

**CULTIVO *IN VITRO* DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES
APLICANDO SISTEMA DE CULTIVO AUTOTRÓFICO DE *Manihot Esculenta***

***IN VITRO* CULTURE OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI APPLYING
AUTOTROPHIC CULTURE SYSTEM OF *Manihot Esculenta***

CARELIS JOSE CANTILLO ORREGOANYELIS MOLINA SAURITH

AUTOR(S)



UNIVERSIDAD POPULAR DEL CESAR

FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS

PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA

VALLEDUPAR- CESAR

2023

**CULTIVO *IN VITRO* DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES
APLICANDO SISTEMA DE CULTIVO AUTOTRÓFICO DE *Manihot Esculenta*
(YUCA)**

***IN VITRO* CULTURE OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI APPLYING
AUTOTROPHIC CULTURE SYSTEM OF *Manihot Esculenta* (YUCCA)**

CARELIS JOSE CANTILLO ORREGO

ANYELIS MOLINA SAURITH

AUTOR(S)

ASLENIS EMIDIA MELO RIOS

(MICROBIÓLOGA MAGISTER EN GESTIÓN Y AUDITORÍA AMBIENTAL)

DIRECTOR(A)

ALEXANDER BENJUMEA

**(ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGÍA Y SEGURIDAD ALIMENTARIA,
MAESTRANTE EN BIOTECNOLOGÍA)**

(ASESOR EXTERNO)

UNIVERSIDAD POPULAR DEL CESAR

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA

VALLEDUPAR- CESAR

2023

NOTA DE ACEPTACION

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Valledupar, () de () del ()

Dedicatoria(s)

Anyelis Molina

Llena de regocijo, de amor y esperanza dedico este proyecto a cada uno de mis seres queridos quienes han sido mis Pilares para seguir adelante.

Es para mí una gran satisfacción poder dedicarles a ellos que con mucho esfuerzo esmero y trabajo me lo han ganado.

Principalmente a Dios por ser el inspirador y darme fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados en mi vida.

A mis padres Osman Molina y Maxula Saurith, porque ellos son la motivación de mi vida mi orgullo de ser lo que seré.

A mis hermanos Anyaith y Osma David porque son la razón de sentirme tan orgullosa de culminar mi meta gracias a ellos por confiar siempre en mí.

También dedico a mis hijas M' Victoria y M' Laura y a mi esposo Victor Fonseca quienes han sido mi mayor motivación para nunca rendirme en los estudios y poder llegar a ser un ejemplo para ellos.

Y sin dejar atrás a toda mi familia por confiar en mí, a mis abuelos, tíos y primos, Gracias por ser parte de mi vida y por permitirme ser parte de su orgullo.

Carelis José Cantillo Orrego

Al Señor Jesucristo por darme sabiduría y permitirme llevar a cabo y culminar con éxito mis estudios profesionales, porque sin ÉL no habría sido posible. A mis padres Rosmelia Orrego Jiménez y José Fernando Cantillo Guerrero quienes siempre me apoyaron y me motivaron a seguir hasta alcanzar la meta y por todos sus esfuerzos. A mis hermanas, Cilma Cantillo, Cilenis Cantillo y Cyndi Cantillo por brindarme su apoyo incondicional.

Agradecimientos

A Dios quien nos llenó de sabiduría, fuerza y perseverancia para culminar con éxito nuestra carrera profesional. A nuestros familiares quienes nos brindaron todo su apoyo durante toda la carrera.

Nuestros sinceros agradecimientos a cada uno de los docentes de la Universidad Popular del Cesar quienes nos formaron como profesionales. De manera muy especial a la Docente Aslenis Emidia Melo Rios quien nos guió en el proceso de redacción de la tesis. A el instructor Alexander Benjumea Córdoba quien nos hizo partícipe de su trabajo y fue de gran ayuda en el proceso de ejecución de éste trabajo de grado.

Contenido

1	RESUMEN	10
2	ABSTRACT	12
3	INTRODUCCION	13
4	PROBLEMA DE ESTUDIO	16
4.1	Título del estudio	16
4.2	Planteamiento de problema	16
4.3	Formulación del problema.	17
4.4	Justificación	18
5	OBJETIVOS	20
5.1	Objetivo General	20
5.2	Objetivos específicos	20
6	MARCO TEÓRICO	21
7	MARCO CONCEPTUAL	22
7.1	Hongos Micorrízicos	22
7.2	Hongos Micorrízicos Arbusculares	23
7.3	Yuca (<i>Manihot esculenta</i>)	24
7.4	Sistema de cultivo autotrófico	26
7.5	Cultivo <i>in vitro</i> vegetal	26

7.6	Antecedentes	27
8	METODOLOGÍA	30
8.1	Tipo de estudio y línea de investigación	30
8.2	Zona de estudio	30
8.3	Muestra	31
8.4	Toma de muestra:	31
8.5	Tratamiento del suelo	31
8.6	Aislamiento de esporas:	32
8.7	Desinfección de esporas:	32
8.8	Multiplicación de vitroplantas de yuca	33
8.9	Inoculación y germinación de esporas HMA:	33
8.11	Análisis de Resultados	35
9	ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
9.1	Aislamiento de esporas HMA.	36
9.2	Desinfección de esporas HMA	38
9.3	Porcentaje de germinación de esporas HMA en sistema de cultivo autotrófico de yuca	41
10	CONCLUSIÓN	45
11	RECOMENDACIONES	46
12	BIBLIOGRAFÍAS	47

Índice de figuras

Figura 1 Estructura de colonización ecnomicorrizicos y endomicorrizicos.	22
Figura 2 Colonización de raíces	24
Figura 3 Partes de la yuca	25
Figura 4 Partes de la yuca	25
Figura 5 Diseño experimental	35
Figura 6 Estructura de algunas esporas HMA aisladas. A. Septoglo mus B. D. E. Acaulospora C. G. H. Glomus F. Rhizophagus	37
Figura 7 Contaminación del medio de cultivo de las esporas de HMA en cada uno de los ensayos.	38
Figura 8 Contaminantes encontrados; observados en el estéreo microscopio (optika Italy SZMA1).	39
Figura 9 Germinación de esporas en cada uno de los ensayos con intervalo de tiempo. Valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente según Tukey.	42
Figura 10 A, B, C Micorrizacion y germinación de esporas HMA	43
Figura 11 Etapas del proceso de multiplicación de vitroplantas de yuca. A. Selección de vitroplantas para micropropagar B, C Multiplicación del explante	60
Figura 12 Etapas del cultivo autotrofico A. Selección de vitroplantas de 2 meses de desarrollo. B. Siembra de la vitroplanta en la placa de Petri con medio MSR. C. Aplicación de la vaselina para sellar el orificio por dónde sale la vitroplanta,	

posterior a la inoculación de la espera HMA. D. Sellado de la placa con parafilm. E. Cubrimiento de la placa de Petri con papel aluminizado. F. Introducción del cultivo autotrófico de yuca en contenedor para su traslado al área de incubación.

60

Figura 13 Proceso de aislamiento de esporas HMA. A. Agitación de la muestra de suelo por 10 minutos B. Solución acuosa depositada en los tamices organizados de mayor a menor tamaño de poro C. Introducción del suelo proveniente del tamiz de 38 μm , con solución de sacarosa al 60% a la centrifuga, a 4000 RPM por 4 minutos D. Extracción de las esporas HMA en el estereomicroscopio.

63

1 RESUMEN

Dado a la creciente necesidad de aportar a la actividad agrícola sostenible, se hace imperioso el uso de nuevas técnicas de producción de micorrizas como alternativas al método tradicional, que hagan posible su cultivo sin agotar el suelo. En este sentido, el presente estudio busca abordar si resulta viable el cultivo *in vitro* de esporas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en cultivo autotrófico de yuca; por lo cual, tuvo como objetivo cultivar *in vitro* esporas HMA aisladas de suelo en sistema de cultivo autotrófico de *Manihot esculenta* (yuca). Se realizó el aislamiento de esporas HMA de suelo recolectado de un cultivo mixto de *Manihot esculenta* (yuca) y *Phaseolus vulgaris* (frijol), ubicado en el corregimiento de Mariangola-Cesar. El procesamiento de la muestra, el aislamiento de las esporas y su cultivo a nivel *in vitro* se realizó en las instalaciones del laboratorio de biotecnología vegetal perteneciente al SENA regional Cesar. Inicialmente se aislaron las esporas por la técnica de tamizado húmedo modificado; estas fueron desinfectadas e inoculadas en vitroplantas de yuca en sistema de cultivo autotrófico, para lo cual se aplicaron cuatro tratamientos con 20 réplicas cada uno, inoculando una única espora por vitroplanta. En este sentido, fue posible la germinación de esporas HMA con un porcentaje del $12,5 \pm 5,8$; mientras que estadísticamente, Tukey y Duncan no presentaron diferencias significativas para los parámetros analizados de formación de micorriza, contaminación y no evidencia de germinación y/o contaminación. Se concluye que el método de

germinación es efectivo y el potencial del uso de las vitroplantas de yuca en este tipo de estudios.

Palabras claves: Hongos micorrizicos arbusculares, aislamiento, desinfección, cultivo in vitro, vitroplantas.

2 ABSTRACT

Given the growing need to contribute to sustainable agricultural activity, it is imperative to use new mycorrhizal production techniques as alternatives to the traditional method, which make their cultivation possible without depleting the soil. In this sense, the present study seeks to address whether the in vitro cultivation of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) spores in autotrophic cassava cultivation is viable; Therefore, the objective was to cultivate in vitro AMF spores isolated from soil in an autotrophic cultivation system of *Manihot esculenta* (cassava). The isolation of AMF spores was carried out from soil collected from a mixed crop of *Manihot esculenta* (cassava) and *Phaseolus vulgaris* (bean), located in the Mariangola-Cesar district. The processing of the sample, the isolation of the spores and their in vitro cultivation were carried out in the facilities of the plant biotechnology laboratory belonging to the Cesar regional SENA. Initially, spores were isolated by the modified wet sieving technique; These were disinfected and inoculated in cassava vitroplants in an autotrophic culture system, for which four treatments were carried out with 20 replicates each, inoculating a single spore per vitroplant. In this sense, the germination of AMF spores was possible with a percentage of 12.5 ± 5.8 ; while statistically, Tukey and Duncan did not present significant differences for the analyzed parameters of mycorrhiza formation, contamination and no evidence of germination and/or contamination. It is concluded that the germination method is effective and the potential of using

cassava vitroplants in this type of studies. **Keywords:** Arbuscular mycorrhizal fungi, isolation, disinfection, in vitro culture, vitroplants

3 INTRODUCCION

Colombia es considerado el estado con mayor mega diversidad, no obstante, la actividad humana ha causado la degradación de 1/3 de la capa superficial del suelo (García, 2020). En este sentido, el sector pecuario es uno de los más influyentes ya que ocupa el 80 % de superficie del territorio la cual se utiliza para cultivar especies forrajeras y pasturas para la alimentación del ganado, esta actividad extensiva trae efectos negativos sobre el suelo causando daños por el sobrepastoreo, dado que el pisoteo promueve la compactación, la pérdida de la capa vegetal y la erosión de los suelos (Restrepo et al., 2019); sumado a esto, la minería en Colombia es otra de las actividades que más afecta al suelo de forma directa, ya que se basa en la explotación y extracción de minerales del suelo lo que desencadena en cambios fisicoquímicos del suelo, destrucción y pérdida de la materia orgánica (Vera, 2018).

Todo lo anterior hace factible la necesidad de aportar a la salud del suelo, mitigando los efectos negativos que desencadenan las actividades antropogénicas en el mismo, por lo que actualmente cobra cada vez mayor importancia la investigación de los microorganismos rizosféricos. Los microorganismos rizosféricos contribuyen al crecimiento vegetal, la disponibilidad de nutrientes, la agrupación bacteriana, etc., dentro de los cuales tenemos los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) que tienen la capacidad de hacer asociación simbiótica con

más del 80 % de las plantas, pertenecen al *Phylum Glomeromycota*, su asociación es intraradical a través de sus hifas cenocíticas, arbusculos y vesículas y extraradical formando micelio y esporas multinucleadas (Uc-Ku et al., 2019; Arancibia et al., 2022; Flores et al., 2020).

La unión de HMA a la raíz de las plantas permiten a estas abarcar mayor superficie del suelo debido a las hifas producidas que funcionan como una extensión de la raíz, esto le permite aumentar 40 veces más la adsorción de minerales como N, P, Cu y Zn, así mismo promueve el crecimiento, resistencia al estrés por sequía, adsorción de agua, protección frente a fitopatógenos y reduce la toxicidad del suelo (Arancibia et al., 2022; Urgiles et al., 2020).

Los HMA se han implementado en cultivos de café, papaya, caña de azúcar, yuca, calabaza, además, en suelos de explotación minera, pecuaria y reforestación, obteniendo un mejor crecimiento, calidad, rendimiento, resistencia frente a fitopatógenos y recuperación de suelos (Navarrete et al., 2022; Vallejos et al., 2019; Becerra 2022; Wilches et al., 2019; Lara et al., 2021).

Pese a que en la actualidad existen muchos biofertilizantes como alternativas a los agroquímicos, su uso se sigue viendo limitado por diferentes causas de índole económico, cultural y diferencias en la efectividad o rango de acción. (Schmidt et al., (2022)) en su revisión, resalta las consecuencias ambientales y sanitarias ocasionadas por el uso de agroquímicos utilizados para la fertilización y control de patógenos, los cuales han llegado a estar ampliamente distribuidos tanto en el ecosistema como en los alimentos, siendo la causa de la aparición de múltiples

enfermedades como: hipertensión, alérgicas respiratorias, malformaciones congénitas, enfermedades oncológicas, etc.

En consecuencia, se presenta el siguiente estudio con el objetivo de evaluar la efectividad del cultivo *in vitro* de hongos micorrízicos arbusculares aplicando sistema de cultivo autotrófico de *Manihot esculenta* (Yuca).

4 PROBLEMA DE ESTUDIO

4.1 Título del estudio

Cultivo *in vitro* de hongos micorrizicos arbusculares aplicando sistema de cultivo autotrófico de *Manihot esculenta* (Yuca)

4.2 Planteamiento de problema

Actualmente la degradación del suelo y la pérdida de nutrientes son problemas que afectan a la producción agrícola y a la seguridad alimentaria en muchas partes del mundo, dado que el suelo está compuesto de material orgánico, minerales, materia viva y diversos elementos nutritivos que aportan al óptimo crecimiento y desarrollo de las plantas. La fertilidad del suelo y la disponibilidad de nutrientes son aspectos fundamentales para el crecimiento y desarrollo de las plantas. (Bernal et al., 2020).

Es así, como entre las principales causas de la degradación del suelo se destacan la explotación intensiva de los recursos naturales, el uso excesivo de fertilizantes químicos y la erosión del suelo; todo esto incide directamente en que la fertilidad del suelo disminuya y la disponibilidad de nutrientes se vea comprometida, lo que afecta negativamente el crecimiento y desarrollo de las plantas y, por ende, la producción de alimentos (Sánchez, 2020; Cacace, 2022).

Este problema es especialmente crítico en países en desarrollo donde la agricultura es una actividad económica importante y la mayoría de los agricultores dependen de la producción agrícola para subsistir; sumado a la falta de información y acceso a tecnologías y prácticas agrícolas sostenibles (Martínez, 2019 Bula, 2020).

En Colombia se presenta un 40% de los suelos con presencia de erosión, dentro de este porcentaje el departamento del Cesar presenta un nivel de erosión de 81, 9 % de los cuales un 12 % son de grado severo y muy severo; las principales causas la deforestación, la agricultura, ganadería, etc (IDEAM, 2017).

En este orden de ideas, la producción a gran escala de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) constituye una alternativa que puede permitir la recuperación y fertilización del suelo y el buen desarrollo de la agricultura; estos hongos son simbioses obligados es decir, presentan una asociación mutualista debido a que son incapaces de generar carbohidratos, los cuales son obtenidos por la planta al llevar a cabo el proceso de fotosíntesis. Los carbohidratos les permiten a los HMA completar sus ciclo biológico (crecimiento y reproducción); Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar el proceso de producción de micorrizas mediante la aplicación de estrategias biotecnológicas para reducir el suelo como recurso primario, no obstante a pesar de su importancia ecológica y agronómica, la producción comercial de MA sigue siendo limitada debido a la dificultad en la propagación de los hongos en laboratorio. (Chim y Carbonell, 2019; Aranguren et al., 2020).

Por lo descrito es necesario analizar ¿Qué tan viable es el cultivo *in vitro* de esporas de hongos micorrízicos arbusculares en cultivo autotrófico de yuca?

4.3 Formulación del problema.

¿Qué tan viable es el cultivo *in vitro* de esporas de hongos micorrízicos arbusculares en cultivo autotrófico de yuca?

4.4 Justificación

La producción *in vitro* de las esporas de hongos micorrízicos arbusculares en cultivo autotrófico de yuca puede significar el aumento del desarrollo agrícola, recuperación de suelos, reducción de agroquímicos y sostenibilidad ambiental progresista (Medina, 2022). El cultivo de HMA *in vitro* constituye una alternativa promisorio al sistema tradicional de producción de micorrizas que provoca el agotamiento de este recurso, es decir, el suelo y la alteración del ecosistema teniendo en cuenta que se debe obtener suelo en cantidades importantes; predominando también sobre otras técnicas de cultivo de micorriza libres de suelo, ya que estas se ven afectadas por la alta contaminación microbiana y desarrollo de algas a causa de la solución de nutrientes, la falta de sustrato lo que afecta la velocidad de producción y baja colonización de la raíz (Uribe et al., 2017).

Así mismo, éste método de producción resulta prometedor para aumentar la productividad agrícola y la sostenibilidad cuando estas cualidades se consideran colectivamente. Además, dado que los HMA están presentes de forma natural en muchos suelos agrícolas y están vinculados a más del 80 % de todas las especies

de plantas, su producción y uso no tienen un costo significativo ni riesgos ambientales adicionales; como resultado, fomentar la producción y aplicación de HMA puede ser una estrategia fructífera y duradera para mejorar la agricultura en todo el mundo. (Chim y Carbonell, 2019).

Por otro lado, la salud del suelo es fundamental para obtener alta producción agrícola y de calidad; en este punto, el cultivo *in vitro* de HMA en vitroplantas de yuca a gran escala puede permitir la elaboración de biofertilizantes a base de cepas específicas. Teniendo en cuenta el papel primordial de los HMA en la absorción de nutrientes por las plantas, dado a la relación simbiótica que establecen con las raíces lo que les permite obtener nutrientes del suelo que las raíces no pueden absorber por sí solas. En particular, los HMA pueden ayudar a las plantas a absorber fósforo, un nutriente esencial que a menudo es limitante en los suelos agrícolas y reducir la absorción de cadmio y otras sustancias que reducen la inocuidad de los alimentos (Pérez et al., 2019; Barahona et al., 2019).

Es así, como esta investigación además de ser novedosa por utilizar vitroplantas de yuca como especie vegetal para cultivar micorrizas a nivel *in vitro*, aporta a la sostenibilidad de la actividad agrícola y sirve como base para futuras investigaciones donde se pueda utilizar la técnica aquí propuesta para la obtención de micorrizas para su potencial uso en fabricación de biofertilizantes.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Cultivar in vitro esporas de hongos micorrízicos arbusculares aisladas de suelo en sistema de cultivo autotrófico de *Manihot esculenta* (yuca).

5.2 Objetivos específicos

- Aislar esporas de hongos micorrízicos arbusculares de suelo de cultivo de yuca para su establecimiento en cultivo autotrófico de yuca.
- Analizar la efectividad del proceso de desinfección de esporas de hongos micorrízicos arbusculares.
- Determinar el porcentaje de germinación de esporas de hongos micorrízicos arbusculares en sistema de cultivo autotrófico de yuca.

6 MARCO TEÓRICO

Smith y Read (2010) describen que los micorrízicos arbusculares (MA) son un grupo de hongos que forman simbiosis mutualistas con la mayoría de las plantas terrestres, incluyendo cultivos agrícolas importantes. Estos hongos a su vez colonizan las raíces de las plantas y proporcionan nutrientes, especialmente fósforo, a cambio de fotosintatos de la planta.

Los micorrízicos arbusculares también pueden mejorar la resistencia de las plantas a los patógenos y a la sequía, así como mejorar la calidad del suelo y la biodiversidad microbiana (Liu et al., 2019). Además, estos hongos pueden desempeñar un papel importante en la mitigación del cambio climático al mejorar la captura de carbono en el suelo (Lehmann y Rillig, 2015).

Se han desarrollado técnicas para la producción *in vitro* de MA, que incluyen la co-cultivación con plantas hospederas en sistemas de cultivo sin suelo, y la utilización de medios de cultivo modificados y factores de crecimiento (Smith y Read, 2010).

Además, los HMA tienen un ciclo de vida complejo que involucra diferentes etapas de crecimiento y diferenciación de las células fúngicas, lo que hace difícil la reproducción *in vitro* de las condiciones naturales necesarias para el crecimiento y la reproducción de estos hongos (Gianinazzi et al., 2010).

7 MARCO CONCEPTUAL

7.1 Hongos Micorrízicos

Los hongos micorrízicos pertenecen al grupo de *Glomeromycota*, cumplen funciones en el suelo como descomposición de materia orgánica y liberación de nutrientes, almacenamiento de nutrientes, mejoramiento de la estructura y agregación del suelo; estos se clasifican según los rasgos anatómicos de las plantas, obteniéndose dos categorías: ectomicorrizas las cuales se encuentran en los espacios intercelulares externos de los tejidos radiculares y endomicorrizas las cuales penetran las células de las plantas (Urgiles et al., 2020; Chim y Carbonell, 2019).

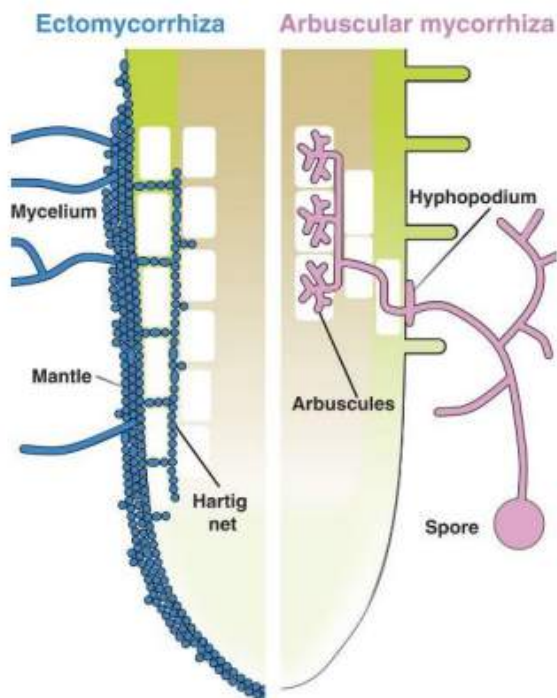


Figura 1 Estructura de colonización ectomicorrizicas y endomicorrizicas.

(Chim y Carbonell, 2019)

7.2 Hongos Micorrízicos Arbusculares

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son un tipo de hongos simbiotes que forman una relación mutualista con las raíces de las plantas. Estos hongos forman estructuras llamadas "arbusculos" en las células de las raíces de las plantas, lo que les permite intercambiar nutrientes y agua con la planta (Reyes, 2023).

Los HMA pueden mejorar la resistencia de las plantas a las enfermedades y al estrés ambiental. Los HMA pueden estimular la producción de compuestos que protegen las raíces de las plantas de los patógenos del suelo y otros factores de estrés, como la sequía o las temperaturas extremas (Zazueta et al., 2021; Vilchis et al., 2019). Como resultado, las plantas asociadas con HMA suelen ser más resistentes y saludables que las que no tienen esta asociación, además, pueden mejorar la calidad del suelo en sí. Estos hongos pueden ayudar a descomponer la materia orgánica y mejorar la estructura del suelo, lo que puede mejorar la retención de agua y nutrientes, así como la aireación del suelo. Esto, a su vez, puede mejorar el rendimiento de los cultivos y reducir la necesidad de fertilizantes y otros insumos (Bedoya et al., 2021; Quispe, 2021).

Los HMA dependen del carbono que produce la planta huésped y este le proporciona a la planta la disponibilidad de nutrientes como P, N, Zn y Cu, este hongo se adhiere a la raíz de la planta y penetra la epidermis, el hongo comienza a desarrollarse cuando llega al lumen de la célula, las hifas de este hongo crecen

inter e intracelularmente hasta llegar a las células corticales más profundas donde desarrollan los arbusculos (Chim y Carbonell, 2019; Farfan, 2022).

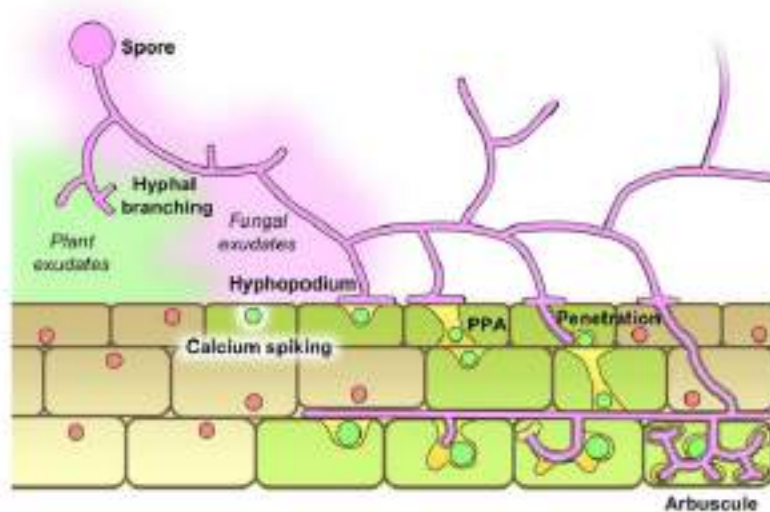


Figura 2 Colonización de raíces

(Chim y Carbonell, 2019)

Durante el desarrollo del hongo las hifas se despliegan por el suelo creando una gran red, lo que le permite a la planta tener la disponibilidad de nutrientes; dentro de esta red de hifas se pueden encontrar: hifas infectivas que son las encargadas de dar inicio a la colonización de nuevas raíces, hifas absorbentes las cuales exploran el suelo en búsqueda de nutrientes y las hifas fértiles que son aquellas que conservan las esporas (Chim y Carbonell, 2019).

7.3 Yuca (*Manihot esculenta*)

La yuca (*Manihot esculenta*) es una planta tropical originaria de América del Sur, que ha sido cultivada durante miles de años por su raíz comestible rica en almidón. La yuca es una importante fuente de carbohidratos y se cultiva

ampliamente en todo el mundo en regiones tropicales y subtropicales (Fathima et al., 2023).

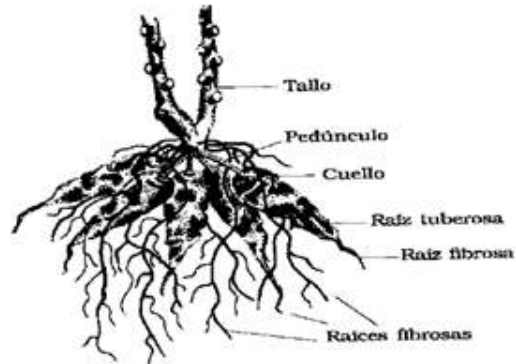


Figura 3 Partes de la yuca



Figura 4 Partes de la yuca

(Ortiz, 2016)

Además de ser un alimento básico para millones de personas en todo el mundo, la yuca también tiene una variedad de otros usos, incluyendo la producción de almidón, harina, bebidas fermentadas y biocombustibles. La yuca también es valorada por su resistencia a las sequías y su capacidad para crecer en suelos

pobres, lo que la convierte en una importante fuente de seguridad alimentaria en muchas regiones del mundo (Abotbina et al., 2022).

7.4 Sistema de cultivo autotrófico

Un sistema de cultivo autotrófico es un método de cultivo en el que las plantas son capaces de producir su propio alimento a través de la fotosíntesis, utilizando la energía solar, el dióxido de carbono y los nutrientes del agua y del sustrato; este tipo de sistema se utiliza con frecuencia en la agricultura y la acuicultura, y puede ser tanto terrestre como acuático (Gómez et al., 2022; Bascuñán, 2021).

La principal ventaja de los sistemas de cultivo autotrófico es que no requieren la adición de nutrientes externos, ya que las plantas son capaces de producir todo lo que necesitan a partir de los recursos disponibles en su entorno. Esto hace que estos sistemas sean muy eficientes en términos de uso de recursos y energía, lo que los convierte en una opción atractiva para la producción sostenible de alimentos y otros productos agrícolas (Bascuñán, 2021).

7.5 Cultivo *in vitro* vegetal

El cultivo *in vitro* de material vegetal es una técnica ampliamente utilizada en la producción y propagación de plantas en el ámbito agrícola, de investigación y de la industria hortícola. Esta técnica implica el cultivo de material vegetal en un ambiente controlado y estéril, como un medio de cultivo enriquecido con nutrientes y hormonas de crecimiento, en condiciones óptimas de luz y temperatura (Muñiz, 2019).

El cultivo *in vitro* de material vegetal se lleva a cabo en diferentes etapas, desde la selección y aislamiento de células o tejidos de la planta madre, la inducción de la formación de estructuras de crecimiento (como brotes y raíces) hasta la aclimatación de las plantas *in vitro* a las condiciones ambientales del exterior (Tonato, 2021; Muñiz, 2019).

Esta técnica ofrece múltiples ventajas como la propagación masiva de plantas de alta calidad genética y sanitaria, la conservación de especies raras y amenazadas, la producción de plantas con características específicas, la investigación de la fisiología y bioquímica de la planta, la producción de metabolitos secundarios y la biotecnología (Ontaneda et al., 2020).

7.6 Antecedentes

En el estudio realizado por Pérez et al. (2012), se logró desarrollar un sistema *in vitro* para el cultivo del HFMA *Glomus* sp. (GEV02), que permitió la formación de estructuras simbióticas típicas, como una colonización intraradical satisfactoria. Se observaron los primeros indicios de interacción entre las raíces de las plantas y las tufas del hongo a partir de la cuarta semana después de la inoculación, con la producción de arbusculos y vesículas, así como el desarrollo de micelio extraradical con hifas ramificadas.

Los cultivos trampa son una alternativa para la producción de micorrizas; Teófilo, (2023), realizó su investigación con cultivos trampa de frijol y sorgo inoculando 17 esporas iniciales por tratamiento con un período de incubación de 95 días, cuyos resultados fueron positivos ya que hubo incremento de las esporas iniciales,

dando mejores resultados el tratamiento donde se realizó cultivo mixto de las dos especies vegetales; además, al utilizar este suelo para plantar lechugas, las condiciones de las plántulas fueron proporcionalmente mejores que las plantadas en el suelo donde solo se había cultivado una de las especies vegetales; Tenorio, 2021 realizó cultivos trampa de arroz y maíz, obteniendo mejor producción de esporas con los tratamientos de arroz quien presento mayor esporulación (174766.67 esporas en 100 g).

Mármol, 2019 realizó la inoculación de *Leccinum aurantiacum* sobre vitroplantas de *Populus tremula*, como resultado obtuvo la ausencia de micorrizas debido a la inexistencia de nódulos característicos de la asociación del hongo con la planta, paralelo a esto se visualizaron diferencias, aunque no significativas entre cada uno de los tratamientos. En este estudio se le atribuyo este cambio a la presencia de las micorrizas y se concluyó que el tiempo de incubación no es clave para el desarrollo del proceso.

Fernández et al. 2015 en su estudio llevo a cabo la obtención de micorrizas en plántulas in vitro, este tuvo en cuenta que los componentes del medio juegan un papel clave para el desarrollo del hongo por lo cual utilizo auxina AIA y la citoquinina kinetina ribósido para la germinación y el crecimiento del tubo germinativo *in vitro* de esporas de *G. clarum*, bajo estas condiciones, a los 10 días el tratamiento con kinetina ribósido aumento el porcentaje de germinación con valores cercanos al 100% y la auxina causo la inhibición del hongo.

Escaleras et al. 2022 evaluó la climatización de vitroplantas de banano con sustratos provenientes de agroecosistemas de producción bananera, inoculados con hongos micorrízicos arbusculares teniendo en cuenta factores de estudio como: muestreo, suelo y micorriza y variables morfológicas como: longitud de la raíz, altura de la planta, número de hojas y contenido de clorofila; la inoculación con hongos micorrízicos (*Acaulospora sp.*) y suelos orgánicos con o sin la presencia del hongo permiten generar una mayor adaptación de las plantas y tolerancia al ser trasplantadas a diferencia de los suelos convencionales donde la presencia de micorrizas permitió un mayor desarrollo de la longitud de las raíces (30,33 y 27,20 cm) donde la utilización de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) incrementan la longitud de las raíces y el crecimiento aéreo de las plantas.

Carreon, 2013 hizo aislamiento de hongos micorrízicos arbusculares (HMAs) donde utilizó la técnica minirizotróf en suelos de huertas de aguacate en el cual estudió la riqueza de las diferentes especies de HMAs evaluando la colonización micorrízica a los 20 y 40 días se hizo el tratamiento individual y en conjunto dando como resultado 95% de colonización micorrízica, en comparación con el cultivo puro de *Sclerocystis rubiformis* que mostró porcentajes hasta de 58% al final del experimento siendo el sistema de minirizotróf ser efectivo para la propagación de cultivos multiespecíficos o monospóricos in vivo.

8 METODOLOGÍA

8.1 Tipo de estudio y línea de investigación

El estudio realizado es de tipo descriptivo transversal, se encuentra dentro de la línea de investigación bioprospección del programa de Microbiología de la Universidad Popular del Cesar. Este es un estudio derivado de una investigación de maestría titulada “Identificación molecular de esporas de Hongos Micorrizicos Arbusculares fenotípicamente asociados a *Glomus spp* en suelos de cultivo de Yuca y Frijol”

8.2 Zona de estudio

La recolección de la muestra de suelo se llevó a cabo en un lote dónde se produjo un cultivo mixto de *Manihot esculenta* (yuca) y *Phaseolus vulgaris* (frijol) entre los años 2019-2020 para bioestimulación de la población HMA; cuya área es de 12 metros de largo por 6 metros de ancho, situado en el corregimiento de Mariangola perteneciente al municipio de Valledupar, ubicado en zona suroccidental junto al corregimiento de Villa Germania entre el piedemonte de la Sierra Nevada de Santa Marta y el rio Cesar en el departamento del Cesar. Las coordenadas de la zona son: Latitud: 10, 182,7058. Longitud: -73.595371315.

La germinación in vitro de las esporas HMA en vitroplantas de yuca, se efectuó en el laboratorio de biotecnología vegetal del centro biotecnológico del caribe SENA CBC regional Cesar.

8.3 Muestra

Se realizó el aislamiento de esporas a partir del suelo recolectado; las vitroplantas de yuca se obtuvieron del material vegetal proveniente del área de incubación del laboratorio de biotecnología vegetal del centro biotecnológico del caribe SENA CBC regional Cesar.

8.4 Toma de muestra:

Para la recolección de la muestra se seleccionaron varios puntos estratégicos del lote. Se realizó un muestreo de tipo Zig-zag en todo el terreno, a una profundidad de 25 cm de largo por 25 cm de ancho, con ayuda de una pala se retiró la primera capa de suelo, luego de lo cual se procedió a tomar aproximadamente 100 g de suelo por punto muestreado. El suelo recolectado se depositó en bolsas resellables estériles y posteriormente se rotuló, para luego ser trasladado a las instalaciones del laboratorio de biotecnología vegetal del Centro Biotecnológico del Caribe SENA Regional César.

8.5 Tratamiento del suelo

A partir del suelo colectado se realizó tamizado húmedo (Gendermann y Nicholson, 1963) con modificaciones. En este caso, inicialmente se tomó la cantidad de suelo necesario el cual fue cernido y depositado en beaker de 1000 ml hasta la cuarta parte de su capacidad, y completado hasta 1000 ml con agua potable, se agitó por 10 minutos, este contenido se hizo pasar por tres tamices en orden descendentes en cuanto el tamaño de los poros así, primero el de 500 μm , 250 μm , 150 μm y 38 μm ; de tal forma que las partículas recolectadas en el último

tamiz correspondiente a 38 μm se depositaron en un tubo falcon por desplazamiento de las partículas sobre el tamiz con agua potable utilizando un frasco lavador; este procedimiento se realizó por triplicado.

El filtrado obtenido en los tres lavados se agregó en un tubo falcon de 50 ml de capacidad el cual se completó hasta su aforo con una solución de sacarosa al 60% y se llevó a la centrífuga (Eppendorf 5702) a 4000 RPM por 4 minutos. El sobrenadante se depositó nuevamente en el tamiz de 38 μm y se enjuagó con abundante agua potable hasta eliminar los restos de sacarosa; luego de lo cual se recogió en una placa de Petri a la cual se le adicionó 2 gotas de NaClO al 2%.

8.6 Aislamiento de esporas:

La placa de Petri que contenía el filtrado con las esporas se llevó a cabina de flujo laminar, donde se procedió a extraer las esporas en el estéreo microscopio (Optika Italy SZMA1) con la ayuda de una micropipeta (Brand) de 20 μl . Las esporas se pasaron a 3 placas de Petri que contenían agua desionizada estéril, este proceso se realizó de forma consecutiva para separar los restos de suciedad de las esporas. Se aislaron esporas de diferentes morfologías. Estas se depositaron en un tubo Eppendorf al cual se le agregó lactato de Ranger y se llevó a refrigeración a temperatura de 4 °C.

8.7 Desinfección de esporas:

Las esporas se trasladaron a cabina de flujo laminar para ser sometidas al proceso de desinfección utilizando la metodología propuesta por Pérez et al.,

(2011), con modificaciones. Primeramente, se extrajeron las esporas de la solución de lactato de Ranger con ayuda de una micropipeta, se depositaron en una caja de Petri y se procedió al siguiente tratamiento: 3 enjuagues con agua desionizada estéril (ADE) + adición de cloramina T al 2% (10 minutos) + 3 enjuagues con ADE + desinfección con antibiótico (Estreptomicina 200 mg+ gentamicina sulfatada 100 mg) + 3 enjuagues con ADE.

8.8 Multiplicación de vitroplantas de yuca

Se tomaron del área de incubación las vitroplantas de yuca para multiplicación que presentaban los siguientes criterios de inclusión : buen desarrollo, tallos gruesos y elongados y buen desarrollo de raíces; se sembraron de uno a tres explantes por contenedor en medio *Murashige & Skoog* (M&S) modificado con adición de azúcares y vitaminas, de tal manera que las yemas apicales se sembraron de una por contenedor y las yemas axilares de dos y tres por contenedor dependiendo del grosor del explante. Al cumplir 2 meses de incubación se seleccionaron las plantulas de yuca que presentaban mejor crecimiento.

8.9 Inoculación y germinación de esporas HMA:

Se tomaron un total de 60 vitroplantas de yuca de 2 meses de desarrollo y se llevaron a cabina de flujo laminar, se les agregó agua desionizada estéril por 10 minutos para facilitar la salida de las raíces del medio de cultivo, posteriormente se

pasaron a un contenedor con agua desionizada estéril con ayuda de una pinza. Para la siembra de las vitroplantas con la espora HMA se utilizó medio Strullu-Romand (MSR) modificado, servido en placas de Petri desechables; a cada placa de medio se le realizó una abertura lateral y se introdujo la vitroplanta, dejando las raíces y parte del tallo inferior dentro de la placa en contacto con el medio, mientras que la parte superior de la vitroplanta quedó fuera de la placa; se inoculó la espora desinfectada en la base del tallo, se selló el orificio con vaselina (Athos) y se envolvió la placa con parafilm; las placas se desinfectaron externamente con hipoclorito de sodio al 2% y con etanol al 70% y se envolvieron en papel aluminizado, para finalmente ser llevadas a cámara húmeda ubicadas en posición vertical por 15 días, con fotoperíodo de 16 horas a 22/18 °C (día/noche) y una humedad relativa del 70 % (Voges et al., 2005).

8.10. Diseño experimental:

Se aplicó diseño preexperimental; para estandarizar la técnica se tomó cada ensayo como 1 tratamiento el cual se llevó a cabo en diferentes tiempos (con intervalos de un mes) y repeticiones de 20 placas para cada uno; dónde se realizó la inoculación de una espora por vitroplanta de yuca. En este caso se observó si hubo producción de micorriza utilizando el mismo tiempo de germinación para cada tratamiento.

Tratamiento	
Réplicas	Descripción

R-1	R-1: primera réplica de 20 placas.
R-2	R-2: segunda réplica de 20 placas.
R-3	R-3: tercera réplica de 20 placas.
R-4	R-4: cuarta replica de 20 placas.

Figura 5 Diseño experimental

Fuente: elaboración propia.

8.11 Análisis de Resultados

Se determinó el porcentaje de germinación; para el análisis de los datos se utilizó el software IBM SPSS versión 27. Se realizó un análisis de varianza (Anava) para los datos registrados con una distribución normal y homogeneidad de varianzas. Posteriormente los datos fueron sometidos a análisis estadístico por medio de Tukey para identificar las diferencias significativas ($p \leq 0,05$) se empleó la prueba de Rangos Múltiples de Duncan y se aplicaron ambas pruebas a todas las variables al tiempo.

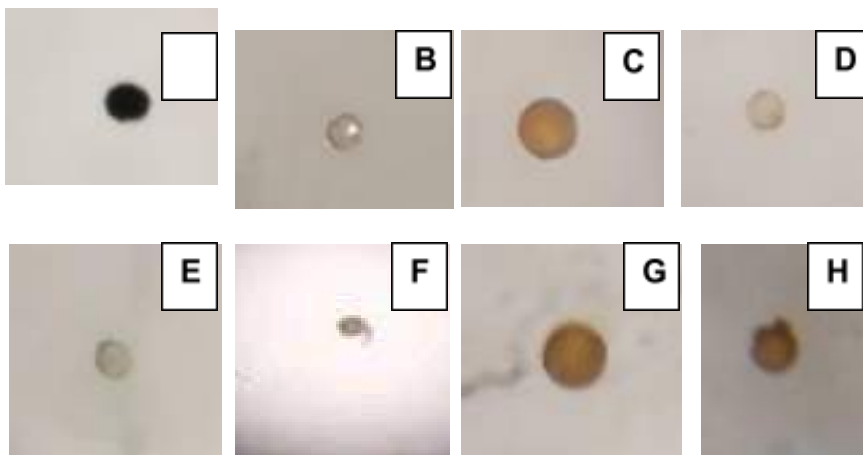
9 ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Aislamiento de esporas HMA.

Las modificaciones realizadas a la metodología de tamizado húmedo Gendermann y Nicholson, permitieron el aislamiento de un mayor número de esporas HMA de diferentes morfologías; así mismo, se consiguió una muestra más limpia lo que facilitó el aislamiento de las esporas HMA de los restos de suciedad propios de la muestra de suelo. Para la identificación de las especies, se empleó las claves taxonómicas del INVAM. De acuerdo al análisis morfológico de las esporas aisladas, se encontraron 5 posibles géneros de los 19 géneros conocidos (*Glomus*, *Septoglomus*, *Scutellospora*, *Rhizophagus* y *Acaulospora*), el más común fue *Glomus*. Resultados similares al de Medina L. et al. (2010) quienes identificaron a los géneros (*Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*). Torres Y. et al. (2015) determinaron la presencia de 30 especies, de las cuales el 67% se ubicó dentro del género *Glomus*, en su estudio sobre las comunidades de HMA presentes en bosques semicaducifolios de la Ciénaga de Zapata, Cuba. González I. et al. (2020) identificó a los géneros *Glomus sp* y *Acaulospora sp* en su estudio de aislamiento de esporas autóctonas en suelos de fincas ganaderas en República Dominicana. Torres Y. et al (2017) Identificaron un total de 38 especies de HMA entre las plantas y las condiciones ambientales analizadas. *Archaeospora sp.1*, *Glomus sp.5*, *Glomus brohultii* y *G. glomerulatumse*.

En el presente estudio, se obtuvieron 176 esporas HMA por 100 gramos de suelo; lo cual es un resultado mayor al obtenido por otros autores, como Urgiles N. et al.

(2019) consiguió el aislamiento de un promedio de frecuencia de 102 esporas por 100 gramos de suelo proveniente de zonas riparias; por su parte, Tapias J. et al (2008) cuantificaron más de 100 esporas en 100 gramos de suelo seco de suelos salinos. Sin embargo, Salgado S. et al. (2014) aislaron un promedio de 943 esporas por 100 gramos de suelo cultivados con caña de azúcar; Restrepo K. et al. (2019) presentaron valores de recuento de esporas HMA que variaron desde 51 a 363 esporas/g de suelo seco en suelos ganaderos. Estos resultados evidencian que la cantidad de esporas HMA aisladas no solo depende de la técnica de aislamiento, si no que incide también el tipo de suelo.



9.2 Desinfección de esporas HMA

En el análisis estadístico realizado Tukey y Duncan, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos para los parámetros analizados, los cuales fueron formación de micorriza, seguido del parámetro de contaminación y las placas donde no se evidencia germinación ni contaminación.

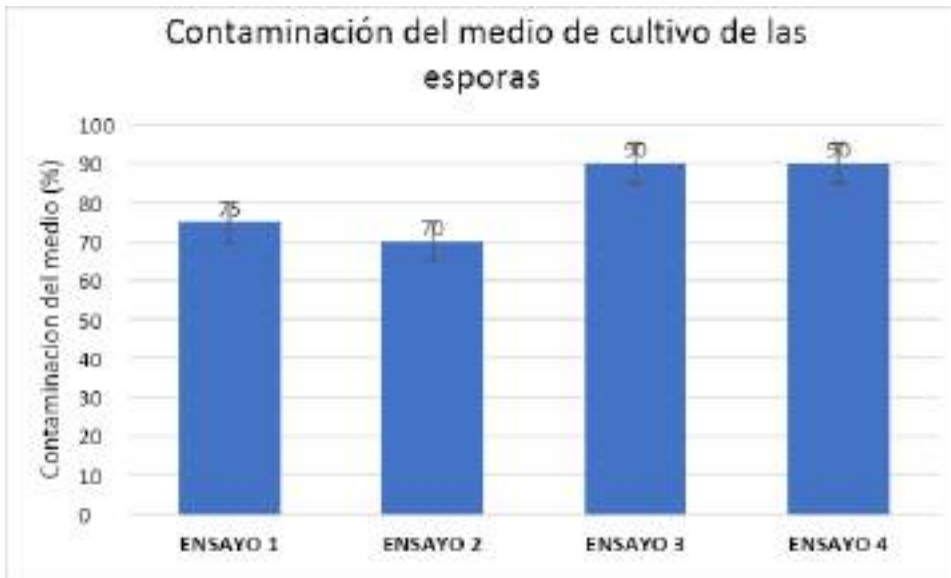


Figura 7 Contaminación del medio de cultivo de las esporas de HMA en cada uno de los ensayos.

En este sentido, el porcentaje de contaminación fue del 80% mucho mayor al obtenido por Pérez et al., (2011) del 1%; esto podría explicarse dado que la efectividad de la metodología de desinfección puede variar entre cepas HMA (Perera et al.2019). Por su parte, Perera et al., (2019) utilizando una metodología de desinfección similar a la llevada a cabo en la presente investigación, presentaron un 60% de contaminación, mientras que realizando un ajuste en el tiempo de exposición de las esporas HMA a la solución antibiótico por 24 horas, lograron reducir la contaminación en un 46%.

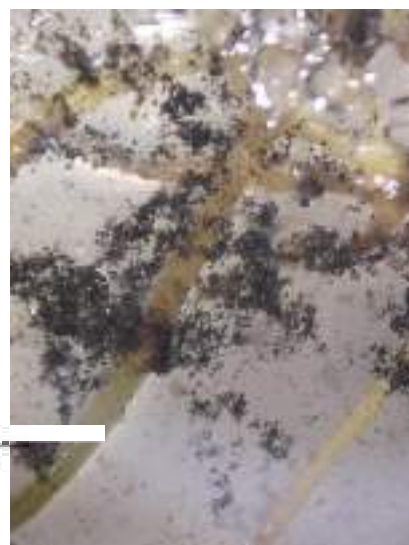


Figura 8 Micrografía de las esporas de HMA.



En otras investigaciones se han logrado buenos resultados de desinfección en cepas específicas; tal es el caso de Mirabal L., (2002) quienes establecieron un método efectivo para la desinfección total de la pared externa de las esporas de HMA de *Glomus clarum*. Fernández K. et al. (2005) lograron la germinación rápida y exitosa de *Glomus mosseae* en ausencia de contaminantes. Perera S. et al (2022) establecieron con éxito el cultivo monoxénico de *R. irregularis* en raíces de achicoria transformadas.

Por otro lado, Perera et al. (2019) hace énfasis en la importancia del proceso de desinfección y como este tiene la capacidad de causar variación en la germinación de las esporas generando que estas germinen entre el sexto y octavo día, obteniendo en promedio un 50 % y un 60% de contaminación siendo esta la limitante para la obtención de un mayor número de germinantes. Bagó y Cano (2005) muestran que la mayor parte de la contaminación es causada por el contenido de la espora, y es que del interior de estas se logró realizar el

aislamiento de una variedad de microorganismos, y sería esa una de las variables que tiene mayor impacto sobre la germinación de las esporas.

En este sentido, para evaluar la efectividad de un protocolo de desinfección para esporas HMA, no basta solamente con tener en cuenta las soluciones desinfectantes, la variación en el tiempo de exposición a los mismos, los factores medio ambientales o la especie de la spora HMA; si no que también juega un papel fundamental el medio de cultivo dónde se va a realizar el estudio; ya que no es lo mismo probar la efectividad de la desinfección en un medio pobre nutricionalmente que resulta en una limitante para la proliferación de contaminantes presentes en las paredes externas de las esporas, como el caso del agar agua, a inocular esporas desinfectadas en medios más nutritivos como M & S, MSR o White. Fernández K., et al. (2005) observaron menores valores de contaminación en medio agar agua, no solo para el tratamiento de desinfección evaluado sino también en el tratamiento control, dónde éstos disminuyeron a la mitad (42.8%) en relación con su homólogo el medio White (93,0%).

9.3 Porcentaje de germinación de esporas HMA en sistema de cultivo autotrófico de yuca

En el desarrollo de la investigación, el porcentaje de germinación fue de $12,5 \% \pm 5,8$. Por su parte, Pérez et al., (2011) obtuvo mayor germinación de esporas (80%) aplicando flavonoide 3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona a una concentración de $5 \mu\text{M}$ a los 4 días de incubación. Mientras que la germinación en el tratamiento control

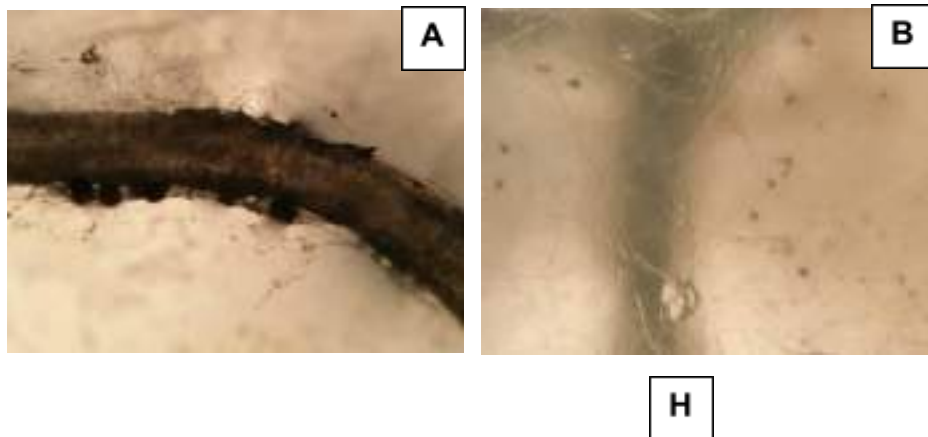
(sin adición del flavonoide 3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona) fue del 33.3% a los 12 días de incubación. Cabe mencionar, que la contaminación puede incidir directamente en la germinación y desarrollo de las esporas (Fernández et.al. 2005). Ramírez et al. (2019), señala que los exudados radiculares, en especial los flavonoides, tienen efecto como estimulantes de la germinación de esporas y proceso de colonización de micorriza arbuscular.



Figura 9 Germinación de esporas en cada uno de los ensayos con intervalo de tiempo. Valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente según Tukey.

Arismendi L. et al (2001) señala que la planta de yuca tiene la habilidad para formar simbiosis vesiculo-arbusculares. Esto permite que la planta mejore la capacidad de absorción de nutrientes como el fósforo en suelos relativamente pobres, lo que se traduce en altos rendimientos del cultivo. Manuel C. et al (2018) obtuvo incremento en el rendimiento del cultivo de yuca, al aplicar cepas eficientes de micorriza. Así mismo; Cuenca G. et al (2007) logró un aumento en la cosecha

de más del 200%, con la aplicación del inoculante *G. manihotis*, sin adición de fertilizantes químicos. Por otro lado; João P. et al (2016) observó incrementos significativos al inocular *Funneliformis mosseae* en cultivo de yuca, en Kibala, Angola en todas las variables evaluadas, obteniéndose plantas más vigorosas con mayor crecimiento e incrementos en altura de 21 %, los rendimientos en raíces comestibles se elevaron de 14,4 Mg ha⁻¹ en el tratamiento testigo a 33,6 Mg ha⁻¹ en el tratamiento inoculado y las esporas micorrízicas en cosecha se incrementaron ocho veces, indicando la efectividad de *F. mosseae* en estas condiciones edáficas.



Leos et al. (2019) obtuvo un 11,6 % de esporas HMA germinadas en agar agua a los 32 días de incubación. Pérez et al. (2012) obtuvo 100% en la frecuencia de micorrización en cultivo autotrófico de mora a las 2 semanas de incubación. Voest et al (2005) obtuvieron %F que alcanzó un valor de $74 \pm 7\%$ a las 22 semanas en cultivo autotrófico de papá, utilizando como inoculante raíces de zanahoria



Figura SEQ figura_ * ARABIC 10 A, B, C
Micorrización y germinación de esporas HMA

transformadas colonizadas con *Glomus intraradices*. Fernández et al. (2013) realizó el establecimiento de HMA in vitro en plántulas de papa, evaluando tres tipos de medio de cultivo: SRM, MS y $\frac{1}{2}$ MS, las condiciones suministradas fueron: 22°C, 70 % de humedad relativa, fotoperiodo de 16 h. día⁻¹ y flujo fotosintético de 225 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y mantenidos en posición vertical durante los 30 días. Como resultado obtuvieron un 50 % de germinación en el medio SRM, 15-20 % medio $\frac{1}{2}$ MS y germinación nula en el medio MS.

Por lo anterior se asume la importancia que ocupa la composición del medio a utilizar para el establecimiento y germinación de HMA en un sistema in vitro, por ende Fernández et al. (2013) Evaluó en comportamiento de la colonización micorrízica en medio MS efectuando variaciones en la concentración de N, P y K,

los cuales generaron cambios significativos en el crecimiento de la plántula, establecimiento y germinación de micorrizas, en donde la disminución conjunta de $\frac{1}{4}P$ - $\frac{1}{4}N$ produjo la germinación en 10 días, una obtención promedio de 70 esporas por placa y un porcentaje de germinación de 15.

10 CONCLUSIÓN

Se logró de manera exitosa el cultivo in vitro de HMA por primera vez en sistema de cultivo autotrófico de yuca. Las modificaciones realizadas a la metodología de aislamiento de esporas, hizo posible obtener una muestra más limpia, lo que facilitó el aislamiento de un mayor número de esporas HMA. El protocolo de desinfección utilizado presentó baja efectividad, ya que se contaminaron cerca del 80% de las placas. Se estableció el porcentaje de germinación de esporas HMA en sistema de cultivo autotrófico de yuca, el cual fue de $12,5 \% \pm 5,8$.

11 RECOMENDACIONES

Realizar ajustes al protocolo de desinfección con el que se consiga la disminución de la contaminación al menos a un porcentaje del 50% para esporas HMA de diferentes especies. Así mismo, se podría realizar una pregerminación de la espora HMA antes de ser inoculada al sistema de cultivo autotrófico para aumentar así el porcentaje de germinación y micorrización.

12 BIBLIOGRAFÍAS

- Abovbina, W., Sapuan, S. M., Ilyas, R. A., Sultan, M. T. H., Alkbir, M. F. M., Sulaiman, S. & Bayraktar, E. (2022). Recent Developments in Cassava (*Manihot esculenta*) Based Biocomposites and Their Potential Industrial Applications: A Comprehensive Review. *Materials*, 15(19), 6992.
- Anwar, F., Sanitha, M., Tripathi, L., Muiruri, S. (2023). Cassava (*Manihot esculenta*) dual use for food and bioenergy: A review. *Food and Energy Security*, 12(1), e380. <https://doi.org/10.1002/fes3.380>
- Arancibia, R., Flores, M., Cabrera, T., Beiza, J., Obando, J. (2022). Evaluación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la rehabilitación

ecológica de ecosistemas con actividad minera. *Ecosistemas*, 31(2), 2304-2304. Doi: <https://orcid.org/0000-0002-8857-904X>

- Aranguren, Y., Castellanos, L., Escalante, J. (2020). Hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) en frutales de Colombia y su comparación con investigaciones internacionales: Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in Colombian fruit trees and their comparability with international research. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 5(1), 27-37.
- Arismendi, L. G. (2001). Investigación sobre el cultivo de la yuca (*Manihotesculenta esculenta* Crantz.) en el Oriente de Venezuela. *Revista científica UDO Agrícola*, 1(1), 1-10.
- Barahona, L., Villarreal, J., Carrasco, W., Quirós, E. (2019). Absorción de nutrientes en arroz en un suelo inceptisol bajo riego en Coclé, Panamá. *Agronomía Mesoamericana*, 30(2), 407-424. doi:10.15517/am.v30i2.33997
- Bascuñán, D. A. (2021). Propagación *in vitro* de maqui (*Aristotelia chilensis*) mediante condiciones autotróficas (Doctoral dissertation, Universidad de Talca (Chile). Facultad de Ciencias Agrarias). Disponible en: <http://dspace.otalca.cl/handle/1950/12468>
- Becerra, L. (2022). Efecto de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el crecimiento y producción del tomate (*Lycopersicum esculentum* L.). Tomado de: <https://repositorio.untrm.edu.pe/handle/20.500.14077/2727>
- Bedoya, B., Dossman, M., Marin, J. (2021). Valoración ecológica de los servicios ecosistémicos prestados por el suelo en fincas cafeteras en Belén

de Umbría, Colombia. *Revista de Ciencias Ambientales*, 55(1), 160-181.
<https://dx.doi.org/10.15359/rca.55-1.8>

- Benjumea, A. (2023). Identificación molecular de esporas de Hongos Micorrízicos Arbusculares fenotípicamente asociados a *Glomus* spp en suelos de cultivo de Yuca y Frijol [Manuscrito en preparación].
- Bernal, J. L. C., Cuenca, L. A. B., & Ortega, Y. B. S. (2020). Producción ganadera: la deforestación y degradación del suelo, una estrategia para el desarrollo sostenible. *Revista Científica Agroecosistemas*, 8(1), 77-82.
- Bula, A. O. (2020). Importancia de la agricultura en el desarrollo socio-económico. Disponible en: <http://biblioteca.puntoedu.edu.ar/handle/2133/18616>
- Cacace, G. (2022). Argentina y los agroquímicos. Posición. *Revista Del Instituto De Investigaciones Geográficas*, (8), 1–26. Disponible en: <https://posicion-inigeo.unlu.edu.ar/posicion/article/view/45>
- Carreón, Y., Treviño, E., Beltrán, M., Martínez, M., Trejo, D., Gavito, M. (2013). Aislamiento y propagación de cultivos puros de hongos micorrízicos arbusculares provenientes de huertas de aguacate con diferente manejo agrícola por la técnica de minirizotróf. *Revista mexicana de micología*, 37, 29-39. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018731802013000100005&lng=es&tlng=es.
- Cuenca, Gisela, Cáceres, Alicia, Oirdobro, Giovanny, Hasmy, Zamira, & Urdaneta, Carlos. (2007). Las micorrizas arbusculares como alternativa

para una agricultura sustentable en áreas tropicales. *Interciencia*, 32(1), 23-29. Recuperado en 13 de agosto de 2023, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442007000100006&lng=es&tlng=es.

- Danesh, Y., Kariman, K., Keskin, N., Najafi, S. (2022). Characterization of arbuscular mycorrhizal fungal communities associated with vineyards in northwestern Iran. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 46(3), 271-279.
- Ek, J. (2019). Establecimiento de la producción de hongos micorrízicos arbusculares asociados a cocotero a través de cultivos trampa (Doctoral dissertation, Centro de Investigación Científica de Yucatán). Disponible en: https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/1567/1/PCB_M_Tesis_2019_Jorge_Ek_Chim.pdf
- Escaleras, J., Herrera, S., Sánchez, A. (2022). Aclimatización de vitroplantas de banano con hongos micorrízicos arbusculares acclimatization of vitroplants of banana with arbuscular mycorrhizal fungi. Cuba. Disponible en: <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/article/download/554/527#page=15>
- Farfan, S. (2022). Efecto de comelina (*Callisia repens* L.) y hongos micorrízicos arbusculares en la disminución de cadmio en cacao (*Theobroma cacao* L.) en Pumahuasi, Leoncio Prado, Huánuco 2018. Disponible en: <https://repositorio.unheval.edu.pe/handle/20.500.13080/7719>

- Fernández, K., Fernández, F., Rivera, R., Olalde, V. (2005). Metodología para la germinación de esporas de *Glomus mosseae*. Cultivos Tropicales , 26 (2), 11-16.
- García, H. (2020). Convenio de Diversidad Biológica y su marco mundial. Situación y reflexiones en torno al estado actual de la biodiversidad en Colombia. Tomado de: <http://hdl.handle.net/20.500.11761/35465>
- Gianinazzi, V., Smith, S., Gianinazzi, S. (2010). Developments in arbuscular mycorrhizal fungi research and its role in salinity stressed agriculture. In Soil biology and agriculture in the tropics (pp. 191-221). Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-10628-9_7
- Goh, D., Martin, J, Banchini, C., MacLean, A., Stefani, F. (2022). RocTest: un método estandarizado para evaluar el rendimiento de los cultivos de órganos de la raíz en la propagación de hongos micorrízicos arbusculares. Fronteras en Microbiología, 13.
- Gómez, Y., Avilés, J., Mena, H., Ortiz, G. (2022). Producción de plántulas de yuca bajo la técnica de sistema autotrófico hidropónico (SAH). Alcances Tecnológicos, 15(1), 116-132. Recuperado a partir de http://revista.inta.go.cr/index.php/alcances_tecnologicos/article/view/226
- González, I. (2020). Aislamiento de Esporas de micorrizas autóctonas procedentes de fincas ganaderas de Montecristi, República Dominicana: Aislamiento de esporas de micorrizas. APF, 9(2), 57-68.
- IDEAM. (2017). El 40 por ciento del territorio colombiano tiene algún grado de erosión. Disponible en:

http://www.ideam.gov.co/inicio?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_returnToFullPageURL=%2Fweb%2Fguest%2Finicio%3Fp_p_id%3D3%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dmaximized%26p_p_mode%3Dview%26_3_groupId%3D0&_101_assetEntryId=22010097&_101_type=content&_101_groupId=24277&_101_urlTitle=el-40-por-ciento-del-territorio-colombiano-tiene-algun-grado-de-erosion&redirect=http%3A%2F%2Fwww.ideam.gov.co%2Finicio%3Fp_p_id%3D3%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dmaximized%26p_p_mode%3Dview%26_3_groupId%3D0%26_3_keywords%3Derosion%2Bdel%2Bsuelo%26_3_struts_action%3D%252Fsearch%252Fsearch%26_3_redirect%3D%252Fweb%252Fguest%252Finicio%253Fp_p_id%253D3%2526p_p_lifecycle%253D0%2526p_p_state%253Dmaximized%2526p_p_mode%253Dview%2526_3_groupId%253D0&inheritRedirect=true

- INVAM. (S.F). International culture collection of arbuscular and vesicular mycorrhizal fungi. Species descriptions from reference culture, names and authorities of fungi in Glomales. <https://invam.ku.edu/species-descriptions>
- João, José P, Mutunda, Moniz P, Taíla, Amílcar F, & Rivera Espinosa, Ramón. (2016). Potencialidad de los inoculantes micorrízicos arbusculares en el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en Kibala, Angola. *Cultivos Tropicales*, 37(2), 33-36. Recuperado en 13 de agosto de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362016000200004&lng=es&tlng=es.

- Lehmann, A., Rillig, M. (2015). Arbuscular mycorrhizal contribution to copper, manganese and iron nutrient concentrations in crops—a meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 81, 147-158. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.11.014>
- Liu, Y., Chen, J., Wu, Q., Ren, X. (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi improve plant growth, nitrogen uptake, and nitrogen use efficiency in acidic soil amended with biochar. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(1), 734-743. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3696-3>
- Manuel, C., & Alexis, F. M. (2018). Response of Cassava Cultivation (Manihot Esculenta, Grantz) to the Application of Mycorrhiza in the Guantanamo Valley. *Contemporary Problems of Social Work*, 4(2), 130-137.
- Mármol, M. (2019). Micorrización *in vitro* de *Leccinum aurantiacum* (Bull.) sobre *Populus tremula* (L.). Disponible en: <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/38387/TFM-L475.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Martínez, H. (2019). Agroquímicos en Quintana Roo: Impacto en la Alimentación, Salud y Medio Ambiente. *Estudios Interculturales*, Vol. 2 Núm. 9 (2019): Año 6, Número 9, Vol. Especial II. Disponible en: <http://estudiosinterculturales.com/rei-ojs/index.php/ei/article/view/24>
- Medina, L, Rodríguez, Y, Torres, Y, Herrera, R. (2010). Aislamiento e identificación de hongos micorrízicos arbusculares nativos de la zona de las Caobas, Holguín. *Cultivos Tropicales*, 31(3), 00. Recuperado en 12 de agosto de 2023, de

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000300014&lng=es&tlng=pt.

- Medina, L. (2022). Los hongos micorrízicos arbusculares y su rol en los agroecosistemas. *Cultivos Tropicales*, 43(1), 14. <https://doi.org/10.1234/ct.v43i1.1650>
- Mirabal, L., Ortega, E., Rodés, R., Fernández, F. (2002). Método efectivo para la desinfección total de esporas de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA): aislamiento y caracterización de bacterias endospóricas en *Glomus clarum*. *Cultivos Tropicales*, 23(1), 21-25.
- Muñiz, R. (2019). Diseño y construcción de un sistema de inmersión temporal de bajo costo para la propagación *in vitro* de plantas bajo el enfoque de una tecnología apropiable. *Tekhné*, 22(2). Recuperado a partir de <https://revistasenlinea.saber.ucab.edu.ve/index.php/tekhne/article/view/4070>
- Navarrete, E., Arteaga, C., Leturne, H., Izurieta, M., Sanchez, A. (2022). Influencia de hongos micorrízicos más ácidos húmicos en la producción de maíz duro (*Zea mays* L.) en Babahoyo. *Journal of Science and Research: Revista Ciencia e Investigación*, 7(2), 2. Tomado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8579981>
- Ontaneda, A. L. C., Herrera, A. M., & Batista, R. M. G. (2020). Eficiencia del sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional *in vitro*. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 3(2), 173-182.

- Ortiz Toro, Jose. (2016). Remoción de cromo en columna empacada con cáscara de yuca (*Manihot esculenta*).
- Perera, S., Fernández, K., Pérez, E. (2019). Germinación y crecimiento de propágulos de *Rhizoglosum* sp. in vitro. *Cultivos Tropicales*, 40(2).
- Pérez, U., Ramírez, M., Núñez, V., Franco, M., Roveda, G. (2012). Evaluación de un sistema para la micorrización *in vitro* en plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth). *Universitas Scientiarum*, 17(2), 140-151. Retrieved April 24, 2023, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-74832012000200002&lng=en&tlng=es.
- Pérez, U., Ramírez, M., Serralde, D., Peñaranda, A., Wilches, Wilmar., Ramírez, L., Rengifo, G. (2019). Hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) como estrategia para reducir la absorción de cadmio en plantas de cacao (*Theobroma cacao*). *Terra Latinoamericana*, 37(2), 121-130. <https://doi.org/10.28940/terra.v37i2.479>
- Quispe, M. (2021). Evaluación de la concentración y absorción de nutrientes en el cultivo de vid (*Vitis vinífera*) variedad Ivory bajo el sistema de conducción parrón español.
- Restrepo, K., Montoya, M., Henao, P., Gutiérrez, L., Molina, L. (2019). Caracterización de hongos micorrízicos arbusculares de suelos ganaderos del trópico alto y trópico bajo en Antioquia, Colombia. *Idesia (Arica)*, 37(1), 35-44. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292019005000301>

- Reyes, D. (2023). Micorrizas asociadas a Quercus sp en la localidad del salto en Tilzapotla, Morelos. Disponible en: <http://riaa.uaem.mx/handle/20.500.12055/3194>
- Salgado, S., Castelán, M., Jiménez, R., Gómez, J., Osorio, M. (2014). Diversidad de hongos micorrícicos arbusculares en suelos cultivados con caña de azúcar en la región de la Chontalpa, Tabasco. Revista mexicana de micología, 40, 7-16. Recuperado en 30 de julio de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802014000200003&lng=es&tlng=es.
- Sánchez, N. (2020). El cambio climático y la degradación del suelo: estudio de caso cuenca arroyo estacas, provincia de entre ríos, argentina climate change and soil degradation: case study of cuenca arroyo estacas, entre ríos province, Argentina. Collectivus, Revista de Ciencias Sociales – Universidad del Atlántico- Vol. 7, No.2 - pp. 30-52. Disponible en: <https://scholar.archive.org/work/lpnmxj33c5gjzfhfzzk7rh7oium/access/wayback/http://investigaciones.uniatlantico.edu.co/revistas/index.php/Collectivus/article/download/2672/3366>
- Schmidt, M., López, V., Tobías, M., Grinberg, E., Merlinsky, G. (2022). Conflictividad socio-ambiental por uso de agroquímicos en Salta, Santiago del Estero y Santa Fe, Argentina. Ciência & Saúde Coletiva, 27, 1061-1072.
- Smith, S., Read, D. (2010). Mycorrhizal symbiosis. Academic press. Pages 637-768. ISBN 9780123705266, Doi:

<https://doi.org/10.1016/B978-012370526-6.50020-9>. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/book/9780123705266/mycorrhizal-symbiosis>

- Solano, J. (2018). La minería en Colombia: del impacto al desastre. Tomado de: https://www.researchgate.net/publication/328203239_La_mineria_en_Colombia_del_impacto_al_desastre/link/5bbf6b5e92851c88fd65091c/download
- Tapia, J., Ferrera, R., Varela, L., Rodríguez, J., Lara, J., Soria, J., Cuellar, H., Tiscareño, M., Cisneros, R. (2008). Caracterización e identificación morfológica de hongos formadores de micorriza arbuscular, en cinco suelos salinos del estado de San Luis Potosí, México. *Revista mexicana de micología*, 26, 1-7. Recuperado en 30 de julio de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802008000100001&lng=es&tlng=es.
- Tenorio, M. (2021). Multiplicación de hongos micorrízicos arbusculares nativos de cacao (*Theobroma cacao* L.) con cultivos trampa, en Nueva Cajamarca-Rioja. Disponible en: https://repositorio.ucss.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14095/1091/Tenorio_Miguel_tesis_2021.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Teófilo, I. (2023). Aislamiento, reproducción y evaluación de micorrizas de un andosol de uso forestal. Disponible en: http://www.riaa.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/20.500.12055/3277/TERIC_R08.pdf?sequence=1&isAllowed=y

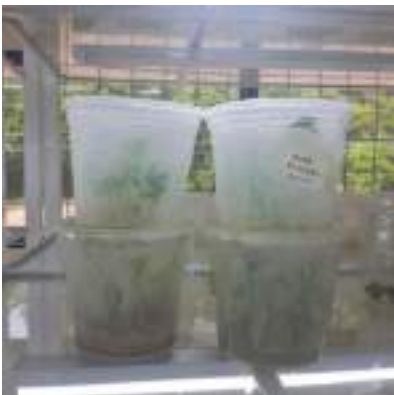
- Tonato, L. (2021). Estandarización del protocolo de micropropagación *in vitro* de *Eryngium* (*eryngium maritimum*) a partir de meristemas axilares en la empresa LePlant (Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Carrera de Ingeniería Bioquímica).
- Torres, Y., Fors, R., Nobre, C., Gómez, E., Berbara, R. (2017). Production of native arbuscular mycorrhizal fungi inoculum under different environmental conditions. *brazilian journal of microbiology*, 48, 87-94.
- Torrres, Y., Ortega, R., González, S., Furrzola, E. (2015). Diversidad de hongos micorrizogenos arbusculares (Glomeromycota) en bosques semicaducifolios de la Ciénaga de Zapata, Cuba. *Revista del Jardín Botánico Nacional*, 36, 195+. <https://link.gale.com/apps/doc/A464981986/AONE?u=anon~5397153a&sid=googleScholar&xid=fe7145be>
- Uc, A., Arreola, J., Carrillo, E., Osnaya, M., Alarcón, A., Ferrera, R., Landeros, C. (2019). Inoculación de hongos micorrízicos arbusculares en el cultivo de *Heliconia stricta*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(5), 1057-1069. Doi: <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i5.1608>
- Urgiles, N., Guachanamá, J., Granda, I., Robles, Á., Encalada, M., Loján, P., Quichimbo, L. (2020). Caracterización morfológica de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) asociados al café en sistemas agroforestales de la provincia de Loja, Ecuador. *Bosques Latid. Cero*, 10, 137-145.

- Uribe, A., Valdez, N., Trujillo, M. Un acercamiento a la fisiología y producción de hongos micorrizicos arbusculares. BioTecnología, Año 2017, Vol. 21 No. 1. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Mauricio-Trujillo-Roldan/publication/356569041_UN_ACERCAMIENTO_A_LA_FISIOLOGIA_Y_PRODUCCION_DE_HONGOS_MICORRICICOS_ARBUSCULARES/links/61a166e407be5f31b7ba1db1/UN-ACERCAMIENTO-A-LA-FISIOLOGIA-Y-PRODUCCION-DE-HONGOS-MICORRICICOS-ARBUSCULARES.pdf
- Vallejos, G., Sánchez, T., García, M., Trigoso, M., Arévalo, L. A. (2019). Efecto de hongos formadores de micorrizas arbusculares en clones de café (*Coffea arabica*) variedad Caturra. Acta Agronómica, 68(4), 278-284. Doi: <https://doi.org/10.15446/acag.v68n4.72117>
- Vilchis, I., Aguilar, E., Montiel, L., Enríquez, G. (2019). Viabilidad de esporas de hongos micorrizicos arbusculares y semillas de girasol para el establecimiento de la simbiosis micorrizica. Disponible en: <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/2897>
- Wilches, W., Ramírez, M., Pérez, U., Serralde, D., Peñaranda, A., Ramírez, L. (2019). Asociación de hongos micorrizicos arbusculares (HMA) con plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) para la producción de panela en Colombia. Terra Latinoamericana, 37(2), 175-184. Doi <https://doi.org/10.28940/terra.v37i2.481>
- Zazueta, A., Burboa, C., Ramírez, D., Flores, H., Segura, M., Gómez, J. (2021). Caracterización de frutos tomate (*Solanum lycopersicum*) en plantas

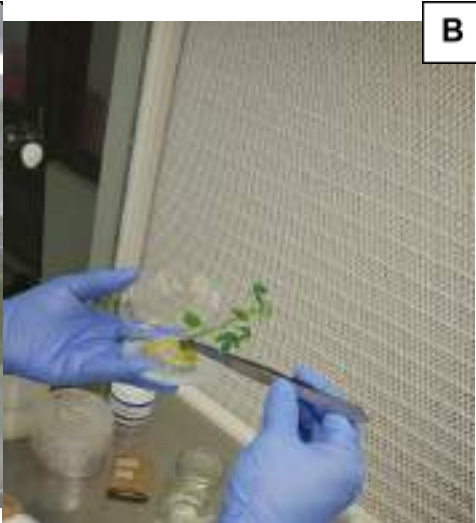
colonizadas por el hongo micorrízico arbuscular *Rhizopagus irregularis* en condiciones de estrés salino. Acta universitaria, 31.

13 ANEXOS

Multiplicación de yuca



Sistema de cultivo autotrófico



GERMINACION

			Subconjunto para alfa = 0.05
ENSAYON			1
HSD Tukey ^a	1,00	20	,1000
	3,00	20	,1000
	4,00	20	,1000
	2,00	20	,2000
	Sig.		,783
Duncan ^a	1,00	20	,1000
	3,00	20	,1000
	4,00	20	,1000
	2,00	20	,2000
	Sig.		,399

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

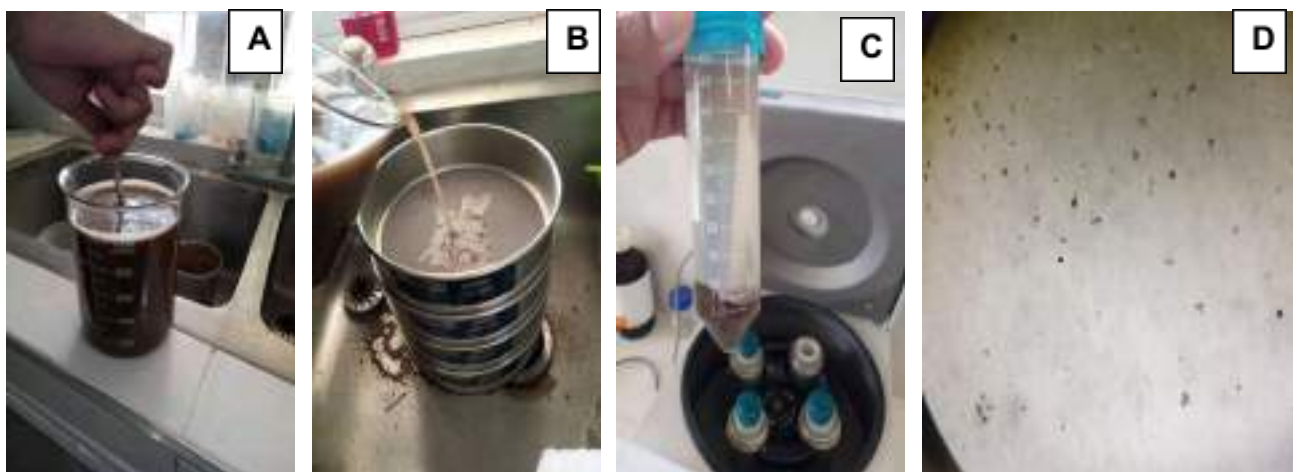
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 20,000.

CONTAMINACION

			Subconjunto para alfa = 0.05
	ENSAYO N		1
HSD Tukey ^a	2,00	20	,7000
	1,00	20	,7500
	3,00	20	,9000
	4,00	20	,9000
	Sig.		,372
Duncan ^a	2,00	20	,7000
	1,00	20	,7500
	3,00	20	,9000
	4,00	20	,9000
	Sig.		,144

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 20,000.



Prueba de homogeneidad de varianzas

		Estadístico de			
		Levene	gl1	gl2	Sig.
micorriza	Se basa en la media	3,227	3	98	,026

	Se basa en la mediana	1,195	3	98	,316
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1,195	3	89,990	,316
	Se basa en la media recortada	3,227	3	98	,026
contaminación	Se basa en la media	4,045	3	98	,009
	Se basa en la mediana	1,238	3	98	,300
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1,238	3	93,283	,300
	Se basa en la media recortada	4,045	3	98	,009
nada	Se basa en la media	4,047	3	98	,009
	Se basa en la mediana	2,652	3	98	,053
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	2,652	3	83,799	,054
	Se basa en la media recortada	4,047	3	98	,009