

MULTIPLICACIÓN MASIVA DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES DE SUELOS CULTIVADOS CON CACAO

Geomar Vallejos-Torres^{1*2}, Miguel A. Tenorio-Cercado¹, Nery Gaona-Jimenez¹, Mike A. Corazon-Guivin², Javier Ormeño Luna², Christopher I. Paredes², Jorge Saavedra³, Juan C. Tuesta³, Oscar A. Tuesta³, M.M. Alguacil⁴, Alejandra G. Becerra⁵ y César Marín⁶

RESUMEN

La multiplicación de esporas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) es una limitante para las aplicaciones agrícolas como biofertilizantes. En el presente estudio se realizó la multiplicación masiva de HMA procedentes de fincas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la región de San Martín, Perú, para optimizar su manejo y producción de esporas en condiciones ambientales controladas. Se diseñó un experimento en condiciones de invernadero, con un diseño completamente al azar, considerando tres fuentes de inóculo de HMA obtenidas en las provincias de Mariscal Cáceres, Lamas y Rioja, en dos periodos de tiempo (110 y 220 días) y dos cultivos hospedantes (maíz y arroz). Este material fue mezclado con un volumen de arena y tres de tierra agrícola, que fueron colocadas en cajones; transcurrido el periodo de tiempo se evaluó la población de esporas, colonización micorrízica, altura de la planta hospedante y peso seco de la parte aérea y de la raíz. La multiplicación de HMA a los 220 días, proveniente de Mariscal Cáceres usando arroz como planta hospedante, demostró ser la más adecuada para la multiplicación de los HMA. El arroz actuó como un huésped adecuado y pudo multiplicar un mayor número de esporas. Se concluye que esta combinación puede ser utilizada como una metodología de propagación masiva de HMA debido a su gran capacidad para reproducirse.

Palabras clave adicionales: Géneros de HMA, inóculo, multiplicación masiva, *Oryza sativa*, periodo de inoculación, *Zea Mays*

ABSTRACT

Multiplication of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from cocoa cultivated soils

The multiplication of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) spores is a limitation for agricultural applications as biofertilizers. In the present study, a massive multiplication of AMF from cocoa farms (*Theobroma cacao* L.) in the San Martín region, Peru, was carried out to optimize their handling and spore production under controlled environmental conditions. The experiment was conducted under greenhouse conditions in a completely randomized design, considering three sources of AMF inoculum obtained in the provinces of Mariscal Cáceres, Lamas and Rioja, in two periods (110 and 220 days) and two host crops (maize and rice). This material was mixed with one volume of sand and three volumes of agricultural soil, which were placed in crates. At the end of the periods, the population of spores, mycorrhizal colonization, height of the host plant, and the dry weight of the aerial part and root were evaluated. Rice acts as a suitable host and multiplies a greater number of AMF spores. The treatment based on the mycorrhizal inoculum from Mariscal Cáceres multiplied with rice plants at 220 days, presented the highest population of spores. Therefore, it could be used as a methodology for massive propagation of AMF due to its great reproduction capacity.

Additional keywords: AMF genera, inoculum, massive multiplication, *Oryza sativa*, *Zea Mays*

INTRODUCCIÓN

Recibido: Noviembre 5, 2021

Aceptado: Abril 14, 2022

¹ Universidad Católica Sedes Sapientiae, Lima, Perú. e-mail: gvallejost@gmail.com (autor de correspondencia); tenoriocercado@gmail.com; nerygaonajimenez@gmail.com

² Universidad Nacional de San Martín, Morales, Perú. e-mail: javierol@unsm.edu.pe; macorazong@unsm.edu.pe; christopherivanparedessanchez@gmail.com

³ Universidad Nacional Autónoma de Alto Amazonas, UNAAA, Loreto, Alto Amazonas, Yurimaguas. e-mail: jsaavedrar@unaaa.edu.pe; jtuesta@unaaa.edu.pe; otuesta@unaaa.edu.pe

⁴ Dpto. Conserv. Suelos y Agua. Campus Universit. Espinardo, Murcia, España. e-mail: mmalguacil@cebas.csic.es

⁵ Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. e-mail: abecerra@unc.edu.ar

⁶ Centro de Investigación e Innovación para el Cambio Climático, Universidad Santo Tomás, Máfil, Chile. e-mail: cmarind@santotomas.cl

El cacao es uno de los principales cultivos agrícolas que genera ingresos para el pueblo peruano y otros países del mundo, en Perú representa un sustento de medio de vida para pequeños productores que buscan un desarrollo sostenible (ICO, 2014; Moreno et al., 2020) como resultado de la productividad del suelo y los cultivos, al tiempo que se conservan los ecosistemas y la biodiversidad (Muthukumar y Udaiyan, 2002; Ijdo et al., 2010). En diversas ocasiones, la sostenibilidad se ve amenazada por malas prácticas agrícolas debido al uso exagerado de fertilizantes químicos. Una forma potencial de reducir este impacto negativo, se basa en el uso de los microorganismos del suelo como es el caso de los hongos HMA, que forman una asociación mutualista con las raíces de la mayoría de las plantas hospedantes, aumentando la biodisponibilidad de nutrientes clave para los cultivos, restableciendo la fertilidad del suelo, reduciendo el impacto negativo de los fertilizantes químicos en el ambiente (Rashid et al., 2016). Por tanto, los HMA pueden incrementar el crecimiento y la productividad de las plantas (Klironomos, 2003; Smith y Read, 2008).

La producción masiva de esporas de HMA siempre ha sido una limitante para la aplicación y uso permanente en diversos cultivos, particularmente en el caso del desarrollo de plantones de cacao con alta calidad selectiva. Las dificultades para obtener grandes cantidades de inóculo de HMA y la explotación comercial todavía está en investigación inicial (Kadian et al., 2013). Las poblaciones de esporas de HMA en cantidad y calidad, dependen de las diferentes prácticas de su propagación, cultivos de procedencia, características de los suelos de los inóculos, las condiciones ambientales, sustratos y tipo de hospedante (Kadian et al., 2018). El método de multiplicación en macetas con cultivos hospedero y suelo, es ampliamente utilizado por estar al alcance de los productores cacaoteros y especialmente por ser natural y menor costo, con capacidad de producir grandes cantidades de inóculos altamente eficientes en la colonización micorrízica de las raíces de las plantas (Schlemper y Stürmer, 2014; Selvakumar et al., 2018). Los hospedantes, son otro de los factores importantes para la multiplicación masiva de los hongos, razón por la cual la eficiencia de la propagación de micorrizas varía según la planta huésped utilizada

(Gaur y Adholeya, 2002).

Este trabajo de investigación se llevó a cabo a partir de suelos rizosféricos obtenidos de tres fincas de cacao procedentes de tres provincias de la región de San Martín. Los propágulos procedentes de dichos suelos fueron, multiplicados en condiciones de vivero empleando como cultivos hospederos maíz y arroz, con el objetivo de obtener una producción masiva de esporas de HMA procedentes de fincas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la región San Martín, Perú.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. El estudio de multiplicación masiva de HMA y las evaluaciones morfológicas de las plantas hospedantes se llevó a cabo en el invernadero experimental de la Universidad Católica Sedes Sapientiae (UCSS), provincia de Rioja y región de San Martín (Perú), con coordenadas geográficas de 5°56' S y 77°18' W, a una altitud de 870 msnm.

Recolección de muestras de suelo. Se identificaron tres zonas productoras de cacao en las provincias de Mariscal Cáceres, Lamas y Rioja con altitudes de 329, 702 y 905 msnm respectivamente, y edades entre 7 a 9 años. Estas parcelas estuvieron asociadas a árboles de sombra como *Calycophyllum spruceanum*, *Guazuma crinita*, *Schizolobium amazonicum*, *Musa paradisiaca* e *Inga edulis* y presentaban un sistema de manejo orgánico con aplicación de compost a plantas de cacao a razón de 2 kg por año. Previo a la toma de suelo rizosférico con esporas de HMA se realizaron ensayos preliminares para corroborar la presencia micorrízica; por lo tanto, se colectaron tres muestras de suelo de la rizósfera por cada provincia. Los suelos rizosféricos colectados en cada provincia fueron caracterizados para determinar sus propiedades físicas y químicas (Cuadro 1). Cada muestra rizosférica se recolectó en bolsas de cloruro de polivinilo esterilizadas, a razón de 33 kg considerando un radio de 30 cm del tallo de la planta de cacao y una profundidad de 20 cm (Vallejos et al., 2019, 2022) y se transportó inmediatamente al laboratorio donde se conservó en refrigeración a 4 °C hasta su uso. El recuento inicial de esporas en las muestras se evaluó utilizando el método de tamizado húmedo

y decantación propuesto por Daniels y Skipper (1982), seguido por el método de centrifugación de sacarosa según la metodología de Utobo et al. (2011).

Se instalaron dieciocho cajas de madera, con dimensiones de 0.4 m de ancho, 0,6 m de largo y 0.30 m de altura, cubiertas con plástico negro.

Cada tratamiento estuvo compuesto por 27,5 kg de una mezcla homogénea (sustrato) de 16,5 kg de suelo rizosférico y 11 kg de arena esterilizada en autoclave (131 °C y 1,5 MPa durante 2 horas). Cada repetición contenía 5.500 g de inóculos de HMA (Cuadro 2).

Cuadro 1. Caracterización de los sustratos empleados en la multiplicación de HMA

Procedencia del sustrato	pH	C.E. (dS·m ⁻¹)	MO (%)	N (%)	P (mg·kg ⁻¹)	K (mg·kg ⁻¹)	CIC (cmol·kg ⁻¹)
Mariscal Cáceres	6,70	0,25	2,31	0,10	5,27	100,50	23,77
Lamas	5,99	0,09	3,85	0,18	6,78	143,50	23,27
Rioja	6,01	0,09	4,20	0,19	19,18	43,00	19,02

Cuadro 2. Procedencia de inóculos utilizados en el estudio y recuento inicial de esporas de los cultivos empleando 5.500 g·caja⁻¹ de inóculo en ambos cultivos

Procedencia del sustrato	Coordenadas geográficas	Conteo inicial de esporas en 100 g suelo
Mariscal Cáceres	6° 26' 18" S; 76° 47' 33" W	167,18 ± 29,31
Lamas	6° 26' 25" S; 76° 36' 40" W	173,72 ± 69,56
Rioja	5° 43' 23" S; 77° 29' 20" W	163,44 ± 11,35

Diseño experimental, preparación y caracterización de sustratos. Se utilizó un diseño completamente al azar, considerando tres fuentes de inóculo de HMA tomado de tres lugares distintos en las provincias de Mariscal Cáceres, Lamas y Rioja, dos cultivos hospederos (*O. sativa* y *Z. mays*) y dos periodos de siembra (110 y 220 días) con tres repeticiones. En total se llevaron a cabo doce tratamientos con tres repeticiones.

Instalación y multiplicación de HMA. De acuerdo a los tratamientos en estudio se sembraron 150 semillas de arroz variedad INIA y 150 semillas de maíz de la variedad Marginal por cada repetición, previamente desinfectadas con una solución de H₂O₂ al 10 % (v/v) durante 10 minutos. Después de 15 días de crecimiento, estas plantas se separaron a 75 por caja, se regaron regularmente en días alternos para cada periodo ensayado durante 80 días (Del Águila et al., 2018). Los siguientes 30 días se sometieron a estrés hídrico que consistió en retirar el agua en su totalidad hasta observar la mortandad del

hospedante, con la finalidad de estimular la multiplicación de los HMA, y se realizaron las evaluaciones correspondientes al primer periodo de 110 días. Posteriormente se aplicó un riego y se volvieron a sembrar las semillas en la cantidad mencionada anteriormente por un tiempo de 80 días y nuevamente se dejó en estrés hídrico por 30 días. Culminado el segundo periodo de 110 días adicionales, se procedió a evaluar la morfología de los cultivos hospedantes, conteo de las esporas, análisis de colonización micorrícica e identificación molecular de los tres inóculos de micorrizas arbusculares multiplicados.

Variables de medición. A los 110 y 220 días de instalado el ensayo, se determinó el crecimiento vegetativo de los cultivos hospedantes; para ello, las plantas fueron extraídas manualmente para medir su altura, y posteriormente, se lavaron con agua corriente, separando las raíces de los órganos aéreos, para determinar el peso seco luego de colocadas en un horno a 70 °C. El recuento de esporas de micorrizas arbusculares se calculó a partir de 20 g de suelo. El porcentaje de

colonización se determinó por el proceso de tinción de las raíces secundarias y terciarias de las plantas de los cultivos hospedantes (maíz y arroz), siguiendo la metodología propuesta por Phillips y Hayman (1970), con modificaciones. El proceso de evaluación de la colonización micorrízica se realizó según la metodología propuesta por Brundrett et al. (1996). La cuantificación de esporas de hongos micorrízicos arbusculares se realizó por tamizado húmedo y decantación, propuesto por Gerdemann y Nicholson (1963), con algunas modificaciones.

Caracterización molecular de HMA. Se realizó la caracterización de los tres consorcios de HMA multiplicados previamente en vivero. Las esporas se extrajeron de cada sustrato siguiendo el método de tamizado húmedo, decantación y centrifugación (Gerdemann y Nicholson, 1963). Posteriormente se realizó la extracción de ADN a partir de las esporas de cada consorcio independientemente, para su amplificación vía PCR, utilizando los primers SSUmAf/LSUmAr y SSUmCf/LSUmBr (~1500 bp, Krüger et al., 2009) y siguiendo la metodología empleada por Corazon et al. (2020). El programa PCR consistió en un paso de desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, hibridación a 58 °C por 45 segundos y elongación a 68 °C por 2 minutos, seguido de un paso final de calentamiento a 68 °C durante 10 minutos. Los fragmentos amplificados fueron confirmados por electroforesis, clonados al vector pCR 2.1 (Invitrogen) y transformados dentro de *Escherichia coli*. Los clones positivos secuenciados se depositaron en la base de datos National Centre for Biotechnology Information (NCBI) Genbank.

Las secuencias ribosomales obtenidas de los diferentes consorcios (SSU parcial, ITS, y LSU parcial) se alinearon con otras secuencias de micorrizas depositadas en el Genbank utilizando ClustalX (Larkin et al., 2007). Antes del análisis filogenético, el modelo de sustitución de nucleótidos se estimó usando Topali 2.5 (Milne et al., 2004). Se realizaron análisis bayesianos (dos ejecuciones en 2×10^6 generaciones, con una frecuencia de muestreo de 200 y un valor de burnin del 25 %) y de máxima verosimilitud (1000 bootstrap), en MrBayes 3.1.2 (Ronquist et al., 2003) y PhyML (Guindon y Gascuel, 2003), desde Topali 2.5, utilizando el modelo GTR+G.

Diseño experimental y análisis de datos. Los datos de infección de HMA y variables fisiológicas de la planta hospedante fueron evaluados mediante análisis de varianza y prueba de Tukey con un nivel de $P \leq 0,05$ de probabilidad de error, empleando el paquete estadístico InfoStat v. 2013 (Córdoba, Argentina).

RESULTADOS Y DISCUSION

Variables de crecimiento de las plantas hospedantes. El cultivo hospedante utilizado y el tiempo de propagación tuvieron efectos significativos en las tres variables de crecimiento de las plantas (altura, peso seco de plantas y de raíces) (Cuadro 3). La mayor altura de planta y peso de raíz se obtuvo con inóculos de HMA procedentes de Mariscal Cáceres, utilizando maíz como hospedero, después de 220 días de multiplicación, y alcanzando 80,0 cm y 2,67 g, respectivamente (Cuadro 4). Sin embargo, como un promedio general, el mayor peso de plantas secas fue obtenido con el inóculo de la provincia de M. Cáceres (4,82 g), mientras que, entre los hospederos, el mayor valor para esta variable fue para el maíz (6,95 g); y en cuanto al tiempo de propagación, el mayor valor promedio se logró a los 220 días (4,39 g) (Cuadro 5). Kadian et al. (2018) también observaron un incremento significativo en la colonización utilizando sorgo y cáscara de garbanzo como sustrato. El arroz actúa como un huésped adecuado para aumentar la densidad de los inóculos de HMA, debido a su corta vida útil y buena arquitectura de la raíz, ya que son especies micotróficas obligadas, que se colonizan fácilmente por muchas especies de HMA (Chaiyasen et al., 2017). Resultados similares fueron obtenidos por Kadian et al. (2019) en un estudio donde se utilizó cebada como planta huésped.

Se evidenció que, aunque los dos cultivos hospedantes inoculados con HMA produjeron esporas de hongos y sus raíces fueron colonizadas, se obtuvieron diferencias en los consorcios de HMA. Es decir, el hospedero vegetal y el tipo de suelo, ejercieron una influencia significativa sobre la capacidad de esporulación e infección de los HMA. El suelo proveniente de Mariscal Cáceres después de 220 días de iniciada la multiplicación, fue el que mejor resultados presentó ya que se obtuvo mayor capacidad de esporulación y

colonización de raíces. Por tanto, este método podría ser el más rentable para producir grandes cantidades de inóculo altamente eficiente para los

productores de Rioja, Lamas y Mariscal Cáceres (Schlemper y Stürmer, 2014; Selvakumar et al., 2018).

Cuadro 3. Probabilidad de encontrar diferencias estadísticas para los factores de lugar, planta hospedante y tiempo de propagación, y sus interacciones, sobre la infección con HMA y el crecimiento de la planta, durante la multiplicación masiva del hongo

Factores	Número de esporas	Colonización (%)	Altura de planta (cm)	Peso seco de planta (g)	Peso seco de la raíz (g)
Lugar	≤0,0001**	0,1537 ns	0,2201 ns	0,0001**	0,0865 ns
Planta hospedante	0,018*	0,0389*	≤0,0001**	≤0,0001**	≤0,0001**
Tiempo de propagación (días)	≤0,0001**	0,0427*	≤0,0001**	0,0327*	0,0005**
Lugar*Planta hospedante	≤0,0001**	0,5762 ns	0,0421*	≤0,0001**	0,0012**
Lugar*Tiempo de propagación (días)	≤0,0001**	0,9623 ns	0,1431 ns	0,0525 ns	0,0222*
Planta hospedante*Tiempo de propagación (días)	0,0058**	0,9826 ns	0,6302 ns	0,1097 ns	0,0352*

** : altamente significativo; * : significativo; ns : no Significativo

Cuadro 4. Variables relativas a la infección con HMA y crecimiento de la planta hospedante en función de factores de lugar, planta y tiempo de propagación, durante la multiplicación masiva del hongo

Tratamientos	Infección de HMA		Variables morfológicas de la planta hospedante		
	Número de esporas	Colonización (%)	Altura de planta (cm)	Peso seco de planta (g)	Peso seco de la raíz (g)
Mariscal Cáceres + Arroz + 110 días	182,22 c	71,11 a	54,41d	1,42 d	0,71 b
Mariscal Cáceres + Arroz + 220 días	15.433,33 a	77,78 a	57,63 bcd	2,33 cd	0,82 b
Mariscal Cáceres + Maíz + 110 días	194,45 c	81,89 a	72,03 ab	7,24 a	2,31 a
Mariscal Cáceres + Maíz + 220 días	5.733,33 b	85,56 a	80 a	8,20 a	2,67 a
Lamas + Arroz + 110 días	222,22 c	75,78 a	55,47 d	0,98 d	0,53 b
Lamas + Arroz + 220 días	4250 b	81,11 a	71,8 ab	1,18 d	2,52 a
Lamas + Maíz + 110 días	337,78 c	78,22 a	70,13 abc	3,65 bc	1,68 ab
Lamas + Maíz + 220 días	5450 b	85,56 a	78,67 a	4,77 b	1,72 b
Rioja + Arroz + 110 días	227,78 c	70,44 a	56,27 cd	1,06 d	0,67 b
Rioja + Arroz + 220 días	2.886,67 b	74,44 a	61,43 bcd	0,37 d	0,72 b
Rioja + Maíz + 110 días	198,89 c	73,56 a	70,2 abc	8,35 a	1,53 ab
Rioja + Maíz + 220 días	3.693,33 b	78,89 a	76,67 a	9,37 a	2,16 a

Medias con letras distintas significan diferencias estadísticas según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$)

Recuento de esporas de HMA y colonización de HMA en la raíz. El cultivo hospedero utilizado y el tiempo de propagación tuvieron, adicionalmente, efectos significativos en el número de esporas de HMA y colonización de raíces, mientras que el lugar de origen del inóculo, influyó significativamente sobre el número de esporas que fue afectado por las interacciones de los tres factores estudiados (Cuadro 3). El mayor número de esporas de HMA se obtuvo con el inóculo procedente de la provincia de Mariscal

Cáceres, con arroz como hospedero después de 220 días de multiplicación, con un promedio de 15433.33 esporas en 100 g de suelo rizosférico (Cuadro 4); asimismo, la mayor colonización de raíces (85,56%) se logró con los inóculos procedentes de la misma provincia y de Lamas, usando maíz como hospedero y después de 220 días de multiplicación con el efecto combinado y un promedio de 80,55 % con el efecto simple (Cuadro 6), aunque no hubo diferencias significativas con la colonización en ninguno de

los tratamientos.

La eficacia del cultivo hospedero en la multiplicación de esporas depende ampliamente de las condiciones de la fuente de inóculo utilizada. Los resultados de este estudio mostraron que el arroz presentó condiciones favorables para la multiplicación de inóculo, ya que se obtuvieron los mayores valores en la población de esporas,

posiblemente debido a que tiene mayor densidad radical. Como ya se mencionó, esta gramínea tiene crecimiento rápido y un sistema radical extenso y ramificado (Bustamante y Zambrano, 2014), característico de plantas monocotiledóneas, por lo que son colonizadas fácilmente permitiendo así la amplia proliferación de vesículas en la raíz de la planta (Sharma et al., 2017).

Cuadro 5. Anova y prueba de Tukey de las variables significativamente diferentes de los factores lugar; planta hospedante y tiempo de propagación

Tratamientos	Peso seco de planta (g)
Lugar	
Mariscal Cáceres	4,82 a
Lamas	2,65 b
Rioja	4,79 a
Planta hospedante	
Arroz	1,22 b
Maíz	6,95 a
Tiempo de propagación (días)	
110 días	3,78 b
220 días	4,39 a

Medias con letras distintas significan diferencias estadísticas según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$)

Cuadro 6: Anova y prueba de Tukey de las variables significativamente diferentes de los factores de planta hospedante y tiempo de propagación

Tratamientos	Colonización (%)	Altura de planta (cm)
Factor: Planta hospedante		
Arroz	75,11 b	59,5 b
Maíz	80,61 a	74,62 a
Factor: Tiempo de propagación (días)		
110 días	75,16 b	63,08 b
220 días	80,55 a	71,03 a

Medias con letras distintas significan diferencias estadísticas según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$)

Por su lado, también se ha demostrado que al utilizar diferentes consorcios micorrícicos nativos, es probable que haya mayor cantidad de unidades de infección, que favorezcan el incremento de micorrización de las plantas (Prieto et al., 2011). Este hecho podría explicar la razón por la que en Mariscal Cáceres se obtuvo el mayor número de esporas de HMA. Covacevich et al. (2021) enfatizaron la importancia de combinar plantas hospedantes y ciclos de multiplicación de HMA; por su parte, Hernández et al. (2006) realizaron un estudio de inoculación micorrícica y su efecto en el crecimiento de dos leguminosas, *Acacia farnesiana* y *Prosopis glandulosa* en el cual

encontró una colonización entre 61,7 y 67,2 %; del mismo modo Sandoval (2019) obtuvo 72,89 % de colonización con *Centrosema macrocarpum*. Por tanto, de acuerdo a este estudio, usar cultivos hospederos incluidos en la familia Poaceae, es una buena estrategia para multiplicar propágulos de HMA en el suelo y por tanto producir inóculo, aunque las plantas sean distintas en género y especie.

En la correlación (Cuadro 7), se puede observar que no existen diferencias significativas en el número de esporas sobre las variables morfológicas; sin embargo, existió diferencia significativa de la colonización para la altura de

planta y peso de la raíz. Estas correlaciones se explicarían por los cambios de orden fisiológico y morfológico ocurridos en las plantas inoculadas a causa de la simbiosis con los HMA, luego de la colonización y desarrollo del micelio extraradical, resultados que coinciden con los obtenidos por

Zangaro et al. (2012) y Del Águila et al. (2018), donde los HMA fueron las que lograron incorporar los nutrientes necesarios para incrementar las tasas de crecimiento y desarrollo significativamente de los cultivos hospederos.

Cuadro 7: Correlación entre variables micorrízicas y morfológicos durante la multiplicación masiva del hongo

Micorrización/variables morfológicos	Altura de planta (cm)	Peso seco de planta (g)	Peso seco de la raíz (g)
Número de esporas	0,07 ns	0,02 ns	0,04 ns
Colonización (%)	0,51**	0,29 ns	0,43 *

** : altamente significativo; * : significativo; ns: no significativo

Cuadro 8. Especies de HMA obtenidos por caracterización molecular en suelos procedentes de Mariscal Cáceres, Lamas y Rioja, después de 220 días de multiplicación.

HMA	Rioja	Lamas	Mariscal Cáceres
<i>Claroideoglossum</i> sp.	X	X	X
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	X	X	
<i>Rhizoglossum</i> sp.		X	
<i>Diversispora aurantia</i>		X	
<i>Microkamienskia</i> sp.			X
<i>Microkamienskia peruviana</i>			X
<i>Diversispora</i> sp.			X
Unidentified taxa			X
<i>Claroideoglossum etunicatum</i>			X

Identificación molecular de HMA. Desde el 2009 a la fecha la mayoría de trabajos enfocados en la identificación molecular de HMA se basan en la amplificación del fragmento formado por la región parcial SSU, ITS1, ITS2 y la región parcial de LSU del ADN ribosomal (DNAr) utilizando los cebadores SSUmAf/LSUmAr y SSUmCf/LSUmBr, según lo propuesto por Krüger et al. (2009). Utilizando esta región de ADN ribosomal fueron reportadas una diversidad de nuevas especies de hongos micorrízicos arbusculares como *Rhizoglossum variabile*, *Nanglossum plukenetiae*, *Acaulospora aspera*, *A. flava*, *A. flavopapillosa*, *Microkamienskia peruviana*, *Paraglossum occidentale*, *P. peruvianum* y *Funneliglossum sanmartinensis* en la amazonia peruana (Corazon et al., 2021a; 2021b; 2022). Al respecto, es ampliamente reconocido entre los micólogos, que las identidades menores a 97 % en la región del

código de barras del gen ribosómico (ADNr) pueden representar diferencias entre especies (Vu et al., 2019), mientras que identidades menores a 90 % en Glomeraceae representarían diferencias entre géneros (Corazon et al., 2019b).

Los resultados, obtenidos al evaluar la diversidad de especies en el consorcio de la provincia de Rioja (Figura 1A), mostraron que, filogenéticamente, las secuencias nucleotídicas codificadas como *Claroideoglossum* sp. representarían una nueva especie debido a que al compararla con las secuencias de *Claroideoglossum etunicatum* (Genbank OK105179.1) presentaron identidades menores a al porcentaje crítico. En tanto, las secuencias nucleotídicas codificadas como *Acaulospora scrobiculata*, están plenamente identificadas como tal especie, debido a que al compararla con las secuencias de *A. scrobiculata* (Genbank

MT65624.1) presentaron identidades mayores a ese porcentaje crítico.

EL consorcio de la provincia de Lamas (Figura 1B) mostró que filogenéticamente las secuencias nucleotídicas codificadas como *Diversispora aurantia* y *A. scrobiculata* están plenamente identificadas como tal, debido a que al compararlas con *D. aurantia* (Genbank MT765585.1) y *A. scrobiculata* (Genbank MT765465.1), respectivamente, presentaron identidades mayores al porcentaje crítico. Por su parte, las secuencias nucleotídicas codificadas como *Claroideoglossum* sp. y *Rhizoglossum* sp. representarían nuevas especies debido a que al compararlas con las secuencias de *Claroideoglossum etunicatum* (Genbank OK105179.1) y *Rhizoglossum variabile* (Genbank MN384875.1), respectivamente, presentaron identidades menores al porcentaje crítico de 97 %.

Se encontró un total de nueve especies de HMA en los tres consorcios de HMA multiplicados mediante el análisis molecular. A pesar de las diferentes características de los suelos usados y su origen, *Claroideoglossum* sp. fue la única especie que estuvo presente en los tres consorcios de HMA (Cuadro 8). El consorcio de la provincia de Mariscal Cáceres (Figura 1C) mostró que filogenéticamente las secuencias nucleotídicas codificadas como Unidentified taxa, representarían un nuevo género, debido a que al compararlo con *Septoglossum viscosum* (Genbank KC182039.1) presentaron identidades menores al 90 %. Las secuencias nucleotídicas codificadas como *Microkamiensia* sp. y las secuencias de *Diversispora* sp. y de *Claroideoglossum* sp representarían nuevas especies debido a que al compararlas con *Microkamiensia peruviana* (Genbank MK903008.1), *Diversispora spurca* (Genbank FN547638.1) y *Claroideoglossum etunicatum* (Genbank OK105179.1) respectivamente, presentaron identidades menores a un valor crítico de 97 %. Asimismo, las secuencias nucleotídicas, codificadas como *Claroideoglossum* sp. y *Diversispora* sp. representarían una nueva especie debido a que al compararlas con las secuencias de *Claroideoglossum etunicatum* (Genbank

OK105179.1) y *Diversispora spurca* (Genbank FN547638.1), respectivamente, presentaron identidades menores a 97 %. Por último, *M. peruviana* y *Claroideoglossum etunicatum*, están plenamente identificadas como tales especies, debido a que al compararlas con *Microkamiensia peruviana* (Genbank MK903008.1) y *Claroideoglossum etunicatum* (Genbank OK105179.1), respectivamente, presentaron identidades mayores a 97 %.

CONCLUSIÓN

El consorcio de HMA procedente de la provincia de Mariscal Cáceres multiplicado en plantas de arroz después de 220 días presentó el mayor número de esporas (hasta 15433 esporas por 100 g de suelo). Por lo tanto, para las condiciones particulares del estudio, se logró la producción masiva de esporas de HMA en condiciones *ex situ*. Además, se logró identificar las siguientes especies de HMA: *Claroideoglossum* sp., *Acaulospora scrobiculata*, *Diversispora aurantia*, *Microkamiensia* sp., *Microkamiensia peruviana*, *Diversispora* sp., *Claroideoglossum etunicatum*, siendo *Claroideoglossum* sp. Por otra parte, se identificó un grupo denominado *Unidentified taxa*, que representaría un nuevo género.

AGRADECIMIENTO

La Universidad Católica Sedes Sapientiae reconoce el apoyo financiero del proyecto Concytec - Banco Mundial "Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica" 8682-PE, a través de su unidad ejecutora Fondecyt, en el marco de la actividades del proyecto "Biorremediación con micorrizas arbusculares nativas en el control de cadmio de clones de *Theobroma cacao* como estrategia sostenible para la seguridad alimentaria ecológica en la Amazonía peruana" con Contrato 105-2018 - FONDECYT - BM - IADT - AV.

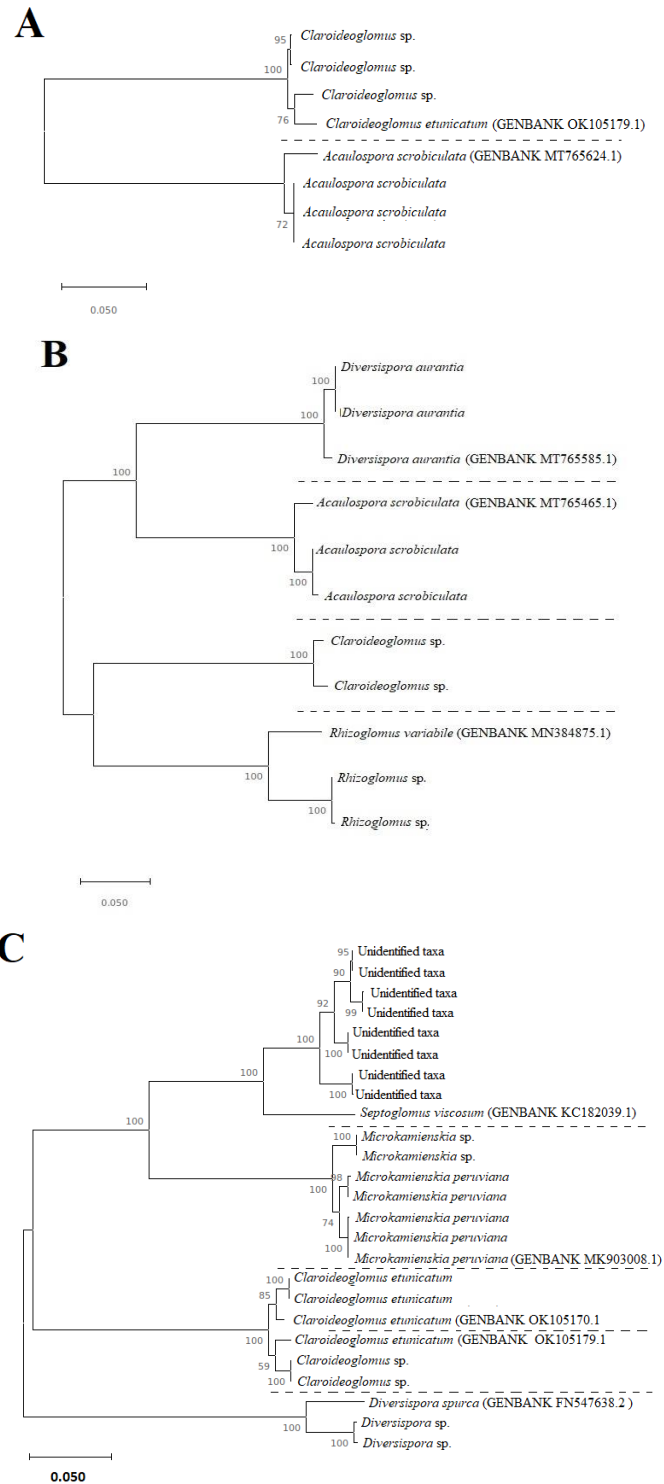


Figura 1. Árboles filogenéticos obtenidos por análisis de secuencias de la región parcial SSU, región ITS completa y región LSU parcial del rDNA de diferentes especies de HMA. Por cada especie identificada, se colocó como referencia una plenamente identificada, utilizando secuencias del Genbank. Las identificadas están separadas con líneas horizontales discontinuas. A) Secuencias obtenidas del consorcio de la provincia de Rioja, B) Secuencias obtenidas del consorcio de la provincia de Lamas, C) Secuencias obtenidas del consorcio de la provincia de Mariscal Cáceres.

LITERATURA CITADA

1. Brundrett, M., N. Bougher, B. Dell, T. Grove y N. Malajczuck. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Camberra, Australia: ACIAR. 374 p.
2. Bustamante, A. y W. Zambrano. 2014. Eficiencia de la multiplicación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), nativos en *Zea mays* L. en condiciones de invernadero. Universidad Nacional "Pedro Ruiz Gallo", Lambayeque, Perú. <https://n9.cl/z0nv3> (consulta de abril 14, 2022)
3. Chaiyasen, A., C. Leardwiriyaakool, D.D. Douds y S. Lumyong. 2017. Influence of host plants and soil diluents on arbuscular mycorrhizal fungus propagation for on-farm inoculum production using leaf litter compost and agrowastes. *Biol. Agric. Hortic.* 33: 52-62.
4. Corazon-Guivin, M.A., A. Cerna-Mendoza, J.C. Guerrero-Abad, A. Vallejos-Tapullima O. Ríos-Ramírez, G. Vallejos-Torres et al. 2020. *Paraglomus occidentale*, a new arbuscular mycorrhizal fungus from the sources of the Amazon river in Peru, with a key to the Paraglomeromycetes species. *Sydowia* 72: 85-94.
5. Corazon-Guivin, M.A., A. Vallejos-Tapullima, A.M. de La Sota-Ricaldi, A. Cerna-Mendoza, J.C. Guerrero-Abad, V.M. Santos et al. 2021a. *Acaulospora flava*, a new arbuscular mycorrhizal fungus from *Coffea arabica* and *Plukenetia volubilis* plantations at the sources of the Amazon river in Peru. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 94: 116-123.
6. Corazon-Guivin, M.A., A. Cerna-Mendoza, J.C. Guerrero-Abad, A. Vallejos-Tapullima, G.A. Silva y F. Oehl. 2021b. *Paraglomus peruvianum* sp. novum. In: R. Lebeuf et al. (eds.). *Fungal Systematics and Evolution: FUSE 8*. *Sydowia* 74: 193-249.
7. Corazon-Guivin, M.A., A. Vallejos-Tapullima, A.M. Sota-Ricaldi, G. Vallejos-Torres, M.E. Ruíz-Sánchez, V.M. Santos et al. 2022. *Acaulospora favopapillosa*, a new fungus in the Glomeromycetes from a coffee plantation in Peru, with an updated key for the identification of Acaulosporaceae species. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 95: 6-16.
8. Covacevich, F., K. Hernández, E.M. Crespo, E. Lumini, M.S. Rivero y M.A. Lugo. 2021. Arbuscular mycorrhizal fungi from Argentinean highland puna soils unveiled by propagule multiplication. *Plants* (Basel, Switzerland) 10(9): 1803.
9. Daniels, B.A. y H.A. Skipper. 1982. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In: N.C. Schenck (ed.). *Methods & Principles of Mycorrhizal Research*. American Phytopathological Society. St. Paul, MN, USA. pp. 29-35.
10. Del Águila Parrillo, K.M., G. Vallejos-Torres, L.A. Arévalo y A. Becerra. 2018. Inoculación de consorcios micorrízicos arbusculares en *Coffea arabica*, variedad Caturra en la región San Martín. *Información Tecnológica* 29(1): 137-146.
11. Gaur, A. y A. Adholeya. 2002. Arbuscular-mycorrhizal inoculation of five tropical fodder crops and inoculum production in marginal soil amended with organic matter. *Biol. Fertil. Soils* 35: 214-218.
12. Gerdemann, J.W. y T.H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46: 235-244.
13. Guindon, S. y O. Gascuel. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *System Biol.* 52: 696-704.
14. Hernández-Martínez, M., V.M. Cetina-Alcalá, M.C. González-Chávez y C.T. Cervantes-Martínez. 2006. Inoculación micorrízica y su efecto en el crecimiento de dos leguminosas arbóreas. *Terra Latinoamericana* 24(1): 65-73.
15. Ijdo, M., S. Cranenbrouck y S. Dealerck. 2010. Methods for large scale production of AM fungi: past, present and future. *Mycorrhiza* 21: 1-16.
16. ICO (International Cocoa Organization). 2014. *Cocoa Market Update*. <https://n9.cl/Invy6> (consulta de abril 14, 2022)
17. Kadian, N., K. Yadav, E. Jangra y A. Aggarwal. 2019. Influencia de la planta hospedante y la paja de arroz como sustrato en la multiplicación masiva de hongos micorrízicos arbusculares para aplicaciones agrícolas a gran escala. *Int J. Recycl Org. Waste Agricult.* 8: 21-26.

18. Kadian, N., K. Yadav y A. Aggarwal. 2013. Significance of bioinoculants in promoting growth, nutrient uptake and yield of *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) 'Taub'. *Eur J Soil Biol* 58: 66-72.
19. Kadian, N., K. Yadav y A. Aggarwal. 2018. Mass multiplication of arbuscular mycorrhizal fungi associated with some leguminous plants: an ecofriendly approach. *Ind. J. Exp. Biol.* 56: 258-266.
20. Klironomos, J.N. 2003. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 84: 2292-2301.
21. Krüger, M., H. Stockinger, C. Krüger y A. Schüßler. 2009. DNA based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 183: 212-223
22. Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A.H. McGettigan, F. Valentin et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
23. Milne, I., F. Wright., G. Rowe, D.F. Marshall, D. Husmeier y G. McGuire. 2004. Software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments. *Bioinformatics* 20: 806-1807.
24. Moreno-Miranda, C., I. Molina, Z. Miranda, R. Moreno y P. Moreno. 2020. La cadena de valor de cacao en Ecuador: una propuesta de estrategias para coadyuvar a la sostenibilidad. *Bioagro* 32(3): 205-214.
25. Muthukumar, T. y K. Udaiyan. 2002. Growth and yield of cowpea as influenced by changes in arbuscular mycorrhiza in response to organic manuring. *J. Agron. and Crop Sci.* 188(2): 123-132.
26. Phillips, J.M. y D.S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment to infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
27. Prieto, O., C. Belezaca, W. Mora, E. Vallejo, L. Gutiérrez y L. Pinargote. 2011. Inoculación de *Brachiaria decumbens* con hongos formadores de micorrizas arbusculares nativos del trópico húmedo ecuatoriano. *Ciencia y Tecnología* 4(2): 9-18.
28. Rashid, M.I., L.H. Mujawar, T. Shahzad, T. Almeelbi y I.M. Ismail. 2016. Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. *Microbiol. Res.* 183: 26-41.
29. Ronquist, F., J.P. Huelsenbeck y M. Bayes. 2003. Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
30. Sandoval, D. T. 2019. Caracterización de hongos micorrízicos arbusculares nativos predominantes, provenientes de pasturas de la zona de Cuñumbuque, San Martín y propagados en especies forrajeras. Tesis. Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto, Perú. 65 p. <https://n9.cl/hu6trr> (consulta de abril 14, 2022)
31. Selvakumar, G., C.C. Shagol, Y. Kang, B.N. Chung, S.G. Han y T.M. Sa. 2018. Arbuscular mycorrhizal fungi spore propagation using single spore as starter inoculum and a plant host. *J. Appl Microbiol.* 124(6): 1556-1565.
32. Schlemper, R.T. y S.L. Stürmer. 2014. On farm production of arbuscular mycorrhizal fungi inoculum using lignocellulosic agrowastes. *Mycorrhiza* 24(8): 571-580.
33. Sharma, S., S. Sharma, A. Aggarwal, V. Sharma, M.J. Singh y S. Kaushik. 2017. Multiplication of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhizal Fungi* 155-173.
34. Smith, S.E. y D.J. Read. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London.
35. Utobo, E.B., E. N. Ogbodo y A.C. Nwogbaga. 2011. Techniques for extraction and quantification of arbuscular mycorrhizal fungi. *Libyan Agriculture Research Center Journal International* 2(2): 68-78.
36. Vallejos-Torres, G., T. Sánchez, M.A. García, M. Trigoso y L.A. Arévalo. 2019. Efecto de hongos formadores de micorrizas arbusculares en clones de café (*Coffea arabica*) variedad Caturra. *Acta Agronómica* 68(4): 278-284.
37. Vallejos-Torres, G., R. Ruíz-Valles., C. E. Chappa-Santa María., N. Gaona-Jiménez. y C. Marín. 2022. High genetic diversity in arbuscular mycorrhizal fungi influence cadmium uptake and growth of cocoa plants. *Bioagro* 34(1): 75-84.
38. Vu, D., M. Groenewald, M. de Vries, T. Gehrman, B. Stielow, U. Eberhardt et al.

2019. Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Stud. Mycol.* 92: 135-154.

39. Zangaro, W., R.A. Alves, L.E. Lescano, A.P. Insanely y M.A. Nogueira. 2012. Investment in fine roots and arbuscular mycorrhizal fungi decrease during succession in three Brazilian ecosystems. *Biotropica* 44 (2): 141-150.