de los tubos en cajas Petri, y posteriormente, mediante un Estereoscopio, se extrajeron las esporas usando una pipeta Pasteur de vidrio, se contabilizaron y se almacenaron en los tubos Eppendorf para su clasificación, según los morfotipos (Anexo 4).

3.2.1.4. Observación de HMA en raíces de Plantago lanceolata. Para el aclareo de las muestras de raíces, se sumergieron en Hidróxido de Potasio (KOH 10 %) a baño maría a 60 °C por una hora, luego se enjuagaron, y seguidamente, se sumergieron por dos minutos en ácido clorhídrico (HCl 10 %), donde las raíces adquirieron un color blanco. Luego, se desechó la solución química, logrando que las raíces queden sin fenoles para la tinción. Las raíces se tiñeron con una solución compuesta por azul de metileno al 0,05 %, diluido en Ácido Láctico al 90 %, a baño maría a 60 °C por una hora. Posteriormente, se colocaron en un portaobjetos 5 segmentos de raíces de aproximadamente 1 cm, bien extendidos, a los que se adicionaron unas gotas de Ácido Láctico (90 %). Acto seguido, se cubrió la muestra con el cubreobjetos, dejando listo el montaje para realizar la observación de las estructuras de los HMA como: arbusculos, apresorios, hifas intercelulares e intracelulares (Anexo 6).

3.3. Metodología para el segundo objetivo

Caracterizar morfológicamente hongos micorrízicos arbusculares asociados al café para describir los principales géneros.

3.3.1. Caracterización morfológica de morfotipos de HMA.

Para los montajes de las esporas, de cada zona, en un portaobjetos se colocaron 5 esporas, y se agregó una gota de Reactivo de Melzer (tinción que sirve para dar color a las esporas y facilitar la observación de sus características principales) y una gota de Polivinil Lacto-Glicerol (PVLG), y se llevaron las placas al microscopio para la respectiva observación con el lente de 40x, con lo cual, se logró realizar la identificación morfológica basada en criterios morfológicos de las esporas como: el tamaño, la ornamentación de la hifa de sostén, el color presentado al observar en el microscopio, la forma de la espora, la

coloración de las capas y de las láminas de la espora al reaccionar con el reactivo de Melzer. Los resultados se contrastaron utilizando las claves de International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Endomycorrhizal Fungi (2018) y las descripciones originales de Glomeromycota de la página web AMF PHYLOGENY (<http://www.amf-phylogeny.Com/index.html>) (Anexo 5).

3.3.2. Establecimiento del consorcio de HMA (biofertilizante).

Con la finalidad de multiplicar y dejar en la Universidad Nacional de Loja un consorcio de HMA, se dispuso de plantas cultivadas de *Plantago lanceolata* L. (Llantén menor o siete venas). Dichas plantas hospederas albergarán propágulos de HMA como: esporas, micelio intracelular e intercelular, hifas en suspensión en el sustrato o suelo. Una vez realizada la identificación de las esporas o morfotipos de HMA de los consorcios provenientes de las tres zonas de estudio de sistemas agroforestales asociados al café, se podrán realizar cultivos monospóricos de los morfotipos ya caracterizados morfológicamente, con la finalidad de conocer la cantidad de biofertilizante que se requiere en los diferentes cultivos establecidos en sistemas agroforestales. Se dejan disponibles los morfotipos para investigaciones futuras, en lo relacionado a la clasificación molecular de los HMA.

4. RESULTADOS

4.1. Aislamiento de hongos micorrízicos arbusculares de sistemas agroforestales de café

En la Tabla 1, se muestran los morfotipos principales de HMA, aislados a partir de las muestras de suelo procedentes de sistemas agroforestales asociados al café. En la zona de Malacatos (Hacienda Cristal) se encontraron tres morfotipos, y un total de 284 esporas/100 g suelo. Mientras que, en las zonas de Chaguarpamba y Lozumbe, se identificaron cuatro morfotipos, con un total de 313 y 598 esporas/100 g de suelo en cada lugar, respectivamente.

Tabla 1. Aislamiento de morfotipos de HMA en 100 g de suelo de sistemas agroforestales de café.

Zonas de estudio	Morfotipos	Número de esporas	Esporas totales
Malacatos	Morfotipo 1	96	284
	Morfotipo 2	107	
	Morfotipo 3	81	
Chaguarpamba	Morfotipo 4	70	313
	Morfotipo 5	123	
	Morfotipo 6	72	
	Morfotipo 7	48	
Lozumbe	Morfotipo 8	135	598
	Morfotipo 9	263	
	Morfotipo 10	115	
	Morfotipo 11	85	

4.2. Caracterización morfológica de morfotipos de HMA

En la Tabla 2, se muestran las características morfológicas de los HMA, aislados de las muestras de suelo procedentes de sistemas agroforestales asociados al café. De acuerdo a la caracterización, se identificaron tres morfotipos del género *Glomus* en la zona de Malacatos (Hacienda Cristal). En tanto que, en las zonas de Chaguarpamba y Lozumbe, se identificó un morfotipo del género *Acaulospora* y tres morfotipos del género *Glomus*.

Tabla 2. Características morfológicas de morfotipos de HMA asociados al café.

Zonas de Estudio	Altitud m.s.n.m	Morfotipos	Color	Forma	Diámetro (µm)	N° de Capas	Reactivo de Melzer	Género
Malacatos	2049	Morfotipo 1	Marrón oscuro	Globosa	205,04	2	Positivo	<i>Glomus</i> sp1.
		Morfotipo 2	Amarillo naranja	Subglobosa	93,086	3	Negativo	<i>Glomus</i> sp2.
		Morfotipo 3	Marrón oscuro	Subglobosa	106,996	1	Positivo	<i>Glomus</i> sp3.
Chaguarpamba	1471	Morfotipo 4	Amarillo a café oscuro	Globosa	154,629	3	Negativo	<i>Acaulospora</i> sp1.
		Morfotipo 5	Marrón oscuro	Globosa	119,654	2	Positivo	<i>Glomus</i> sp4.
		Morfotipo 6	Café oscuro	Subglobosa	67,082	3	Negativo	<i>Glomus</i> sp5.
		Morfotipo 7	Café oscuro-naranja	Subglobosa	127,07	1	Positivo	<i>Glomus</i> sp6.
Lozumbe		Morfotipo 8	Amarillo a naranja	Subglobosa	138,819	2	Negativo	<i>Acaulospora</i> sp2.
		Morfotipo 9	Marrón oscuro	Globosa	90,176	3	Positivo	<i>Glomus</i> sp7.
		Morfotipo 10	Rojo oscuro	Subglobosa	177,135	1	Positivo	<i>Glomus</i> sp8.
		Morfotipo 11	Café oscuro-amarillo	Globosa	159,308	3	Positivo	<i>Glomus</i> sp9.

4.3. Principales géneros de HMA procedentes de sistemas agroforestales asociados al café

En la Figura 5, se presentan los morfotipos caracterizados morfológicamente de sistemas agroforestales asociados al café Malacatos, Chaguarpamba y Lozumbe, pertenecientes a los géneros *Glomus* y *Acaulospora*. En lo referente al género *Glomus* se identificaron tres morfotipos en cada una de las zonas de estudio. En cuanto al género *Acaulospora* se identificó un morfotipo, tanto en la zona de Chaguarpamba como en Lozumbe. Todos los morfotipos presentaron variación en cuanto a color, forma y tamaño.

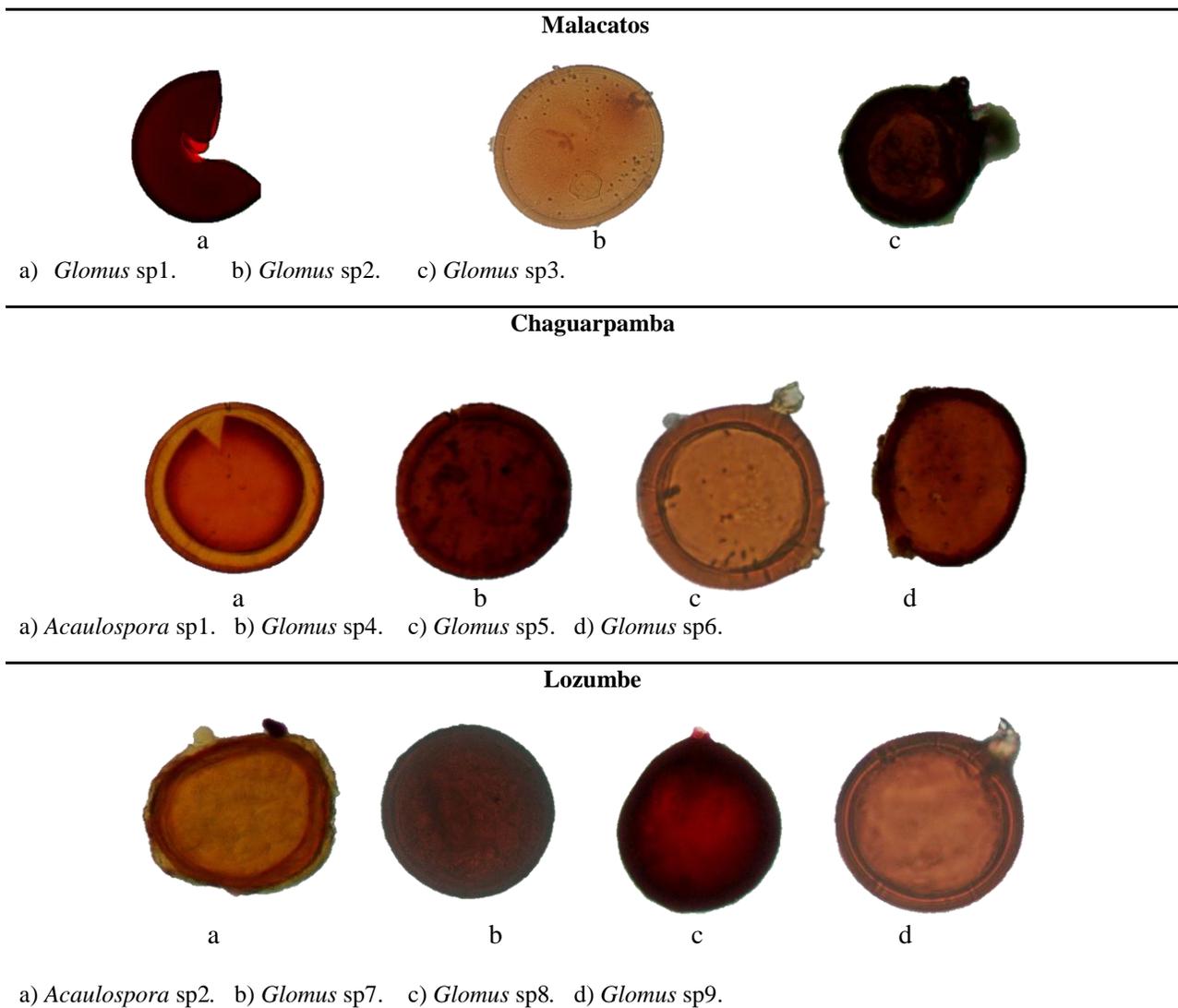


Figura 5. Caracterización morfológica de HMA.

5. DISCUSIÓN

En las zonas de estudio, las condiciones climáticas, la asociación con especies vegetales y el manejo agronómico difieren en cada sistema agroforestal asociado al café. En Lozumbe, está asociado con mayor diversidad de especies, tales como banano (*Musa paradisiaca* L), Guaba (*Inga edulis* Mart), Naranja (*Citrus x sinensis* L.), Porotillo (*Erythrina velutina* Willd), Fernán Sánchez (*Triplaris cumingiana* Fisher y Meyer), vegetación herbácea y arbustiva. Mientras que, en Chaguarpamba, está asociado con banano (*Musa paradisiaca* L). Guayabo (*Psidium guajava* L) y Pico-Pico (*Acnistus arborescens* L). Finalmente, en Malacatos, está asociado con Aliso (*Alnus acuminata* Kunth) y vegetación herbácea. Trejo *et al.* (2011) señalan que las comunidades de HMA pueden experimentar variación, debido a efectos estacionales, la dinámica de esporulación entre las especies y el manejo agronómico en los ecosistemas y agroecosistemas, teniendo influencia directa en las poblaciones de HMA. Esto puede explicar la presencia del género *Acaulospora* en las zonas de Chaguarpamba y Lozumbe, lugares que presentan vegetación asociada a los cultivos de café con hábitos de crecimiento similares. A su vez, la diversidad de morfotipos y el número de esporas registrado en cada zona, puede guardar estrecha relación con la diversidad vegetal asociada al cultivo de café.

Existen interacciones complejas entre los HMA y las plantas, pero la abundancia de los HMA depende de factores como: plantas hospederas predominantes en la zona, el nivel de esporulación de las especies de HMA y las condiciones edáficas (Smith y Read, 2008). Según Ivette- Noboa *et al.* (2018) en un estudio de los HMA en especies del bosque seco tropical del litoral ecuatoriano, los porcentajes de micorrización encontrados en plantas de Fernán Sánchez fueron de 71.7%, siendo alto el nivel de esporulación. En Lozumbe, zona de estudio de la presente investigación, se registró el mayor número de esporas, lo que coincide con la presencia *Triplaris cumingiana* (Fernán Sánchez) en dicha zona, por lo tanto, se podría decir que esta especie vegetal puede potenciar la esporulación de HMA

asociados a cultivos de café.

Así también, la disponibilidad del fósforo y la acidez del suelo son elementos que regulan las comunidades de HMA en la rizósfera de los cafetales (De Beehouwer *et al.*, 2015). No se han registrado estas variables en el desarrollo del trabajo, no obstante, su estudio sería de importancia para determinar su influencia en las comunidades de HMA en los sistemas agroforestales.

En el presente estudio se realizó la caracterización morfológica de géneros predominantes en los tres sistemas agroforestales. Se logró identificar los géneros *Glomus* y *Acaulospora*, estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Bolaños *et al.* (2000). En el mismo, se evaluaron 28 sistemas cafetaleros, de los cuales se aislaron e identificaron 6 géneros y 20 especies de HMA. En dichos sistemas los géneros predominantes fueron *Acaulospora* y *Glomus*. Por su parte Bertolini (2018) en un estudio realizado en México, en sistemas agroforestales de café, se encontraron 20 morfotipos de HMA pertenecientes los géneros: *Acaulospora*, *Glomus*, *Gigaspora* y *Sclerocystis*, de los cuales, los géneros predominantes fueron *Acaulospora* con diez morfotipos y *Glomus* con siete morfotipos.

La dominancia del género *Glomus* se da en todos los tipos de suelo, debido a su capacidad de adaptación a diferentes condiciones edáficas. En la mayoría de las poblaciones nativas, se caracteriza por ser dominante, abarcando más de 100 especies de HMA (Medina *et al.*, 2010). Además, la prevalencia del género *Glomus* se da en todos los tipos de suelo, debido a la rapidez y facilidad con la que este género coloniza las raíces (Prieto-Benavides *et al.*, 2012). Por tal motivo la dominancia de este género también se evidenció en los sistemas agroforestales asociados al café, ya que, presentó un mayor número de morfotipos en las zonas objeto de estudio.

6. CONCLUSIONES

Del aislamiento de los hongos micorrízicos arbusculares en muestras de suelo de los sistemas agroforestales asociados al café, se evidenció variación en el número de esporas, esto debido al debido a que el tipo de manejo agronómico es diferente en cada sistema agroforestal y también por la composición florística diversa de cada zona.

De acuerdo a las características morfológicas de las esporas encontradas en los tres sistemas agroforestales asociados al café, se determinó la presencia de los géneros *Glomus* y *Acaulospora*. Sin embargo, para conocer la biodiversidad total de HMA se requiere el análisis molecular, ya que pudieron existir otros géneros en estado vegetativo.

El género *Glomus* está presente en las tres zonas de estudio, debido a que el mismo es de distribución cosmopolita.

7. RECOMENDACIONES

Continuar con la caracterización morfológica y molecular de las esporas de HMA de sistemas agroforestales asociados al café, con la finalidad de identificar nuevas especies.

Realizar cultivos trampa y aislamientos de las esporas de HMA para ser utilizados como biofertilizante que requiere el cultivo de café en los sistemas agroforestales.

Determinar el grado de colonización de los HMA de los cultivos trampa, del café y de especies forestales que conforman los sistemas agroforestales para que se puedan utilizar como fuentes de inóculos en biofertilizantes.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Bertolini, V., Montaña, N. M., Sánchez, E. C., Fregoso, L. V., Ruiz, J. G., y Vázquez, J. M. M. (2018). Abundancia y riqueza de hongos micorrizógenos arbusculares en cafetales de Soconusco, Chiapas, México. *Revista de Biología Tropical*, 66(1), 91–105. <https://doi.org/10.15517/rbt.v66i1.27946>
- Bhagwat, S. A., Willis, K. J., Birks, H. J., y Whittaker, R. J. (2008). Agroforestry: a refuge for tropical biodiversity? *Trends in ecology y evolution*, 23(5), 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.01.005>
- Bolaños, B., Rivillas, C., y Vásquez, S. (2000). Identificación de micorrizas arbusculares en suelos de la zona cafetera colombiana. *Cenicafé*. 51, 245 – 262.
- De Beenhouwer, M., Van Geel, M., Ceulemans, T., Muleta, D., Lievens, B., y Honnay, O. (2015). Changing soil characteristics alter the arbuscular mycorrhizal fungi communities of Arabica coffee (*Coffea arabica*) in Ethiopia across a management intensity gradient. *Soil Biology and Biochemistry*, 91, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.08.037>
- Del Águila, K. M., Vallejos-Torres, G., Arévalo, L. A., y Becerra, A. G. (2018). Inoculación de Consorcios Micorrícicos Arbusculares en *Coffea arabica*, Variedad Caturra en la Región San Martín. *Información Tecnológica*, 29(1), 137–146.
- Durazzini, A. M., Teixeira, M. A., y Adami, A. A. (2017). Quantificação de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em solo sob diferentes cultivos de cafeeiros. *Revista Agrogeoambiental*, 8(4), 83–91. <http://dx.doi.org/10.18406/2316-1817v8n42016923>
- Farf, F., y Baute-Balc, E. (2009). Efecto del arreglo espacial del café y del sombrío sobre la producción de café. *Cenicafé*, 60(4), 313–323.
- Gerdemann, J.W., Nicolson, T.H. (1963). Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting, *Transactions of the British. Mycological Society*, 46, 235-244.
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (2010). Programa nacional de cacao.

- Recuperado en: <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/2060/1/iniaplsbt151.pdf>. Consultado el: 11 de mayo de 2020.
- Ivette-Noboa, C., Naranjo Morán, J., y Milton Barcos-Aria. (2018). Presencia de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en especies representativas del bosque seco tropical del litoral ecuatoriano. *Bionatura*, 3(1), 524-526.
- Jansa, J., Bukovská, P., y Gryndler, M. (2013). Mycorrhizal hyphae as ecological niche for highly specialized hypersymbionts or just soil free-riders. *Plant Science*, 4(134): 1-8
- Jezeer, R. E., y Verweij, P.A. (2015). Café en sistema agroforestal - doble dividendo para la biodiversidad y los pequeños agricultores en Perú. *Hivos, The Hague, Holanda*, 1-60
- Martínez, L. B., y Pugnaire, F. I. (2009). Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos. *Ecosistemas*, 18(2), 44–54.
- Medina, L. R., Rodríguez, Y., Torres, Y., y Herrera, R. (2010). Aislamiento e identificación de hongos micorrízicos arbusculares nativos de la zona de las Caobas, Holguín. *Cultivos tropicales*, 31(3).
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2019). Festival de Café Cuatro Mundos Ecuador. Recuperado en: <https://www.agricultura.gob.ec/a-traves-del-festival-de-cafe-cuatro-mundos-ecuador-se-impulsa-la-caficultura/#>. Consultado el 13 de mayo de 2020.
- Molina, L. M., Mahecha Ledesma, L., y Medina, S. M. (2005). Importancia del manejo de hongos micorrizógenos en el establecimiento de árboles en sistemas silvopastoriles. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(2), 162–175.
- Mujica, Y. (2012). Inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) por dos vías diferentes en el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Tropicales*, 33(4), 71–76.
- Peterson, R. L., Massicotte, H. B., y Melville, L. H. (2004). Arbuscular mycorrhizas. *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. NRC-CNRC. *Research Press. Ottawa, Canada*, 3, 57-79.
- Prieto-Benavides, O. O., y Belezaca-Pinargote, C. E., Mora-Silva, W. F., Garcés-Fiallos, F. R., Sabando-Ávila, F. A., Cedeño-Loja, P. E. (2012). Identificación de hongos micorrízicos arbusculares en sistemas agroforestales con cacao en el trópico

- húmedo ecuatoriano. *Agronomía Mesoamericana*, 23(2),233-23.
- Redecker, D., Schüßler, A., Stockinger, H., Stürmer, S. L., Morton, J. B., y Walker, C. (2013). An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza*, 23(7), 515–531.
- Ruiz, P. O., Rojas, K. C., y Sieverding, E. (2011). La distribución geográfica de los hongos de micorriza arbuscular: una prioridad de investigación en la Amazonía peruana. *Espacio y desarrollo*, 23, 47–63.
- Sánchez, E., Montaña, N. M., Camargo-Ricalde, S. L., García-Sánchez, R., y Hernández - Cuevas, L. V. (2016). Nuevos registros de hongos micorrizógenos arbusculares para México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(1), 242–247. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.01.024>
- Sieverding, E. (1991). Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Eschborn Germany, GTZ.
- Smith, S. Read, D. (2008). Mycorrhizal Symbiosis. Tird edition. Academic Press.
- Stürmer, S. L., Stürmer, R., y Pasqualini, D. (2013). Taxonomic diversity and community structure of arbuscular mycorrhizal fungi (Phylum Glomeromycota) in three maritime sand dunes in Santa Catarina state, South Brazil. *Fungal Ecology*, 6(1), 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2012.10.001>
- Torres-Arias, Y., Rodríguez, R.O., y Herrera, R. (2002). Ecotecnologías para la rehabilitación de áreas afectadas por la minería en Moa. *Acta Botánica Cubana*. 165, 7-12.
- Trejo, D., Ferrera-Cerrato, R., García, R., Varela, L., Lara, L., y Alarcón, A. (2011). Effectiveness of native arbuscular mycorrhizal fungi consortia on coffee plants under greenhouse and field conditions. *Revista chilena de historia natural*, 84(1), 23-31.
- Van Der Heijden, M. G. A., Klironomos, J. N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Sanders, I. R. (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396(6706), 69–72. <https://doi.org/10.1038/23932>
- Velasco, A., Zambrano, J. (2000). Mejoramiento del Suelo por *Acacia mangium* en un sistema silvopastoril con *Brachiaria humidicola*. *CATIE*, 1- 15

9. ANEXOS

Anexo 1. Muestreo de suelo y raicillas en los sistemas agroforestales asociados al café.



Figura 1. Recolección de suelo y raicillas de Malacatos (Hacienda Cristal), Chaguarpamba y Lozumbe de la provincia de Loja

Anexo 2. Establecimiento de cultivos trampa. Laboratorio de Fisiología Vegetal.
FARNR



Figura 2. Establecimiento de cultivos trampa para HMA con sustrato proveniente de tres sistemas agroforestales de Malacatos, Chaguarpamba y Lozumbe de la provincia de Loja.

Anexo 3. Tamizado de muestras de suelo procedentes de los sistemas agroforestales.
Laboratorio de Fisiología Vegetal. FARNR



Figura 3. Preparación de muestras de suelo procedentes de sistemas agroforestales para extracción de esporas de HMA.

Anexo 4. Extracción e identificación de esporas de las muestras de suelo provenientes de los sistemas asociados al café. Laboratorio de Sanidad Vegetal. FARNR.

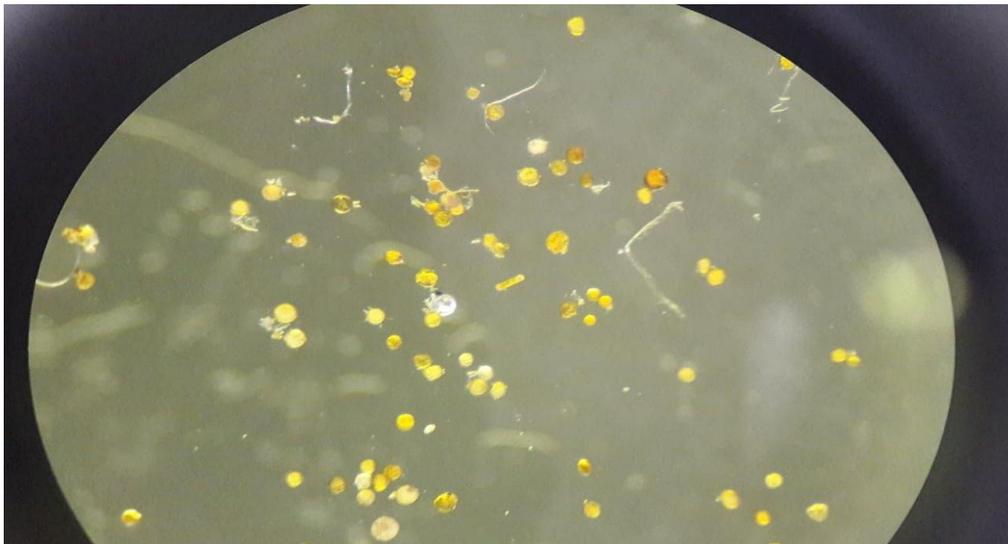


Figura 4. Observación y extracción de esporas de HMA en el estereoscopio.

Anexo 5. Identificación morfológica de morfotipos de HMA. Laboratorio de Sanidad Vegetal. FARNR.



Figura 5. Observación de los montajes de esporas e identificación de los géneros predominantes en los sistemas agroforestales asociados al café de la Malacatos, Chaguarpamba y Lozumbe de la provincia de Loja.

Anexo 6. Observación de HMA en raíces de *Plantago lanceolata* L. Laboratorio de Microbiología. UTPL



Figura 6. Proceso de tinción de raíces de *Plantago Lanceolata* L. para observar estructuras de HMA.