



UNIVERSIDAD  
CATÓLICA  
DE CUENCA

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA**

*Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo*

**UNIDAD ACADÉMICA CIENCIAS**

**AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE AGRONOMÍA**

**PRODUCCIÓN DE ESPORAS DE HONGOS  
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES UTILIZANDO UN  
MÉTODO DE PLANTAS TRAMPA MEDIANTE UN  
SISTEMA AEROPÓNICO**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO**

**AUTOR: BRYAN XAVIER QUEZADA FIGUEROA.**

**DIRECTOR: Blga. JAZMIN SALAZAR ORELLANA, Mgt.**

**CUENCA – ECUADOR**

**2024**

**DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA**

*Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo*

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS**

**AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE AGRONOMÍA**

**PRODUCCIÓN DE ESPORAS DE HONGOS**

**MICORRÍZICOS ARBUSCULARES UTILIZANDO UN**

**MÉTODO DE PLANTAS TRAMPA MEDIANTE UN**

**SISTEMA AEROPÓNICO**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL**

**TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO**

**AUTOR: BRYAN XAVIER QUEZADA FIGUEROA.**

**DIRECTOR: Blga. JAZMIN SALAZAR ORELLANA, Mgt.**

**CUENCA – ECUADOR**

**2024**

**DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO**

**Declaratoria de Autoría y Responsabilidad**

**Bryan Xavier Quezada Figueroa** portador de la cédula de ciudadanía N° **0107337743**. Declaro ser el autor de la obra: **“Producción de esporas de hongos micorrízicos arbusculares utilizando un método de plantas trampa mediante un sistema aeropónico”**, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, **05 de septiembre de 2024**



**Bryan Xavier Quezada Figueroa**  
C.I. **0107337743**

## CERTIFICACIÓN

Yo, Marjorie Jazmín Salazar Orellana con cédula de identidad N° 0703228841 en calidad de directora del Trabajo de titulación con el tema: **“Producción de esporas de hongos micorrízicos arbusculares utilizando un método de plantas trampa mediante un sistema de cultivo aeropónico”**, certifico que el presente trabajo fue desarrollado por, bajo mi supervisión



---

**Marjorie Jazmín Salazar Orellana**  
**DIRECTORA**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios por las oportunidades con las que nos bendijo.

A la Universidad Católica de Cuenca y a los docentes de la Facultad de Agronomía, por los valiosos conocimientos impartidos a lo largo de estos años por abrirme las puertas y darme la oportunidad de adquirir conocimientos en sus aulas.

A la Blga. Jazmín Salazar, tutora del trabajo de investigación, por su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable para llegar a mi meta.

También quiero expresar mi agradecimiento sincero a mis padres y amigos por brindarnos su apoyo incondicional y acompañamiento durante estos años de formación profesional en mis logros y mis fracasos, por sus sabios consejos que me pudieron dar en el momento ideal lo cual nos permitió valorar una verdadera amistad.

## **DEDICATORIA**

A Dios por darme la bendición de la vida y una madre ejemplar que me ha apoyado y lo seguirá haciendo.

A mi querida y amada madre; Lilia Figueroa quien me trajo al mundo guiándome por el camino correcto para lograr cumplir mis metas.

Con cariño a mi abuelita que me crio con amor y me brindaron su apoyo emocional para seguir adelante cumpliendo ese sueño de ser una profesional.

## CONTENIDO

Declaratoria de Autoría y Responsabilidad .....	III
CERTIFICACIÓN .....	IV
AGRADECIMIENTO .....	V
DEDICATORIA .....	VI
LISTA DE ILUSTRACIONES .....	9
RESUMEN .....	10
ABSTRACT.....	11
CAPÍTULO 1.....	12
<b>1.1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3 ANTECEDENTES .....</b>	<b>16</b>
<b>1.4 OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>1.4.1 Objetivo general.....</b>	<b>16</b>
<b>1.4.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>16</b>
<b>1.5 JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>17</b>
CAPÍTULO 2.....	18
<b>2.1 MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>18</b>
<b>1.5.1 Etapas de la simbiosis micorrízica. ....</b>	<b>20</b>
<b>1.5.2 Sistema aeropónico como una alternativa para la producción de HMA.....</b>	<b>21</b>
CAPÍTULO 3.....	22
<b>1.6 ZONA DE ESTUDIO.....</b>	<b>22</b>
<b>1.7 METODOLOGÍA .....</b>	<b>23</b>
<b>1.7.1 Análisis físico-químico del suelo.....</b>	<b>23</b>
<b>1.7.2 Procesamiento de las muestras para aislamiento de esporas de HMA.....</b>	<b>23</b>
<b>1.7.3 Conteo y extracción de esporas. ....</b>	<b>24</b>
<b>1.7.4 Protocolo de desinfección de las esporas. ....</b>	<b>24</b>
<b>1.7.5 Producción de esporas de HMA mediante biorreactores. ....</b>	<b>25</b>
<b>1.7.6 Siembra en Sistema Aeropónico.....</b>	<b>26</b>
<b>1.7.7 Protocolo de tinción de raíces. ....</b>	<b>27</b>
<b>1.7.8 Descripción de especies. ....</b>	<b>28</b>

<b>1.7.9 Protocolo para establecer el porcentaje de micorrización.....</b>	<b>28</b>
<b>1.7.10 Cálculo de raíces micorrizadas.....</b>	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>30</b>
<b>1.8 RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>1.8.1 Clasificación de morfotipos e identificación de esporas HMA           encontradas en suelos de cultivo de maíz.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1.1.1 Acaulospora colombiana. ....</b>	<b>30</b>
<b>Morfología.....</b>	<b>30</b>
<b>Hábitat.....</b>	<b>31</b>
<b>1.8.1.2 Gigaspora rosea.....</b>	<b>31</b>
<b>Morfología.....</b>	<b>31</b>
<b>Hábitat.....</b>	<b>32</b>
<b>1.8.1.3 Rhizophagus clarus.....</b>	<b>33</b>
<b>Morfología.....</b>	<b>33</b>
<b>Hábitat.....</b>	<b>34</b>
<b>1.8.1.4 Rhizophagus irregularis.....</b>	<b>34</b>
<b>Morfología.....</b>	<b>34</b>
<b>1.8.2 Tinción y conteo de raíces micorrizadas.....</b>	<b>35</b>
<b>CAPÍTULO 5.....</b>	<b>37</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO 6.....</b>	<b>40</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>41</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>48</b>
<b>AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO.....</b>	<b>56</b>

## LISTA DE ILUSTRACIONES

<b>FIGURA 1</b> MAPA DE UBICACIÓN DE LAS PARCELAS EN LOS SECTORES DE PINDAL, LA MANGA Y LA CABINA.....	22
<b>FIGURA 2</b> ZONA DE CULTIVO DE MAÍZ EN LOS CANTONES DE PINDAL Y ZAPOTILLO.....	23
<b>FIGURA 3</b> PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN DE ESPORAS DE HMA.....	25
<b>FIGURA 4</b> SISTEMA AEROPÓNICO PARA LA COLOCACIÓN DE PLANTAS TRAMPA.....	26
<b>FIGURA 5</b> INOCULACIÓN DE ESPORAS EN LAS RAÍCES DE LAS PLANTAS TRAMPAS .....	27
<b>FIGURA 6</b> PROTOCOLO DE TINCIÓN DE ESPORAS DE HMA Y RAÍCES .....	27
<b>FIGURA 7</b> PASOS PARA EL CONTEO DE ESPORAS .....	28
<b>FIGURA 8</b> CONTEO DE RAÍCES MICORRIZADAS .....	29
<b>FIGURA 9</b> SECUENCIA DE DIFERENCIACIÓN DE LAS ESPORAS .....	30
<b>FIGURA 10</b> CAPAS DE LA PARED DE LA ESPORA.....	32
<b>FIGURA 11</b> ESTRUCTURA SUBCELULAR DE LAS ESPORAS RHIZOPHAGUS CLARUS.....	33
<b>FIGURA 12</b> ESTRUCTURA SUBCELULAR DE LAS ESPORAS RHIZOPHAGUS IRREGULARIS ...	34

## LISTA DE TABLAS

TABLA 1PORCENTAJE DE INOCULACIÓN EN LAS PLANTAS TRAMPAS.....	34
--------------------------------------------------------------	----

## RESUMEN

El suelo está sujeto al uso agrícola intensivo que responde a la necesidad humana de cultivar para sobrevivir, se estima que el 40% de los suelos a nivel mundial están moderada o gravemente degradados, provocando la pérdida de nutrientes y alterando la microbiota. Está conformada por hongos micorrízicos arbusculares (HMA).

Basado en los beneficios de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y su capacidad de ser producidos en medios artificiales, en este estudio se elabora un protocolo de producción, para que fuera necesario obtener muestras de suelo destinados al cultivo de maíz en 6 parcelas de 10 m<sup>2</sup> ubicadas en los sectores La Manga, La Cabina y Pindal pertenecientes cantón Zapotillo y Pindal de la Provincia de Loja al sur del Ecuador y suelo rizosférico de 20 plantas escogidas al azar de cada uno de los sitios de estudio, donde se aislaron e identificaron esporas de 4 especies de HMA: *Rhizophagus irregularis*, *Rhizophagus clarus*, *Gigaspora rosea* y *Acaulospora colombiana*.

Identificadas las esporas de HMA, se extrajeron e inocularon 20 esporas en raíces de *Beta vulgaris L. var. Cicla L* (Acelga) como plantas trampa, las cuales fueron colocadas al sistema de biorreactor aeróbico, que permitió la nebulización de nutrientes requeridos por las esporas cada 3 minutos por un periodo de 1.10 minutos, transcurridos tres meses de inoculación, se colecto muestras de raíces para la tinción y contabilizar el porcentaje de micorrización que alcanzo un 41%. Se logro observar producción de esporas, y el proceso de inoculación de las raíces es un éxito.

**Palabras clave:** Producción, micorrizas, arbusculares, asilamiento, suelo, micorrización

## ABSTRACT

Soil is subject to intensive agricultural use because humans need to cultivate it for survival. Approximately 40% of soils worldwide are moderately or severely degraded, leading to nutrient loss and altering the microbiota, which is composed of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF).

This study develops a production protocol of AMF based on their benefits and ability to be produced in artificial media. It required obtaining soil samples intended for maize cultivation from 6 plots of 10 m<sup>2</sup> located in the sectors of La Manga, La Cabina, and Pindal, belonging to the Zapotillo and Pindal cantons in the Province of Loja in southern Ecuador, as well as rhizosphere soil from 20 randomly selected plants from each of the study sites, where spores of 4 species of AMF were isolated and identified: *Rhizophagus irregularis*, *Rhizophagus clarus*, *Gigaspora rosea*, and *Colombian Acaulospora*.

After identifying the AMF spores, 20 were extracted and inoculated onto the roots of *Beta vulgaris L. var. Cicla L* (Swiss chard) as trap plants. They were placed in an aeroponic bioreactor system that allowed for the nebulization of nutrients required by the spores every 3 minutes for 1.10 minutes. After three months of inoculation, root samples were collected for staining and counting the percentage of mycorrhization, which reached 41%. Spore production was observed, and the process of inoculating the roots was successful.

**Keywords:** Production, arbuscular mycorrhizae, isolation, soil, mycorrhization

## CAPÍTULO 1

### 1.1 INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrízicos son organismos que viven en relación simbiótica con las raíces de las plantas, lo que explica su nombre "Myces-rhiza" (hongo de la raíz). Fueron identificados por primera vez por el botánico polaco Franciszek Dionizy Kamienski en 1882. Inicialmente se pensaba que estaban solo presentes en algunas plantas, pero en el año 1900 se confirmó que la mayoría de las plantas pueden desarrollar esta simbiosis. Las micorrizas conforman parte del ecosistema del suelo, creando redes tróficas de microorganismos que favorecen al desarrollo y la nutrición de las plantas (Alba, 2020).

Las micorrizas influyen en varios niveles, causando modificaciones tanto morfológicas como anatómicas en las plantas que las hospedan. Estos cambios incluyen variaciones en la proporción tallo y raíz, alteraciones en los tejidos y estructura radicales, modificaciones en el número de cloroplastos, un incremento en la lignificación, y alteraciones en equilibrios hormonales, entre otros. Estos efectos no se deben únicamente a una mejora en la nutrición de la planta a través de una mayor eficiencia en la absorción de nutrientes por las raíces gracias a la micorriza. Más bien, son el resultado de cambios metabólicos profundos y complejos derivados de la adaptación fisiológica entre las plantas y hongos destacando la naturaleza multifacética de la asociación simbiótica (Dhiman , Sharma, Kaushik, Singh, & Sharma, 2022).

Los hongos micorrízicos forman una asociación en las raíces de las plantas. Esta relación es especial porque ambos organismos se benefician mutuamente, un tipo de interacción conocida como simbiosis. La planta obtiene nutrientes que el hongo extrae del suelo y le transfiere, mientras que el hongo recibe de la planta el carbono necesario para su crecimiento (Prisa, 2023).

Existen diferentes tipos de micorrizas. Por ejemplo, las que se desarrollan en árboles como cipreses, pinos y robles se conocen como ectomicorrizas. Otro grupo incluye las endomicorrizas, siendo las más comunes las endomicorrizas arbusculares. Este tipo de micorriza es especialmente relevante en la agricultura para cultivos como frutales, hortalizas, café, maíz, leguminosas, pastos, entre otros (Bolaños & Luna, 2007).

La formación de micorrizas requiere que haya un inóculo del hongo responsable de esta asociación, el cual puede ser natural, dado que el hongo suele estar presente en el suelo, o artificial, es decir, una persona lo inocula a las plantas. En el proceso, se producen diversos cambios bioquímicos entre el hongo y la raíz de la planta, lo que permite al hongo penetrar en la raíz y facilitar así el establecimiento de la simbiosis. El trabajo con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) es de gran utilidad por el efecto positivo que ofrecen a las plantas en diferentes ámbitos, por ejemplo, como biofertilizantes, favoreciendo su desarrollo, ya que benefician la captura de nutrientes, aumentan su supervivencia y producción. Además, ayudan a soportar ambientes hostiles, ya que en algunos casos pueden reducir las concentraciones tóxicas de los metales pesados como es el cadmio (Cd) y el arsénico (As) que suelen encontrarse en áreas contaminadas. Además, colaboran en la adaptación de las plantas al suelo, favoreciendo su reproducción (Bahukhandi, 2023).

Los hongos micorrízicos pertenecen al grupo *Glomeromycota* y su aparición se remonta a 400 millones de años. El término "arbuscular" se deriva de la presencia de estructuras llamadas arbusculos en estos hongos, las cuales son formaciones características creadas por las hifas. Cuando los HMA establecen relación simbiótica con las raíces de las plantas, aumentan considerablemente el área superficial gracias a la extensa formación de hifas. Este incremento facilita el desarrollo de las plantas en condiciones adversas, como el estrés causado por la sequía y la insuficiencia de nutrientes en el suelo (Urgiles Gómez, y otros, 2019).

El uso de micorrizas arbusculares (HMA) es viable en la agricultura debido a sus múltiples beneficios para las plantas. Las micorrizas son estructuras que se forman a partir de la unión en la raíz de una planta y el micelio de un hongo. Actúan como un sistema de absorción extendido por el suelo, ofreciendo a la planta agua y nutrientes, en particular nitrógeno y fósforo. Además, ayudan a proteger las raíces de ciertos patógenos del suelo como *Phytophthora cinnamomi*, *Thielaviopsis basicola*, *Rhizoctonia* spp., y *Cylindrocarpon destructans*, entre otros. En absoluto, las micorrizas se consideran órganos absorbentes, ya que las hifas fúngicas reemplazan a los pelos absorbentes de las raíces, siendo más eficaces en esta función (Lies, Delteil, Prin, & Duponnois, 2018).

Se estima que alrededor del 95% de las especies de plantas conocidas forman de manera natural y constante asociaciones simbióticas con hongos del suelo. La mayoría de las plantas vasculares pueden desarrollar micorrizas. En el entorno natural, el órgano encargado de absorber los nutrientes del suelo no es la raíz propiamente dicha, sino un sistema que se origina durante la conversión de la raíz en micorriza (Raji Mol, Karthika, Philip, & Chadrakala, 2024). Las micorrizas arbusculares (HMA) ayudan a mitigar los efectos negativos de factores abióticos como el estrés biótico causado por varios patógenos. No obstante, en los sistemas de cultivo modernos, se utilizan fungicidas para gestionar o erradicar los patógenos fúngicos que afectan a las plantas (Vu, Blumwald, & Gelli, 2021).

No obstante, estos productos también pueden impactar la supervivencia de microorganismos locales, incluyendo aquellos que son beneficiosos para el crecimiento de las plantas, como los hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Por ello, el uso de fungicidas en sistemas agrícolas puede perjudicar los efectos positivos de la micorrización en el incremento y desarrollo de las plantas hospedantes. Los fungicidas sistémicos, que son absorbidos por las raíces y transportados a otras partes de la planta cuando se aplican al suelo, son sustancias persistentes. Sus efectos sobre puede ser perjudiciales sobre los hongos micorrízicos, ya que están formulados para eliminar las quitinas fúngicas, así como proteínas y enzimas específicas que producen estos hongos. Esto puede dificultar o retrasar la formación de la simbiosis entre los hongos y las plantas, lo que a su vez disminuye los beneficios que las (HMA) ofrecen a las plantas, como la absorción de fósforo, entre otros (Arocha-Rodríguez, Pérez-Ortega, Fernández-Suárez, & Rodríguez-Yong, 2023).

Los hongos micorrízicos arbusculares ofrecen ventajas a las plantas al aportar nutrientes que encarga de suministrar a la planta agua y nutrientes tales como Fósforo (P), Potasio (K), Calcio (Ca), Hierro (Fe), Zinc (Zn), Magnesio (Mg) y Manganeso (Mn), impidiendo la actividad de microorganismos patógenos en las raíces, aumentando la tolerancia de las plantas a condiciones de estrés abiótico en el suelo (González Ramírez & Pupo Feria, 2017).

Las micorrizas representan una opción viable para la biofertilización de cultivos. La sostenibilidad a largo plazo en la agricultura requiere promover el uso y la gestión eficiente de los recursos disponibles dentro de los agroecosistemas. Es fundamental

introducir bioinsumos basados en micorrizas arbusculares (HMA), ya que las prácticas agroecológicas de fertilización son esenciales para sistemas sostenibles. Estas prácticas ofrecen una alternativa económica y aceptable para reducir la dependencia de insumos externos, al mismo tiempo que optimizan la cantidad y calidad de los recursos internos de los cultivos. La utilización de micorrizas es fundamental para alcanzar procesos agrícolas más eficientes y con un menor impacto ambiental, convirtiéndose en una opción ecológica comparable a la aeroponía (González Ramírez & Pupo Feria, 2017) y (Akbar, y otros, 2023)

La aeroponía es una variante de los sistemas de producción hidropónicos y es una alternativa con gran potencial en términos de rendimiento, ahorro de agua, y calidad de producción. Además, gracias al sistema aeropónico se puede producir hortalizas durante todo el año, manteniendo un suministro estable de productos y creando recursos económicos para los productores (Torres, 2016).

## **1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Debido a la demanda en los mercados y a la necesidad humana de trabajar para vivir, ha generado que los suelos reciban sobre explotación agrícola, una de las zonas que sufren de este fenómeno de siembra continua está ubicada al sur del país, uso inadecuado de productos químicos que degradan el suelo produciendo la pérdida de nutrientes y alteración del microbiota entre estos los HMA.

Uno de los cultivos más importantes en esta zona es el maíz, donde actualmente se siembran híbridos bajo prácticas agrícolas que implican el uso excesivo de productos químico, que, si bien han mejorado la productividad del cultivo, a su vez han degradado el suelo. Alterando de manera significativa la microbiota, la disponibilidad de materia orgánica, contaminación del agua, pérdida de la diversidad genética y cultivares criollos (Delgado-Ruiz, Guevara-Hernández, & Acosta-Roca, 2018).

Los hongos micorrízicos arbusculares están ampliamente distribuidos en el suelo y mantienen relaciones con otros microorganismos. Su importancia radica en la capacidad para mejorar la absorción de los nutrientes en las plantas. Las micorrizas son fundamentales para el desarrollo de bosques y cultivos agrícolas, ya que aumentan la capacidad de las plantas para absorber el fósforo y agua del suelo, ayudan a la agregación

de partículas del suelo, mejorando su estabilidad, y contribuyen al almacenamiento de carbono en el suelo (Ruíz , Rojas, & Sieverding, 2011).

Otro de los beneficios de esta asociación es que mejora la eficiencia del sistema radicular de las plantas, permitiéndoles alcanzar nutrientes y agua en zonas donde las raíces por sí solas no llegarían. Esta ventaja hace que las plantas sean más resilientes en situaciones de estrés hídrico.

### **1.3 ANTECEDENTES**

La importancia del uso de los hongos y su interés está enfocada a la investigación de cómo estos organismos interactúan con las plantas en sistemas forestales y agroecosistemas. Al combinar herramientas y conocimientos de biotecnología y ecología, se busca comprender el proceso ecológico conocido como “micorriza” para aplicar estos conocimientos de restauración ecológica y en el cultivo o reforestación de especies vegetales de interés para la silvicultura o la agricultura.

El uso de microorganismos beneficiosos es clave en la agricultura y los ecosistemas, incluyendo bacterias que estimulan el crecimiento de las plantas, bacterias que fijan nitrógeno, microorganismos que solubilizan fosfatos y hongos micorrízicos arbusculares. Es fundamental considerar las razones para utilizar hongos micorrízicos arbusculares en la fertilización de cultivos, así como los principales beneficios que ofrece su aplicación. También es crucial considerar el uso excesivo de fertilizantes químicos y sus efectos negativos tanto en el medio ambiente como en la salud humana.

### **1.4 OBJETIVOS**

#### **1.4.1 Objetivo general.**

- Establecer un protocolo para la producción de esporas de hongos micorrízicos arbusculares HMA mediante el uso de plantas trampa de maíz como base para la elaboración de un bioinsumo.

#### **1.4.2 Objetivos específicos.**

- Identificar esporas de HMA del suelo rizosférico del cultivo de maíz mediante técnicas de aislamiento.

- Clasificar morfotipos de esporas de hongos micorrízicos arbusculares mediante descripción morfológica.
- Determinar un protocolo para la producción de esporas de HMA mediante la implementación de un biorreactor.

## **1.5 JUSTIFICACIÓN**

La FAO, en colaboración con el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), lidera la implementación del Decenio de las Naciones Unidas sobre la Restauración de los Ecosistemas (2021-2030). Esta planificación define la restauración de los ecosistemas como un conjunto amplio de prácticas destinadas a conservar y reparar los ecosistemas dañados, con el propósito de enfrentar la crisis climática y de biodiversidad. Con la restauración de los ecosistemas implica detener y revertir su degradación, mitigar el motivo del clima extremo, mejorar la salud humana y recuperar la biodiversidad, lo que incluye también de regenerar la polinización de las plantas (FAO, 2020).

El mundo enfrenta una triple amenaza del cambio climático, la degradación ambiental y la contaminación, y es necesario cumplir con el meta de restaurar al menos 1000 millones de hectáreas de tierras deterioradas en la próxima década. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) informa que en Ecuador se cosecharon 365.334 hectáreas de maíz, el rendimiento de 4,58 toneladas por hectárea y una producción total de 1.479.700 toneladas. Las cifras subrayan sobre la importancia de los cultivos del maíz en un país donde su producción se destina principalmente a la alimentación humana, animal e industrial (Caviedes, Carvajal-Larenas, & Zambrano, 2022).

En Ecuador, los estudios sobre mejoramiento genético en la semilla, nutrición vegetal, fitopatología y entomología desempeñan un papel crucial. El uso de biotecnología y las aplicaciones para el crecimiento la productividad de los cultivos está en sus primeras etapas, de mejoramiento genético son uno de factores clave de mejoramiento de la productividad en las dos principales regiones agrícolas del país: la Costa y la Sierra (Caviedes, Carvajal-Larenas, & Zambrano, 2022) y (Haug, Setaro, & Suárez, 2019).

Es de importancia la búsqueda de alternativas que mejoren la situación actual de los suelos sometidos a una extensa y extensiva actividad agrícola, uno de los caminos es la producción de bioinsumos basados en el uso potencial de los microorganismos como facilitadores de nutrientes para las plantas y generadores de vida en el suelo (Vurukonda, Fotopoulos, & Saeid, 2023)

## CAPÍTULO 2

### 2.1 MARCO TEÓRICO

El maíz, conocido científicamente como *Zea mays L.*, es un cultivo esencial en la población para producción de alimentos a nivel mundial. Sus usos son variados, abarcando desde la alimentación humana y animal hasta la elaboración de numerosos productos (Coral - Valenzuela, Andrade - Bolaños, Pumisacho - Gualoto, Caicedo - Chávez, & Salazar - Vizúete, 2020). El maíz es uno de los cereales alimenticios más antiguos que se conocen, perteneciente a la familia *Poaceae* y a la tribu *Maydeas*. Única especie cultivada de su género y tiene su centro de origen en América (Paliwal, 2001). El maíz es uno de los cereales emblemático de los pueblos y culturas del continente americano. Las civilizaciones antiguas de Mesoamérica, como los Olmecas y Teotihuacanos, hasta los Incas y Quechuas en la región andina de Sudamérica, esta planta ha sido una compañera fundamental en su desarrollo (Serratos, 2009).

La palabra micorriza, de origen griego, describe la simbiosis entre un hongo y las raíces de las plantas. En esta relación, la planta suministra carbohidratos y un microhábitat al hongo, mientras que el hongo le proporciona a la planta mayor cantidad de agua, nutrientes minerales y protección contra patógenos. Las plantas de maíz se asocian con micorrizas por razones de crecimiento, lo que se refleja, entre otras cosas, en el aumento del tamaño y peso de los granos y en una mejor floración (Ramírez-Flores, Perez-Limon, Barrales-Gamez, Olalde-Portugal, & Sawers , 2020).

En las últimas décadas, se han utilizado micorrizas arbusculares (HMA) en la producción de bioinóculos para desarrollar la productividad de las plantas y su resistencia a las plagas. La aplicación puede contribuir a disminuir el uso de fertilizantes químicos, cuyos efectos residuales provocan contaminación ambiental (Urgiles Gómez, y otros, 2019).

La investigación sobre las micorrizas arbusculares (HMA) es crucial debido a que están asociadas con más del 80% de las plantas y desempeñan funciones esenciales, como proteger el sistema radicular contra fitopatógenos, mejorar la nutrición mineral y optimizar la absorción de agua en la planta huésped. Dada la relevancia de los cultivos en Ecuador y otras partes del mundo, es fundamental caracterizar las HMA para comprender su diversidad biológica para identificar comunidades claves asociadas con este cultivo, lo que permitirá futuras investigaciones sobre caracterización molecular, propagación o utilización de HMA y uso en la producción de maíz en plantaciones tanto convencionales como artificiales (Urgiles Gómez, y otros, 2019) y (Wang, y otros, 2024).

Una excelente alternativa al excesivo de fertilizantes químicos es el empleo de los microorganismos del suelo. En este contexto, las bacterias fijadoras de nitrógeno y los hongos micorrícicos mejoran el crecimiento de diversos cultivos. Los hongos formadores de micorrizas arbusculares son los bioinoculantes que más utilizan en la agricultura, ya que facilitan que absorban los nutrientes esenciales como fósforo, nitrógeno y agua, además de proteger a las plantas contra patógenos. La aplicación de inoculantes de simbiosis, como hongos micorrícicos arbusculares y bacterias, junto con dosis moderadas de fertilizantes químicos, puede favorecer el crecimiento tanto aéreo como radicular de las plantas de maíz (Montejo-Martínez, y otros, 2018).

El microbiota del suelo es un recurso importante para la fertilidad del suelo, ya que su diversidad preserva las condiciones necesarias para la supervivencia de bastantes especies vegetales. Destacan como los microorganismos y hongos micorrícicos arbusculares (HMA), que establecen una conexión entre las hifas y las raíces de alrededor del 80% de las plantas terrestres. Esta simbiosis permite a las plantas hospederas obtener nutrientes minerales y mejorar su tolerancia a factores bióticos y abióticos (Cervantes-Gámez, y otros, 2021).

En la provincia de Loja, cantón Pindal al sur del Ecuador, el maíz se está convirtiendo en un producto económico y socialmente muy importante para el cantón, ya sea directamente para el consumo humano o para la industria en general. Es así que, para lograr una mayor producción, es necesario manejar adecuadamente esta cosecha (Escobar, 2021). Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) forman relaciones

simbióticas con el 90% de las plantas terrestres, formando diversas combinaciones micorrízicas. Aunque se desconoce el número exacto de hongos del suelo que participan la simbiosis, que han demostrado ser beneficiosos para muchas especies agrícolas importantes, como el maíz, mejorando su adaptación a distintos entornos y teniendo un impacto positivo en la productividad del sistema (Serralde O & Ramírez G, 2004).

### **1.5.1 Etapas de la simbiosis micorrízica.**

Los (HMA), son responsables de proporcionar agua y nutrientes como P, K, Ca, Fe, Zn, Mg y Mn a las plantas (Symborg, 2023). La planta proporciona al hongo azúcares producidos por la fotosíntesis, para que esta simbiosis se dé, se siguen las siguientes etapas:

- El hongo ingresa en los pelos absorbentes: Las plantas reconocen al hongo como beneficioso e ingresa por los pelos absorbentes.
- Formación de arbuscúlos: En las raíces, los hongos producen estructuras especiales llamadas arbuscúlos para transferir nutrientes del suelo a la planta, permitiendo así la producción de azúcares y ácidos grasos.
- Posición del micelio externo: El hongo explora el suelo y crece fuera de las raíces a través del micelio extracelular, que absorbe nutrientes y agua y los libera a la planta. La red de hifas procede como un auténtico medio de transporte. Es elástico y muy fino. Dada longitud de las hifas por metro de raíz se estima entre 7 y 250 metros, los agregados miceliales externos son muy capaces de explorar el suelo. Los nutrientes se transportan a través de las hifas hacia las vesículas, que son estructuras en aspecto de cápsulas donde se almacenan. Por ejemplo, el fósforo es absorbido por las hifas en forma de iones ortofosfato y se acumula en las vesículas como polifosfatos. Esta forma de fósforo es distinta de la que utilizan las plantas.
- Mejoran sistema radicular de las plantas: El hongo estimula a la planta a secretar auxina, una hormona mejor relación con el desarrollo de las raíces, lo que aumenta el número de folículos pilosos, aumentando así la cantidad de pelos absorbentes.
- Aumenta el poder fotosintético: En condiciones de simbiosis efectiva, el propio hongo estimula la fotosíntesis en la planta, lo que favorece que la planta produzca más CO<sub>2</sub>, garantizando el desarrollo de la simbiosis, aumentando del

intercambio de los nutrientes y agua a través de su presencia en el sistema radicular y arbusculares produciendo así mayores cantidades de nutrientes.

### **1.5.2 Sistema aeropónico como una alternativa para la producción de HMA.**

La aeroponía ofrece la posibilidad de cultivar plantas de manera eficiente, mejorando los procesos agrícolas. Sin embargo, es necesario implementar mejores soluciones en los sistemas de suministro de energía y control del riego para optimizar su rendimiento (Hoyos, Candelo-Becerra, & Chavarria, 2019).

Los cultivos aeropónicos se diferencian de los cultivos hidropónicos tradicionales y del cultivo *in vitro* en que sus raíces permanecen suspendidas en el aire y no se utiliza ningún sustrato ya sea líquido o sólido. El sistema de nebulización rocía periódicamente las raíces para proporcionar la humedad y el fertilizante necesario. Se trata de un sistema muy limpio y eficiente, ya que las raíces están bien aireadas y crecen mejor, proporcionando una producción mayor y más limpia, con un importante ahorro de fertilizante y agua (hasta un 60% de agua y un 90% de fertilizante). El exceso de solución nutritiva se puede recolectar y enviar de regreso al tanque de alimentación, lo que recircula los nutrientes y ahorra significativamente el suministro de agua (Torres, 2016).

Las micorrizas complementan las actividades sostenibles de producción de alimentos, contribuyendo al fortalecimiento y avance de acuerdo a la autosuficiencia alimentaria. El suelo alberga vida, y los organismos que habitan ellos son esenciales para su fertilidad natural. Entre estos organismos se encuentran los hongos micorrícicos, que rodean y penetran las raíces de las plantas, formando redes subterráneas de conexión entre las raíces de la misma o distintas especies vegetales. En ciertas condiciones, esta red facilita el intercambio de nutrientes entre las plantas hospedadoras y las raíces interconectadas. Así, las micorrizas crean una vasta red subterránea que ofrece múltiples beneficios para la supervivencia y funcionamiento de las plantas. La agroecología busca replicar este sistema natural de fertilización, imitando los ciclos naturales del ecosistema y preservando la diversidad microbiana del suelo, es fundamental para su equilibrio, salud y productividad (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2020).

El uso de micorrizas como biofertilizante en plantas de maíz mejora la nutrición de los cultivos, contribuye a la reducción de costos de producción y disminuye la contaminación

en el agua, suelos y mantos freáticos causada por fertilizantes químicos. Las micorrizas se integran en las prácticas sostenibles del sector alimentario, ayudando a fortalecer, consolidarlo y avanzar la autosuficiencia alimentaria (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2020).

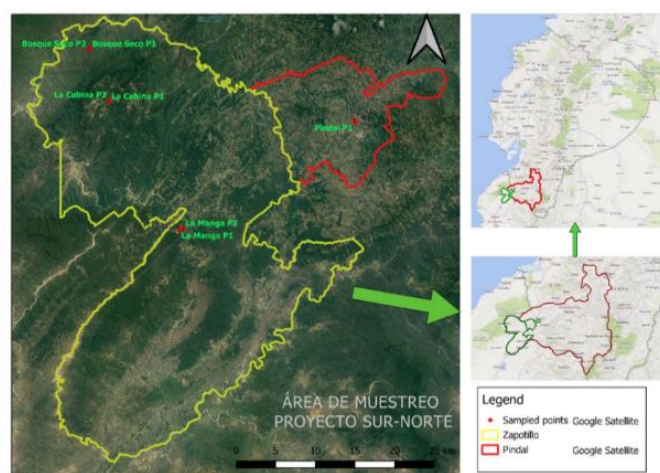
## CAPÍTULO 3

### 1.6 ZONA DE ESTUDIO

Las muestras se recolectaron en 6 parcelas de cultivos de maíz, ubicadas a diferentes altitudes en los cantones de Zapotillo y Pindal de la provincia de Loja (figura 1 y al detalle figura 2) al sur del Ecuador específicamente en los sectores de la Manga, Pindal y la Cabina donde se implementaron 2 parcelas de 10 x 10 m en cada uno de los sitios mencionados.

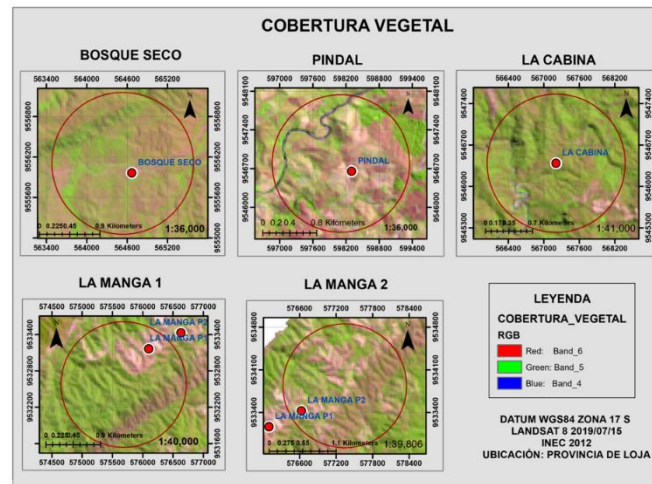
Para colecta de muestras del suelo de la rizosfera se seleccionaron 20 plantas al azar en cada uno de los sitios establecidos. Además, de 10 submuestras de suelo de 10 cm de profundidad, retirando la materia orgánica de la superficie, para formar una muestra compuesta de 1kg. El suelo fue colocado en fundas herméticamente cerradas y etiquetadas. Las muestras se trasladaron al Laboratorio de Ecología Microbiana y Principios Activos del CIITT para su procesamiento. Una vez en el laboratorio, las muestras se mantendrán a 4°C para su conservación.

*Figura 1* Mapa de ubicación de las parcelas en los sectores de Pindal, La Manga y La Cabina.



Fuente: Daniel Segovia

**Figura 2** Zona de cultivo de maíz en los cantones de Pindal y Zapotillo



Fuente: Bryan Quezada

## 1.7 METODOLOGÍA

### 1.7.1 Análisis físico-químico del suelo.

Se pesó aproximadamente 1 kg de la muestra compuesta para realizar el análisis físico-químico, incluido el pH, la densidad aparente, el contenido de MO, la textura, la salinidad, la conductividad eléctrica y la humedad. Además del contenido de; C, N, K, P, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn y Zn, el análisis completo se realizó mediante el servicio de un laboratorio externo que se visualiza en el (Anexo B).

### 1.7.2 Procesamiento de las muestras para aislamiento de esporas de HMA.

Como se extrae las esporas de HMA del suelo, se empleó la técnica de decantación húmeda y tamizado. Se tomó una muestra de 200 g, la cual se diluyó en 1000 ml de agua. La mezcla se dejó reposar durante 10 minutos para permitir que los sólidos se sedimentaran. Luego, se filtró a través de tamices con poros de 850, 250 y 40 micras para finalmente recuperar la muestra del último tamiz. Se afora a 40 ml el sobrenadante con sacarosa al 70%. Se procedió a centrifugar a 3500 rpm por 3 min, se decantó el sobrenadante usando un tamiz de 40 micras, lo que queda en este último tamiz se

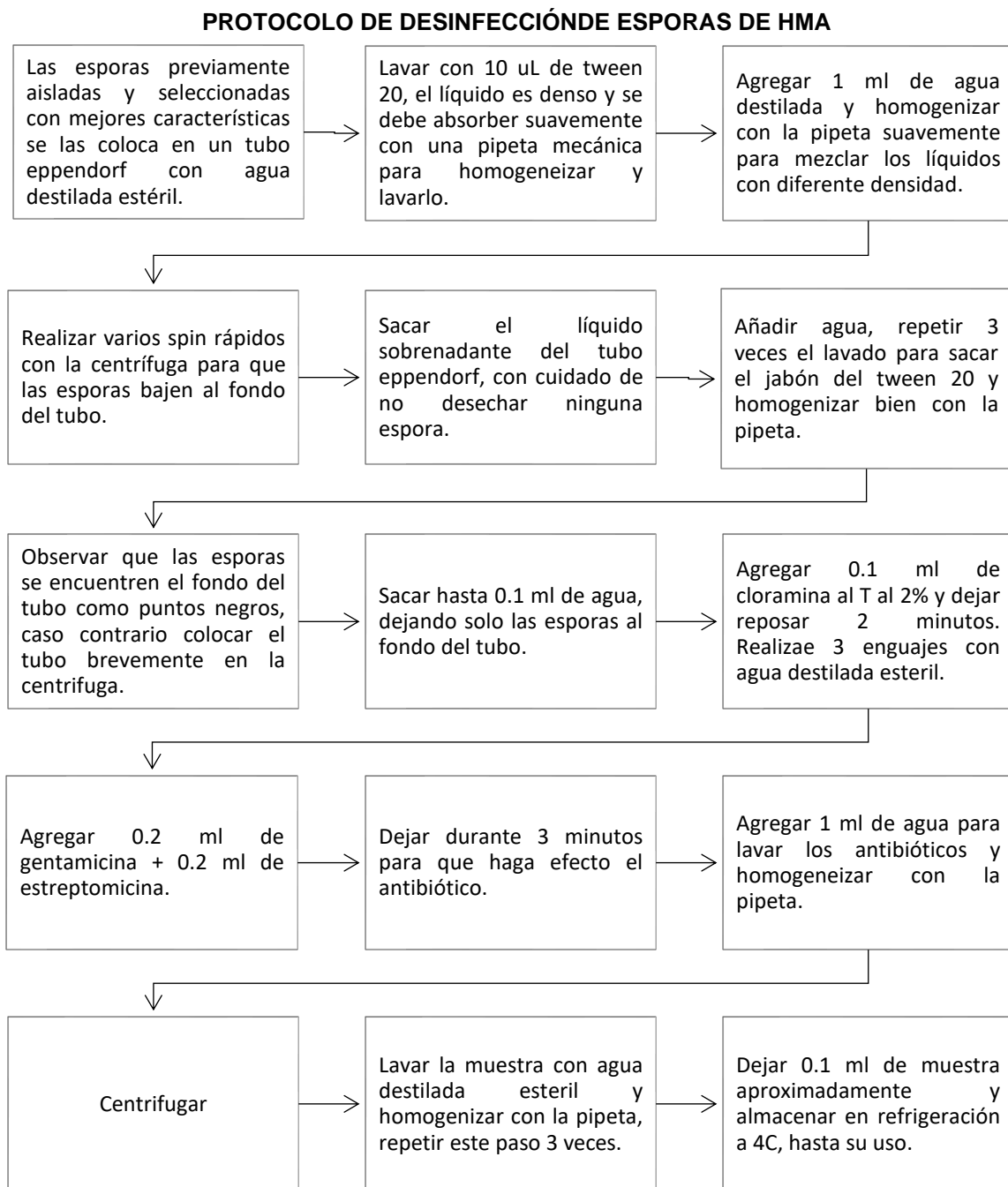
almacena en caja petri para posterior ser observado bajo el estereomicroscopio (Awad & Pena, 2023).

### **1.7.3 Conteo y extracción de esporas.**

Para poder realizar el conteo de las esporas se utilizó un estereomicroscopio, esta ha pasado previamente por el proceso de tamizado y centrifugado. Las muestras obtenidas son sometidas durante 15 segundos a baño ultrasónico con finalidad de limpiar impurezas. Con una micro pipeta se aíslan las esporas y se colocan por separado en cajas Petri que contienen agua destilada.

### **1.7.4 Protocolo de desinfección de las esporas.**

Una vez obtenidas las esporas del suelo, estas pasaron por un proceso de desinfección (figura 3) que permite eliminar restos de materia orgánica y microorganismos que se adhieren a sus paredes

**Figura 3** Protocolo de desinfección de esporas de HMA

### 1.7.5 Producción de esporas de HMA mediante biorreactores.

Esta fase involucra el uso de biorreactores para el crecimiento de microorganismos ya sean hongos o bacterias. La meta principal es la producción en gran escala de esporas, ya que esto aumenta el coeficiente de multiplicación y mejora la calidad del material regenerado en condiciones in vitro ( Kumar - Shanmugam, Mandari , Kumar - Devarai , & Gummadi , 2022).

Para la producción de HMA empleando un reactor de cultivo aeropónico, se elaboró un medio de cultivo que contiene macro y micro nutrientes, sin la adición de azúcares, vitaminas, con un atomizador se asperjando la solución nutritiva que va alimentando a las plantas, permitiendo entonces el desarrollo de la raíz, la germinación de las esporas y el incremento de los HMA (Rombe, Husna, Danu - Tuheteru, & Arif, 2022).

Se colocaron plantas trampa que estén previamente micorrizadas y crecidas en maceteros, estas plantas se introducen y la raíz queda suspendida en el aire y la parte área queda fuera del reactor. Posteriormente, después del proceso de asperjado por un tiempo establecido, se realizaron cortes histológicos para verificar su colonización de las raíces y producción de las esporas. Esta sería la base para la elaboración de un bioinsumo a mayor escala (Selvakumar, y otros, 2016)

#### **1.7.6 Siembra en Sistema Aeropónico.**

Se utiliza plantas trampa donde se inoculan las esporas, estas plantas se colocaron en una caja con un sistema aeropónico como se ilustra en la figura 4 donde el sistema de nebulización rocía las raíces para darles la humedad y nutrientes necesarios, asegurando condiciones ideales para la reproducción de esporas.

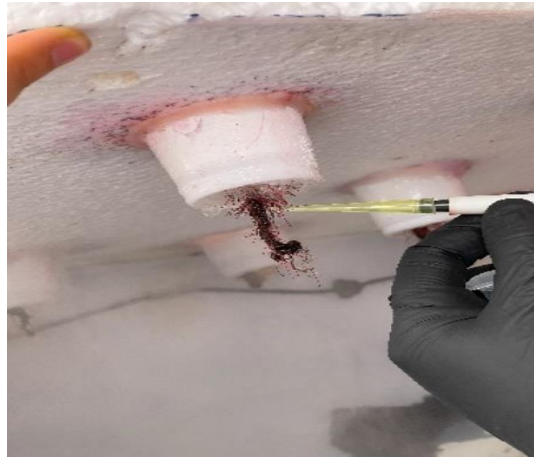
*Figura 4 Sistema aeropónico para la colocación de plantas trampa*



*Fuente:* Bryan Quezada

En cada planta se colocaron 20 esporas de HMA, obtenidas de las muestras de suelo de las parcelas mencionadas, las mismas se inocularon a las raíces como se puede observar en la figura 5, una vez que transcurran tres meses, tiempo suficiente para que los HMA colonicen la raíz, se continua con el proceso de tinción y conteo de raíces micorrizadas para verificar el porcentaje de micorrización y producción de esporas.

**Figura 5** Inoculación de esporas en las raíces de las plantas trampas

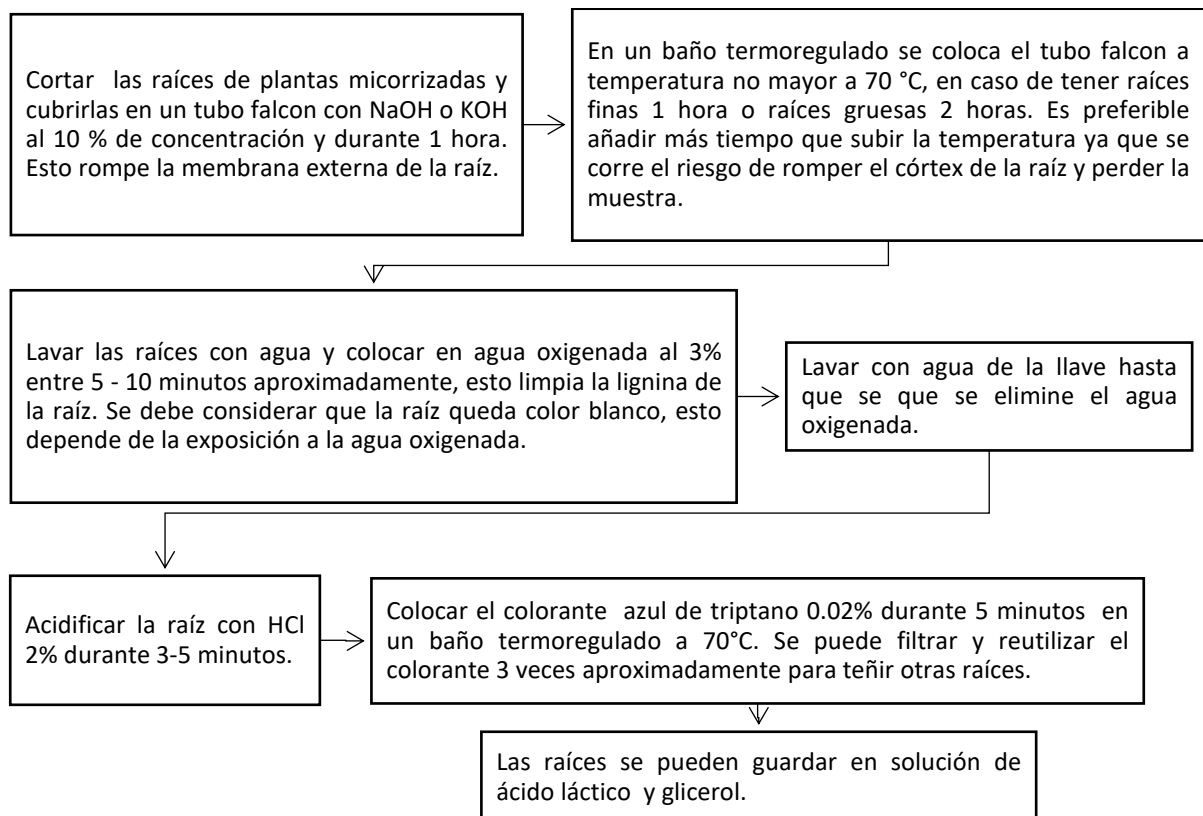


Fuente. Bryan Quezada

### 1.7.7 Protocolo de tinción de raíces.

Para verificar la presencia de HMA en las raíces de las plantas trampa se realizaron cortes histológicos de la raíz y mediante un proceso de tinción éstas se observaron al estereomicroscopio y se registró la presencia o ausencia de arbusculos, estructuras propias de la relación simbiótica entre HMA y la raíz; este proceso de tinción se especifica en la figura 6.

**Figura 6** Protocolo de tinción de esporas de HMA y raíces



Es posible lavar las raíces después de cada paso, y también, pueden ser reversibles menos la última aplicación con el HCl ya que el colorante se fija en medio ácido. El orden de los pasos depende si se aclara el color de la raíz hasta presenten un color blanquecino.

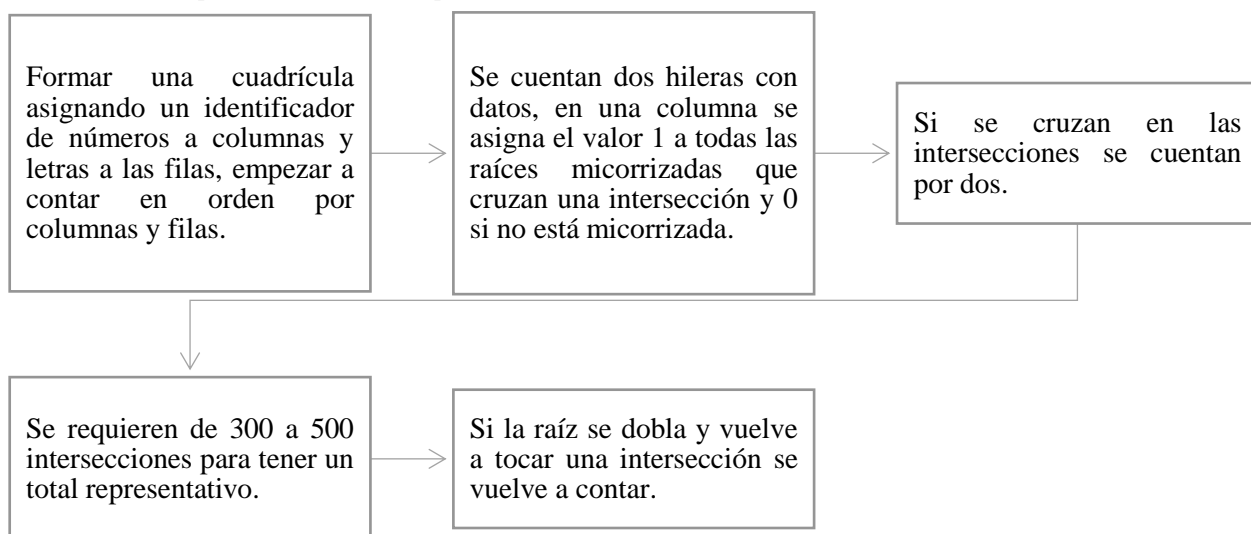
### 1.7.8 Descripción de especies.

Luego de los respectivos conteos de las esporas extraídas de cada muestra, estas se colectaron en una caja petri de plástico, donde se observaron con un estereomicroscopio y se separaron por morfotipos con una aguja de disección, agrupándolas según la similitud de su forma, color y tamaño. Las esporas correspondientes a cada morfotipo identificado se extrajeron con una micropipeta y se etiquetaron con un código de muestra, detallando la fecha, lugar de recolección y una descripción de las características de cada morfotipo encontrado. Finalmente, estas esporas se almacenaron a 4 °C hasta su análisis morfológico, se ha determinado que en las muestras de suelos estudiadas predominan 4 tipos de esporas las cuales corresponde al género y especie: *Acaulospora colombiana*, *Gigaspora rosear*, *Rhizophagus clarus* y *Rhizophagus irregularis*.

### 1.7.9 Protocolo para establecer el porcentaje de micorrización.

Para establecer el porcentaje de micorrización se requiere elaborar una cuadrícula en la superficie de una caja Petri. Una vez teñidas, las raíces se extienden aleatoriamente a lo largo de la placa de Petri. Se Eligió las raíces que se encontraban en buen estado. Es importante repetir varias veces para asegurar un porcentaje representativo (figura 7).

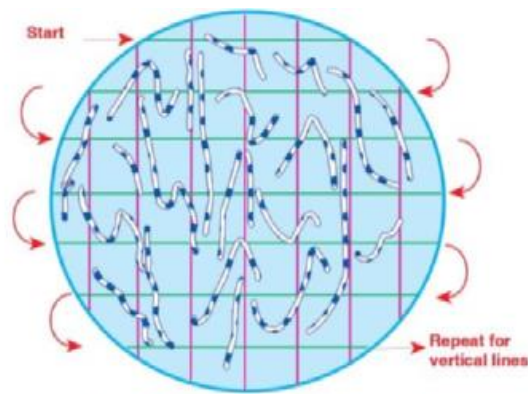
**Figura 7** Pasos para el conteo de esporas



### 1.7.10 Cálculo de raíces micorrizadas.

En la caja Petri que contiene la cuadrícula (Fig. ) se cuentan las columnas y filas donde se presentan las raíces micorrizadas teñidas, aquí se contabilizan primero desde la primera fila en la parte superior en sentido de izquierda a derecha y retornando en sentido opuesto en la siguiente fila inferior, luego se procede con el mismo conteo en las columnas empezando por la primera columna izquierda iniciando de arriba hacia abajo retornando en la siguiente columna en sentido opuesto como se muestra a continuación (Brundrett, 2008).

**Figura 8** *Conteo de raíces micorrizadas*



Fuente: (Brundrett, 2008)

- En la columna o fila que se recorra y se encuentren raíces micorrizadas se le asigna el valor de 1 a toda la fila o columna analizada.
- Se suman todos los valores de las raíces que se asignaron el valor de 1.
- Se suman los valores de las raíces micorrizadas
- Se suman todos los totales de las repeticiones y se calcula el promedio mediante una regla de 3.

## CAPÍTULO 4

### 1.8 RESULTADOS

#### 1.8.1 Clasificación de morfotipos e identificación de esporas HMA encontradas en suelos de cultivo de maíz.

Luego de extraer las esporas de HMA de las muestras de suelo de cultivos de maíz, se realizó el aislamiento e identificación de estas como se indica en el apartado 3.2.7.

Se lograron identificar por morfotipo 4 clases de HMA, los cuales corresponden a *Rhizophagus irregularis*, *Rhizophagus clarus*, *Gigaspora rosea* y finalmente el HMA *Acaulospora colombiana*.

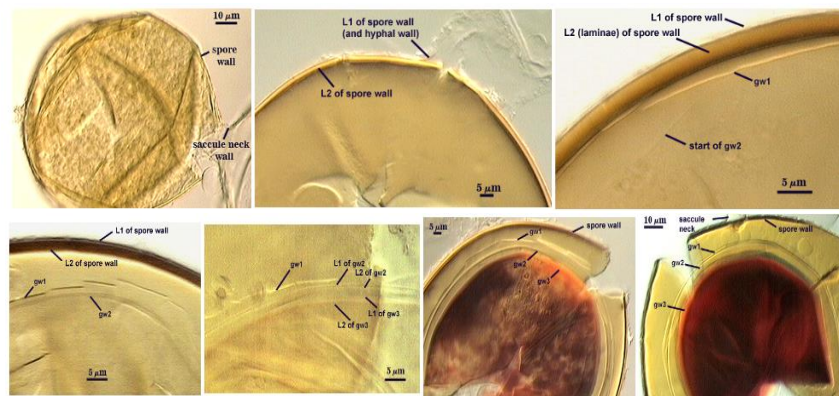
##### 4.1.1.1 *Acaulospora colombiana*.

La *Acaulospora colombiana* es un hongo micorrízico arbuscular, lo que significa que forma simbiosis con las raíces de las plantas, ayudándolas a absorber nutrientes del suelo, especialmente fósforo, a cambio de azúcares que la planta produce. Se encuentra principalmente en Colombia, Costa de Marfil y América del Norte (Wilches - Ortiz, y otros, 2019).

##### Morfología.

Sus esporas son de color marrón anaranjado a marrón oscuro, de forma globosa a subglobosa, con un diámetro de 100-140 micrómetros. Las esporas contienen una estructura llamada orbe, que juega un papel en la germinación (INVAM, 2024).

**Figura 9** Secuencia de diferenciación de las esporas



Fuente: Dr. Joe Morton, curator of the collection at West Virginia University

### **Estructura subcelular de las esporas.**

**L1:** Capa hialina adherida a la pared del cuello del sáculo; 0,5-0,8 micrones de espesor; a medida que las esporas se expanden.

**L2:** Forman una capa de aspecto marrón (0-30-100-10) a partir de L1. El rango de espesor es de 2,4 a 4,4  $\mu\text{m}$  (promedio de 3,3  $\mu\text{m}$ ). Cuando maduran, los poros de las esporas y el cuello de la cápsula se cierran completamente mediante este proceso, creando una "endospora".

**L3:** Su ubicación varía mucho dependiendo del tipo de ruptura bacteriana. Se separa en diferentes partes de la pared de la espora, pero rara vez se ve cuando está adherida. Cuando la distancia entre las paredes de las esporas es la misma, estas capas pueden confundirse con paredes flexibles. Sin embargo, es ligeramente más rígido que la pared flexible porque puede romperse junto con la pared de esporas de ahí la designación "semirrígida". (Fig. 11)

### **Hábitat.**

Prefiere suelos con alto contenido de materia orgánica y poco nivel de fósforo. Se ha encontrado en asociación con diversas plantas, como café, pastos, leguminosas y árboles (González - Osorio, Botero - Carmenza, Rivera - Medina, & Vega, 2020).

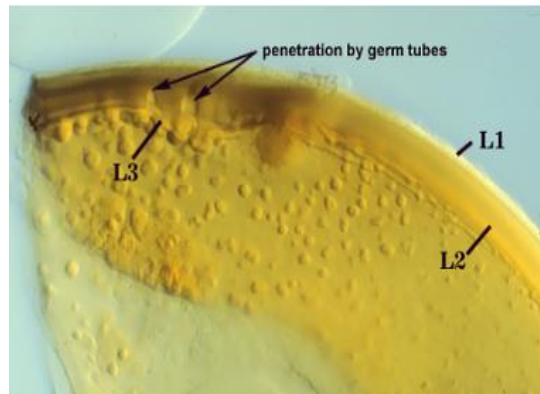
#### **1.8.1.2 *Gigaspora rosea*.**

*Gigaspora rosea* es un tipo de hongo micorrízico arbuscular, lo que significa que forma asociaciones mutuamente beneficiosas con las raíces de las plantas. Estos pequeños pero poderosos hongos ejercen un papel crucial en la salud de las plantas y la estabilidad de los ecosistemas ( Tang, y otros, A Survey of the Gene Repertoire of *Gigaspora rosea* Unravels Conserved Features among Glomeromycota for Obligate Biotrophy, 2016).

### **Morfología.**

Las esporas son las unidades reproductivas de *G. rosea* y tienen un color característico de rosa pálido a marrón claro, de ahí la palabra "rosea" en su nombre. Tienen forma de globosa a subglobosa, con un diámetro que suele oscilar entre 160 - 280 micrómetros. La pared de las esporas es lisa y está adornada con pequeñas protuberancias o verrugas (INVAM, 2024)

**Figura 10** Capas de la pared de la espora



Fuente: Tomado de. Dr. Joe Morton, curator of the collection at West Virginia University

### **Estructura subcelular de las esporas.**

La pared de la espora de la *Gigaspora rosea* está formada por tres capas: L1, L2 y L3. Las dos primeras son adherentes y de igual grosor en las esporas juveniles, pero la L2 se engrosa a medida que se diferencia la pared de la espora y la L3 se engrosa justo antes de la formación del tubo germinal.

**L1:** Capa regular, transparente y compacta. La superficie es lisa, pero puede contener esporas viejas, especialmente las que se acumulan en el suelo.

**L2:** El espesor de las esporas maduras varía ampliamente; Este cambio se debe a la plasticidad de la capa base, que provoca alargamiento y fractura cuando se aplica fuerza al portaobjetos.

**L3:** La capa “germinal” es del mismo color que la capa laminar (L2). L3 es más evidente en el nivel ultra estructural, donde parece denso en electrones. Cuando se ve bajo un microscopio se comporta como L2. En el interior de esta capa se forman numerosas “verrugas” o “pezones”, especialmente en las zonas donde se forman las bacterias.

### **Hábitat.**

Se encuentra en varios tipos de suelo, pero prospera en suelos tranquilos y bien aireados con un contenido moderado de materia orgánica. Su distribución es amplia y se encuentra en áreas tropicales, subtropicales y templadas de todo el mundo forma asociaciones de micorrizas arbusculares con una amplia gama de plantas, incluidos cultivos agrícolas, pastos y árboles (Tang, y otros, A Survey of the Gene Repertoire of

*Gigaspora rosea* Unravels Conserved Features among Glomeromycota for Obligate Biotrophy, 2016).

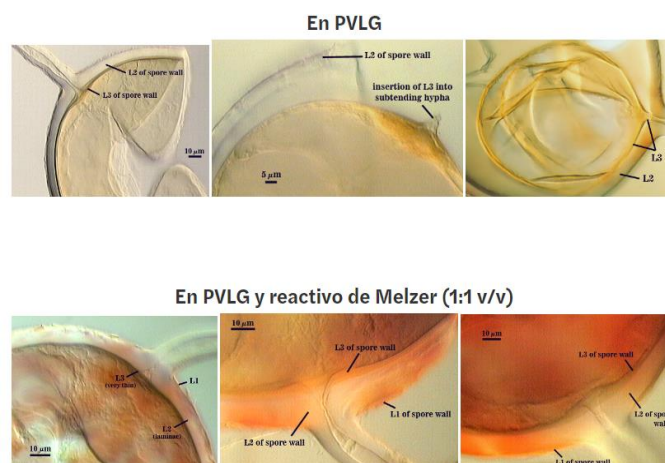
### 1.8.1.3 *Rhizophagus clarus*.

*Rhizophagus clarus* (anteriormente conocido como *Glomus clarum*) es un hongo micorrízico arbuscular de la familia Glomeraceae. Se ha demostrado que la especie incrementa la absorción de nutrientes y el crecimiento en varios cultivos agrícolas (Olivera Thales, y otros, 2022).

#### Morfología.

Las esporas de *Rhizophagus clarus* varían en color de blanco a amarillo-marrón. Naturalmente varían en tamaño de 100 a 260  $\mu\text{m}$  y tienen forma globosa a subglobosa. Las esporas son más grandes que las esporas de otras especies del género *Rhizophagus*. Las esporas están compuestas por una capa mucilaginosa externa que se espesa a medida que maduran (INVAM, 2024).

**Figura 11** Estructura subcelular de las esporas *rhizophagus clarus*



Fuente: Tomado de. Dr. Joe Morton, curator of the collection at West Virginia University - INVAN

#### Estructura subcelular de las esporas.

**L1:** Es una capa transparente y pegajosa generalmente se rompe y se desprende, por lo que con frecuencia falta en las esporas cultivadas; muestran una coloración de rojo rosado a violeta claro cuando se tiñen con el reactivo de Melzer. Esta capa parece casi hojas de esporas jóvenes debido a las líneas de las áreas más gruesas.

**L2:** Una capa hialina que permanente está formada por subcapas que no son quebradizas, sino que tienen una consistencia granular, lo que provoca el

agrietamiento y la fragmentación de la pared de las esporas. Las esporas suelen parecer "aplastadas" en lugar de romperse limpiamente. Esta capa puede ser más gruesa en algunas áreas hasta un 25%, lo que hace que la superficie interna parezca "ondulada" y, a veces, también muestra protuberancias poco profundas.

**L3:** Otra capa que normalmente consiste en 2-4 subcapas o láminas, de color amarillo a amarillo oscuro. Las subcapas suelen ser adherentes, pero a veces se separan y engrosan en la unión de la hifa subtendente.

### Hábitat.

Se encuentra en una amplia variedad de tipos de suelo a nivel mundial, entre ellos los climas templados y cálidos. Comúnmente se encuentra en suelos agrícolas, particularmente bajo cultivos como soja, maíz y árboles frutales. También se puede encontrar en pastizales, bosques y otros ecosistemas naturales (Camargo Gomes, 2017).

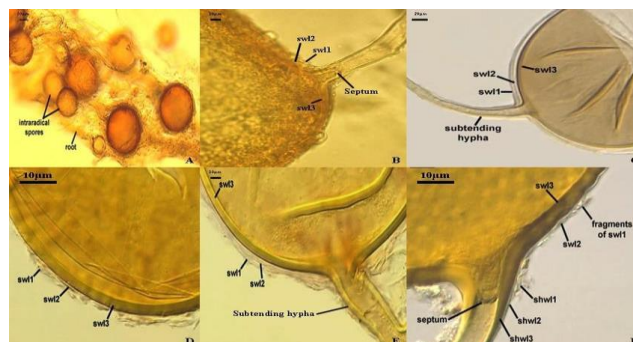
#### 1.8.1.4 *Rhizophagus irregularis*.

*Rhizophagus irregularis* es un hongo micorrízico arbuscular aplica como inoculante del suelo en agricultura y horticultura. En estudios científicos para mejorar plantas y suelos, se usa en combinación con bacterias (Anckaert, y otros, 2023).

### Morfología.

Sus esporas tienen un marrón amarillento de forma: globosa, subglobosa, ovoide, oblonga o lo suficientemente irregular como para que a veces parezca nudosa con diámetro de 70-165  $\mu\text{m}$  de diámetro, la unión hifal es cilíndrica y recta, y consta de 3 capas en la pared (INVAM, 2024).

**Figura 12** Estructura subcelular de las esporas *rhizophagus irregularis*



Fuente: Tomado de. Dr. Joe Morton, curator of the collection at West Virginia University

### Hábitat.

Esta se encuentra en suelos de todo el mundo, desde regiones templadas hasta climas tropicales, se ha adaptado para florecer en diversos ecosistemas. No se adapta a la humedad excesiva del suelo y no tolera suelos arcillosos pesados con mal drenaje. *R. irregularis* forma relaciones simbióticas con una amplia gama de plantas, desde productos agrícolas básicos como el maíz y los tomates hasta árboles y pastos. Esta diversidad muestra su adaptabilidad y relevancia ecológica (Srivastava, Conlan, Cahill, & Adholeya, 2016).

### 1.8.2 Tinción y conteo de raíces micorrizadas.

Inicialmente, se planteó utilizar planta trampa de maíz, sin embargo, estas no tuvieron un comportamiento idóneo, debido a los problemas de humedad que presentan sus raíces en la caja aeropónica, por lo tanto, se utilizó las plantas trampa de acelgas.

Transcurridos tres meses después de la inoculación de esporas en las raíces de las plantas trampas de acelga en un sistema aeropónico, se procedió a cortar la raíz y tincionar, seguido a esto se colocó en cajas petri con cuadrícula de esta manera se pudo contabilizar las raíces micorrizadas y evaluar el porcentaje de micorrización de cada una de las plantas. Se registro un porcentaje de micorrización diferente en cada planta como se lo puede visualizar en la Tabla 1.

**Tabla 1.**

*Porcentaje de inoculación en las plantas trampas*

VALOR ASGINADO A COLUMNAS Y FILAS DE LA CAJA PETRI	NÚMERO DE MICORRIZAS ENCONTRADAS EN LAS RAICES DE LAS COLUMNAS	NÚMERO DE MICORRIZAS ENCONTRADAS EN LAS RAICES DE LAS FILAS	TOTAL DE VALORES ASIGNADOS A LA CAJA PETRI	TOTAL DE RAICES MICORRIZADAS CONTABILIZADAS EN LA CAJA PETRI	PORCENTAJE DE INOCULACIÓN
12	8	4	24	12	50.00%
12	3	6	24	9	37.50%
12	4	5	24	9	37.50%
12	4	5	24	9	37.50%
12	7	5	24	12	50.00%
12	5	6	24	11	45.83%
12	3	4	24	7	29.17%

*Nota.* Se indica los resultados de micorrización. tabla realizada por el autor del presente estudio.

La variación del porcentaje entre las siete plantas, se debe a la calidad de la raíz de cada una de ellas, como promedio global de todo el proceso se tiene que la producción de esporas de hongos micorrízicos arbusculares utilizando un método de plantas trampa mediante un sistema aeropónico tiene una efectividad del 41.07 %, el cual es el promedio obtenido entre las siete plantas inoculadas.

Por lo tanto, debido a la eficacia del proceso de inoculación realizado, se puede determinar un protocolo válido expuesto en el presente trabajo para la producción de esporas de HMA, siendo el siguiente proceso a seguir paso a paso.

- Extraer las esporas de HMA del suelo.
- Desinfectar las esporas.
- Agrupar las esporas en tubos falcón.
- Utilizar micro pipetas para extraer y colocar las esporas en las raíces de las plantas trampas.
- Dejar las plantas trampa con las esporas inoculadas, en el sistema aeropónico por 3 meses.
- Tener cuidado de que la caja aeropónica cumpla correctamente el proceso de nebulización.
- Medir continuamente el pH del medio entre 6.2 a 6.5, siendo el óptimo 6.5.
- Alimentar el sistema aeropónico con el medio de cultivo cuantas veces sea necesario, cabe recalcar esto dependerá del crecimiento de la planta.
- Continuar con el proceso de tinción y conteo de raíces para determinar el porcentaje de micorrización y esporulación para garantizar que el proceso esté funcionando.

## CAPÍTULO 5

### DISCUSIÓN

En esta investigación se logró registrar en suelos cultivados con maíz cuatro especies de esporas de HMA que corresponden a los géneros *Rhizophagus*, *Acaulospora* y *Gigaspora* que concuerda con el estudio realizado por Santana (2023) y Tosi (2023) quienes reportan a *Acaulospora* y *Rhizophagus* en el mismo tipo de cultivo. En Ecuador, estudios han demostrado que la inoculación con *Rhizophagus clarus* y *Claroideoglossum etunicatum*, puede mitigar los efectos de la sequía en cultivos de maíz, lo que conduce a una recuperación favorable de las plantas y a una mejor resiliencia después del estrés hídrico (Santana, y otros, 2023).

En los cultivos la simbiosis con HMA reduce la necesidad de agroquímicos al mejorar la absorción de nutrientes, la tasa de desarrollo de las plantas y la tolerancia al estrés, contribuyendo así a prácticas agrícolas sostenibles (Hao , y otros, 2024). Además, la fitorremediación asistida por los HMA ha surgido como una estrategia efectiva para suelos contaminados, promoviendo la eliminación de contaminantes a través de diversos mecanismos como la agregación a exudados hifales, la acumulación y el intercambio de nutrientes con plantas hospederas (Zhang, y otros, 2024). En general, la presencia de HMA en el suelo puede mitigar los impactos negativos de los productos químicos, optimiza la condición del suelo, la salud de las plantas y la sustentabilidad del ecosistema.

La aplicación en cultivos como maíz han mejorado la tasa de crecimiento, aumento de biomasa, la eficiencia de la absorción de nutrientes como fósforo (Liu, Ma, Lakshmanan, Wang, & Li, 2024). Además, de mitigar los efectos del estrés abiótico ocasionado por la temperatura, la salinidad, el estrés hídrico y los ataques de patógenos en el maíz, destacando su papel en la productividad bajo condiciones adversas (Bisht & Gupta, 2023).

Los HMA han beneficiado a las plantas en diversas etapas del crecimiento, y demostrado que impacta significativamente en los parámetros morfofisiológicos y bioquímicos bajo condiciones de sequía, potenciando la colonización radicular, la absorción de nutrientes y la actividad antioxidante, mejorando la eficiencia fotosintética (Abrar , y otros, 2024). La colonización influye positivamente en las tasas de

germinación, el peso y el aumento del sistema radicular, y la biomasa en las primeras etapas fenológicas del desarrollo de las plantas (Vázquez-Santos, y otros, 2024).

En el análisis de los resultados del suelo del Bosque Seco, se logró identificar, la familia dominante *Glomeraceae* como *Rhizophagus clarus* y *Gigaspora rosea* encontrándose con mayor cantidad en la zona de la Cabina, lo cual difiere con el estudio realizado por (Haug, Haug, Setaro, & Súares, 2021)(2021) donde la familia dominante es *Glomeromycota*.

Las especies de hongos micorrízicos determinados de la clase *Glomeromycetes*, como *Acaulospora colombiana*, no han sido reportadas hasta el momento en suelos de maíz, pero se conoce que estas especies son útiles para mejorar las características del suelo (Agbodjato, y otros, 2022). Resultados similares a los de Landínez-Torres et al. (2020) que reporta la misma especie en América del Sur.

La producción con plantas trampa de HMA implica el uso de plantas hospedantes para propagar esporas usadas en la producción de biofertilizantes. Estudios indican que el cocultivo de plantas hospedantes, como maíz y sorgo, puede aumentar la producción de esporas, pero no mantener las composiciones originales de la comunidad tan efectivamente como el monocultivo de plantas hospedantes (Wangmo, 2022; Sefrila, 2023).

*Acaulospora sp.* y *Glomus sp.* se pueden encontrar en las raíces del maíz después de un cultivo trampa, el maíz muestra un alto potencial de colonización de HMA en comparación con otras plantas hospedantes como la soja y la caña de azúcar. La densidad y diversidad de esporas en la rizosfera impactan significativamente el desarrollo y la producción de biomasa de las plantas trampa, y una mayor colonización de esporas conduce a una mayor altura de la planta, número de hojas y producción de biomasa según Husein (2022). Esto resalta la importancia de la selección de plantas hospedantes y la producción sostenible de biofertilizantes.

Con respecto al uso de sistemas aeropónicos, estos permiten asegurar un ambiente limpio para el desarrollo de las micorrizas inoculadas, sin embargo, si bien Hoyos (2019) indica que el buen uso de este tipo de tecnología incrementa la eficiencia en la producción de esporas; es necesario realizar continuas evaluaciones para conocer la cantidad y tipo de nutrientes que cada planta necesita, así como la frecuencia de riego, con el fin de evitar

la pudrición radicular, siendo una alternativa para la producción de inóculos ( Khan & Mohammad, 2022). Esta técnica ha demostrado éxito de viabilidad e infectividad por parte de los HMA (de Santana, Cavalcante, de Sa Barreto, & Costa Maia , 2014).

La tinción de las raíces de las plantas trampa es crucial para visualizar y cuantificar la colonización fúngica. El colorante azul de triptano se ha utilizado con el propósito, de identificar y visualizar la colonización de las raíces, observándose con claridad bajo el estereomicroscopio (Wilkes, 2023), lo que permite documentar de manera eficiente las estructuras fúngicas, como hifas extrarradiculares, vesículas y arbuscúlos, lo que contribuye a una mejor comprensión de las interacciones simbióticas (ManojKumar & Kalpana, 2023).

El porcentaje de micorrización alcanzado en este estudio fue del 50 demostrando ser una técnica eficiente como manifiesta Sing et al (2011), que mediante este sistema se obtiene una alta densidad de propágulos sin necesidad de un sustrato sólido. Según Santana (2023) la infectividad de los inóculos de la HMA es de alrededor del 59% en los 10 primeros meses, si se almacenan a 4 °C en sustratos específicos como arena en combinación con vermiculita o arena más arcilla, reduciéndose con el tiempo. También sean desarrollado varios métodos para preservar los HMA inoculados en vermiculita con un contenido de humedad del 10% a temperaturas de 20-30 °C y en condiciones de luz de 1500 lux, que puede mantener el recuento de esporas y la infectividad hasta por 5 meses (Kumari & Prabina, 2017).

## **CAPÍTULO 6**

### **CONCLUSIONES**

El protocolo de desinfección de las esporas, extracción e identificación de HMA, permitió clasificar en base a los morfotipos las esporas de hongos micorrízicos arbusculares. Estos protocolos, son detallados paso a paso para que puedan emularse y asegurar éxitos en el resultado final, mientras se cumplan las condiciones que se sugieren.

La utilización de plantas como maíz, lechuga y cebollín por sus características de desarrollo no se pudieron utilizar como plantas trampas, encontrando como alternativa la acelga como planta trampa que permitió el establecimiento del presente protocolo.

Por el porcentaje obtenido del 41% podemos sugerir este sistema como idóneo para la producción de hongos micorrízicos arbusculares. La identificación fue corroborada mediante análisis de metabarcoding.

### **RECOMENDACIONES**

Sugerir para analizar las muestras de suelo máximo a las 72 horas de ser extraídos de sitio, para evitar que el tiempo influya en la calidad de las esporas de los HMA.

Se debe cumplir con el mínimo de 300 intersecciones en la caja petri para tener un valor más cercano a la realidad del número de esporas producidas posterior al sembrado.

Utilizar plantas trampa sembradas en maceteros cuyo estado de raíces sean grandes y sanas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abrar , M., Zhu, Y., Rehman, M., Batool , A., Duan, H.-X., Ashraf , U., . . . Xiong, Y.-C. (2024). Functionality of arbuscular mycorrhizal fungi varies across different growth stages of maize under drought conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 213, 108839. doi:<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.108839>
- Agbodjato, N., Assogba, S., Babalola, O., Koda, A., Aguégué, R., Sina, H., . . . Baba-Moussa, L. (2022). Formulation of Biostimulants Based on Arbuscular Mycorrhizal Fungi for Maize Growth and Yield. *Frontiers in Agronomy*, 1-15. doi:<https://doi.org/10.3389/fagro.2022.894489>
- Akbar, M., Chohan, S., Yasin, N., Ahmad, A., Akram, W., & Nazir, A. (2023). Mycorrhizal inoculation enhanced tillering in field grown wheat, nutritional enrichment and soil properties. *PeerJ*, 11, e15686. doi:<https://doi.org/10.7717/peerj.15686>
- Alba, E. (16 de 1 de 2020). *Micorrizas ; qué son y cómo se reproducen*. Obtenido de simientedisidente: <https://simientedisidente.com/2020/micorrizas-que-son-y-como-se-reproducen>
- Anckaert, A., Declerck, S., Poussart, L., Lambert, S., Helmus, C., Boubsi, F., . . . Ongena, M. (2023). Deciphering the biology and chemistry of the mutualistic partnership between *Bacillus velezensis* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *Current Biology*, 1- 48. doi:<https://doi.org/10.1101/2023.10.28.564539>
- Arocha-Rodríguez, M., Pérez-Ortega, E., Fernández-Suárez, K., & Rodríguez-Yong, Y. (2023). Efecto de un fungicida sistémico en el establecimiento de Hongos Micorrizógenos Arbusculares en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.). *Cultivos Tropicales*, 1-10. Obtenido de <https://ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/view/1655>
- Awad , A., & Pena, R. (2023). An improved method for extraction of soil fungal mycelium. *MethodsX*, 11, 102477. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mex.2023.102477>
- Bahukhandi, D. (2023). Mycorrhiza and its Applications in Agriculture and Forestry. En S. J. Ashutosh Gupta, *Industrial Applications of Soil Microbes* (págs. 1- 48). Bentham Science Publishers . doi:10.2174/9789815079753124030004

- Bisht, A., & Gupta, M. (2023). Arbuscular Mycorrhiza Fungi Resources for Sustainable and Climate-Smart Cultivation of Maize. En I. R. Singh, *Fungal Resources for Sustainable Economy* (págs. (pp. 299-317)). Singapore: Springer. doi:10.1007/978-981-19-9103-5\_11
- Bolaños, M., & Luna, L. (2007). *Las Micorrizas: Una Opcion Sostenible De Manejo De Suelos Y Nutricion De Plantas*. Bogota: AGROSAVIA. Obtenido de <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/1122>
- Brundrett, M. (2008). *MYCORRHIZAL ASSOCIATIONS: The Web Resource*. Obtenido de Section 10. METHODS FOR IDENTIFYING MYCORRHIZAS: <https://mycorrhizas.info/method.html>
- Camargo Gomes, S. (2017). *Crescimento e absorção de fósforo em mudas de Mimosa scabrella inoculadas com isolados de Rhizophagus clarus em substrato contendo rejeito de mineração de carvão*. Tesis de grado, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Obtenido de <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/174482>
- Caviedes, M., Carvajal-Larenas, F., & Zambrano, J. (2022). Tecnologías para el cultivo de maíz (*Zea mays*. L). *ACI Avances en Ciencias e Ingeniería*, 14, 2588. doi:<https://doi.org/10.18272/aci.v14i1.2588>
- Cervantes-Gámez, R., Peñuelas-Rubio, O., Araujo-Benard, N., Fierro-Coronado, R., Trejo-Aguilar, D., Maldonado-Mendoza, I., & Cordero-Ramírez, J. (2021). Diversidad de hongos micorrízicos arbusculares asociados a plantas voluntarias de maíz en suelos de transición: ecosistema natural - uso agrícola. *Scientia Fungorum*, 51, e1330. doi:<https://doi.org/10.33885/sf.2021.51.1330>
- Coral - Valenzuela, J., Andrade - Bolaños, H., Pumisacho - Gualoto, M., Caicedo - Chávez, J., & Salazar - Vizúete, D. (2020). Caracterización morfológica y agronómica de dos genotipos de maíz (*Zea mays* L.) en la zona media. *ACI Avances en Ciencias e Ingenierías*, 11, 40- 49. doi:<https://doi.org/10.18272/aci.v11i1.1091>
- de Santana, A. S., Cavalcante, U., de Sa Barreto, E., & Costa Maia, L. (2014). Production, storage and costs of inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). *Brazilian Journal of Botany*, 37, 159-165. doi:10.1007/s40415-014-0056-3
- Delgado-Ruiz, F., Guevara-Hernández, F., & Acosta-Roca, R. (2018). Criterios campesinos para la selección de maíz (*Zea mays* L.) en Villaflores y Villa Corzo, Chiapas, México. *CienciaUAT*, 13, 123 - 134. Obtenido de

[https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-78582018000200123](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-78582018000200123)

- Dhiman , M., Sharma, L., Kaushik, P., Singh, A., & Sharma, M. (2022). Mycorrhiza: An Ecofriendly Bio-Tool for Better Survival of Plants in Nature. *Sustainability*, *14*, 10220. doi:<https://doi.org/10.3390/su141610220>
- Escobar, M. (13 de Enero de 2021). *Inicio de siembra de maíz en el cantón Pindal*. Obtenido de Colectivo prodh derechos humanos: <https://www.prodh.org/2021/01/13/inicio-de-siembra-de-maiz-en-el-canton-pindal/>
- FAO. (2020). *Comité Forestal: Documento de posición sobre “restauración de los de los ecosistemas” relativo de los ecosistemas de producción, en el contexto del decenio de las naciones unidas sobre la restuaracion de los ecosistemas (2021-2930)*. Obtenido de <https://www.fao.org/3/nd651es/nd651es.pdf>
- González - Osorio, H., Botero - Carmenza, G., Rivera - Medina, R., & Vega, N. (2020). Screening for phosphate-solubilizing fungi from colombian andisols cultivated with coffee (*Coffea arabica* L.). *Coffe Science*, *15*, e151666. doi:<https://doi.org/10.25186/v15i.1666>
- González Ramírez, G., & Pupo Feria, C. (2017). Aplicación de micorrizas: alternativa ecológica para la disminución o sustitución de fertilizantes químicos en el cultivo del maní. *DELOS: Desarrollo Local Sostenible*, *10(29)*, 15. Obtenido de <https://ojs.revistadelos.com/ojs/index.php/delos/article/view/636>
- Hao , S., Tian, Y., Lin, Z., Xie, L., Zhou, X., & Bañuelos, G. (2024). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the reduction of arsenic accumulation in plants: a meta-analysis. *Frontiers in Plant Science*, 1-13. doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1327649>
- Haug, Haug, I., Setaro, S., & Suárez, P. (2021). Global AM fungi are dominating mycorrhizal communities in a tropical premontane dry forest in Laipuna, South Ecuador. *Mycological Progress*, *20*, 837–845. doi:<https://doi.org/10.1007/s11557-021-01699-4>
- Haug, I., Setaro, S., & Suárez, J. (2019). Species composition of arbuscular mycorrhizal communities changes with elevation in the Andes of South Ecuador. *PLoS One*, *14(8)*, e0221091. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221091>

- Hoyos, F., Candelo-Becerra, J., & Chavarria, H. (2019). Automation of pesticide-free cilantro aeroponic crops. *INGE CUC*, *15*, 123- 132. doi:<https://doi.org/10.17981/ingecuc.15.1.2019.01>
- INVAM. (2024). *Acaulospora colombiana*. Obtenido de Invam: <https://invam.ku.edu/colombiana>
- INVAM. (2024). *Gigaspora rosea*. Obtenido de Invam: <https://invam.ku.edu/rosea>
- INVAM. (2024). *Rhizophagus clarus*. Obtenido de Invam: <https://invam.ku.edu/clarus>
- INVAM. (2024). *Rhizophagus irregularis*. Obtenido de Invam: <https://invam.ku.edu/irregularis>
- Khan, A., & Mohammad, A. (2022). Mass production of arbuscular mycorrhizal fungus inoculum and its use for enhancing biomass yield of crops for food, for in situ nano-phyto-mycorrhizo remediation of contaminated soils and water, and for sustainable bioenergy production. En M. Policarpo, R. Bhat, & G. Dar, *Nanotechnology for Environmental Pollution Decontamination* (pág. 16). Nueva York: Apple Academic Press. doi:<https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1774504>
- Kumar - Shanmugam, M., Mandari , V., Kumar - Devarai , S., & Gummadi , S. (2022). Chapter 1 - Types of bioreactors and important design considerations. En R. Sirohi, A. Pandey, M. Taherzadeh, & C. Larroche, *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (págs. 3- 30). Elsevier. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91167-2.00008-3>
- Kumari, S., & Prabina, B. (2017). Storage Life of Arbuscular Mycorrhizal Fungal (AMF) Inoculum in Vermiculite Based Culture. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, *2*(3), 1281-1287. doi:<http://dx.doi.org/10.22161/ijeab/2.3.33>
- Lies, A., Delteil, A., Prin, Y., & Duponnois, R. (2018). Using Mycorrhiza Helper Microorganisms (MHM) to Improve the Mycorrhizal Efficiency on Plant Growth. En V. Meena, *Role of Rhizospheric Microbes in Soil* (págs. 277-298). Singapore: Springer. doi:10.1007/978-981-10-8402-7\_11
- Liu, Y., Ma, C., Lakshmanan, P., Wang, G., & Li, C. (2024). Phosphorus solubilizing bacteria rather than arbuscular mycorrhizal fungi drive maize/faba bean intercropping advantages. *Plant and Soil*. doi:<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4522067/v1>

- ManojKumar, A., & Kalpana, N. (13 de 11 de 2023). *Rapid Staining Technique for Visualizing Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) Colonization in Legume Roots v1*. doi:10.17504/protocols.io.rm7vzx1oxgx1/v1
- Montejo-Martínez, D., Casanova-Lugo, F., García-Gómez, M., Oros-Ortega, I., Díaz-Echeverría, V., & Morales-Maldonado, E. (2018). Respuesta foliar y radical del maíz a la fertilización biológica-química en un. *Agron. Mesoam*, 29(2), 325-341. doi:doi:10.15517/ma.v29i2.29511
- Olivera Thlales, C., Rodrigues, J., Rezende, L., Gouveia, G., Santos, S., Prado, T., . . . Costa, A. (2022). The arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus* improves physiological tolerance to drought stress in soybean plants. *Sci Rep*, 12, 9044. doi:10.1038/s41598-022-13059-7
- Paliwal, R. (5 de 05 de 2001). Introducción al maíz y su importancia. En R. Paliwal, G. Granados, H. Lafitte, & A. Violic, *EL MAÍZ EN LOS TRÓPICOS: Mejoramiento y producción*. Dirección de Producción y Protección Vegetal de la FAO. Obtenido de fao.org: <https://www.fao.org/3/x7650s/x7650s02.htm>
- Prisa, D. (2023). Mycorrhizal symbioses and plant interactions. *Karbala International Journal of Modern Science*, 9, 6. doi:<https://doi.org/10.33640/2405-609X.3296>
- Raji Mol, R., Karthika, K., Philip, P., & Chadrakala, M. (2024). Soil Mycorrhiza: Overview, Evolution, Agricultural, and Commercial Applications. En A. Gupta, S. Jain, & N. Verma, *Industrial Applications of Soil Microbes* (Vol. 3, págs. 149-160). Betham Science. doi:10.2174/9789815079753124030011
- Ramírez-Flores, M., Perez-Limon, S., Barrales-Gamez, M., Olalde-Portugal, V., & Sawers, R. (2020). The genetic architecture of host response reveals the importance of arbuscular mycorrhizae to maize cultivation. *elife*, 9, e61701. doi:<https://doi.org/10.7554/eLife.61701>
- Rombe, Y., Husna, H., Danu - Tuheteru, F., & Arif, A. (2022). Production of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Spores (AMF) *Glomus Coronatum* and *Glomus Claroideum* With Ab Mix Nutrition. *Journal of Tropical Mycorrhiza*, 1(2), 87-98. doi:<https://doi.org/10.58222/jtm.v1i2.33>
- Ruíz, P., Rojas, K., & 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. Obtenido de <https://revistas.pucp.edu.pe/index.php/espacioydesarrollo/article/view/3479>

- Santana, L., Silva, L., Tavares, G., Batista, P., Rodrigues - Cabral, J., & Souchie, E. (2023). Arbuscular mycorrhizal fungi associated with maize plants during hydric deficit. *Sci Rep*, 13(1), 1519. doi:10.1038/s41598-023-28744-4
- Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. (2020). *Micorriza, una alternativa sustentable de fertilización*. Obtenido de Gobierno de Mexico: [https://www.gob.mx/agricultura/articulos/micorriza-una-alternativa-sustentable-de-produccion#:~:text=Las%20micorrizas%20\(del%20griego%20myces,fertilizante%2C%20mejorando%20la%20producci%C3%B3n%20agr%C3%ADcola](https://www.gob.mx/agricultura/articulos/micorriza-una-alternativa-sustentable-de-produccion#:~:text=Las%20micorrizas%20(del%20griego%20myces,fertilizante%2C%20mejorando%20la%20producci%C3%B3n%20agr%C3%ADcola).
- Selvakumar, G., Kim, K., Walitang, D., Chanratana, M., Kang, Y., Chung, B., & Sa, T. (2016). Trap Culture Technique for Propagation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi using Different Host Plants. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, 49(5), 608-613. doi:<https://doi.org/10.7745/KJSSF.2016.49.5.608>
- Serralde O, A., & Ramírez G, M. (2004). Análisis de poblaciones micorrizas en maíz (*Zea mays*) cultivado en suelos ácidos bajo diferentes tratamientos agronómicos. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 4(1), 31- 40. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/4499/449953025004.pdf>
- Serratos, J. (2009). *El origen y la diversidad del maíz en el continente americano*. México: Greenpeace México. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/303571504\\_El\\_origen\\_y\\_la\\_diversidad\\_del\\_maiz\\_en\\_el\\_continente\\_americano](https://www.researchgate.net/publication/303571504_El_origen_y_la_diversidad_del_maiz_en_el_continente_americano)
- Srivastava, S., Conlan, X., Cahill, D., & Adholeya, A. (2016). Rhizophagus irregularis as an elicitor of rosmarinic acid and antioxidant production by transformed roots of *Ocimum basilicum* in an in vitro co-culture system. *Mycorrhiza*, 26(8), 919-930. doi:10.1007/s00572-016-0721-4
- Symborg. (2023). *Micorrizas, el aliado imprevisible para un cultivo extra eficiente*. Obtenido de Symborg Supera tus retos: <https://symborg.com/es/que-son-las-micorrizas/#:~:text=Veamos%20cu%C3%A1les%20son%20las%20etapas,interiormente%20entre%20los%20espacios%20intercelulares>.
- Tang, N., San Clemente, H., Roy, S., Bécard, G., Zhao, B., & Roux, C. (2016). A Survey of the Gene Repertoire of *Gigaspora rosea* Unravels Conserved Features among Glomeromycota for Obligate Biotrophy. *Frontiers in Microbiology*, 7 - 333. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00233>

- Torres, M. (2016). *Manual para la producción de cultivos aeropónicos*. Alajuela. Obtenido de <https://repositorio.utn.ac.cr/items/2ba1c7c5-3452-462c-8cd1-91c1afcaba53>
- Urgiles Gómez, N., Lalangui Zhingre, C., Chamba Quiñonez, E., Loján Armijos, P., Poma López, L., Encalada Cordova, M., & Aguirre Mendoza, N. (2019). Aislamiento y caracterización morfológica de Hongos Micorrízicos. *CEDAMAZ*, 9(1), 1-7. Obtenido de <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/700>
- Vázquez-Santos, Y., Castillo-Argüero, S., Montaña, N., Espinosa-García, F., Flores-Ortiz, C., & Martínez-Orea, Y. (2024). Arbuscular mycorrhizal fungi affect early phenological stages of three secondary vegetation species in a temperate forest. *Plant Ecology*, 14. doi:<https://doi.org/10.1007/s11258-024-01448-z>
- Vu, K., Blumwald, E., & Gelli, A. (2021). The Antifungal Activity of HMA, an Amiloride Analog and Inhibitor of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchangers. *Frontiers in Microbiology*, 12, 673035. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.673035>
- Vurukonda, S., Fotopoulos, V., & Saeid, A. (2023). Production of a Rich Fertilizer Base for Plants from Waste Organic Residues by Microbial Formulation Technology. *Microorganisms*, 12(3), 541. doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms12030541>
- Wang, Q., Liu, M., Wang, Z., Li, J., Liu, K., & Huang, D. (2024). The role of arbuscular mycorrhizal symbiosis in plant abiotic stress. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1323881. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1323881>
- Wilches - Ortiz, W., Ramírez - Gómez, M., Pérez - Moncada, U., Serralde - Ordoñez, D., Peñaranda - Rolon, A., & Ramírez, L. (2019). Asociación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) con plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) para la producción de panela en Colombia. *Terra Latinoam*, 37(2), 75-184. doi:<https://doi.org/10.28940/terra.v37i2.481>
- Wilkes, T. (2023). Alternative inks for arbuscular mycorrhizal root staining. *Access Microbiology*, 1- 8. doi:<https://doi.org/10.1099/acmi.0.000618.v1>
- Zhang, X., Wang, Z., Lu, Y., Wei, J., Qi, S., Wu, B., & Cheng, S. (2024). Sustainable Remediation of Soil and Water Utilizing Arbuscular Mycorrhizal Fungi: A Review. *Microorganisms*, 12(7), 1255. doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms12071255>

## ANEXOS

### Anexo A: Registro fotográfico

*Figura A1* Panorámica de la zona de estudio



*Figura A2* Lugar de extracción de suelo de cultivo de maíz



*Figura A3* Recolección muestras de suelo



**Figura A4** Recolección muestras de suelo rizosférico



**Figura A5** Preparación de muestras



**Figura A6** Pesar la muestra



**Figura A7** Diluir la muestra de suelo



**Figura A8** Centrifugación de la muestra diluida



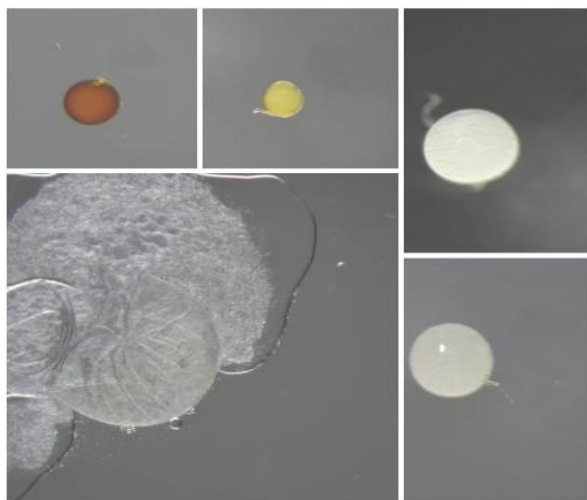
**Figura A9** Se vierte las esporas de HMA para visualizar en estereomicroscopio



**Figura A10** Visualización de algunas esporas de HMA



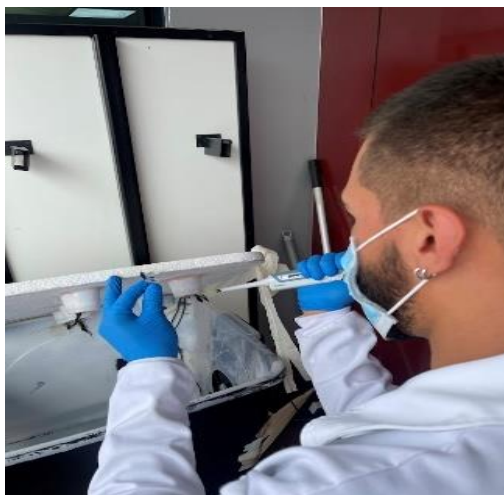
**Figura A11** Esporas obtenidas para su desinfección



**Figura A12** Desinfección de los HMA para su inoculación



**Figura A13** Inoculación de los HMA en la caja aeropónica en el cultivo de acelga



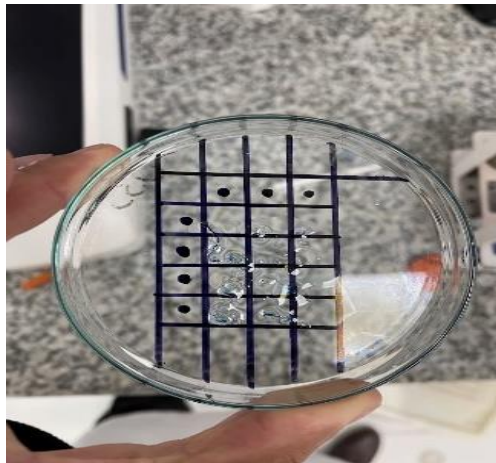
**Figura A14** Corte de las raíces de las plantas de acelga para las tinciones



**Figura A15** Tinciones de raíces siguiendo el protocolo



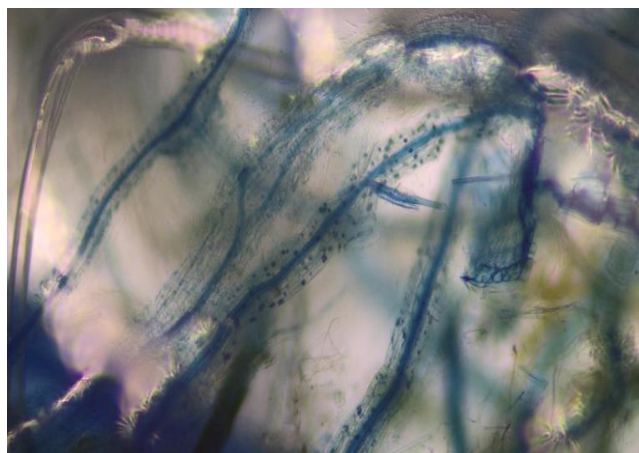
**Figura A16** Se coloca las raíces en una cuadrícula para visualizar estereomicroscopio para su conteo



**Figura A17** Conteo de esporas de HMA inoculados en las raíces en la cuadrícula



**Figura A18** Visualización de raíces micorrizadas



## Anexo B

Se detallan en las tablas, el análisis físico-químico del suelo

**Tabla B1a.**

Fecha	Nombre Muestra	Sitio	Coordenadas	Coordenadas UTM	Fecha de Muestreo	Observaciones	Tratamiento del Suelo	Laboratorio	pH	Conductividad Eléctrica mmhos/cm	Conductividad Eléctrica S/m
1/2/2024	PINDAL P1 PP1 FEB 24	Pindal p1	0598216 / 9547005	-4.09938. - 80.11425	1-feb-24	cambio de cultivo a café	sembrio café	Pindal p1	5,9	0,23	0,023
	PINDAL P2 PP2 FEB 24	Pindal p2	0598216 / 9547005	-4.09938. - 80.11425	1-feb-24		aun no sembrado	Pindal p2	5,9	0,18	0,018
	la cabina p1 lcp1 feb 24	La Cabina p1	0567304 / 9549353	-4.075220. - 80.393640	8-feb-24	siembra 29 enero	siembra	La Cabina p1	4,9	0,91	0,091
Fecha	Nombre Muestra	Sitio	Coordenadas	Coordenadas UTM	Fecha de Muestreo	Observaciones	Tratamiento del Suelo	Laboratorio	pH	Conductividad Eléctrica mmhos/cm	Conductividad Eléctrica S/m
1/2/2024	la cabina p2 lcp2 feb 24	La Cabina p2	567253 / 9549536	-4.075185. - 80.394101	8-feb-24	se movió el sitio de la parcela porque estaban estacas caídas	siembra	La Cabina p2	5,4	0,31	0,031
	Imp1 feb 24	la manga p1	0576099 / 9533164	-4.221540. - 80.314290	8-feb-24	aplicación de mata semilla, kuik 900, fuerza verde	fumigación	la manga p1	6,7	0,25	0,025
	Imp2 feb 24	la manga p2	576632 / 9533426	-4.220855. - 80.309478	8-feb-24	aplicación de mata semilla, kuik 900, fuerza verde	fumigación	la manga p2	6,8	0,24	0,024

**Tabla B1b.** Análisis de la continuación de la tabla

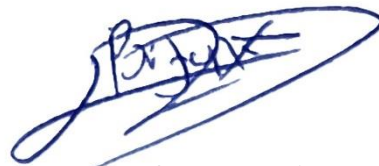
Fecha	Materia Orgánica % oxidación vía húmeda	Materia Orgánica % walkley and black	Fosforo ppm	Potasio meq/100mL	Calcio meq/100mL	Magnesio meq/100mL	Azufre ppm	Zinc ppm	Sodio meq/100mL	Al+H meq/100mL	Hierro ppm	Manganeso ppm
1/2/2024	2,02	2,62	5	0,1	18,82	3,05	4,4	4,3	0,04		69,6	26,2
	1,38	1,79	0,8	0,09	18,73	3,86	3,2	2,2	0,04	1	42,5	24,4
	1,36	1,77	3,6	4,1	5,878	1,6	7,7	3,4	0,04	1	275,7	13,5
Fecha	Materia Orgánica % oxidación vía húmeda	Materia Orgánica % walkley and black	Fosforo ppm	Potasio meq/100mL	Calcio meq/100mL	Magnesio meq/100mL	Azufre ppm	Zinc ppm	Sodio meq/100mL	Al+H meq/100mL	Hierro ppm	Manganeso ppm
1/2/2024	1,08	1,4	2,8	0,52	4,4	1,29	11,7	2,1	0,03		414,5	15,6
	0,65	0,84	0,7	0,12	17,73	6,35	9,2	1,4	0,04		5,1	5,1
	0,43	0,56	1,28	0,07	19,19	5,56	6,4	1,1	0,04		3	6,8

**Tabla B1c.** Análisis de la continuación de la tabla

Fecha	Boro ppm	Amonio ppm	CICE meq/100mL	Calcio / Magnesio	Magnesio / Potasio	(Ca + Mg) / Potasio	Hierro/Magnesio	Cobre ppm	Arena	Limo	Arcilla	Clase textural
1/2/2024	0,39	30,5	22,01	6,17	30,5	218,7	3,65	6,5	18	52	30	arcilloso
	0,22	22,7	22,72	4,85	42,88	251	1,74	3,1	24	46	30	arcilloso
	1,36	65,6	12,52	3,361	0,39	1,8	20,42	1,6	46	30	24	franco arcilloso arenoso
Fecha	Boro ppm	Amonio ppm	CICE meq/100mL	Calcio / Magnesio	Magnesio / Potasio	(Ca + Mg) / Potasio	Hierro/Magnesio	Cobre ppm	Arena	Limo	Arcilla	Clase textural
1/2/2024	0,09	61,7	7,24	3,41	2,48	10,94	26,57	2,2	56	26	18	franco arcilloso arenoso
	0,14	10,9	24,24	2,79	52,91	200,66	1	2	36	36	28	franco arcilloso
	0,06	10,9	24,86	3,45	79,42	353,57	0,44	1,2	42	28	30	franco arcilloso

**Bryan Xavier Quezada Figueroa** portador de la cédula de ciudadanía N° **0107337743**. En calidad de autor y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación **“Producción de esporas de hongos micorrízicos arbusculares utilizando un método de plantas trampa mediante un sistema aeropónico ”** de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizo además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, **05 de septiembre de 2024**



**Bryan Xavier Quezada Figueroa**

**C.I. 0107337743**