



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución- NoComercial-Compartirigual 2.5 Perú](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/).

Vea una copia de esta licencia en <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



**Caracterización de Hongos Micorrízicos Arbusculares nativos
predominantes, provenientes de pasturas de la zona de Cuñumbuque,
San Martín y propagados en especies forrajeras.**

Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agrónomo

AUTOR:

Diana Trace Sandoval Flores

ASESOR:

Dr. Winston Franz Ríos Ruíz

CO-ASESOR:

Ing. M.Sc. José Carlos García Rojas

Tarapoto – Perú

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**



**Caracterización de Hongos Micorrízicos Arbusculares nativos
predominantes, provenientes de pasturas de la zona de Cuñumbuque,
San Martín y propagados en especies forrajeras.**

AUTOR:

Diana Trace Sandoval Flores

Sustentada y aprobada el día 14 de diciembre del 2018, ante el honorable jurado:

.....

Dr. Carlos Rengifo Saavedra

Presidente

.....

M.Sc. Segundo Darío Maldonado Vásquez

Secretario

.....

Ing. Eybis José Flores García

Vocal

.....

Dr. Winton Franz Ríos Ruíz

Asesor

Declaratoria de autenticidad

Diana Trace Sandoval Flores con DNI N° 479322259, egresada de la Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela profesional de Agronomía, de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, con la tesis titulada Caracterización de Hongos Micorrízicos Arbusculares nativos predominantes, provenientes de pasturas de la zona de Cuñumbuque, San Martín y propagados en especies forrajeras.

Declaro bajo juramento que:

1. La tesis presentada es de mi autoría.
2. He respecto a las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas. Por tanto, la tesis no ha sido plagiada ni totalmente ni parcialmente.
3. La tesis no ha sido auto plagiado; es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico precio o título profesional.
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados, ni copiados y por tanto los resultados que se presenten en la tesis se constituirán en aportes a la realidad investigada.

De considerar que el trabajo cuenta con una falta grave, con el hecho de contar con datos fraudulentos, demostrar indicios y plagio (al no citar la información con sus autores), plagio (al presentar información de otros trabajos como propios), falsificación (al presentar la información e ideas de otras personas de falsa), entre otros, asumo las consecuencias y sanciones que de mi acción se deriven, sometiéndome a la normativa vigente de la Universidad Nacional de San Martín

Tarapoto, 14 de diciembre del 2018


.....
Diana Trace Sandoval Flores
DNI N° 479322259



Formato de autorización NO EXCLUSIVA para la publicación de trabajos de investigación, conducentes a optar grados académicos y títulos profesionales en el Repositorio Digital de Tesis.

1. Datos del autor:

Apellidos y nombres: <i>Sandarel Flores Diana Traca</i>	
Código de alumno : <i>121114</i>	Teléfono: <i>963706470</i>
Correo electrónico : <i>traca_19@hotmail.com</i>	DNI: <i>47932259</i>

(En caso haya más autores, llenar un formulario por autor)

2. Datos Académicos

Facultad de: <i>Ciencias Agrarias</i>
Escuela Profesional de: <i>Agronomía</i>

3. Tipo de trabajo de investigación

Tesis	<input checked="" type="checkbox"/>	Trabajo de investigación	<input type="checkbox"/>
Trabajo de suficiencia profesional	<input type="checkbox"/>		

4. Datos del Trabajo de investigación

Título: <i>Caracterización de Hongos Micorrízicos Arbusculares nativos predominantes, provenientes de pasturas de la zona de Cuzumbugue, San Martín y propagación en especies forrajeras</i>
Año de publicación: <i>2018</i>

5. Tipo de Acceso al documento

Acceso público *	<input checked="" type="checkbox"/>	Embargo	<input type="checkbox"/>
Acceso restringido **	<input type="checkbox"/>		

Si el autor elige el tipo de acceso abierto o público, otorga a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, una licencia **No Exclusiva**, para publicar, conservar y sin modificar su contenido, pueda convertirla a cualquier formato de fichero, medio o soporte, siempre con fines de seguridad, preservación y difusión en el Repositorio de Tesis Digital. Respetando siempre los Derechos de Autor y Propiedad Intelectual de acuerdo y en el Marco de la Ley 822.

En caso que el autor elija la segunda opción, es necesario y obligatorio que indique el sustento correspondiente:

6. Originalidad del archivo digital.

Por el presente dejo constancia que el archivo digital que entrego a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, como parte del proceso conducente a obtener el título profesional o grado académico, es la versión final del trabajo de investigación sustentado y aprobado por el Jurado.

7. Otorgamiento de una licencia *CREATIVE COMMONS*

Para investigaciones que son de acceso abierto se les otorgó una licencia *Creative Commons*, con la finalidad de que cualquier usuario pueda acceder a la obra, bajo los términos que dicha licencia implica

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

El autor, por medio de este documento, autoriza a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, publicar su trabajo de investigación en formato digital en el Repositorio Digital de Tesis, al cual se podrá acceder, preservar y difundir de forma libre y gratuita, de manera íntegra a todo el documento.

Según el inciso 12.2, del artículo 12º del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales - RENATI **“Las universidades, instituciones y escuelas de educación superior tienen como obligación registrar todos los trabajos de investigación y proyectos, incluyendo los metadatos en sus repositorios institucionales precisando si son de acceso abierto o restringido, los cuales serán posteriormente recolectados por el Repositorio Digital RENATI, a través del Repositorio ALICIA”.**

.....
Firma del Autor

8. Para ser llenado en la Oficina de Repositorio Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso Abierto de la UNSM – T.

Fecha de recepción del documento:

16 / 09 / 2019



.....
Firma del Responsable de Repositorio
Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso
Abierto de la UNSM – T.

***Acceso abierto:** uso lícito que confiere un titular de derechos de propiedad intelectual a cualquier persona, para que pueda acceder de manera inmediata y gratuita a una obra, datos procesados o estadísticas de monitoreo, sin necesidad de registro, suscripción, ni pago, estando autorizada a leerla, descargarla, reproducirla, distribuirla, imprimirla, buscarla y enlazar textos completos (Reglamento de la Ley No 30035).

** **Acceso restringido:** el documento no se visualizará en el Repositorio.

Dedicatoria

A mis queridos padres: **Reogildo Sandoval Vargas y Olga Flores Falcón**, quienes con su infinito amor, sacrificio, perseverancia y sabiduría, me brindaron su confianza y apoyo incondicional en todo momento, dándome fuerzas para lograr una de mis metas propuestas.

A mis hermanos **Erick y Percy**, queridos tíos **Elda, Miguel y abuelitos** que siempre me ofrecieron su cariño, sus ánimos y las ganas de seguir adelante.

A los miembros del Laboratorio de Microbiología Agrícola, por la confianza, el apoyo que me brindaron y permitir ser parte de este equipo de investigación.

Autor: **Diana Trace Sandoval Flores**

Agradecimiento

A los docentes de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, por contribuir a mi formación profesional en el campo de la Agronomía. A mi asesor Dr. Winston Franz Ríos Ruiz (UNSM-T), Coordinador General del proyecto “Recuperación de pasturas degradadas empleando microorganismos benéficos y leguminosas asociadas con un sistema silvopastoril en la zona Cuñumbuque – San Martín – Perú. Convenio N° 205-2015, CONCYTEC – MINEDU, por su apoyo y supervisión en la elaboración de la presente tesis.

Al Ing. M. Sc. José Carlos Rojas García y al Blgo. Mblgo. M. Sc. Renzo Alfredo Valdez Núñez, Co-investigadores del proyecto, por compartir sus conocimientos, tiempo, dedicación y guiarme en el desarrollo de técnicas y procedimientos que hicieron posible este trabajo de investigación.

A mis queridos tíos Elda Flores Falcón y Miguel Hidalgo Pinedo, por su apoyo incondicional y a mis abuelitos Bernardino Sandoval Saldaña, Marne Vargas Ríos y Consuelo Falcón Vargas por alegrarme todos los días de mi vida.

Índice General

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1.1. Características del suelo en la producción de pastos	3
1.2. Asociación de especies forrajeras con hongos micorrízicos arbusculares.....	5
1.3. Hongos micorrízicos arbusculares en pasturas	7
1.3.1. Características morfológicas de los principales géneros de HMA	8
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
2.1. Técnicas de recolección de datos.....	12
2.1.1. Ubicación y caracterización del área de estudio	12
2.1.2. Colecta de muestras de suelos de campo	14
2.1.3. Propiedades físicas - químicas y biológicas del suelo	16
2.1.4. Implementación y conducción del experimento	17
2.1.5. Instalación de las leguminosas forrajeras para la multiplicación de HMA	19
2.1.6. Selección de suelo y raíces de macetas con las leguminosas forrajeras	20
2.2. Densidad de esporas	21
2.3. Porcentaje de colonización micorrízica	22
2.4. Separación e identificación de morfotipos de HMA nativos predominantes	24
2.5. Diseño Experimental	25
2.6. Indicadores de la Variable	27
2.6.1. Determinación de la colonización micorrízica	27
2.6.2. Densidad de esporas de HMA	27
2.6.3. Selección de morfotipos de HMA nativos predominantes	27
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
3.1. Colonización Micorrízica.....	28
3.2. Número de esporas de HMA nativos	33
3.3. Caracterización de morfotipos de HMA nativos Predominantes	38
CONCLUSIONES	47
RECOMENDACIONES	48

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXO	59

Índice de Tablas

Tabla 1 <i>Detalles de las 10 parcelas de colecta</i>	13
Tabla 2 <i>Descripción de las 10 zonas agroecológicas de estudio</i>	15
Tabla 3 <i>Análisis físicos – químicos de suelos de las zonas de colecta</i>	16
Tabla 4 <i>Análisis microbiológicos de suelos de las zonas de colecta</i>	17
Tabla 5 <i>Tratamientos en estudio</i>	26
Tabla 6 <i>Análisis de varianza para el experimento</i>	26
Tabla 7 <i>Análisis de varianza para la colonización micorrízica (%) en raíces de leguminosas forrajeras en 10 zonas de la zona Cuñumbuque y dos leguminosas forrajeras. Datos transformados arcsen %</i>	28
Tabla 8 <i>Análisis de varianza del número de esporas de HMA nativos (10 g de suelo seco) de las diez zonas de la zona de Cuñumbuque y dos plantas de leguminosas forrajeras. Datos transformados. Log (x)</i>	34
Tabla 9 <i>Caracterización de morfotipos nativos predominantes de las diez zonas de la zona de Cuñumbuque y las dos leguminosas forrajeras.</i>	38
Tabla 10 <i>Distribución de los morfotipos según zona y leguminosa forrajera.</i>	42
Tabla 11 <i>Ubicación taxonómica de los HMA-N encontrados según las diez zonas de muestreo y las dos leguminosas forrajeras</i>	43
Tabla 12 <i>Ubicación taxonómica de los HMA-N encontrados según las diez zonas de muestreo y las dos leguminosas forrajeras (Continuación de la tabla 11)</i>	44

Índice de Figuras

<i>Figura 1.</i> Mapa de la zona de Cuñumbuque indicando la localización de los 10 puntos de muestreo de suelo. (Fuente: Imagen Satelital LANDSAT 8 Unidades Administrativas Provinciales MINAM-IGN ZEE de la zona de Cuñumbuque)	12
<i>Figura 2.</i> Vista panorámica de parcelas seleccionadas de la zona de Cuñumbuque: A) Carañayacu-A, B) Carañayacu-B, C) Bosalao-A, D) Bosalao-B, E) Estero-A, F) Estero-B, G) Cercado-A, H) Cercado-B, I) Difuntillo y J) Chacrilla.	13
<i>Figura 3.</i> Procedimiento de colecta: A) Limpieza de la superficie del suelo para el muestreo, B y C) Colecta de muestras de suelo, D) Homogenización de muestras y E) Transporte de muestras para el laboratorio.....	16
<i>Figura 4.</i> Vista panorámica del vivero de multiplicación de HMA.....	18
<i>Figura 5.</i> Instalaciones del laboratorio de microbiología agrícola	18
<i>Figura 6.</i> Procedimiento para la instalación de las leguminosas forrajeras: A y B) Lavado y esterilización de vermeculita, C) Preparación de sustrato, D) Desinfección de semillas, E y F) siembra de leguminosas forrajeras, G) Aplicación de perlita y H) Leguminosas forrajeras a los 90 dds (días después de la siembra)	20
<i>Figura 7.</i> Procedimiento para la selección de suelo y raíces: A y B) Extracción de la raíz, C) Tamizado de suelo, D) Codificación de suelo, E) Lavado de raíces, F) Selección de raíces, G y H) Conservación de raíces.	21
<i>Figura 8.</i> A, B, C, D, E, F, G, H, I Y J: Procedimientos para el aislamiento de esporas.	22
<i>Figura 9.</i> Procedimiento para el conteo de esporas de HMA-Nativos: A) Lavado de las muestras, B) Depósito de la muestra en la placa concéntrica, C) Placa concéntrica con la muestra de esporas, D) Observación en el estereomicroscopio binocular, E) Esporas viables observadas y F) Conteo de esporas en placa concéntrica.....	22
<i>Figura 10.</i> A, B, C, D, E, F, G, H, I y J: Procedimientos para tinción en raíces de leguminosas forrajeras.....	24

- Figura 11.* Etapas para determinar el porcentaje de colonización micorrízica: A) Ubicación de las raíces para evaluación, B) Aplicación de lactoglicerol, C) Dispersión de las raíces en la placa cuadrículada, D) Observación en estereomicroscopio, E) Estructuras de HMA en raíces y F) Forma de evaluación de cada segmento de raíz.24
- Figura 12.* Procedimiento para selección de morfotipos nativos predominantes: A y B) Aislamiento de esporas, C) Separación por morfotipos, D) Morfotipo predominante y E) Montaje de morfotipos.....25
- Figura 13.* Efecto principal de los niveles del Factor A x B: Zona por Leguminosas forrajeras, en relación a los veinte tratamientos en estudio para el porcentaje de colonización micorrízica. Medias con letra común no son significativamente diferentes.....30
- Figura 14.* Efecto de la interacción entre las diez zonas y las dos leguminosas forrajeras en relación al porcentaje de colonización micorrízica.31
- Figura 15.* Estructuras de HMA en raíces de leguminosas forrajeras observadas al microscopio binocular. A) Esporas, B) Hifas intraradicales, C) Vesículas y D) Arbúsculo.33
- Figura 16.* Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para efecto principal de los niveles del Factor A x B: Zona por Leguminosas forrajeras, en relación a los veinte tratamientos en este estudio para el número de esporas (10 g de suelo seco). Medias con letras diferentes difieren estadísticamente entre sí.....35
- Figura 17.* Efecto de la interacción entre las diez zonas y las dos leguminosas forrajeras en relación al número de esporas (10 g de suelo seco).36

Resumen

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son organismos del suelo que forman asociaciones mutualistas con la mayoría de las plantas. El uso de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) constituye una estrategia para la recuperación de suelos degradados favoreciendo así la productividad de los cultivos. Los HMA nativos pueden ser seleccionados de áreas con condiciones edafoclimáticas particulares para luego ser multiplicados y utilizados como inoculantes, con mejor posibilidad de adaptación a zonas degradadas. El objetivo de este trabajo fue caracterizar HMA nativos predominantes, provenientes de pasturas de la zona norte del Perú. Se colectaron muestras de suelo de las zonas de Carañayacu (A y B), Bosalao (A y B), Estero (A y B), Cercado (A y B), Chacrilla y Difuntillo en el distrito de Cuñumbuque en la región San Martín. Los suelos fueron utilizados como sustrato para el crecimiento de dos leguminosas forrajeras entre ellas *Centrosema macrocarpum* y *Leucaena leucocephala*. Se utilizó un diseño completamente al azar, con arreglo factorial de 10 (zonas) x 2 (leguminosas), con tres repeticiones. Los resultados mostraron que las zonas tuvieron mayor influencia en el porcentaje de colonización micorrízica en relación a las leguminosas, siendo las zonas de Estero (72,89%) y Difuntillo (70,81%), las que presentaron mayor porcentaje de colonización. El número de esporas fue influenciado principalmente por las leguminosas, donde *Centrosema macrocarpum* presentó el mayor número con 710 esporas/10 g de suelo proveniente de la zona de Difuntillo. Finalmente se caracterizaron 7 morfotipos de HMA nativos predominantes, siendo el morfotipo del género *Claroideoglossum* el de mayor predominancia. Los HMA multiplicados en condiciones de invernadero y re-introducidos en áreas de pasturas degradadas pueden incrementar su riqueza y junto con la instalación de leguminosas favorecer la recuperación de suelos degradados.

Palabras clave: Suelo de pasturas, Hongos Micorrízicos Arbusculares, Leguminosa forrajera.

Abstract

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are soil organisms that form mutualistic associations with most plants. The use of AMF is a strategy for the recovery of degraded soils, thus favoring the productivity of the crops. Native AMF can be selected from areas with particular soil and climatic conditions to be multiplied and used as inoculants, with better possibility of adaptation to degraded areas. The objective of this work was to characterize predominant native AMFs, from pastures of the northern zone of Peru. Soil samples from the areas of Carañayacu (A and B), Bosalao (A and B), Estero (A and B), Cercado (A and B), Chacrilla and Difuntillo in Cuñumbuque district in the San Martín region were collected. The soils were used as a substrate for the growth of two forage legumes including *Centrosema macrocarpum* and *Leucaena leucocephala*. A completely randomized design was used, with a factorial arrangement of 10 (zones) x 2 (legumes), with three repetitions. The results showed that the zones had greater influence in the percentage of mycorrhizal colonization in relation to the legumes, being the areas of Estero (72, 89%) and Difuntillo (70, 81%) those that had the highest percentage of colonization. The number of spores was influenced mainly by legumes, where *Centrosema macrocarpum* had the highest number with 710 spores / 10 g of soil from the Difuntillo area. Finally, 7 predominant native AMF morphotypes were characterized, being the morphotype of the *Claroideoglomus* genus the most predominant. AMF selected and multiplied under greenhouse conditions and re-introduced in areas of degraded pastures can increase their richness and, together with the installation of legumes, favor the recovery of degraded soils.

Keywords: Pasture soil, Arbuscular mycorrhizal fungi, Forage legume.



Introducción

En el Perú el 14% de los suelos son aptos para uso de pasturas y producción de forrajes verdes, de las cuales la mitad de estas áreas muestran cierta degradación (Ministerio de Agricultura, 2017). En la Región de San Martín se tiene cultivada 2514,8 hectáreas (has) de pasturas en proceso de degradación que limitan los factores químicos (disponibilidad de nutrientes) y físicos (compactación del suelo) que afectan directamente la sustentabilidad de la ganadería (DRASAM, 2017). El distrito de Cuñumbuque tiene como primera actividad económica a la ganadería, con una superficie de 37,607 has de pasto *Brachiaria brizantha*, en su mayoría en un proceso evolutivo de pérdida de vigor, productividad y de baja capacidad de recuperación natural. Diversos factores contribuyen a la degradación de estas pasturas, principalmente la topografía trayendo serios problemas de erosión, ausencia de cobertura arbórea y pisoteo continuo del ganado (Chen *et al.*, 2018).

Por estas razones en los sistemas ganaderos, la incorporación de leguminosas forrajeras se muestra como una opción para mejorar la fertilidad de los suelos y como alimentación del ganado (Flores *et al.*, 2014), contribuyendo así a mejorar la calidad de las dietas de los animales, por el alto contenido de proteínas y minerales que presentan (Lok, 2015). Esto indica la adecuada calidad de biomasa que estas especies poseen para ser incorporadas en los pastizales (Petit y Sánchez, 2009), sin embargo, la baja disponibilidad de nutrientes de los suelos con actividad ganadera, limitan sus rendimientos, por lo que se hace necesario adoptar tecnologías amigables con el medio ambiente, basados en el manejo eficiente y sostenible del sistema suelo-pastura-animal (Cañizares *et al.*, 2016).

Una de las estrategias importantes es el uso de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) por sus potencialidades para mejorar la productividad de los cultivos y pasturas (Castillo *et al.*, 2014). Los HMA pueden desempeñar un papel fundamental en el mantenimiento de la estabilización de la estructura del suelo mediante la glomalina, una glicoproteína producida por los HMA que genera la agregación de las partículas del suelo, aumentando las reservas de carbono y nitrógeno (Ellouze *et al.*, 2014), además al explorar eficientemente grandes volúmenes del suelo mejoran la absorción de nutrientes (Gianinazzi *et al.*, 2012), poco móviles, principalmente fósforo (P), con lo cual contribuye

a mejorar la absorción de nutrientes y la estructura del suelo, formando una simbiosis estable (Roth y Paszkowski, 2017).

Por el reconocimiento de la importancia funcional de los HMA en los agroecosistemas de pastizales, en los últimos años se ha desarrollado estudios sobre el papel de las micorrizas en el establecimiento, nutrición y productividad de estos sistemas (Carneito *et al.*,2013), sumado a ello el uso de especies forrajeras, con quienes los HMA logran establecer una simbiosis efectiva incrementando la superficie de absorción de sus raíces y en consecuencia, la eficiencia de la utilización de los nutrientes para mejorar los suelos de pasturas (Cavagnaro *et al.*,2014).

Sin embargo, no se tiene conocimiento sobre las características de HMA en suelos de pasturas de la zona de Cuñumbuque, ya que no se han realizado estudios para determinar la presencia de HMA como componentes integrales de la rizósfera del suelo y su importancia funcional en la calidad y mejoramiento de los suelos en esta zona. La hipótesis de este estudio es que en los suelos de pasturas de la zona de Cuñumbuque existen morfotipos predominantes de HMA nativos, y que se incrementan al ser propagados en dos especies forrajeras.

Para este fin, el objetivo fue caracterizar hongos micorrízicos arbusculares nativos predominantes, provenientes de pasturas de la zona de Cuñumbuque, y propagados en dos especies forrajeras en condiciones de invernadero. Los objetivos específicos fueron: a) Determinar la densidad de esporas de hongos micorrízicos arbusculares nativos, provenientes de suelos de pasturas de la zona de Cuñumbuque propagados en dos especies forrajeras *Centrosema macrocarpum* y *Leucaena leucocephala* en condiciones de invernadero b) Determinar la colonización micorrízica en raíces de las especies forrajeras *Centrosema macrocarpum* y *Leucaena leucocephala*, inoculadas con hongos micorrízicos arbusculares nativos, provenientes de suelos de pasturas de la zona de Cuñumbuque, cultivadas en condiciones de invernadero; y c) Seleccionar y caracterizar morfotipos predominantes de hongos micorrízicos arbusculares nativos, provenientes de suelos de pasturas de la zona de Cuñumbuque, y propagadas en dos especies forrajeras.

La estructura de este trabajo de investigación incluye tres capítulos: Capítulo I. Revisión bibliográfica, Capítulo II. Materiales y Métodos y Capítulo III. Resultados y Discusiones.

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Características del suelo en la producción de pastos

Para la mayoría de ecosistemas terrestres, el suelo es el escenario en el que se desarrolla la vida y es utilizado por el ser humano para producir el 95 % de sus alimentos, siendo esta su función más reconocida donde el pastoreo ocupa más del 25% de la superficie terrestre global (FAO, 2015).

Existen propiedades físicas, químicas y biológicas que interactúan para definir la fertilidad de los suelos, físicamente son los que condicionan el desarrollo del sistema radicular, los factores químicos hacen referencia a la reserva de nutrientes, y los biológicos, son importantes al momento de estimar la fertilidad del suelo (Janns *et al.*, 2010). Por ello los suelos difieren ampliamente en cuanto a sus propiedades físicas y químicas, lo mismo que en profundidad y en condiciones topográficas, estas diferencias se pueden reflejar en la productividad y persistencia de las pasturas que se establecen en ellos (Isbell, 1978). Asimismo, los cambios en el manejo del suelo, como la conversión de los bosques a pastizales o cultivares y viceversa, pueden tener efectos significativos y duraderos en los nutrientes del suelo, el contenido de carbono, la textura del suelo y pH (Lauber *et al.*, 2008). Por estos motivos según Moreno, (2015), el éxito en el establecimiento de una pastura, está relacionado con las propiedades del suelo que confieren un adecuado suministro de nutrimentos para las plántulas, y el medio físico apropiado para los procesos de germinación de la semilla, de emergencia y crecimiento.

Los suelos dedicados a los pastos son aquellos que, por una u otra razón, son inadecuados para otros tipos de cultivos y su fertilidad es generalmente baja (Jones, 1983), entre los principales nutrimentos que limitan la producción de pastos son el nitrógeno, el fósforo, el azufre y en menor grado el potasio, el magnesio y los elementos menores, además la alta acidez del suelo y sus niveles tóxicos de aluminio y manganeso (Sánchez y Tergas, 1979). El pH del suelo juega un papel principal en la disponibilidad de estos nutrientes, el óptimo pH para el desarrollo de las pasturas oscila entre 6 y 7 (pH neutro).

En cuanto al reciclaje de nutrientes, son evidentes los efectos en la transferencia de nutrientes vegetales en los potreros debido a los productos excretados por los animales,

que probablemente aumenta el pH del suelo debido a hidrólisis de las excreciones en pastizales (Raiesi y Riahi, 2014).

En un período prolongado de utilización de las pasturas, es posible que ocurran cambios importantes en la estructura física del suelo, como el aumento de la compactación, escorrentía, disminuye el desarrollo de las raíces y la extracción de nutrientes que se encuentran a mayor profundidad en el suelo (Dalhatu y Garba, 2012). Como muchos suelos en todo el mundo tienen una capacidad moderada a alta para retener elementos como el fósforo (P), la mayor parte del fertilizante y el estiércol aplicados al suelo para P se unen rápidamente a los minerales del suelo que no están sujetos a liberación rápida (Richardson, 2011). Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar plantas más eficientes para reducir el uso ineficiente de varios insumos de P y para minimizar la pérdida potencial de P al ambiente (Lazali *et al.*, 2016).

Por lo cual, la mejora de la rentabilidad del sector lechero requiere sistemas de alimentación que utilicen con eficiencia los recursos forrajeros propios, por ello, la investigación sobre forrajes y cultivos forrajeros debe encaminarse hacia nuevas formas de producción, que garanticen un uso eficiente de los mismos y adaptar el modelo de manejo (Peeters *et al.*, 2006). Además, la población de microorganismos del suelo cumple funciones vitales en los ecosistemas naturales (Singh y Pandey, 2011), son un componente importante del suelo y directa o indirectamente influyen en la salud de éste, mediante procesos tales como descomposición, movilización de nutrientes y mineralización, liberación de nutrientes, fijación de N₂ y desnitrificación (Richardson y Simpson, 2011). Por tal razón el aprovechamiento óptimo y responsable de los microorganismos del suelo son necesarios para lograr una agricultura sostenible, ya que llegan a reducir el consumo de energía, la degradación del agroecosistema y la pérdida de nutrientes del suelo, contribuyendo a una producción estable y sustentable en un periodo prolongado (Inocencio, 2016).

Oehl *et al.*, (2010), probaron si los tipos de suelo pueden caracterizarse por sus comunidades de hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Para ello eligieron un área de estudio bien definida en la zona climática templada de Europa Central con un amplio espectro de suelos y materiales originales. Tomaron muestras de suelo representativas de un total de 16 sitios que difieren en la intensidad del uso de la tierra agrícola (9 pastizales y 7 tierras cultivables). Las esporas de HMA se aislaron e identificaron morfológicamente directamente de los suelos de campo y después de la reproducción en cultivos de trampa.

La diversidad de AMF y la composición de la comunidad dependieron fuertemente del tipo de suelo y la intensidad del uso de la tierra, y varias especies de AMF fueron características para un tipo de suelo específico o un tipo de uso de suelo específico. Y concluyeron que la intensidad del uso de la tierra y el tipo de suelo afectaron fuertemente la composición de la comunidad HMA, así como la presencia y prevalencia de muchos Hongos Micorrízicos Arbusculares.

1.2. Asociación de especies forrajeras con hongos micorrízicos arbusculares

En los últimos años se ha insistido en la introducción de leguminosas forrajeras en las pasturas, debido a su capacidad de proveer alimento de alto valor nutritivo, especialmente durante la época de seca (Lamela *et al.*, 2010). Además, éstos se utilizan como fuente de sombra, para conservar y mejorar el suelo, reciclar los nutrientes y como alternativa para revertir el proceso de degradación de los pastos (Sánchez, 2007). Su capacidad de rebrote después del corte o ramoneo, así como su rápido restablecimiento a los estreses bióticos y abióticos, hacen de estas especies, plantas idóneas para la recuperación de pasturas (Wencomo y Ortiz, 2011). Las áreas sembradas con leguminosas forrajeras forman lo que se conoce un banco de proteínas, mejorando el rendimiento de biomasa en condiciones de déficit de agua, esta forma de disposición proporciona una alta calidad de forraje para el ganado como suplemento alimenticio en pastos (Yu *et al.*, 2017)

A parte de sus ventajas nutricionales las leguminosas tienen un sistema radicular capaz de explorar los horizontes inferiores del suelo y llevar los nutrientes y agua hacia la superficie de forma eficaz, aspecto muy importante para una mejor gestión del agua (González *et al.*, 2014), como las del género *Leucaena*, sus características morfológicas y fisiológicas de *Leucaena leucocephala*, asociada a microorganismos benéficos, son una alternativa para enfrentar algunos problemas ambientales en las explotaciones ganaderas (Aguirre *et al.*, 2015). Es una especie arbustiva que juega un papel principal en la fertilidad de los suelos ya que incorpora N atmosférico y recicla cantidades significativas de nutrientes por medio de producción e incorporación de hojarasca al suelo (Chikowo *et al.*, 2006). Además, tiene la capacidad de liberar en un tiempo corto más de 50% del contenido total de nutrimentos como el N, K y el P cuando se incorporan al suelo (Bossa *et al.*, 2005), en concentraciones superiores entre los 10-30 cm del suelo a comparación de gramíneas en monocultivos (Mahecha, 2009). Schneider *et al.*, 2017, enfatizaron el potencial de la

simbiosis de los hongos micorrízicos arbusculares con *Leucaena leucocephala*, incrementando su tolerancia ante el estrés.

Por su parte *Centrosema macrocarpum* produce cambios significativos en las propiedades físicas del suelo principalmente en densidad aparente, porosidad y resistencia a la penetración (Lozano *et al.*, 2010). Es una leguminosa con un contenido de proteína entre un 20 a 30% y tiene una digestibilidad de 45 a 70% siendo muy palatable para el ganado (Peters *et al.*, 2011). Es por ello que la inclusión de leguminosas como *Leucaena leucocephala* y *Centrosema macrocarpum* en sistemas silvopastoriles genera beneficios en la fertilidad de los suelos y en la calidad del forraje en oferta para los animales (Bueno y Camargo, 2015).

Se ha demostrado que los árboles que fijan nitrógeno, y que además se asocian a hongos micorrízicos arbusculares que favorecen su crecimiento, son utilizados para mejorar la calidad de las pasturas, en la rizósfera donde se realiza un amplio rango de actividades entre la planta huésped y los microorganismos (Kennedy, 2005), aportando carbono orgánico procedente de su masa miceliar extrarradical y producen glicoproteínas denominadas glomalinas las cuales contienen un alto porcentaje de carbono orgánico (Schindler *et al.*, 2007) que es incorporado directamente al suelo mediante la descomposición de los propágulos fúngicos (Driver *et al.*, 2005). Por eso el manejo efectivo de estos microorganismos rizosféricos puede constituir una alternativa ecológica económicamente viable para incrementar la productividad, la persistencia y el valor nutritivo de las leguminosas forrajeras, y reducir el uso de fertilizantes inorgánicos (Corbera y Nápoles, 2011). Es evidente que las interacciones de los hongos micorrízicos arbusculares en plantas de leguminosas tienen un significado relevante en el ciclismo N y P en la biosfera para beneficiar la agricultura sostenible, con cultivos de leguminosas y para mejorar la productividad de los ecosistemas naturales donde las leguminosas son componentes clave de las comunidades vegetales (Courty *et al.*, 2015).

Tomando en cuenta la importancia que tienen las leguminosas forrajeras y su transformación a proteína animal para consumo humano y el tener una raíz pivotante (Suárez, 1994), las hacen un modelo de estudio importante en relación con los HMA, además de que el uso de estos microorganismos logra importantes funciones bioquímicas y geoquímicas en los ambientes que habitan (Molina *et al.*, 2005), infectando las raíces y

creando un ambiente rico en nutrientes para el crecimiento de las plantas y la seguridad alimentaria (Rodríguez y Sanders, 2015).

Por otra parte, las leguminosas forrajeras también presentan asociaciones con bacterias como el *Rhizobium* más las micorrizas arbusculares, que mejoran el desarrollo de los nódulos y la fijación de nitrógeno e incrementan el rendimiento de los cultivos y la eficiencia en el uso de los fertilizantes (Ferrero y Alarcón, 2001). Muchos estudios han analizado la base fisiológica y bioquímica de las interacciones de HMA, rizobios y leguminosas y estos han sido recientemente revisados (Azcón y Barea, 2010).

1.3. Hongos micorrízicos arbusculares en pasturas

Existen estudios que muestran una influencia significativa de los hongos micorrízicos arbusculares en la estructuración de comunidades vegetales en los ecosistemas terrestres (Landis *et al.*, 2005). Particularmente en pastizales se ha encontrado que poaceas características de estos sistemas responden favorablemente a dicha asociación (Hartnett y Wilson, 2002).

Varios autores han señalado el efecto positivo de los HMA en la nutrición y productividad de los pastos y cultivos forrajeros (Butler y Muir, 2010), pues éstos son componentes integrales de la rizósfera de las pasturas, donde las plantas permanecen estrechamente asociadas mediante una red de hifas interconectadas, que incrementan el volumen de suelo que exploran las raíces (Johnson *et al.*, 2003), además incrementan el aprovechamiento de elementos minerales presentes en el suelo a través de una extensa red de micelio que les permite el mayor transporte de agua y nutrientes especialmente Fósforo (P), Cobre (Cu) y Zinc (Zn) (Pérez *et al.*, 2016).

La disponibilidad de P es el factor más limitante para el rendimiento de los cultivos en muchos suelos cultivables, por lo tanto, la capacidad de algunos microorganismos para movilizar P a partir de fuentes poco disponibles de este nutriente puede ayudar a la nutrición de la planta (Barea y Richardson, 2015).

La mayoría de los pastos posee una alta dependencia micorrízica, por tal motivo el manejo efectivo de las asociaciones micorrízicas es una vía para mejorar la productividad de los pastizales y a la vez reducir su dependencia de los fertilizantes (Cavallini, 2009), ya que esta asociación incrementa la tolerancia de las plantas al pastoreo por animales herbívoros, por un incremento en el suministro de nutrientes a las plantas huésped, los

cuales estimulan el rebrote continuo de las pasturas después de las defoliaciones (Johnson, 2015). Pero la defoliación puede comprometer la calidad y la cantidad de colonización por hongos micorrízicos arbusculares (HMA), que contribuyen a la persistencia de la vegetación en los pastizales (Lis *et al.*, 2018)

Pero cuando las pasturas poseen bajas cantidades de propágulos micorrízicos nativos no son capaces de establecer una simbiosis efectiva, las condiciones ambientales donde se desarrollan los pastos puede proporcionar considerables beneficios (Pellegrino *et al.*, 2011). No obstante, estos solo se conseguirán después de una selección adecuada del hongo o del consorcio de hongos, que demuestre el más alto nivel de compatibilidad funcional y ecológica para el sistema suelo-planta (Öpik y Moora, 2012).

1.3.1. Características morfológicas de los principales géneros de HMA

Los hongos micorrízicos arbusculares han recibido recientemente un nuevo estado, desde el filo (Glomeromycota) para sub-phylum (Glomeromycotina) (Spatafora *et al.*, 2016). Junto con este avance, nuevas familias y géneros han sido descritos (Blaszkowski *et al.*, 2017; Symanczik *et al.*, 2018). Con eso, actualmente tenemos 3 clases, 16 familias, 41 géneros y 300 especies oficialmente descritas. A continuación, se detalla los principales géneros:

a) Género *Acaulospora* (Medina, 2017)

Espora, es globosa, de 55-440 μm de diámetro, de color blanco, café rojizo oscuro, al estereoscopio, y blanca o amarilla oliva al microscopio. La hifa adherida a la espora es de forma ahusada con el ápice inflado y globoso llamado vesícula, a medida que la espora va llegando a su madurez en la vesícula se produce un colapso celular, por tanto, la espora adopta una posición amorfa sin ningún signo de origen a excepción de un pequeño poro.

Paredes de la espora, son formadas por dos grupos de paredes fácilmente distinguibles: La primera unidad, la más externa, está formada por una pared hialina remanente del sáculo la cual no ha sido observada. Seguidamente aparece una pared laminada, que le confiere el color a la espora, una segunda pared aparece debajo de la pared laminada, muy pegada a esta. Es de color más claro, delgada, flexible, no mayor a 2 μm de espesor. El segundo grupo de paredes está formado por dos paredes denominadas germinales, de las cuales la que fácilmente se evidencia es una transparente, de 2 μm de espesor, la cual posee una superficie rugosa, seguida por una pared interna, membranosa, transparente, que contiene el citoplasma de la espora. Las paredes de la espora son de color

hialino, amarillo, marrón, verde grisáceo que se encuentran en todo hospedero de micorriza versículo arbuscular.

Cicatriz, es difícil de observar por la ornamentación de la espora. Pero cuando se observa aparece como una marca ovoide de 9-16 μm de diámetro, que aparece en una de las zonas donde no hay ornamentación.

Reacción Melzer, la pared más interna reacciona tornándose roja o rosada.

b) Género *Gigaspora* (Medina,2017)

Espora, es globosa, grande, de 250 - 405 μm de diámetro, opaca, de color amarillo pálido a amarillo. La forma de las esporas es globosa y sub globosas.

Paredes de la espora, se distinguen dos paredes que forman un único grupo: una externa, laminada, con corona de 5 micras de espesor, y una pared interna más clara, rígida de 2 μm de espesor, las paredes son de una capa, sin escudo.

Reacción Melzer, presenta pared externa que se torna rojo intenso a vino tinto.

c) Género *Glomus* (Medina,2017)

Esporas, generalmente son globosas, algunas irregulares, pequeñas, de 18 - 370 μm en diámetro, de color hialino, amarillo, negro, de marrón amarillento a rojizo o anaranjado al estereoscopio. Se organizan en esporocarpos laxos de uno a más de esporas. Aun cuando se reporta que forman grupos de más de 100 esporas, las esporas se unen frágilmente entre sí, a través de conexiones hifales múltiples. Las esporas cuando están maduras contienen un líquido aceitoso a manera de gotas de tamaños variable.

Paredes de la espora, forman un solo grupo grueso de paredes, la pared más externa es laminada de 4 μm de espesor que le da el color a la espora. Generalmente con restos de hifas en la superficie o conexiones hifales. La forma es globosa, elipsoides o reniformes; de superficie lisa o áspera deslucido, escamoso o sin escama, verrugoso con espinas delgadas.

Conexión hifal, de las esporas pueden presentar más de una conexión hifal, esta puede ser sencilla o doble. La conexión hifal es gruesa, de 5-6 μm de ancho, estrecha hacia la base de la espora, puede o no formar sepa, la que es formada por engrosamiento e la pared interna.

Reacción Melzer, ninguna en la mayoría de especies, sin embargo, en algunos puede reaccionar formando un color púrpura claro.

d) Género *Entrophospora* (Medina,2017)

Espora, es de forma globosa, opaca, de superficie lisa, entre 95 - 220 μm de diámetro, de color oliva pálida al estereoscopio, y amarillo-oliva al microscopio.

Paredes de la espora, posee tres grupos de paredes: la más externa es membranosa, transparente, de menos de 1 μm de espesor. Se continúa con el sáculo, por lo que es más evidente verla cuando se aísla la espora con este. La segunda pared es laminada, de 2 a 4 μm de espesor, de color amarillo. La pared más interna es transparente, delgada y se aprecia cuando se desprende de la laminada al escachar la espora. Esta pared se observa como una pared flexible. El grupo de paredes más internas de tipo germinal está compuesto por una pared de aproximadamente 2 μm de espesor, rugosa en la superficie y una más interna, membranosa que contendría el citoplasma.

Cicatrices: Se distinguen claramente dos cicatrices. Una ovoide de 15-30 μm de diámetro y otra ubicada en el lado opuesto de la anterior, más pequeña, circular, de 5 a 10 μm de diámetro.

Reacción Melzer: La pared más interna reacciona tornándose de color púrpura intenso.

e) Género *Claroideoglopus* (Medina,2017)

Espora, formadas individualmente o en grupos sueltos en el suelo y con poca frecuencia como esporas individuales en la raíz, de color crema a amarillo claro, mayormente de forma globosa a subglobosa, de 70-160 μm de diámetro.

Paredes de la espora, poseen cuatro capas (L1, L2, L3 y L4), solo las dos primeras están presentes en las esporas más juveniles y continúa con la pared juvenil de la hifa subyacente. L3 se desarrolla a continuación tanto en la hifa subyacente como en la espora, engrosándose gradualmente, para eventualmente conformar la mayor parte del espesor de la pared de la espora. L4 es el último en formarse, originado como parte de la pared de hifas subyacente, pero solo en la región de la base de esporas.

Reacción Melzer, la primera capa L1 produce una reacción de rosa a rosa más oscuro en el reactivo de Melzer.

f) Género *Rhizoglopus* (Medina,2017)

Espora, mayormente las esporas se forman en esporocarpos sueltos, en racimos, o individualmente en el suelo, y con frecuencia en las raíces. Tienen de 50 -100 μm

Paredes de la espora, la pared de las hifas subyacentes continúa con la pared de la espora, y por una cierta distancia con color rosa con la pared de la espora, o es ligeramente más clara. Substancia de la hifa cilíndrica o raramente ligeramente en forma de embudo en la base de la espora. Los poros en la base de las esporas se abren regularmente, raramente cerrados por un tabique. Las paredes de esporas muestran más de una, y generalmente de dos a tres (y hasta cinco) capas distintas, de las cuales una o varias de las más externas pueden separarse cuando se aplica presión a las esporas.

g) Género *Septoglo mus* (Medina,2017)

Esporas, las esporas se forman típicamente en la rizosfera, pero también se pueden formar dentro de las raíces. Este hábito varía mucho entre las cepas e incluso las culturas sucesivas de una cepa particular. Son de rango bastante amplio, desde rojo marrón hasta casi negro, tienen forma globosa a subglobosa, rara vez irregular y miden entre 19 -335 μm .

Paredes de la espora, Las esporas tienen una pared de esporas de 2 capas y una hifa subyacente cilíndrica, ligeramente en forma de embudo o restringida, cuyo poro está ocluido por un tabique en la base de las esporas o a cierta distancia de él. Donde la capa externa está adherida hasta que se degrada y se desprende.

L1: una capa hialina; 2-4 μm de espesor; no reacciona en el reactivo de Melzer. En las esporas envejecidas, esta capa generalmente falta, excepto quizás en la base en la región de la hifa subyacente. L2: Capa laminada de color naranja-café a rojo oscuro-negro, 5-9 μm que es continua con la capa interna de una hifa subyacente persistente.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Técnicas de recolección de datos

2.1.1. Ubicación y caracterización del área de estudio

Para este trabajo de investigación se identificaron diez parcelas diferentes de la zona de Cuñumbuque, Carañayacu-A, Carañayacu-B, Bosalo-A, Bosalao-B, Estero-A, Estero-B, Cercado-A, Cercado-B, Chacrilla y Difuntillo, ubicadas en la provincia de Lamas, departamento de San Martín (Figura 1). En cada localidad se seleccionaron parcelas que presentan pasturas en un proceso evolutivo de pérdida de vigor, donde predominan gramíneas como monocultivos, leguminosas arbóreas de huairuro (*Ormosia coccinea*), leguminosas *Desmodium sp*, especies arbóreas y leguminosas nativas (Figura 2 y Tabla 1)

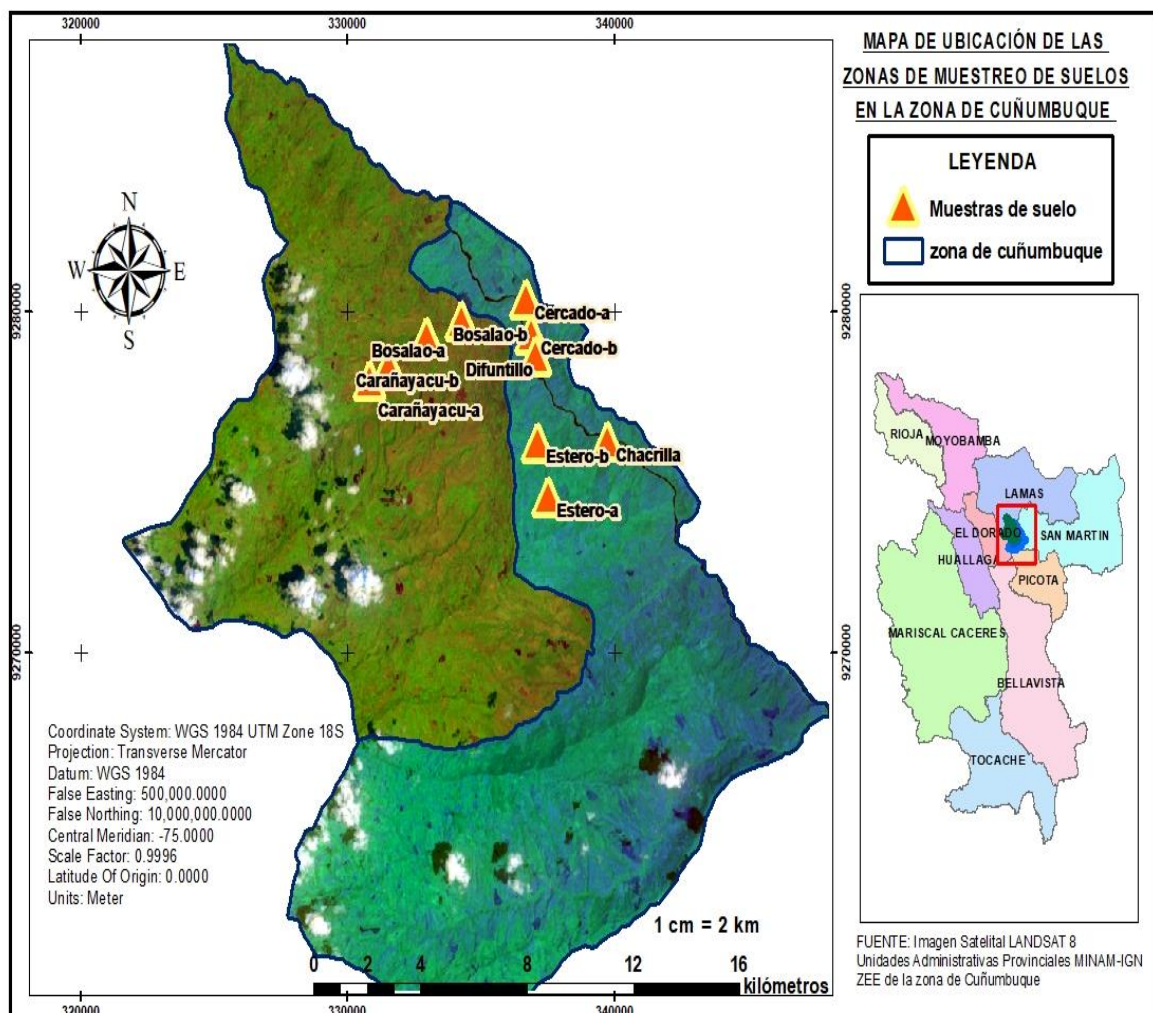


Figura 1. Mapa de la zona de Cuñumbuque indicando la localización de los 10 puntos de muestreo de suelo. (Fuente: Imagen Satelital LANDSAT 8 Unidades Administrativas Provinciales MINAM-IGN ZEE de la zona de Cuñumbuque)

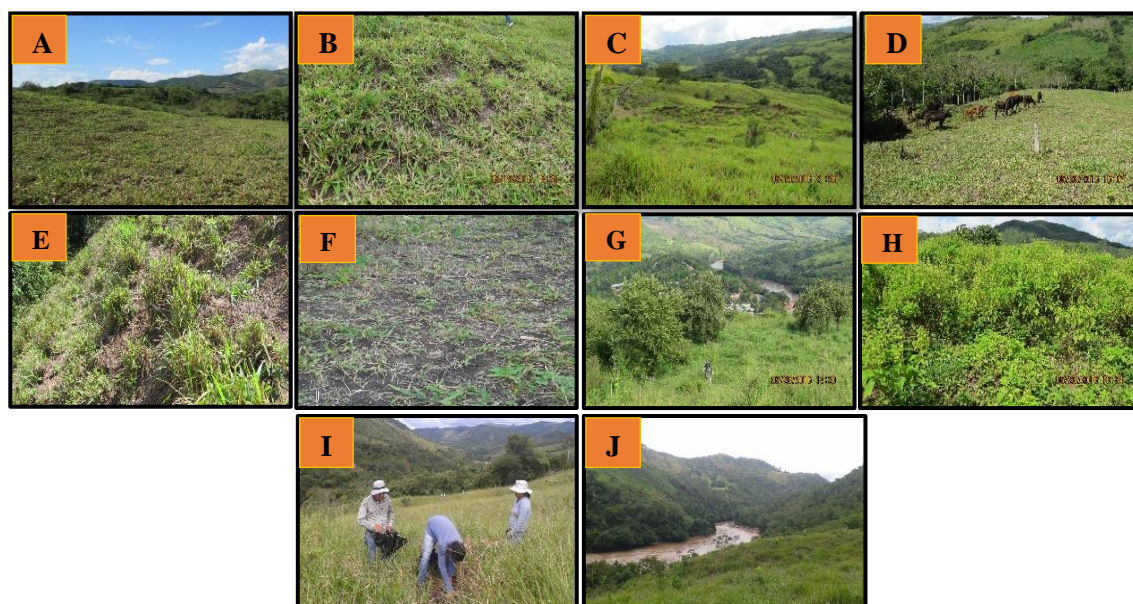


Figura 2. Vista panorámica de parcelas seleccionadas de la zona de Cuñumbuque: A) Carañayacu-A, B) Carañayacu-B, C) Bosalao-A, D) Bosalao-B, E) Estero-A, F) Estero-B, G) Cercado-A, H) Cercado-B, I) Difuntillo y J) Chacrilla.

Tabla 1

Detalles de las 10 parcelas de colecta

	Origen de la parcela	Composición vegetal
Carañayacu-A	Parcela con instalación de <i>Brachiaria brizantha</i> desde el inicio del terreno	Presencia de leguminosa <i>Desmodium sp</i>
Carañayacu-B	Parcela con instalación de <i>Brachiaria brizantha</i> desde el inicio del terreno	Presencia de gramíneas como monocultivos
Bosalao-A	Parcela con instalación de <i>Brachiaria brizantha</i> desde el inicio del terreno	Presencia de gramíneas como monocultivos
Bosalao-B	Parcela con instalación de <i>Brachiaria brizantha</i> desde el inicio del terreno	Presencia de leguminosas nativas
Estero-A	Parcela con instalación de <i>Brachiaria brizantha</i> desde el inicio del terreno	Especies herbáceas nativas de la zona
Estero-B	Parcela instalada con pasto hace más de 30 años, antes de que sembrara pasto <i>Brachiaria brizantha</i> predominaba el pasto Castilla.	Presencia de gramíneas como monocultivos
Cercado-A	Parcela con instalación de <i>Brachiaria brizantha</i> desde el inicio del terreno	Abundante presencia de huairuro (<i>Ormosia coccinea</i>)
Cercado-B	Parcela con instalación de <i>Brachiaria brizantha</i> desde el inicio del terreno	Presencia de "cuna del niño" y "albahaca"
Difuntillo	Antes de ser pastizal fue purma, la parcela tiene 22 años con instalación de pasto <i>Brachiaria brizantha</i>	Presencia de huairuro, mimosas y acacias
Chacrilla	Parcela con instalación de <i>Brachiaria brizantha</i> desde el inicio del terreno	Presencia significativa de huairuro (<i>Ormosia coccinea</i>)

Fuente: Proyecto Recuperación de pasturas degradadas empleando microorganismos benéficos y leguminosas asociadas con un sistema silvopastoril en la zona Cuñumbuque – San Martín – Perú. Abril - Mayo 2016, Convenio N° 205-2015, CONCYTEC – MINEDU

2.1.2. Colecta de muestras de suelos de campo

Las muestras de suelo fueron colectadas de áreas de pasturas en 10 parcelas de la zona de Cuñumbuque, las zonas fueron Carañayacu-A ($S6^{\circ} 31.771'$ $W76^{\circ} 28.807'$; 590 m.s.n.m.m), Carañayacu-B ($S6^{\circ} 31.563'$ $W76^{\circ} 28.430'$; 534 m.s.n.m.m), Bosalao-A ($S6^{\circ} 31.091'$ $W76^{\circ} 28.641'$; 417 m.s.n.m.m), Bosalao-B ($S6^{\circ} 30.839'$ $W76^{\circ} 28.945'$; 305 m.s.n.m.m), Estero-A ($S6^{\circ} 33.645'$ $W76^{\circ} 28.188'$; 489 m.s.n.m.m), Estero-B ($S6^{\circ} 32.787'$ $W76^{\circ} 28.389'$; 322 m.s.n.m.m), Cercado-A ($S6^{\circ} 30.496'$ $W76^{\circ} 28.613'$; 309 m.s.n.m.m), Cercado-B ($S6^{\circ} 31.059'$ $W76^{\circ} 28.507'$; 230 m.s.n.m.m), Difuntillo ($S6^{\circ} 31.396'$ $W76^{\circ} 28.438'$; 261 m.s.n.m.m) y Chacrilla ($S6^{\circ} 32.758'$ $W76^{\circ} 26.965'$; 234 m.s.n.m.m) (Tabla 2). En cada zona se realizó un muestreo aleatorio en forma de zig-zag, tomando 1kg de suelo de 10 puntos equidistantes (10 mts aproximadamente), haciendo un total de 10 sub muestras por cada zona, a una profundidad de 0 – 20 cm, siguiendo la metodología sugerida por Alves *et al.*, (2016), las muestras fueron homogenizadas y depositadas en bolsas plásticas de polietileno y rotuladas con el nombre de la zona y fecha de recolección (Figura 3). Fueron separadas en dos muestras, para los análisis microbiológicos que fueron puestas en refrigeración a 4 °C hasta su posterior análisis en el laboratorio de microbiología Agrícola y la otra muestra para los análisis físico-químicos, en el Laboratorio de suelos y aguas de la Facultad de Ciencias Agrarias – UNSM-Tarapoto. También se colectó suelo adicional para la instalación de las leguminosas forrajeras en condiciones de vivero. Las muestras de suelo fueron colectadas en el año 2016, en los meses de abril y mayo.

Tabla 2

Descripción de las 10 zonas agroecológicas de estudio

	Altitud m.s.n.m.m	Coordenadas del muestreo		Clasificación de suelo	Zona de vida
		X	Y		
Carañayacu-A	595	336343	9278021	Vertisol	Bosque Seco - Tropical (bs-T) *
Carañayacu-B	534	337037	9278406	Inceptisol	Bosque Seco - Tropical (bs-T) *
Bosalao-A	425	336646	9279275	Vertisol	Bosque Seco - Tropical (bs-T) *
Bosalo-B	299	336084	9279737	Vertisol	Bosque Seco - Tropical (bs-T) *
Estero-A	489	337495	9274570	Vertisol	Bosque Seco - Tropical (bs-T) *
Estero-B	330	337119	9276150	Vertisol	Bosque Seco - Tropical (bs-T) *
Cercado-A	305	336694	9280371	Vertisol	Bosque Seco - Tropical (bs-T) *
Cercado-B	235	336893	9279334	Vertisol	Bosque Seco - Tropical (bs-T) *
Difuntillo	235	337022	9278714	Vertisol	Bosque Seco - Tropical (bs-T) *
Chacrilla	260	339744	9276211	Vertisol	Bosque Seco - Tropical (bs-T) *

Fuente: Proyecto: Recuperación de pasturas degradadas empleando microorganismos benéficos y leguminosas asociadas con un sistema silvopastoril en la zona Cuñumbuque – San Martín – Perú. Abril – mayo.2016, Convenio N° 205-2015, CONCYTEC – MINEDU. * Peruvian Interpolation of the SENAMHI Climatological and Hydrological Stations, 2016.





Figura 3. Procedimiento de colecta: A) Limpieza de la superficie del suelo para el muestreo, B y C) Colecta de muestras de suelo, D) Homogenización de muestras y E) Transporte de muestras para el laboratorio.

2.1.3. Propiedades físicas - químicas y biológicas del suelo

El análisis físico-químico de las muestras de suelo colectadas en las diez parcelas de la zona de Cuñumbuque fue realizado por el laboratorio de suelos, aguas y foliares (Tabla 3) y los análisis microbiológicos (Tabla 4) se realizaron en el laboratorio de microbiología agrícola, ambos de la Facultad de Ciencias Agrarias – UNSM, Tarapoto. Donde se obtuvieron los siguientes datos.

Tabla 3

Localidad	pH (1:1)	C.E (1:1) ds/m	N meq 100g	Ca meq 100g	M.O meq 100g	P ppm	CIC meq 100g	Análisis mecánico			Clase textural
								Arena %	Limo %	Arcilla %	
Cercado-A	7.87	196.32	0.205	21.08	4.10	15.68	25.84	27.5	17.5	55	Arcilla
Cercado-B	7.94	419.23	0.178	21.19	3.56	10.32	25.88	29.5	18.5	52	Arcilla
Carañayacu-A	7.02	26.35	0.160	8.89	3.20	10.25	10.91	52	30	18	Franco arenoso
Carañayacu-B	7.84	152.32	0.242	52.12	4.84	12.32	58.27	53	28	19	Franco arenoso
Bosalao- A	8.02	193.25	0.256	50.16	5.12	14.12	59.64	40	27	33	Franco arcilloso
Bosalao-B	7.91	263.12	0.158	20.71	3.15	16.32	24.79	33	25	42	Arcilla
Estero- A	7.75	185.23	0.306	43.41	6.12	14.56	48.47	50	18	32	Franco arcilloso arenoso
Estero-B	7.96	210.56	0.262	51.45	5.24	22.32	58.28	54	23	23	Franco arcilloso arenoso

Chacrilla	8.21	124.51	0.173	47.23	3.45	13.56	51.74	30	37	33	Franco arcilloso
Difuntillo	7.27	218.63	0.212	55.94	4.23	12.12	61.10	40	25	35	Franco arcilloso

*Análisis físicos – químicos de suelos de las zonas de colecta**

* Metodologías de análisis: Textura: (Hidrómetro Bouyoucos), pH (Potenciómetro suspensión suelo-agua 1:2.5), MO=materia orgánica (Walkley y Black), P=fósforo extraíble (Olsen), K=Potasio, N=Nitrógeno, Mg= Magnesio y Ca= Calcio (extracción NaHCO₃ 0.5 M; 8.5 Fotómetro), Corriente eléctrica (C.E), capacidad de intercambio catiónico (CIC). Fuente: Laboratorio de Análisis de Suelos y Aguas- UNSM-T. Mayo, 2016.

Tabla 4

*Análisis microbiológicos de suelos de las zonas de colecta**

Suelos	Bacterias totales (UFC/g)*	Bacterias esporuladas (UFC/g)*	Hongos totales (UFC/g)*	Actinobacterias (UFC/g)*	Bacterias solubilizadoras de fosfato (UFC/g)*	Esporas de HMA/10 g suelo
Cercado-A	6.79	6.21	2.52	6.2	3	11
Cercado-B	6.87	5.78	4.15	6.17	3	6
Carañayacu-A	6.92	5.11	3.52	5.49	5	11
Carañayacu-B	6.49	5.00	3.92	5.29	5	43
Bosalao-A	7.29	5.44	3.96	6.32	4	28
Bosalao-B	7.11	6.36	3.82	5.77	4.3	28
Estero-A	7.06	6.45	3.89	6.11	5	16
Estero-B	7.21	6.39	4.15	6.3	5	4
Chacrilla	6.82	6.00	3.85	6.5	5	35
Difuntillo	6.85	6.3	4.23	6.52	5	27

Valores convertidos a escala logarítmica base 10.

* Metodologías de análisis: Bacterias (B) totales, B. esporuladas, B. solubilizadoras de fosfato y Actino bacterias (Recuento en placa por siembra en superficie), Esporas de HMA (tamizado en húmedo y decantación). **Fuente:** Laboratorio de Microbiología Agrícola – UNSM -T. Mayo, 2016.

2.1.4. Implementación y conducción del experimento

El trabajo de investigación se realizó en dos fases: Vivero y laboratorio.

Fase de vivero

La primera fase consistió en la multiplicación de HMA con las leguminosas forrajeras *Centrosema macrocarpum* y *leucaena leucocephala* que se instaló en el vivero del laboratorio de Microbiología Agrícola-Facultad de Ciencias Agrarias – UNSM, Tarapoto (Figura 4).



Figura 4. Vista panorámica del vivero de multiplicación de HMA

Fase de laboratorio

La siguiente fase fue de selección, aislamiento, conteo y caracterización de esporas y evaluación de la colonización micorrízica de HMA, se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias (Figura 5).



Figura 5. Instalaciones del laboratorio de microbiología agrícola

Generalidades del lugar

a) Ubicación Política

Sector : Ciudad Universitaria

Distrito : Morales
 Provincia : San Martín
 Departamento : San Martín

b) Ubicación Geográfica

Latitud Sur : 06° 35' 00"
 Longitud Oeste : 76° 05' 00"
 Altitud : 290 m.s.n.m.m

c) Condiciones climáticas:

Ecosistema : bosque seco Tropical
 Precipitación : 1200 mm/año
 Temperatura : Máxima=32°C, Mínima=22°C, Promedio= 26°C
 Altitud : 290 m.s.n.m.m
 Humedad relativa: 70%

2.1.5. Instalación de las leguminosas forrajeras para la multiplicación de HMA

Los suelos recolectados de las parcelas de cada zona en estudio se secaron bajo sombra a temperatura ambiente, para luego ser triturados, tamizados según Moreira *et al.*, (2016), y mezclados con vermiculita esterilizada en proporción (1:1) v/v (Rodríguez *et al.*, 2000), para la siembra en macetas. Éstas se instalaron en el vivero del laboratorio de Microbiología Agrícola, utilizando dos leguminosas forrajeras adaptadas a climas tropicales y a condiciones de suelos de pasturas como son: *Centrosema macrocarpum* y *Leucaena leucocephala*. Se sembraron semillas desinfectadas de las dos leguminosas forrajeras, en macetas de 3,5 kg de sustrato (suelo de la zona de estudio y vermiculita en proporción 1:1). Las leguminosas forrajeras se mantuvieron en condiciones de invernadero durante 3 meses, las cuales fueron regadas según necesidad de las plantas, y a los 60 días se sometieron a un estrés hídrico, esto para estimular la multiplicación de esporas de HMA (Figura 6).

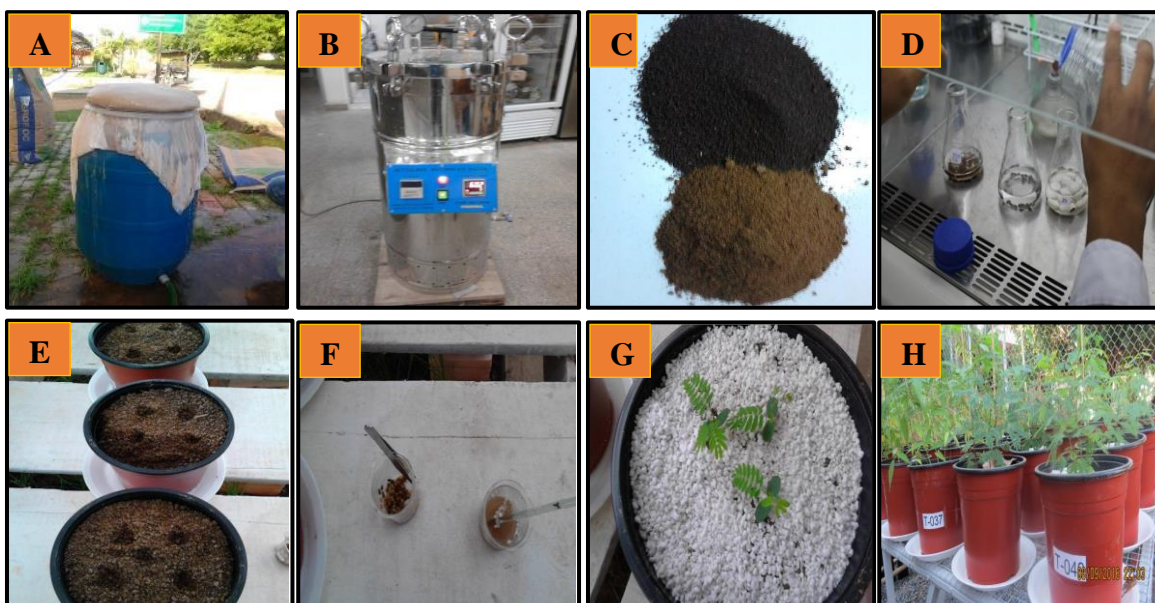


Figura 6. Procedimiento para la instalación de las leguminosas forrajeras: A y B) Lavado y esterilización de vermiculita, C) Preparación de sustrato, D) Desinfección de semillas, E y F) siembra de leguminosas forrajeras, G) Aplicación de perlita y H) Leguminosas forrajeras a los 90 dds (días después de la siembra)

2.1.6. Selección de suelo y raíces de macetas con las leguminosas forrajeras

Las muestras biológicas que se tomaron de cada tratamiento biomasa radicular y suelo rizosférico. Las muestras de suelo fueron puestas a secar bajo sombra y tamizadas logrando eliminar restos de perlita. Se tomaron 500g de suelo y se almacenaron en bolsas de cierre hermético “ziploc” a 4°C debidamente codificado.

Por otro lado, las raíces fueron lavadas con abundante agua para poder desprender partículas de suelo, posteriormente se seleccionaron raíces más finas (secundarias y terciarias) de las leguminosas forrajeras *Centrosema macrocarpum* y *Leucaena leucocephala* las cuales fueron cortadas en segmentos de 1 cm de longitud aproximadamente y colocadas en tubos falcon de 50 ml con alcohol al 70% y puestas a temperatura ambiente hasta su posterior evaluación (Figura 7).



Figura 7. Procedimiento para la selección de suelo y raíces: A y B) Extracción de la raíz, C) Tamizado de suelo, D) Codificación de suelo, E) Lavado de raíces, F) Selección de raíces, G y H) Conservación de raíces.

2.2. Densidad de esporas

El aislamiento de esporas se realizó según el método de tamizado en húmedo y decantación propuesta por Gerdemann y Nicholson (1963) con modificaciones. Las esporas de HMA se extrajeron de 10g de suelo seco de la rizósfera de cada zona muestreada, pasando a través del tamiz de 710 μm y 53 μm en secuencia para aislar esporas de diversos tamaños, los suelos con alto contenido de arcilla pueden obstruir los tamices; por esa razón se agregaron una pequeña cantidad de pirofosfato de sodio a 0.1M (Fogel y Hunt, 1979) por 30 minutos, para dispersar las partículas de arcilla y liberar las aberturas del tamiz, y después éstas se centrifugaron en tubos falcón de 50 ml con agua destilada a 3500 rpm durante 5 minutos, seguido de centrifugación en solución acuosa a 70 % de sacarosa (Walker *et al.*, 1982) a 3500 rpm durante cinco minutos. Esta etapa se repitió dos veces (Figura 8).

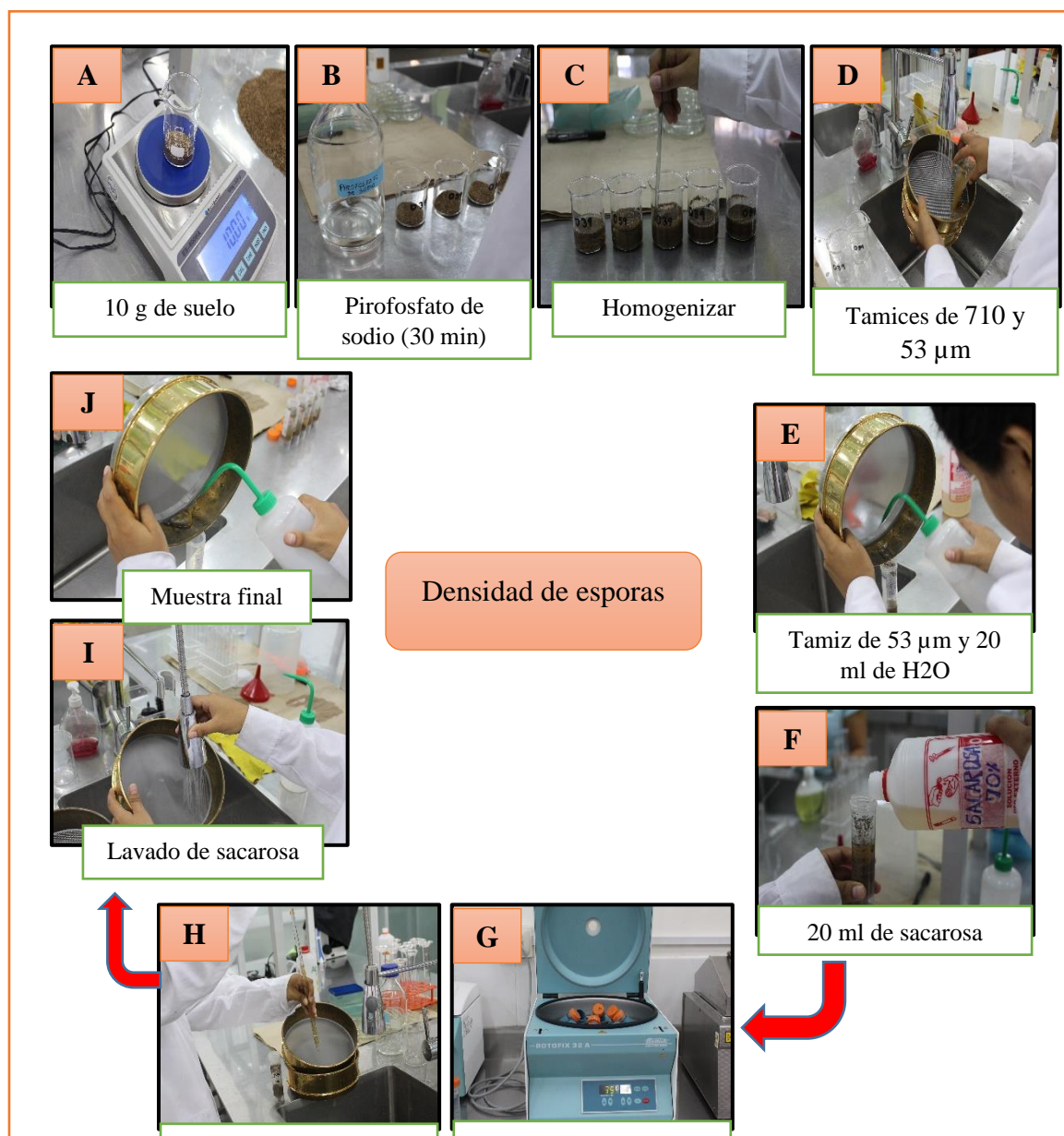


Figura 8. A, B, C, D, E, F, G, H, I y J: Procedimientos para el aislamiento de esporas.

Para la cuantificación de esporas se realizó de acuerdo a Schenck y Pérez (1990), de cada muestra procesada por la técnica de tamizado y decantación se tomaron 10 ml de cada uno de ellas, estas se depositaron en una placa concéntrica para facilitar el conteo de esporas. Las esporas se contaron con la ayuda de un contómetro y vistas al estereomicroscopio de aumento de 40 veces. Por cada muestra se realizaron tres conteos, para tener un estimado total de número de esporas/g de suelo (Figura 9).

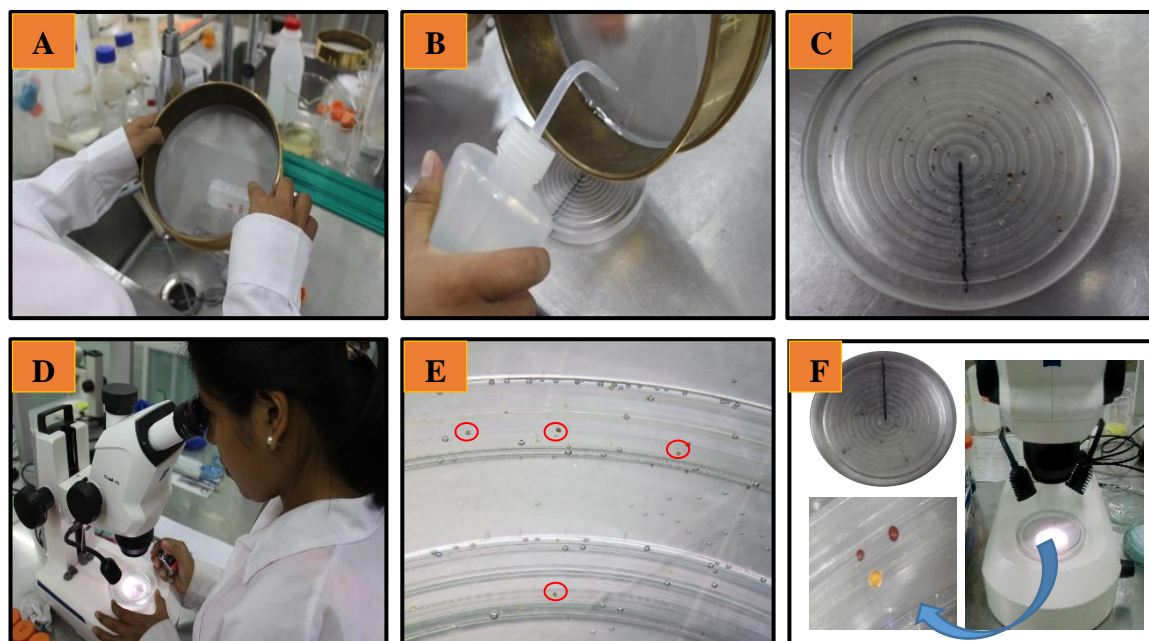


Figura 9. Procedimiento para el conteo de esporas de HMA-Nativos: A) Lavado de las muestras, B) Depósito de la muestra en la placa concéntrica, C) Placa concéntrica con la muestra de esporas, D) Observación en el estereomicroscopio binocular, E) Esporas viables observadas y F) Conteo de esporas en placa concéntrica.

2.3. Porcentaje de colonización micorrízica

La tinción de raíces de las leguminosas forrajeras, se realizó de acuerdo a la metodología de (Viertheilig *et al.*, 1998) modificado, las muestras de raíces que estuvieron

conservadas en alcohol al 70% se lavaron con agua corriente, después se agregó solución de KOH al 10% (p/v) donde las raíces permanecerán inmersas por un tiempo de 6 horas, completada las horas posteriormente se calentaron en baño maría a 90° durante 30 minutos. Luego se añadió H₂O₂ al 10% a las raíces, hasta lograr aclararlas. Seguidamente se añadió tinta azul Parker al 5%, posteriormente para ser pasadas al baño maría durante un minuto a 90° C. Por último, las raíces teñidas fueron conservadas en lactoglicerol, hasta su posterior evaluación (Figura 10).

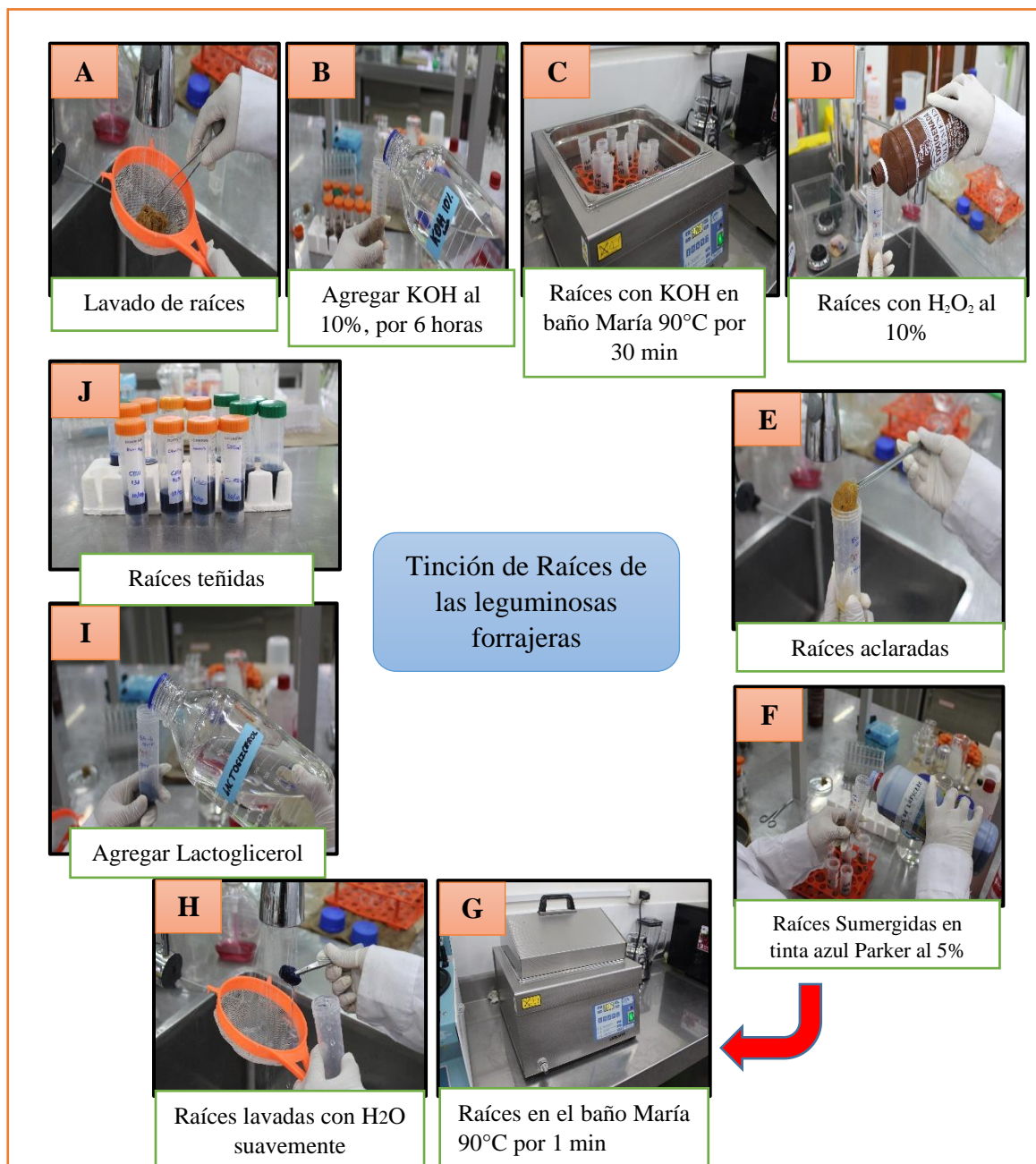
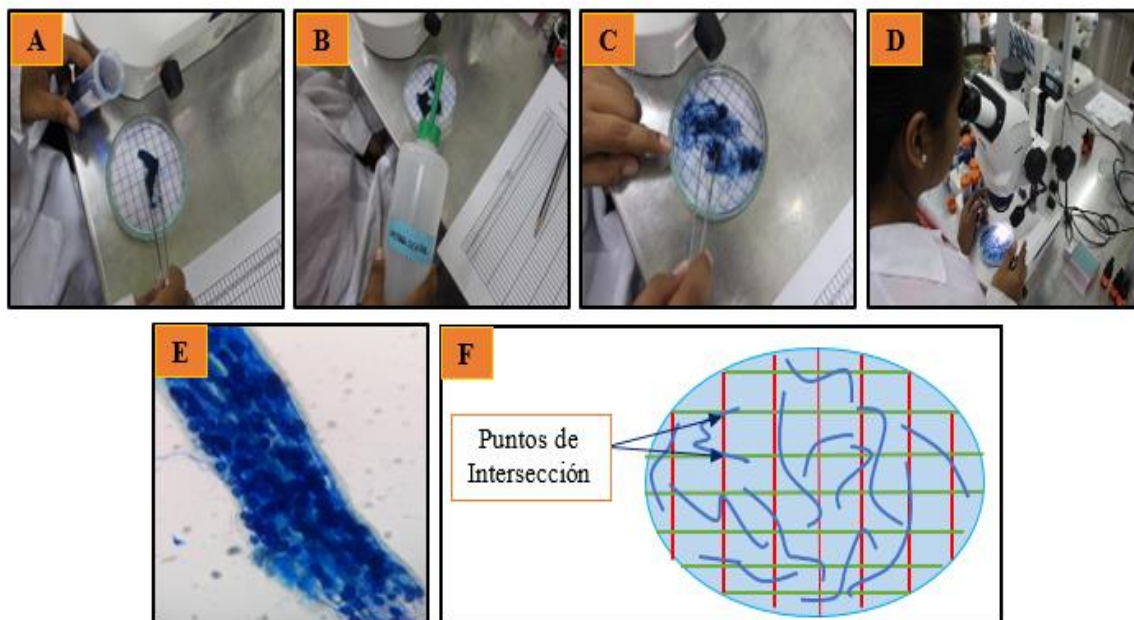


Figura 10. A, B, C, D, E, F, G, H, I y J: Procedimientos para tinción en raíces de leguminosas forrajeras.

Para determinar el porcentaje de colonización micorrízica por HMA se realizó según la metodología de Giovannetti y Mosse (1980). Las raicillas se distribuyeron en forma



aleatoria en una placa Petri cuadrículada en solución de lactoglicerol, donde fueron evaluadas los fragmentos de raíces conteniendo estructuras fúngicas de los HMA (hifas, vesículas, arbuscúlos, esporas y células auxiliares) vistas en un estereoscopio binocular. Se observó cada campo visual, la intersección de las raíces con la línea horizontal, anotando la presencia o ausencia de colonización micorrízica del segmento de la raíz que está en contacto con la línea de la cuadrícula (Figura 11).

Figura 11. Etapas para determinar el porcentaje de colonización micorrízica: A) Ubicación de las raíces para evaluación, B) Aplicación de lactoglicerol, C) Dispersión de las raíces en la placa cuadrículada, D) Observación en estereomicroscopio, E) Estructuras de HMA en raíces y F) Forma de evaluación de cada segmento de raíz.

2.4. Separación e identificación de morfotipos de HMA nativos predominantes

Para el desarrollo de esta actividad se colocaron las esporas en una placa reloj y se observaron al estereomicroscopio. Con la ayuda de una aguja de disección las esporas se agruparon y separaron según los morfotipos, considerando parámetros morfológicos como

forma, color y tamaño, para posteriormente extraerlas con la ayuda de una micropipeta. Las esporas de los morfotipos predominantes de cada zona se montaron en portaobjetos utilizando como líquidos de montaje alcohol polivinílico y ácido láctico glicerol (PVLG)

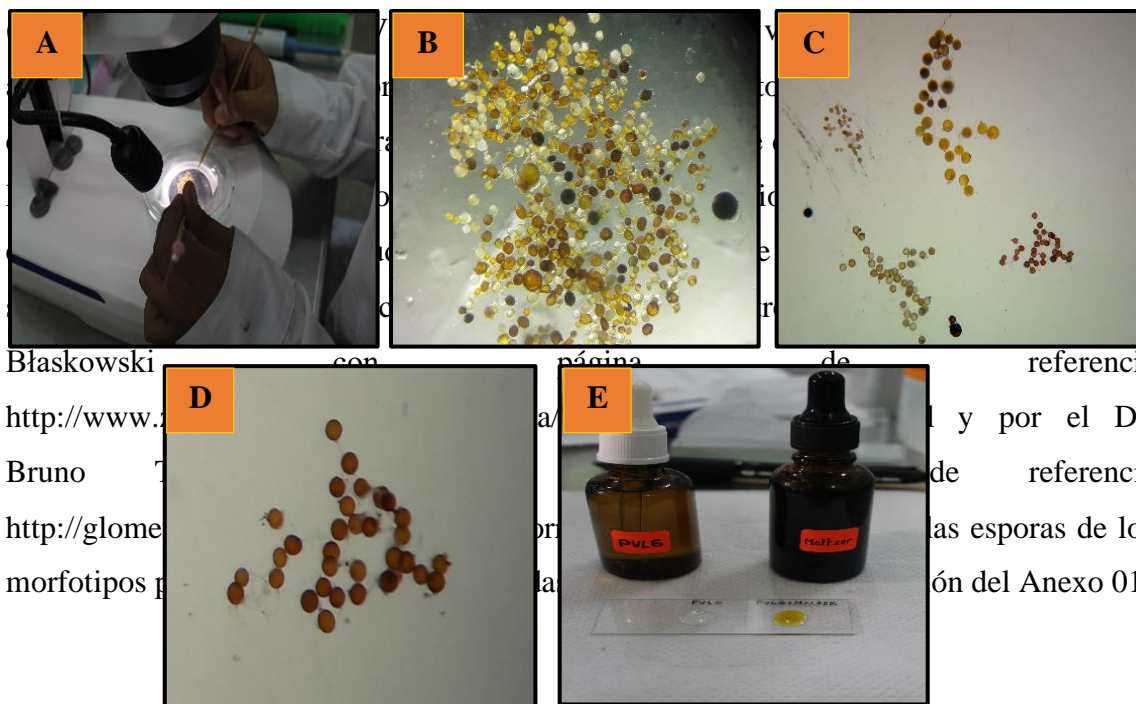


Figura 12. Procedimiento para selección de morfotipos nativos predominantes: A y B) Aislamiento de esporas, C) Separación por morfotipos, D) Morfotipo predominante y E) Montaje de morfotipos.

2.5. Diseño Experimental

El diseño experimental en este trabajo de investigación se desarrolló utilizando el diseño completamente al azar (DCA), con arreglo factorial de 10A x 2B, considerando el factor A (zona) y el factor B (leguminosas forrajeras).

Factor A: zona

A1 = Carañayacu -A

A2 = Estero-B

A3 = Difuntillo

A4 = Chacrilla

A5 = Carañayacu B

A6 = Estero-A

A7 = Bosalao-A

A8 = Cercado-B

A9 = Cercado-A

A10 = Bosalao-B

Factor B: Leguminosas forrajerasB1 = *Centrosema macrocarpum*B2 = *Leucaena leucocephala*

La interacción entre los factores resultó 20 tratamientos (Tabla 5), con 3 repeticiones por tratamiento, haciendo 60 unidades experimentales, con nivel de significancia de $p < 0,05$ y probabilidad de error para determinar la confiabilidad y naturaleza de las diferencias entre tratamientos. Todos los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza, una vez comprobada la homogeneidad de las varianzas y la distribución normal de los datos, se compararon las medidas mediante la prueba de rango múltiple de Tukey. Para todos los casos se utilizó un nivel de significancia $p < 0,05$ mencionado anteriormente, con $n=3$. Los datos fueron analizados con el programa SAS 9.2 (SAS INSTITUTE, 2008).

Tabla 5

*Tratamientos en estudio***TRATAMIENTOS**

Carañayacu-A	Estero-B	Difuntillo	Chacrilla	Carañayacu-B
T1=CARA-A-CEN	T3=ESTE-B-CEN	T5=DIFUN-CEN	T7=CHACRI-CEN	T9=CARA-B-CEN
T2=CARA-A-LEU	T4=ESTE-B-LEU	T6=DIFUN-LEU	T8=CHACRI-LEU	T10=CARA-B-LEU
Estero-A	Bosalao-A	Cercado-B	Cercado-A	Bosalao-B
T11=ESTE-A-CEN	T13=BOSA-A-CEN	T15=CERCA-B-CEN	T17=CERCA-A-CEN	T19=BOSA-B-CEN

T12=ESTE-A- LEU	T14=BOSA-A- LEU	T16=CERCA-B- LEU	T18=CERCA-A- LEU	T20=BOSA-B- LEU
--------------------	--------------------	---------------------	---------------------	--------------------

T= Tratamiento, Cara = Carañayacu, Este = Estero, Difun = Difuntillo, Chacri = Chacrilla, Bosa = Bosalao, Cerca = Cercado, Cen = Centrosema macrocarpum, Leu = Leucaena leucocephala, A= Primera parcela, B = Segunda parcela

Tabla 6

Análisis de varianza para el experimento

F. de V.	G.L
A	p - 1 = 9
B	q - 1 = 1
A B	(p - 1) (q - 1) = 9
Error	(p x q x r) - 1 = 59

Para realizar el análisis de varianza, los datos expresados en porcentaje (colonización micorrízica) y datos cuantificables (número de esporas) fueron transformados ha arco seno \sqrt{x} y log (x) respectivamente.

2.6. Indicadores de la Variable

2.6.1. Determinación de la colonización micorrízica

Con la finalidad de determinar la colonización de hongos micorrízicos arbusculares en raíces de leguminosas de cobertura se realizó el siguiente análisis:

Porcentaje de colonización

El porcentaje de colonización en raíces se calculó según la metodología propuesta por Giovannetti y Mosse (1980), utilizando la siguiente formula:

$$\% \text{ de colonización} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de segmentos colonizados}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de segmentos evaluados}} \times 100$$

2.6.2. Densidad de esporas de HMA

La densidad de esporas, es la abundancia o el número de esporas que se encuentran en una determinada muestra evaluada (Robles *et al.*, 2013). La cuantificación de esporas se realizó al tercer mes del experimento, donde se contaron las esporas viables que se encontraron en 10 g de suelo.

2.6.3. Selección de morfotipos de HMA nativos predominantes

Para la selección de los morfotipos predominantes encontrados en cada muestra de suelo se realizó al tercer mes del experimento, donde se seleccionaron los morfotipos

predominantes de cada muestra de suelo. Se consideraron morfotipos predominantes los que tuvieron el mayor número de individuos (esporas), considerando un número mayor de 10 esporas por muestra de suelo.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Colonización Micorrízica

La colonización micorrízica en raíces de leguminosas forrajeras presentó efecto altamente significativo en relación a las diez zonas y dos leguminosas, las leguminosas influenciaron significativamente en la colonización micorrízica, mientras que la zona tuvo una influencia altamente significativa, lo que nos indica que las leguminosas y las zonas influenciaron en la colonización ($p \leq 0,05$). Así mismo el coeficiente de variabilidad fue 11,08 % y el coeficiente de determinación R^2 fue de 77%. Además, se observó diferencias significativas entre los factores de las 10 zonas de estudio de la zona Cuñumbuque (Tabla 7).

Tabla 7

Fuente de variabilidad	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F.C	P - Valor Sig.
Zona	9	0,49119396	0,05457711	8,44	0,0001 **

Leguminosa	1	0,05762127	0,05762127	8,91	0,0048 *
Zona x Leguminosa	9	0,32777893	0,03641988	5,63	0,0001 **
Error	40	0,25857786	0,00646445		
Total	59	1,13517203			

** : Altamente significativo a 1%; * : Significativo a 5%

C.V= 11,08% **R²= 77%** (Fuente original de la tesis)

Análisis de varianza para la colonización micorrízica (%) en raíces de leguminosas forrajeras en 10 zonas de la zona Cuñumbuque y dos leguminosas forrajeras. Datos transformados $\arcsen \sqrt{\%}$

En relación a los veinte tratamientos, en el análisis de comparación de medias de Tukey ($p < 0,05$) ($p < 0,01$) para el efecto principal de las zonas de Cuñumbuque en la colonización micorrízica (%), se observó diferencias altamente significativas entre las diez zonas y las dos leguminosas forrajeras, siendo los tratamientos T-3 correspondiente a la zona Estero-B con (72,89%) y T-5 correspondiente a la zona Difuntillo con (70,81%), las de mayor porcentaje de colonización micorrízica dentro la interacción con la leguminosa forrajera *Centrosema macrocarpum*, posteriormente las demás zonas con los siguientes mayores valores en porcentajes de colonización micorrízica, siendo estadísticamente todas iguales. Mientras los tratamientos T-12 correspondiente a la zona Estero-A con (28,87%) y T-8 correspondiente a la zona Chacrilla con (25,58%) presentaron los menores porcentajes de colonización micorrízica dentro la interacción con la leguminosa forrajera *Leucaena leucocephala* (Figura 13).

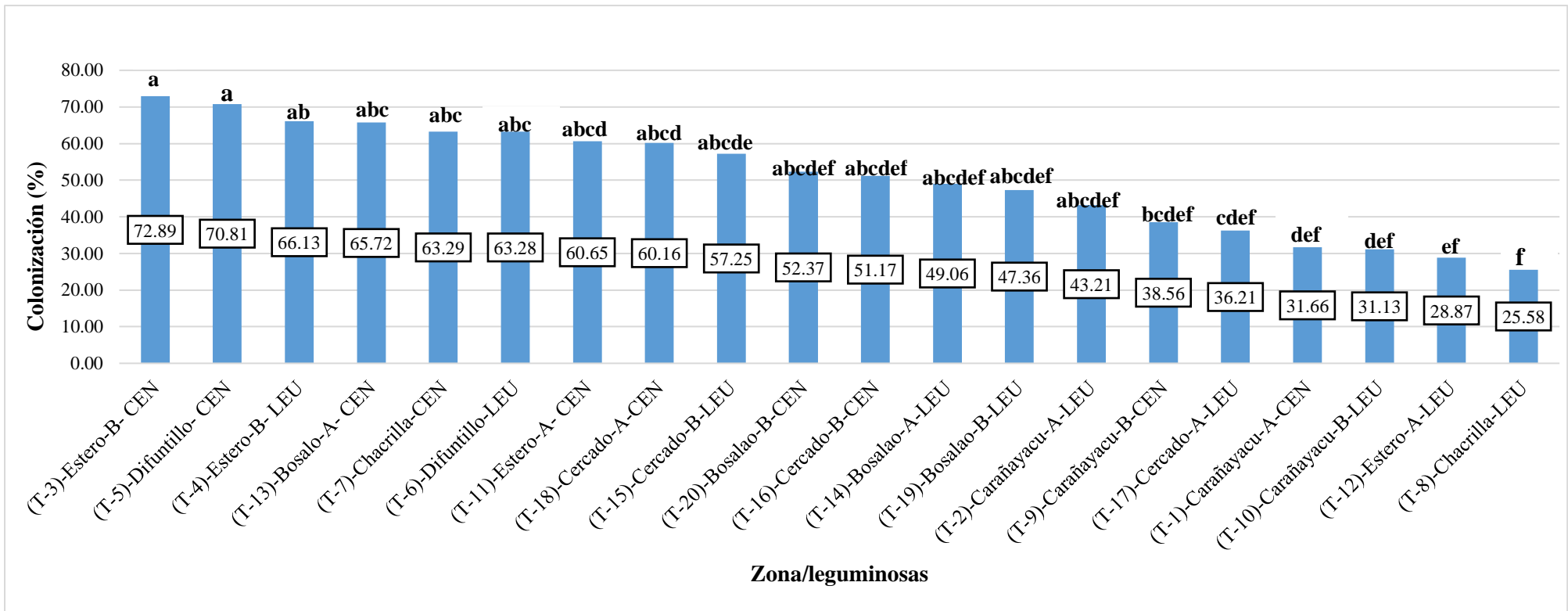


Figura 13. Efecto principal de los niveles del Factor A x B: Zona por Leguminosas forrajeras, en relación a los veinte tratamientos en estudio para el porcentaje de colonización micorrízica. Medias con letra común no son significativamente diferentes.

El efecto de la interacción entre las diez zonas y las dos leguminosas forrajeras, evidenció la posibilidad de que las zonas hayan tenido efectos diferentes de acuerdo a las leguminosas forrajeras utilizadas en estudio, para el porcentaje de colonización micorrízica. Donde la leguminosa forrajera *Centrosema macrocarpum* tuvo los mayores porcentajes de colonización micorrízica en las zonas de Estero-B, Difuntillo y Bosalao-A, a diferencia del resto de zonas.

Por su parte, la leguminosa forrajera *Leucaena leucocephala* tuvo los mayores porcentajes de colonización micorrízica en la zona de Cercado-B y también en las zonas de Estero-B y Difuntillo, sobre las demás zonas. Siendo *Centrosema macrocarpum* la leguminosa forrajera más representativa en los resultados de colonización micorrízica (Figura 14).

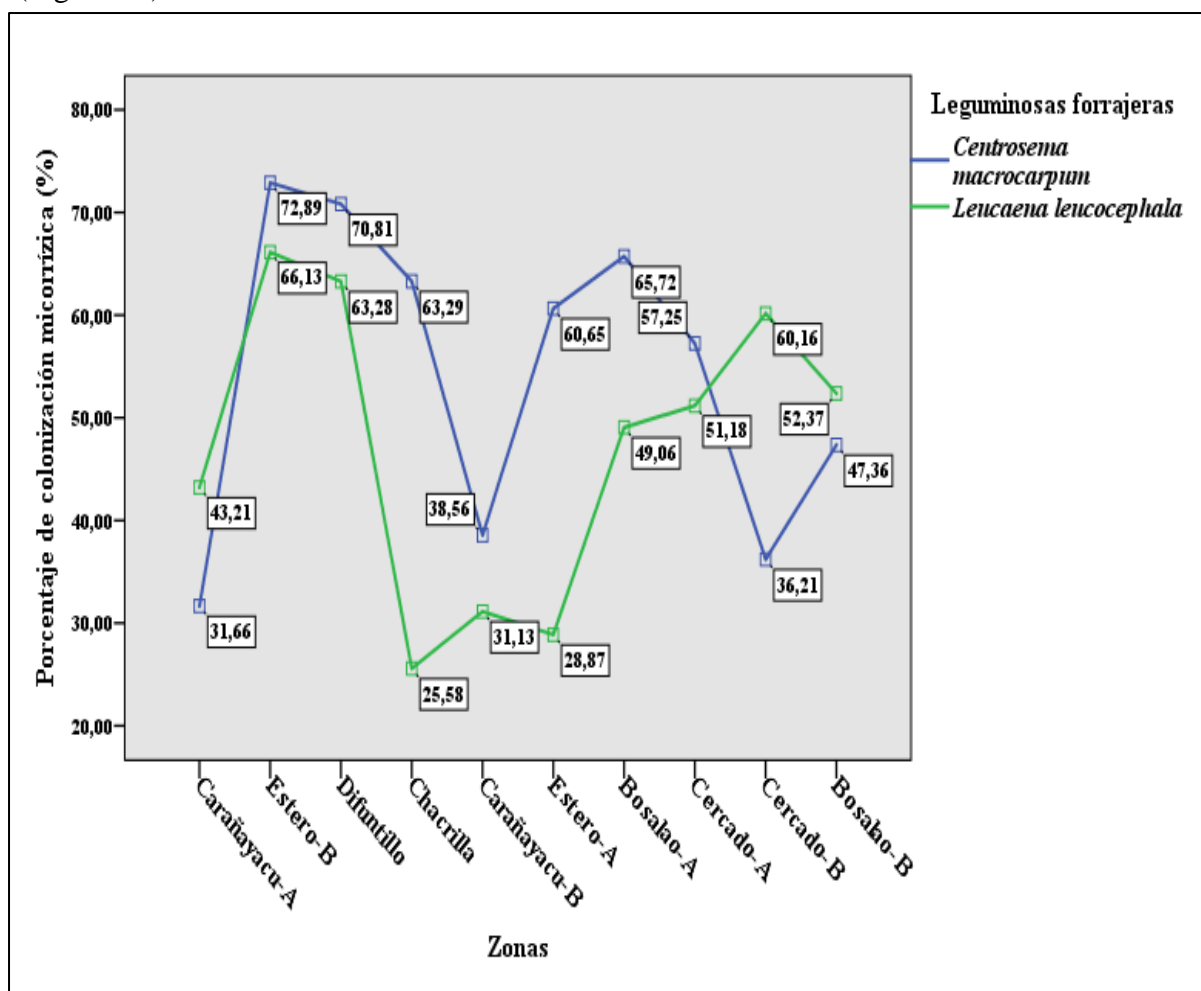


Figura 14. Efecto de la interacción entre las diez zonas y las dos leguminosas forrajeras en relación al porcentaje de colonización micorrízica.

Estos resultados, pueden estar estrechamente ligados al pH de los suelos (Tabla 3), Abd-Alla, *et al.*, (2014), encontraron un aumento en la infección micorrízica del 40% al 86,66% en pH de (7,5 a 9), dicho rango de valores se asemeja con los resultados obtenidos en este trabajo (Figuras 13 y 14), además, dicho autor reportó que la mayor proporción de colonización micorrízica fue constante en toda la estructura micorrízica, como los arbusculos, las vesículas y el micelio externo a un nivel de alcalinidad de pH 9. Además, también se puede destacar la funcionabilidad de lo HMA en suelos ácidos, como lo reportado por Barrios, (2017) quien encontró porcentajes de 70.32% en pH bajos de (3.5 a 4.2).

En relación a los resultados obtenidos en las plantas de *Centrosema macrocarpum* y *Leucaena leucocephala* dentro la interacción con las diez zonas, concuerdan con los resultados reportados por autores como Flores *et al.*, (2008) donde encontraron una colonización micorrízica de 44% y 49% en raíces de *Leucaena leucocephala*, porcentajes cercanos a los promedios obtenidos en *Leucaena leucocephala* en interacción con las zonas Cercado-A y Carañayacu-A, mientras que en las demás zonas en este estudio se observaron porcentajes mayores. Miranda, (2005) indica que algunas plantas de leguminosas de interés agronómico son altamente micotróficas y de esta manera pueden contribuir para un alto índice de colonización micorrízica en este grupo de plantas. Así mismo García *et al.*, (2016) señala que la planta huésped proporciona alojamiento y carbohidratos para la formación, el mantenimiento y la función de las estructuras micorrízicas, como las esporas (estructuras esféricas asexuales, cuya función es la de supervivencia y propagación), hifas (estructura intra y extraradical cuya función es de infección, absorción y reproducción, invaden y exploran el suelo, absorbiendo nutrientes minerales y traslocarlo a la planta hospedera), vesículas (órgano de reserva importante en el almacenamiento de lípidos y glucógeno) y arbusculos (órganos de transferencia de nutrientes, donde se realizan el intercambio metabólico del carbono y fósforo y otros nutrientes minerales entre la planta y el hongo) (Figura 15).

Por otra parte, Rivera *et al.*, (2015), encontraron que, en comparación con la especificidad del cultivo, el factor suelo también determina la efectividad de las especies de HMA introducidas, lo que explica los resultados obtenidos en este trabajo en relación al porcentaje de colonización micorrízica entre la interacción de las 10 zonas y las dos leguminosas forrajeras (Figuras 13 y 14). Oehl *et al.*, (2003), reportó que las comunidades de HMA de pastizales colonizan las raíces de las plantas más rápido que las comunidades

de HMA de otras tierras en los cultivos hospederos. Por lo tanto, se podría deducir que las diferencias en los efectos de los HMA en el crecimiento de la planta entre los tipos de suelo podrían derivarse de la diferencia en la disponibilidad de nutrientes y las proporciones de nutrientes entre los suelos.

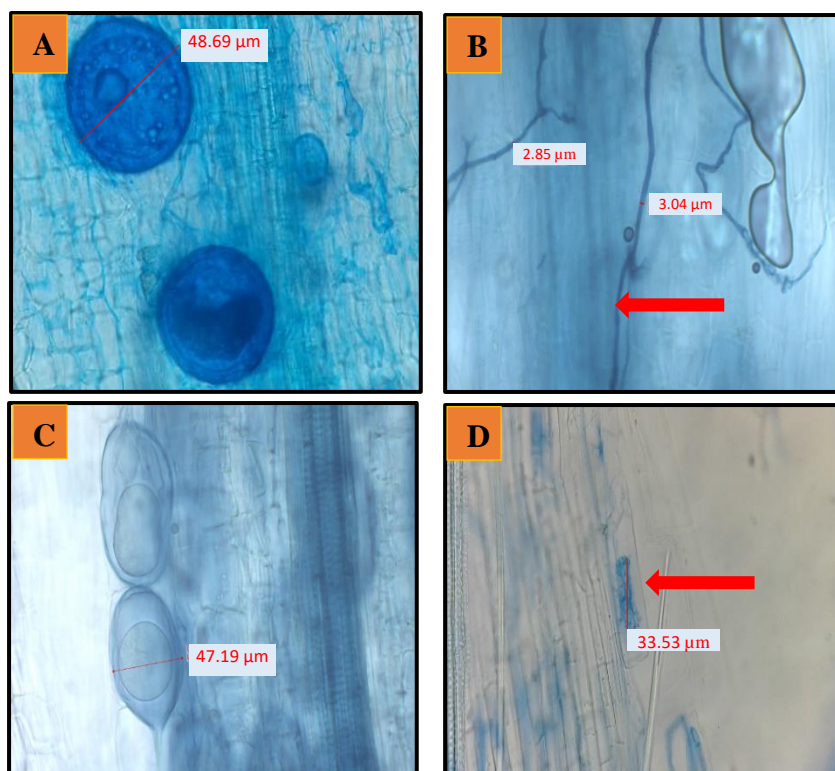


Figura. 15. Estructuras de HMA en raíces de leguminosas forrajeras observadas al microscopio binocular. A) Esporas, B) Hifas intraradicales, C) Vesículas y D) Arbúsculo.

3.2. Número de esporas de HMA nativos

Para el análisis de varianza se observó un efecto significativo en la interacción entre los factores de zonas y leguminosas para el número de esporas de Hongos Micorrízicos Arbusculares. El factor zonas resultó ser altamente significativo, mientras el factor de leguminosas forrajeras fue significativo, lo cual nos indica que existe diferencia significativa entre los niveles de los dos factores (Tabla 8). El coeficiente de determinación (R^2) fue de 65% y el coeficiente de variabilidad (C.V) fue de 8,27 %.

Tabla 8

Análisis de varianza del número de esporas de HMA nativos (10 g de suelo seco) de las diez zonas de la zona de Cuñumbuque y dos plantas de leguminosas forrajeras. Datos transformados. Log (x)

Fuente de variabilidad	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F.C	P - Valor Sig.
zona	9	5,58984667	0,62109407	16,72	0,0001 **
Leguminosa	1	0,29403000	0,29403000	7,92	0,0059 *
Zona x Leguminosa	9	1,04123667	0,11569296	3,11	0,0024 **
Error	100	3,71423333	0,03714233		
Total	119	10,63934667			

** : Altamente significativo a 1%; * : Significativo a 5%

C.V= 8,27% **R²= 65%** (Fuente original de la tesis)

En relación a los veinte tratamientos, en el análisis de comparación de medias de Tukey ($p < 0,05$) ($p < 0,01$), se observó diferencias significativas entre la interacción de las diez zonas y las dos leguminosas forrajeras, siendo el tratamiento (T-5) representado por la zona Difuntillo con 710 esporas/10g de suelo seco, la de mayor número de esporas dentro la interacción con la leguminosa forrajera *Centrosema macrocarpum*, seguido las demás zonas con los segundos mayores promedios en número de esporas, dentro la interacción con las dos leguminosas forrajeras respectivamente, encontrándose los dieciocho tratamientos (desde la zona Bosalao-A hasta la zona Carañayacu-A) todas estadísticamente iguales.

Mientras el tratamiento (T-7) representado por la zona Chacrilla con 100 esporas/10g de suelo, dentro la interacción con la leguminosa forrajera *Centrosema macrocarpum*, presento el menor número de esporas en promedio a los demás tratamientos (Figura 16).

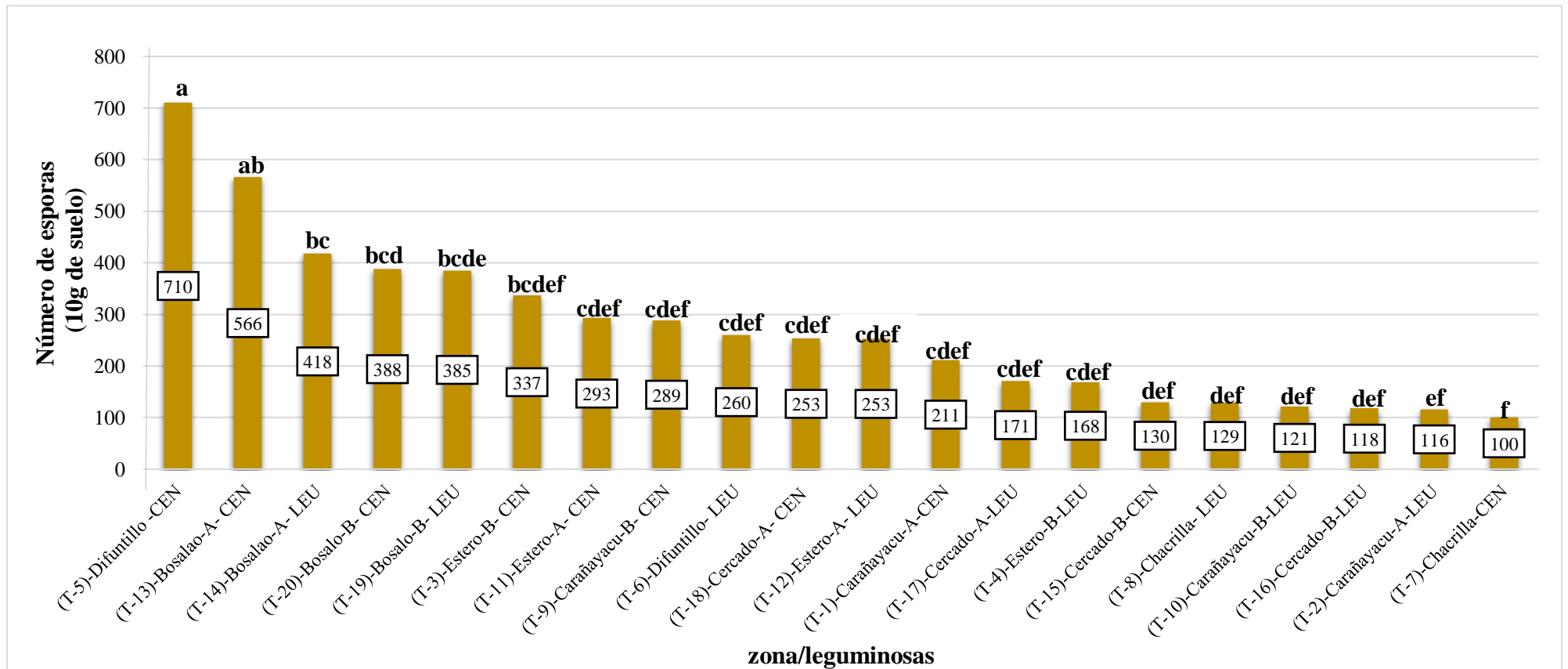


Figura 16. Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para efecto principal de los niveles del Factor A x B: Zona por Leguminosas forrajeras, en relación a los veinte tratamientos en este estudio para el número de esporas (10 g de suelo seco). Medias con letras diferentes difieren estadísticamente entre sí.

El efecto de la interacción entre las diez zonas y las dos leguminosas forrajeras, en relación al número de esporas, evidencio la posibilidad de que las zonas hayan tenido efectos diferentes después de la utilización de las leguminosas forrajeras en este estudio.

Donde las zonas Difuntillo y Bosalao-A, fueron las de mayor número de esporas después de la utilización de la leguminosa forrajera *Centrosema macrocarpum*, a diferencia de las demás zonas.

Mientras la zona Bosalao-B, y nuevamente la zona Bosalao-A, tuvieron mayor número de esporas después de la utilización de la leguminosa forrajera *Leucaena leucocephala*. Teniendo un efecto superior la leguminosa forrajera *Centrosema macrocarpum* sobre la leguminosa forrajera *Leucaena leucocephala* en cuanto al número de esporas según las zonas (Figura 17).

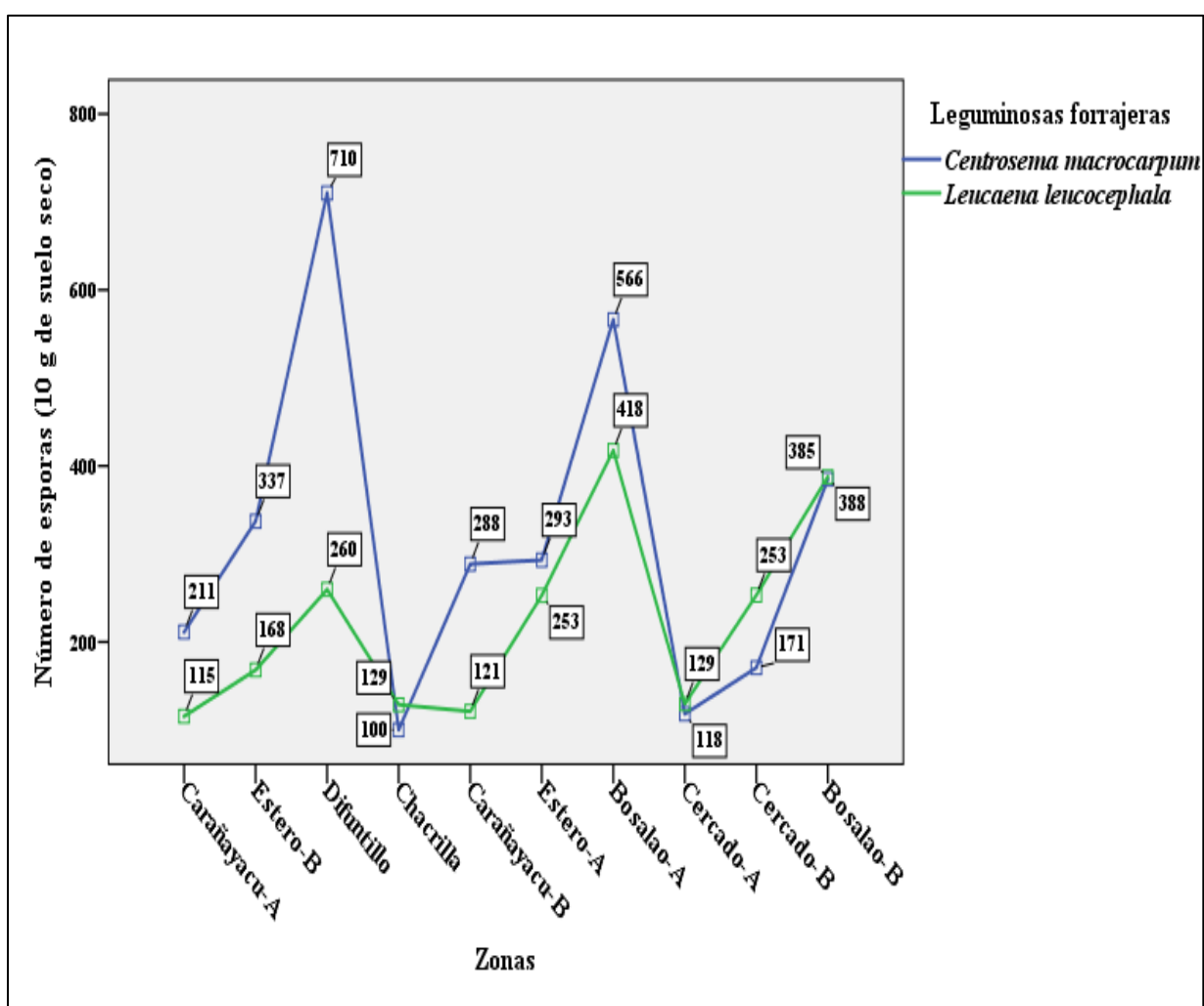


Figura 17. Efecto de la interacción entre las diez zonas y las dos leguminosas forrajeras en relación al número de esporas (10 g de suelo seco).

Los resultados obtenidos de número de esporas (10 g de suelo seco) de HMA nativos para el efecto principal de las zonas de Cuñumbuque, donde se observó diferencias significativas entre la interacción de las diez zonas y las dos leguminosas forrajeras (Figuras 16 y 17), pueden deberse a las características físicas y químicas de los suelos de cada zona, como el pH, el nivel de fertilidad en fósforo y nitrógeno, textura y estructura (Tabla 3). Lo que concuerda con algunos estudios donde relacionaron la aparición de especies específicas de HMA con las características físicas y químicas del suelo, como la textura del suelo, el contenido de materia orgánica y el contenido de nutrientes, en particular la disponibilidad de fósforo (Bashan *et al.*, 2007).

Sumado a estos estudios previos, se ha demostrado que tanto la temperatura como la precipitación, junto con la elevación y la latitud, pueden influir en la composición de la comunidad fúngica de HMA (Egerton-Warburton *et al.*, 2007). Este hallazgo está de acuerdo con Carvalho *et al.* (2012) donde la ocurrencia de especies comunes a gran altitud y la menor competencia de especies a baja altitud podrían influir en la densidad de esporas de HMA en diferentes gradientes de pendiente. Lo que demuestra la influencia de la altitud de cada zona en nuestros resultados en número de esporas, siendo la zona Difuntillo la de menor altitud, y la de mayor número de esporas (Tabla 2).

Además, Caruso *et al.*, (2012) menciona que muchos factores, como el tipo de vegetación dominante, también influyen en la abundancia y distribución de los HMA en múltiples escalas espaciales. Así como la gestión del pasado puede afectar la estructura de las comunidades de HMA causando una disminución en la diversidad de HMA y produciendo un cambio en la composición de la comunidad de HMA. Lo que se relaciona con los detalles de cada zona en nuestro estudio en donde se trabajó con suelos de pasturas (Tabla 1).

Los resultados obtenidos demuestran que la instalación de las leguminosas forrajeras *Centrosema macrocarpum* y *Leucaena leucocephala*, permitió aumentar el número de esporas recolectadas (Figuras 16 y 17), en comparación con el suelo proveniente del campo, donde no se pudieron recolectar esporas nucleadas (Tabla 4). Esto coincide con lo comunicado por Troeh y Loynachan (2009), quienes utilizando cultivos hospederos de HMA observaron no solo aumentos en la abundancia de esporas, sino también aumentos en la colonización por HMA. Así como mencionan dichos autores, es probable entonces que los propágulos micorrícicos de los suelos utilizados en este estudio consistieran en

segmentos de hifas y raíces colonizadas, más que en esporas. Asimismo, es probable también que las esporas generadas en las leguminosas forrajeras hayan provenido de las hifas activas de los HMA que colonizaron la raíz de las leguminosas.

Según Sivakumar (2013), la densidad de esporas refleja el efecto neto de la esporulación contra la desaparición de esporas debido a la germinación, dispersión, lixiviación, depredación y mortalidad, así como las raíces de los cultivos que pueden ser infectadas por los HMA, son otro factor importante para la diferencia en la densidad de esporas, porque los HMA no forman esporas sin infección. García *et al.*, (2016), menciona que las diferencias en el número de esporas pueden deberse a la dependencia del cultivo de micorrizas que influyen en la esporulación y germinación de esporas. Lo que explica los resultados obtenidos en este estudio para el factor zona por leguminosas forrajeras, en relación al número de esporas (10 g de suelo seco) (Figuras 16 y 17).

3.3. Caracterización de morfotipos de HMA nativos Predominantes

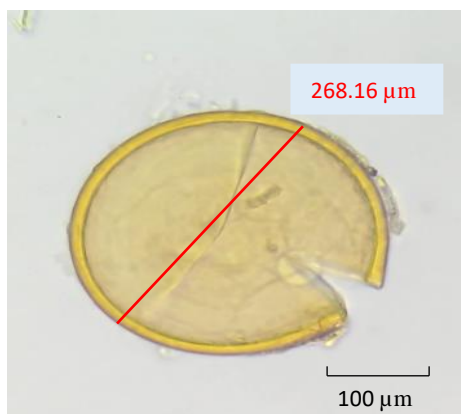
Tabla 9

Caracterización de morfotipos nativos predominantes de las diez zonas de la zona de Cuñumbuque y las dos leguminosas forrajeras.

CÓDIGO Y MORFOTIPO

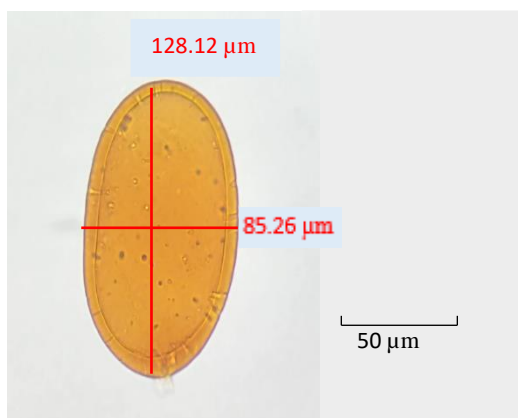
CARACTERÍSTICAS

M1



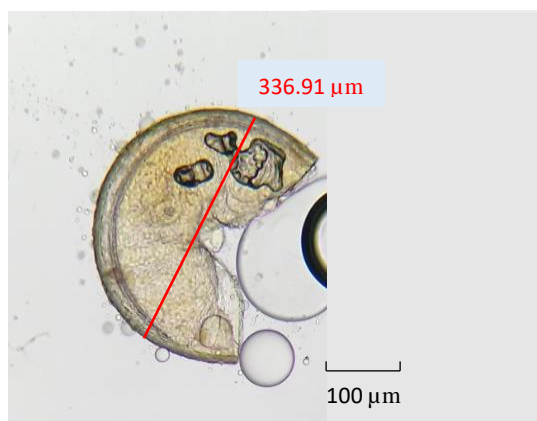
Número de esporas: 256
 Color: Amarillo crema
 Forma: Globosa
 Diámetro: 268.16 μm
 Número de capas: 3
 Ornamentación: No
 Cicatriz: No
 Hifa de suspensión: No
 Placa germinativa: No
 Reacción en melzer: No
 Género: *Claroideoglomus*
 Especie: *Claroideoglomus claroideum 1**

M2



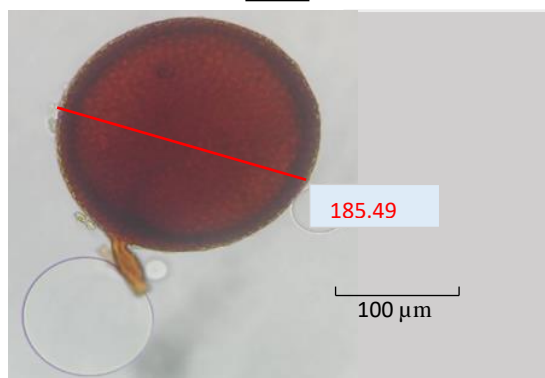
Número de esporas: 112
 Color: Anaranjado
 Forma: Elíptica
 Diámetro mayor: 128.12 μm
 Diámetro menor: 85.26 μm
 Número de capas: 3
 Ornamentación: No
 Cicatriz: No
 Hifa de suspensión: Si
 Placa germinativa: No
 Reacción en melzer: Si
 Género: *Claroideoglomus*
 Especie: *Claroideoglomus claroideum 2**

M3

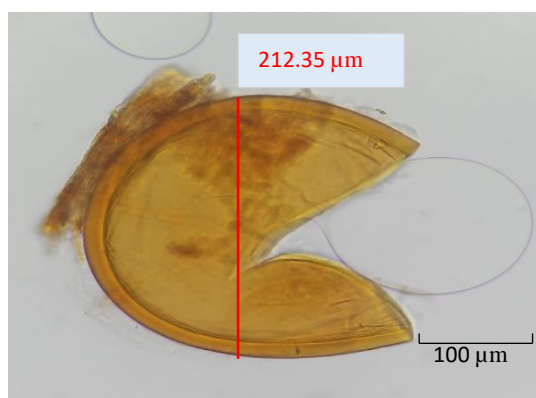


Número de esporas: 57
 Color: Amarillo a crema
 Forma: Globosa
 Diámetro: 336.91 μm
 Número de capas: 3
 Ornamentación: Si
 Cicatriz: No
 Hifa de suspensión: Si
 Placa germinativa: No
 Reacción en melzer: Si
 Género: *Ambispora*
 Especie: *Ambispora appendicola**

*Goto y Blaszkowski, (2018). Laboratorio de Biología de Micorrizas- Natal, RN-Brazil

CÓDIGO Y MORFOTIPO
CARACTERÍSTICAS
M4

Número de esporas: 45
 Color: Amarillo Marrón rojizo
 Forma: Esférica
 Diámetro: 185.49 μm
 Número de capas: 03
 Ornamentación: Si
 Cicatriz: No
 Hifa de suspensión: Si
 Placa germinativa: No
 Reacción en melzer: No
 Género: *Septoglo mus*
 Especie: *Septoglo mus sp **

M5

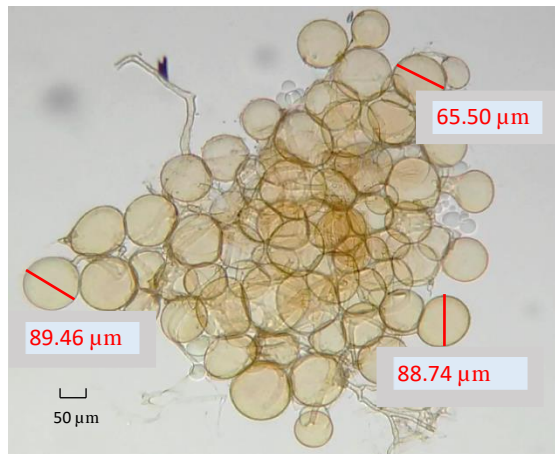
Número de esporas: 37
 Color: Anaranjado
 Forma: Globosa
 Diámetro mayor: 212.35 μm
 Número de capas: 3
 Ornamentación: No
 Cicatriz: No
 Hifa de suspensión: No
 Placa germinativa: No
 Reacción en melzer: Si
 Género: *Glomus*
 Especie: *Glomus spinuliferum*

M6

Número de esporas: 24
 Color: Marrón oscuro
 Forma: Esférica
 Diámetro: 196.69 μm
 Número de capas: 03
 Ornamentación: No
 Cicatriz: No
 Hifa de suspensión: Si
 Placa germinativa: No
 Reacción en melzer: No
 Género: *Septoglo mus*
 Especie: *Septoglo mus constrictum**

*Goto y Blaszkowski, (2018). Laboratorio de Biología de Micorrizas- Natal, RN-Brazil

CÓDIGO Y MORFOTIPO**CARACTERÍSTICAS**

M7

Número de esporas: Agrupados

Color: Amarillo claro

Forma: Globosa agrupado

Diámetro: 50 – 150 μm

Número de capas: 2

Ornamentación: No

Cicatriz: No

Hifa de suspensión: Si

Placa germinativa: No

Reacción en melzer: No

Género: *Rhizoglosum*Especie: *Rhizoglosum sp**

*Goto y Blaszkowski, (2018). Laboratorio de Biología de Micorrizas- Natal, RN-Brazil

Tabla 10

Distribución de los morfotipos según zona y leguminosa forrajera.

ZONAS DE LA ZONA DE CUÑUMBUQUE	LEGUMINOSAS FORRAJERAS	Morfotipos nativos predominantes de HMA						
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Carañayacu-B	<i>Centrosema macrocarpum</i>							
	<i>Leucaena leucocephala</i>	131						
Estero-A	<i>Centrosema macrocarpum</i>					16		
	<i>Leucaena leucocephala</i>							
Estero-B	<i>Centrosema macrocarpum</i>							
	<i>Leucaena leucocephala</i>							agrupados
Cercado-A	<i>Centrosema macrocarpum</i>							
	<i>Leucaena leucocephala</i>	40				21		
Cercado-B	<i>Centrosema macrocarpum</i>							
	<i>Leucaena leucocephala</i>							agrupados
Bosalao-A	<i>Centrosema macrocarpum</i>	56	87				12	
	<i>Leucaena leucocephala</i>							
Bosalao-B	<i>Centrosema macrocarpum</i>		25	57	16			
	<i>Leucaena leucocephala</i>							
Chacrilla	<i>Centrosema macrocarpum</i>	29			29			
	<i>Leucaena leucocephala</i>							
Difuntillo	<i>Centrosema macrocarpum</i>						12	
	<i>Leucaena leucocephala</i>							
		256	112	57	45	37	24	agrupados

Fuente: Realización propia

Tabla 11

Ubicación taxonómica de los HMA-N encontrados según las diez zonas de muestreo y las dos leguminosas forrajeras

ZONAS	LEGUMINOSAS FORRAJERAS	ORDEN	FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE
Carañayacu-B	<i>Centrosema macrocarpum</i>				
	<i>Leucaena leucocephala</i>	Glomerales	Entrophosporaceae	<i>Claroideoglomus</i>	<i>claroideum 1</i>
Estero-A	<i>Centrosema macrocarpum</i>	Glomerales	Glomeraceae	<i>Glomus</i>	<i>spinuliferum</i>
	<i>Leucaena leucocephala</i>				
Estero-B	<i>Centrosema macrocarpum</i>				
	<i>Leucaena leucocephala</i>	Glomerales	Glomeraceae	<i>Rhizoglomus</i>	<i>sp.</i>
Cercado-A	<i>Centrosema macrocarpum</i>				
	<i>Leucaena leucocephala</i>	Glomerales	Entrophosporaceae Glomeraceae	<i>Claroideoglomus</i> <i>Glomus</i>	<i>claroideum 1</i> <i>spinuliferum</i>

Fuente: Realización propia

Tabla 12

Ubicación taxonómica de los HMA-N encontrados según las diez zonas de muestreo y las dos leguminosas forrajeras (Continuación de la tabla 11)

ZONAS	LEGUMINOSAS FORRAJERAS	ORDEN	FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE
Cercado-B	<i>Centrosema macrocarpum</i>				
	<i>Leucaena leucocephala</i>	Glomerales	Glomeraceae	<i>Rhizoglosum</i>	<i>sp.</i>
Bosalao-A	<i>Centrosema macrocarpum</i>	Glomerales	Entrophosporaceae Glomeraceae	<i>Claroideoglosum</i> <i>Septoglosum</i>	<i>claroideum 1 y 2</i> <i>constitium</i>
	<i>Leucaena leucocephala</i>				
Bosalao-B	<i>Centrosema macrocarpum</i>	Glomerales Archaeosporales Glomerales	Entrophosporaceae Ambisporaceae Glomeraceae	<i>Claroideoglosum</i> <i>Ambispora</i> <i>Septoglosum</i>	<i>claroideum 2</i> <i>appendicola</i> <i>sp. **</i>
	<i>Leucaena leucocephala</i>				
Chacrilla	<i>Centrosema macrocarpum</i>	Glomerales	Entrophosporaceae Glomeraceae	<i>Claroideoglosum</i> <i>Septoglosum</i>	<i>claroideum 1</i> <i>sp. **</i>
	<i>Leucaena leucocephala</i>				
Difuntillo	<i>Centrosema macrocarpum</i>	Glomerales	Glomeraceae	<i>Septoglosum</i>	<i>constitium</i>
	<i>Leucaena leucocephala</i>				

** Puede ser *Multiforum sp.*; Fuente: Realización propia.

Según las características morfológicas observadas en las esporas de HMA y corridas en las claves de identificación se logró la caracterización de 7 morfotipos e identificación de 7 especies de HMA-Nativo pertenecientes a 5 géneros, tres familias y dos órdenes. Entre los géneros tenemos *Claroideoglomus* (2 especies), *Ambispora* (1 especie), *Septoglomus* (2 especies), *Rhizoglomus* (1 especie) y *Glomus* (1 especie), siendo el orden Glomerales el más frecuente, a su vez el género más representativo *Claroideoglomus* con 256 individuos respectivamente (Tabla 10). Dichos resultados en nuestro estudio, según Becerra *et al.*, (2014), mencionan que puede deberse a los factores edáficos y los cambios climáticos, las esporas y las actividades de los hongos HMA pueden no distribuirse por igual en diferentes suelos y que, además, la densidad de las esporas de HMA generalmente varía significativamente con la estación y la etapa de crecimiento del cultivo hospedante.

Esto parece razonable ya que *Claroideoglomus*, se ha encontrado con frecuencia como dominante entre algunas zonas y las dos leguminosas forrajeras de este estudio (Tablas 11 y 12). Lo que concuerda con Melo *et al.*, (2014), quienes reportaron que, en pastos intensivos, el género *Claroideoglomus* se encontró con mayor frecuencia y abundancia, además mencionan que las densidades de esporas de las agrupaciones más comúnmente encontradas de *Claroideoglomus*, se correlacionaron con las propiedades químicas del suelo, lo que sugiere que las características del suelo influyen en las comunidades de HMA, y que la intensidad del manejo de los pastos puede no influir en la riqueza de HMA, pero es probable que sea un factor importante que influya en su composición y abundancia.

Por otra parte, los mismos autores reportaron la presencia del género *Ambispora* en pastos semi-naturales, mientras que el suelo intensivo de pastos estaba dominado por *Claroideoglomus* y especies de *Glomus*. Lo que explica la identificación de estos géneros en nuestro estudio. Mientras que, en estudios anteriores, Becerra *et al.*, (2014), encontraron *Septoglomus* en tierras de cultivo con rotaciones de cultivos más amplias y en pastizales, sobre todo en suelos de pH del suelo (> 6.0), por lo que ahora concluimos que *Septoglomus* es un género que se encuentra en suelos de pastizales con mayor pH.

Así mismo, el morfotipo M1 perteneciente al género *Claroideoglomus* presentó la mayor abundancia de esporas con 256 individuos, seguido el morfotipo M2 con un total de 112 individuos encontrados en las zonas de Bosalao-A y Bosalao-B, M3 con un total de 57 individuos pertenecientes al género *Ambispora* y el morfotipo M4 con un total de 45 individuos pertenecientes al género *Septoglomus*. El morfotipo M5 perteneciente al género

Glomus se encontró solo en las zonas de Estero-A y Cercado-A, asociadas a las leguminosas *Centrosema macrocarpum* y *Leucaena leucocephala*. El morfotipo M6 perteneciente al también al género *Septoglomus* se encontró su predominancia en dos zonas y asociada a una leguminosa forrajera *Centrosema macrocarpum* con un total de 24 esporas respectivamente. Así también el morfotipo M7 perteneciente al género de *Rhizoglomus* fue el género de menor distribución y predominancia, asociada a *Leucaena leucocephala* respectivamente (Tabla 10).

Dichas diferencias en la composición de las especies podrían relacionarse con diferencias en las unidades de propagación entre las familias glomeromycotan, algunos miembros de Glomeraceae pueden tener un micelio extra-radical altamente infeccioso que puede colonizar directamente las raíces (Hart y Reader 2002), mencionan que algunos géneros como el género *Rhizoglomus* se autoanastomizan, por lo que puede restablecer una red interconectada después de una alteración mecánica, por lo que las especies de la familia Glomeraceae son las más comúnmente observadas en hábitats estresantes, por lo cual autores como (Jefwa *et al.*, 2009), mencionan que algunos miembros de Glomeraceae responden al estrés produciendo más esporas, lo que les permite persistir y dominar los paisajes perturbados durante más tiempo. Lo que respalda la ubicación taxonómica según las diez zonas de muestreo y las dos leguminosas forrajeras de este estudio (Tablas 10, 11 y 12).

Como se ha podido demostrar en este estudio los HMA son un componente común e importante en estas zonas de pasturas y su impresionante adaptación de éstos simbioses a estas zonas, merece una gran atención, en especial aquellos que buscan métodos para la recuperación de fertilidad de los suelos. El empleo de los HMA nativos es de suma importancia para mejorar el desarrollo y disponibilidad de Fósforo (P) para los posteriores cultivos agrícolas. Estos morfotipos caracterizados permitirían que los HMA-nativos de estas zonas de pasturas pudieran ser utilizados como inoculantes potenciales para usarse en el establecimiento de leguminosas forrajeras en los procesos de mejoramientos de pasturas, lo cual es una de los proyectos a futuro que se llevarán después de este estudio.

CONCLUSIONES

La colonización micorrizica fue influenciada por los tratamientos. Dentro de la interacción las zonas Estero-B, Difuntillo, Bosalao-A y Cercado-B, presentaron mayor colonización micorrizica con las especies forrajeras *Centrosema macrocarpum* y *Leucaena leucocephala*, donde la más representativa fue la leguminosa forrajera *Centrosema macrocarpum*. Siendo principalmente las zonas más influyentes sobre las leguminosas forrajeras.

En el número de esporas se observó diferencias significativas entre los tratamientos, siendo Difuntillo la zona más representativa con mayor número de esporas asociado con *centrosema macrocarpum*, influenciando más las leguminosas forrajeras sobre las zonas.

Dentro de los morfotipos predominantes se caracterizaron 07 morfotipos e identificaron 07 especies de HMA nativos, correspondientes a los géneros *Claroideoglomus*, *Ambispora*, *Septoglomus*, *Rhizoglomus* y *Glomus*, siendo el género *Claroideoglomus* el más representativo en los suelos de pastura de la zona de Cuñumbuque.

RECOMENDACIONES

Continuar con el estudio de la presencia de los Hongos micorrízicos arbusculares a nivel de especie en un rango más amplio de especies de leguminosas forrajeras, en suelos de pasturas, para enriquecer las identificaciones y caracterizaciones taxonómicas de HMA.

Las leguminosas forrajeras evaluadas en condiciones de suelo nativo de pasturas, mostraron gran eficiencia micorrízica, por lo que se requiere proteger la diversidad de estos simbioses, para contribuir con la fertilidad de nuestros suelos, juntamente con un buen manejo de las pasturas.

Realizar los muestreos de suelos en diferentes épocas del año, y realizar un análisis microbiológico de las muestras de colecta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd-Alla, M. H., El-Enany, A. W. E., Nafady, N. A., Khalaf, D. M., and Morsy, F. M. (2014). Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers in alkaline soil. *Microbiological research*, 169(1), 49-58.
- Aguirre, F. A., Velazco, M. E., Aguirre, J. F. (2015). Crecimiento de *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit inoculada con hongo micorrízico y bacteria fijadora de nitrógeno en vivero. *Quehacer Científico en Chiapas* vol. 10 (1)
- Alves D. J., Chapaval P. I., Signor, D., de Paula, A. M., Maceda, A., Mattana, A. L. (2016). *Guía Práctico de Biología do Solo*. Curitiba: SBCS/NEPAR. Pág.152
- Asner, G. P., Elmore, A. J., Olander, L. P., Martin, R. E., Harris, A. T., (2004). Grazing systems, ecosystem responses, and global change. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 29 (1), 261–299.
- Azcón, R., y Barea, J. M. (2010). Mycorrhizosphere interactions for legume improvement. In: M.S. Khan, A. Zaidi, J. Musarrat (eds). *Microbes for legume improvement*. Springer-Verlag, pp: 237-271.
- Barea, J. M., y Richardson, A. E. (2015). Phosphate mobilisation by soil microorganisms. In: B. Lugtenberg (ed). *Principles of Plant-Microbe Interactions*. Springer, pp: 225-234
- Barrios, L. LL. (2017). Selección de morfotipos de hongos Micorrízicos arbusculares nativos predominantes de suelos degradados asociados a plantas de cobertura de la sub cuenca del Cumbaza. Tesis para la obtención del título de Ingeniería en Agronomía. Universidad Nacional de San Martín. Facultad de Ciencias Agrarias, San Martín, 37 p.
- Bashan, Y., Khaosaad, T., Salazar, B. G., Ocampo, J. A., Wiemken, A., Oehl, F., Vierheilig, H., (2007). Mycorrhizal characterization of the boojum tree, *Fouquieria columnaris*, an endemic ancient tree from the Baja California Peninsula, Mexico. *Trees* 21, 329e335.
- Becerra, A., Bartoloni, N., Cofré, N., Soteras, F., and Cabello, M. (2014). Arbuscular mycorrhizal fungi in saline soils: Vertical distribution at different soil depth. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 585-594.

- Bhadalung, N. N., Suwanarit, A., Dell, B., Nopamornbodi, O., Thamchaipenet, A., and Rungchuang, J. (2005). Effects of long-term NP-fertilization on abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and soil*, 270(1), 371-382.
- Błaszowski, J., Kozłowska, A., Crossay, T., Symanczik, S., y Al-Yahya'ei, M. N. (2017). A new family, Pervetustaceae with a new genus, Pervetustus, and *P. simplex* sp. nov. (Paraglomerales), and a new genus, Innospora with *I. majewskii* comb. Nov. (Paraglomeraceae) in the Glomeromycotina. *Nova Hedwigia*. Doi: 10.1127/nova_hedwigia/2017/0419
- Bossa, J. R; Adams, J. F; Shannon, D. A., y Mullins, G. L. (2005). Patrón de liberación de fósforo y potasio de hojas de leucaena en tres ambientes de Haití. *Nutr. Cycl. Agroecosys.* 73: 25-35.
- Brundrett, M. C., Abbott, L. K., Jasper, D. A. (1999). Glomalean mycorrhizal fungi from tropical Australia. *Mycorrhiza* 8, 305-314.
- Bueno, LL., y Camargo, G. J. (2015). Nitrógeno edáfico y nodulación de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit en sistemas silvopastoriles. *Acta Agronómica* 64(4):349-354.
- Butler, T. J., y Muir, J. P. (2010). Dairy manure compost improves soil and increases tall wheatgrass yield. *Agronomy Journal*, vol. 98, p. 1090-1096.
- Cañizares, J. G., Pedroso, F. R., Espinosa, R. R., Jiménez, A. H., y Flores, G. C. (2016). Eficacia de la inoculación de dos leguminosas forrajeras cultivadas en dos tipos de suelo con hongos micorrízicos arbusculares. *Forrajes Tropicales*, 4(2), 82-90.
- Carneiro, F. V; Martins, M. A; Araújo, S. F; Nunes, P. L. (2013). Inoculação micorrízica arbuscular e adubação fosfatada no cultivo de forrageiras consorciadas. *Archivos de Zootecnia* 60:1191–1202.
- Caruso, T., Hempel, S., Powell, J. R., Barto, E. K., Rillig, M. C., (2012). Compositional divergence and convergence in arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Ecology* 93, 1115e1124.
- Carvalho, F., Souza, F. A., Carrenho, R., Moreira, F. M. S., Jesus, E. C., Fernandes, G. W., (2012). The mosaic of habitats in the high-altitude Brazilian rupestrian fields is an hotspot for arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Soil Ecol.* 52, 9e19.
- Castillo, C. G; Fredericksen, C; Koch, R; Sieverding, E. (2014). Effect of seed treatment with natural products on early arbuscular mycorrhizal colonization of wheat by *Claroideo- glomus claroideum*. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 87:117–123.

- Cavagnaro, R. A., Oyarzabal, M., Oesterheld, M., Grimoldi, A. A. (2014). Screening of biomass production of cultivated forage grasses in response to mycorrhizal symbiosis under nutritional deficit conditions. *Grassland Science*, 60 (3): 178–184, ISSN: 17446961, DOI: 10.1111/grs.12057.
- Cavallini, M. C. (2009). Correlação entre a produtividade e teor de proteína bruta do capim-Marandu com atributos físicos y químicos de um Latossolo do Cerrado Brasileiro. Tesis para la obtención del título de Maestro en Agronomía. Universidade Estadual Paulista. Facultad de Ingeniería de Ilha Solteira, São Paulo, 124 p.
- Corbera, J.; y Nápoles, C. (2011). Evaluación de la inoculación conjunta *Bradyrhizobium japonicum* - hongos MA y la aplicación de un bioestimulador del crecimiento vegetal en soya, cultivada en época de primavera. *Cultivos Tropicales*. 32 (4):13-19.
- Courty, P. E., Smith, P., Koegel, S., Redecker, D., Wipf, (2015). Inorganic nitrogen uptake and transport in beneficial plant root-microbe interactions. *Crit. Rev. Plant Sci.* 34, 4-16
- Chicowo, R.; Mapfumo, P.; Leffelaar, P. A. and Giller, K. E. (2006). Integrating legumes to improve N cycling on smallholder farms in sub-humid Zimbabwe: resource quality, biophysical and environmental limitations. *Nutr. Cycl. Agroecosys.* 76:219-231.
- Chen, X. J, Lin, Q. M, Zhao, X. R, Chen, H., Wen, J., Li, y., y Li, G. T., (2018). La exclusión del pastoreo a largo plazo influye en los hongos micorrízicos arbusculares y su asociación con la vegetación en la estepa típica de Mongolia Interior. *Revista de Agricultura Integrativa*, 17 (6), 1445-1453.
- Dalhatu, S., J. Garba. (2012). Soil Resources Degradation and Conservation Techniques Adopted Among the Small Holder Farmers in Gusau, North-Western Nigeria. *Nigerian Journal of Basic and Applied Science* 20(2): 134-14p.
- Drasam.gob.pe [Internet]. Perú: Dirección Regional de Agricultura San Martín; 2017 [actualizado 15 de Jul 2017; citado 21 de ene 2018]. Disponible en: <http://www.drasam.gob.pe/vista/web/docs/diagnostico%20cadena%20ganaderia.pdf>
- Driver, J; Holben, W and Rillig, M. (2005). Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *SoilBiol. Biochem.* 37: 101-106
- Egerton-Warburton, L. M., Johnson, N. C., Allen, E. B., (2007). Mycorrhizal community dynamics following nitrogen fertilization: a cross-site test in five grasslands. *Ecological Monographs* 77, 527e544.

- Ellouze, W., Taheri, A., Bainard, E., Yang, C., Bazglaleh, N., Navarro, A., Hanson, K., y Hamel, C. (2014). Soil fungal resources in annual cropping systems and their potential for management. *BioMed Reserch International*. Pp: 15
- Fao.org [Internet]. Perú: Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura; (2015). [Actualizado 2015; citado 2 de feb 2017]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i4646e.pdf>
- Ferrero, R., y Alarcón, A. (2001). La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sun*. 8 (2):175
- Flores, M. D. R., Aguilar, S., García, C. R., Zamora, A., Farias, L. J., y López, A. J. G. (2008). Inoculación con hongos micorrícicos arbusculares y el crecimiento de plántulas de *Leucaena*. *Terra Latinoamericana*, 26(2), 127-131.
- Flores, G. C., Ramírez, J. F., González, P. J., y Hernández, I. (2014). Coinoculación de cepas de rizobios y del hongo micorrízico arbuscular en *Stylosanthes guianensis* vc. CIAT-184
- Fogel, R. y Hunt, G. (1979). 'Fungal and arboreal biomass in a Western Oregon Douglas-fir ecosystem: Distribution pattern and turnover', *Canadian Journal of Forest Research*, vol. 9, pp. 245–256.
- García, I.; Quemada, M.; Gabriel, J. L. and Hontoria, C. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungal activity responses to winter cover crops in a sunflower and maize cropping system. *Applied Soil Ecology*, 102, 10-18.
- Gerdemann, J. W., and Nicolson, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological society*, 46(2), 235-244.
- Gianinazzi, P. V., Van, T. D., Wipf, D.G., Recorbet, G., Lyu, y Doidy, J., Redecker, D., Ferrol, N. (2012). Exploring the genome of Glomeromycotan fungi. In: B. Hock (ed). *The Mycota, a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research*. Springer, pp: 1-21.
- Giovannetti, M., y Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New phytologist*, 84(3), 489-500.
- González, M. A., Vicente, F., Delgado, B., Soldado, A., Modroño, S., González, C. y Martínez, A. (2014). Evaluación de rotaciones de cultivos adaptadas a zonas templadas húmedas y obtenidas en condiciones de manejo sostenible destinadas al vacuno lechero. En: Busqué M. et al. (Eds). *Pastos y PAC 2014-2020*, 311-318. Potes (Cantabria), España: SEEP.

- Goto, B. T., y Blaszkowski, J., (2018). Laboratorio de Biología de Micorrizas. Universidad Federal de Río Grande del Norte. [Actualizado 31 de Mar 2018; citado 3 de abr 2018]. Disponible en: <http://glomeromycota.wixsite.com/lbmicorrizas>.
- Hart, M. M y Reader, R. J. (2002). Beneficio de la planta huésped de la asociación con hongos micorrízicos arbusculares: variación debido a las diferencias en el tamaño del micelio. *Biology and Fertility of Soils*, 36 (5), 357-366.
- Hartnett, D. C., y Wilson, W. T. (2002). The role of mycorrhizas in plant community structure and dynamics: lessons from grasslands. *Plant and Soil*, 244: 319–331.
- Inocencio, J. P. (2016). Micorrizas: una realidad para la producción agrícola. *Revista Innovación Agrícola*, vol. 1(2).
- Isbell, R. F. Suelos de los trópicos y subtropicos: Génesis y características. En Taller sobre Nutrición Mineral de Leguminosas en Suelos Tropicales y Subtropicales. Brisbane. [Internet].1978 [citado 18 de feb 2017]. Disponible en: <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/56073>
- Janns Beltrán, L. H., León, E., Bonifaz, N. Evaluación de la actividad microbiana en el suelo en respuesta a la aplicación de abono compost y su efecto en la producción en pastos [Internet].2010 [citado 14 de Feb 2017]; pp.23. Disponible en: LH Janns Beltrán, E León, N Bonifaz - infortamboandina.com.
- Jefwa, J. M, Mung'atu, J., Okoth, P., Muya, E., Roimen, H., y Njuguini, S. (2009). Influencia de los tipos de uso de la tierra sobre la presencia de hongos micorrízicos arbusculares en las regiones de gran altitud del monte. Kenia. *Agroecosistemas tropicales y subtropicales*, 11 (2).
- Johnson, N. C. (2015). Uncoupling the effects of phosphorus and precipitation on arbuscular mycorrhizas in the Serengeti. *Plant and Soil*, 388, 21–34.
- Johnson, N. C., Rowland, D. L., Corkidi, L., Egerton-Warburton, L. M, Allen, E. B. (2003). Nitrogen enrichment alters mycorrhizal allocation at five mesic to semiarid grasslands. *Ecology*, 84, 1895–1908.
- Jones, R. R. Efecto del clima, el suelo y el manejo del pastoreo en la producción y persistencia del germoplasma forrajero tropical. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali. [Internet]. 1983. [citado 18 de feb 2017]; pp:11-31. Disponible en: http://ciat-library.cgiar.org/articulos_ciat/Digital/63853_Caracterizaci%C3%B3n_%20de_%20la_%20accesi%C3%B3n_%20Centrosema_%20sp._%20nov._%20CIAT_%205277_%20en_%20un%20oxisol_%20de_lo.pdf

- Kennedy, A. C. (2005). Rhizosphere. In: M. D. Sylvia, J. J. Fuhrmann, G. P. Harte, A. D. Zuberer (Eds.), *Principles and Applications of Soil Microbiology* (pp. 242-262). 2nd Edition. New Jersey, USA. Pearson Prentice-Hall
- Koske, R. E y Tessier, B. (1983). A convenient permanent slide mounting medium. *Mycological Society of America Newsletter*, 34:59 p.
- Lamela, L.; Soto, R. B.; Sánchez, Tania; Ojeda, F. Montejó, I. (2010). Producción de leche de una asociación de *Leucaena leucocephala*, *Morus alba* y *Pennisetum purpureum* CT-115 bajo condiciones de riego. *Pastos y Forrajes*. 33:311.
- Landis, F. C., Gargas, A., Givnish, T. J. (2005). The influence of arbuscular mycorrhizae and light on Wisconsin (USA) sand savanna understories: 1. Plant community composition. *Mycorrhiza*, 15: 547–553.
- Lauber, C. L. Strickland, M. S., Bradford, M. A., y Fierer, N. (2008). La influencia de las propiedades del suelo sobre la estructura de las comunidades bacterianas y fúngicas en los tipos de uso de la tierra. *Soil Biology and Biochemistry*, 40 (9), 2407 - 2415.
- Lazali, M., Brahimi, S., Merabet, C., Latati, M., Benadis, C., Maougal, R. T., Blavet, D., Drevon, J. J., Ounane, S. M. (2016). Nodular diagnosis of contrasting recombinant inbred lines of *Phaseolus vulgaris* in multi-local field tests under Mediterranean climate. *Eur J Soil Biol* 73:100–107
- Lis, A. M, Alberto, B. C, Noemí, C. M, Silvana, V. M, Alejandra, T. Y, Soledad, I. L, y Rosana, P. I., (2018). Colonización total y estructural por hongos micorrízicos arbusculares en gramíneas nativas perennes de diferente calidad de forraje expuestas a la defoliación. *Revista de King Saud University-Science*.
- Lok, M. S. (2015). Los suelos dedicados a la ganadería en Cuba: Características, manejo, oportunidades y retos. En *Memorias, V Congreso Producción Animal Tropical*. 16-20[Internet]; 2015 [actualizado mayo 2016; citado 20 de ene del 2017]. Disponible en:
http://www.cubadiplomatica.cu/Portals/143/5to%20Congreso%20%20de%20Producci%C3%B3n%20Animal%20Tropical%202015_actualizadomayo_.pdf
- Lozano, Z., Romero, H., y Bravo, C. (2010). Influencia de los cultivos de cobertura y el pastoreo sobre las propiedades físicas de un suelo de sabana. *Agrociencia*, 44(2), 135-146.
- Medina, R. E. V.(2017). Biogeografía de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.) en la región San Martín, Perú. Tesis para la

- obtención del título de Ingeniería en Agronomía. Universidade Nacional de San Martín. Facultad de Ciencias Agrarias, San Martín, 17 p.
- Mahecha, L. (2009). El silvopastoreo: una alternativa de producción que disminuye el impacto ambiental de la ganadería bovina. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias (Colombian journal of animal science and veterinary medicine)*, 15(2), 226-231.
- Melo, C. D., Walker, C., Rodríguez-Echeverría, S., Borges, P. A., and Freitas, H. (2014). Species composition of arbuscular mycorrhizal fungi differ in semi-natural and intensively managed pastures in an isolated oceanic island (Terceira, Azores). *Symbiosis*, 64(2), 73-85.
- Minagri.gob.pe [Internet]. Perú: Minagri; 2017 [actualizado Jul 2017; citado 3 de feb 2018]. Disponible en: <http://www.minagri.gob.pe/portal/objetivos/43-sector-agrario/suelo/331-potencial-de-los-suelos>
- Miranda, J. C. C., Vilela, L., y de Miranda, L. N. (2005). Dinâmica e contribuição da micorriza arbuscular em sistemas de produção com rotação de culturas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40(10), 1005-1014.
- Molina, M., Mahecha, L., y Medina, M. (2005). Importancia del manejo de hongos micorrizógenos en el establecimiento de árboles en sistemas silvopastoriles. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 18: 162-175.
- Moreira, F. M., Coelho, K. P., Ribeiro, P. R., and Guimaraes, A. A. (2016). Nursery growth and rhizobia symbiosis of scandent Leguminosae species native to the Amazon region. *Acta Amazonica*, 46 (4), 367-376.
- Moreno, V., Ángela, L. Dinámica de crecimiento y criterios de pastoreo para optimizar el uso de praderas *Brachiaria brizantha* cv Toledo. [Internet].2015. [Citado 18 de feb 2017]; pp.252. Disponible en: http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/17717/89112202_2015.pdf?sequence=1
- Oehl, F., Laczko, E., Bogenrieder, A., Stahr, K., Bösch, R., van der Heijden, M., & Sieverding, E. (2010). Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 724-738.
- Oehl, F., Sieverding, E., Ineichen, K., Mäder, P., Boller, T., and Wiemken, A. (2003). Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in

- agroecosystems of Central Europe. *Applied and environmental microbiology*, 69(5), 2816-2824.
- Öpik, M; y Moora, M. (2012). Missing nodes and links in mycorrhizal networks. *New Phytologist* 194:304–306.
- Peeters, A., Parente, G. y Le, G. A. (2006). Temperate Legumes: key-species for sustainable temperate mixtures. *Grassl. Sci. Eur.*, 11, 205-219.
- Pellegrino, E; Bedini, S; Avio, L; Bonari, E; Giovannetti, M. (2011). Field inoculation effectiveness of native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi in a Mediterranean agricultural soil. *Soil Biology y Biochemistry* 43:367–376.
- Pérez, A. F., Cury, K. I., Oviedo, L. E. (2016). Colonización de micorrizas arbusculares en tres especies de pasturas del departamento de Sucre. *Revista Temas Agrarios Volumen* 21(2)
- Peters, M., Franco, T., Schmidt, A., y Hincapie, B. (2011). Especies forrajeras multipropósito: Opciones para productores del Trópico Americano. [Internet]. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT); [actualizado jun 2011; citado 3 de feb 2017] disponible en: http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Forrajes_Tropicales/pdf/Books/Especies%20Forrajeras%20MultipropositoTropico%20Americano.pdf
- Petit, A. J., y Sánchez, F. J. (2009). Especies de árboles forrajeros en asociación para mejorar la productividad y el ciclo de nutrientes. *Agricultura Técnica en México*, 35(1), 113-122.
- Raiesi, F., y Riahi, M., (2014). The influence of grazing enclosure on soil C stocks and dynamics, and ecological indicators in upland arid and semi-arid rangelands. *Ecol. Indic.* 41, 145 and 154
- Richardson, A. E., y Simpson, R. J. (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability: update on microbial phosphorus. *Plant Physiol* 156:989–996
- Richardson, A. E. (2011). Plantas y estrategias microbianas para mejorar la eficiencia del fósforo en la agricultura. *Planta y suelo*, vol. 349, no 1-2, p. 121-156.
- Rivera, R; González, P. J; Hernández, A; Martín, G; Ruiz, L; Fernández, K; Simón, J; García, M; Pérez, A; Riera, M; Bustamante, C; Joao, J. P; Ruiz, M. (2015). La importancia del ambiente edáfico y del pH sobre la efectividad y la recomendación de cepas eficientes de HMA para la inoculación de los cultivos. CONGRESO SUELOS 2015. 2–5 de junio de 2015. Comisión de Biología del Suelo y Biofertilizantes, La Habana, Cuba.

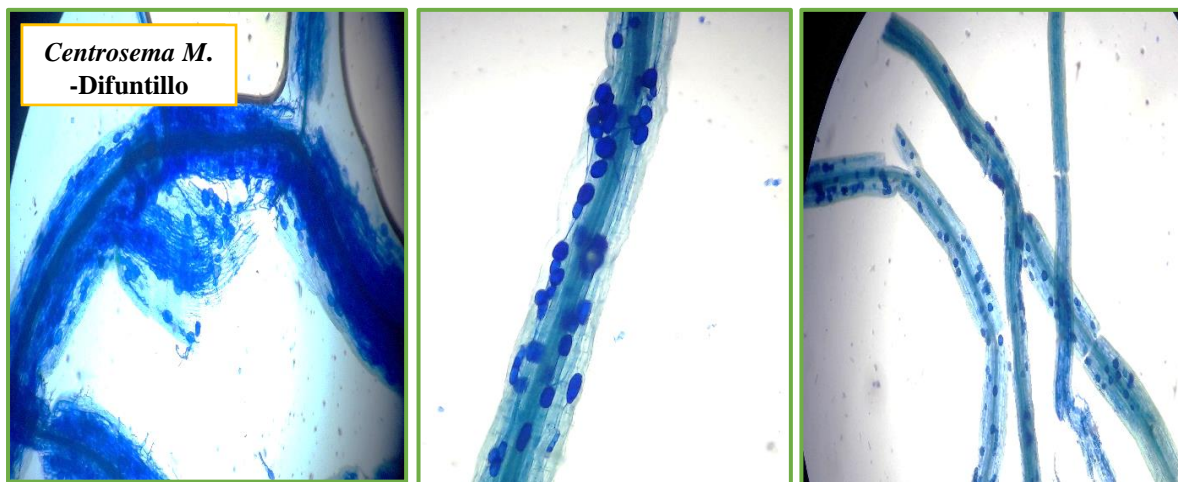
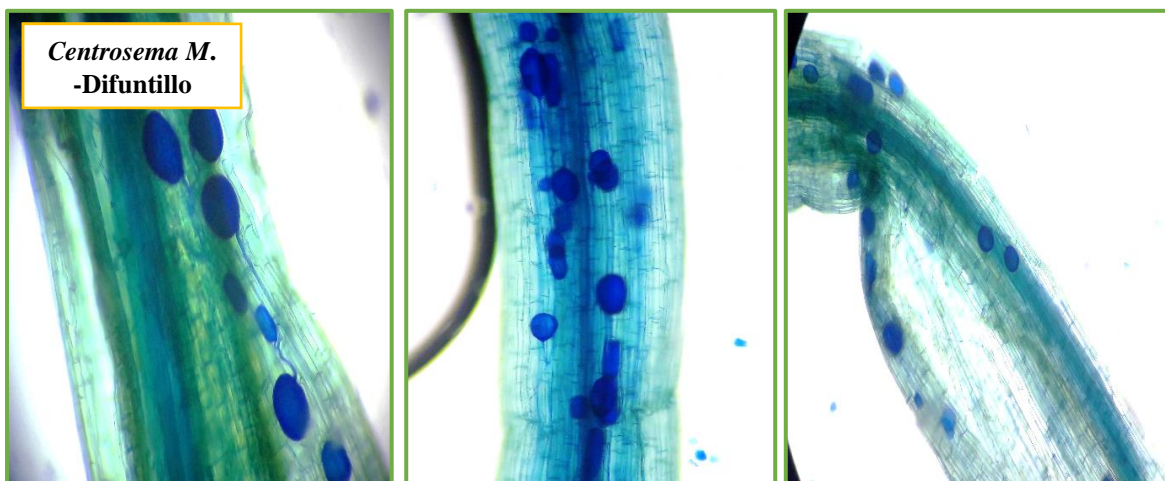
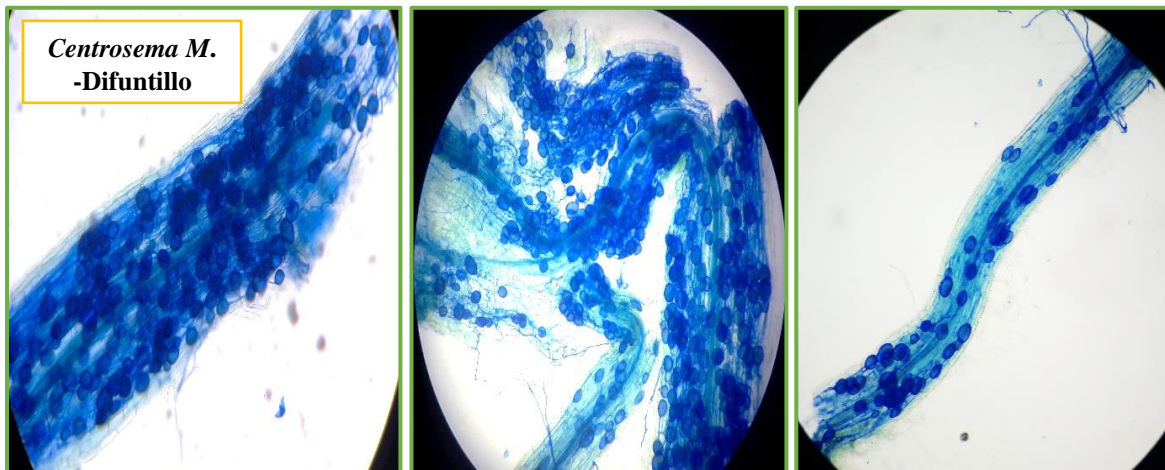
- Robles, M. D.; Robles, C.; Rivera, B. F., Ortega, L. M., y Pliego, M. L. (2013). Inoculación con consorcios nativos de hongos de micorriza arbuscular en *Agave angustifolia* Haw. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(SPE6), 1231-1240.
- Rodriguez, A., Sanders, I. R. (2015). The role of community and population ecology in applying mycorrhizal fungi for improved food security. *ISME J* 9:1053–1061
- Rodríguez, D. N., Buendía, A. M., Camacho, M., Lucas, M. M., Santamaría, C. (2000). Characterization of *Rhizobium* spp. Bean isolates from South West Spain. *Soil Biol. Biochem.* 32:1601-1613.
- Roth, R., & Paszkowski, U. (2017). Plant carbon nourishment of arbuscular mycorrhizal fungi. *Current opinion in plant biology*, 39, 50-56.
- Sánchez, P. A., y Tergas, F. (1979). Pasture production maced soils of the tropics. *Memorias de un seminario*, Colombia, abril, CIAT, pág 448.
- Sánchez, T. (2007). Caracterización de la comunidad vegetal en una asociación de gramíneas mejoradas y *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham. *Pastos y Forrajes*. Vol. 30.
- Schenck, N. C., y Pérez, (1990). *Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi* (Vol. 286). Gainesville: Synergistic Publications.
- Schindler, F; Mercer, E; Rice, J. (2007). Chemical characteristics of glomalin-related soil protein (GRSP) extracted from soils of varying organic matter content. *Soil Biol. Biochem.* 39: 320-329
- Schneider, J., Bundschuh, J., de Melo Rangel, W., & Guilherme, L. R. G. (2017). Potential of different AM fungi (native from As-contaminated and uncontaminated soils) for supporting *Leucaena leucocephala* growth in As-contaminated soil. *Environmental pollution*, 224, 125-135.
- Singh, J. S., Pandey, V. C. y Singh, D. P. (2011). Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 140, 339-353.
- Sivakumar, N. (2013). Effect of edaphic factors and seasonal variation on spore density and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi. *Annals of microbiology*, 63(1), 151-160.
- Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. – *Mycologia* 108: 1028–1046, doi: 10.3852/16-042

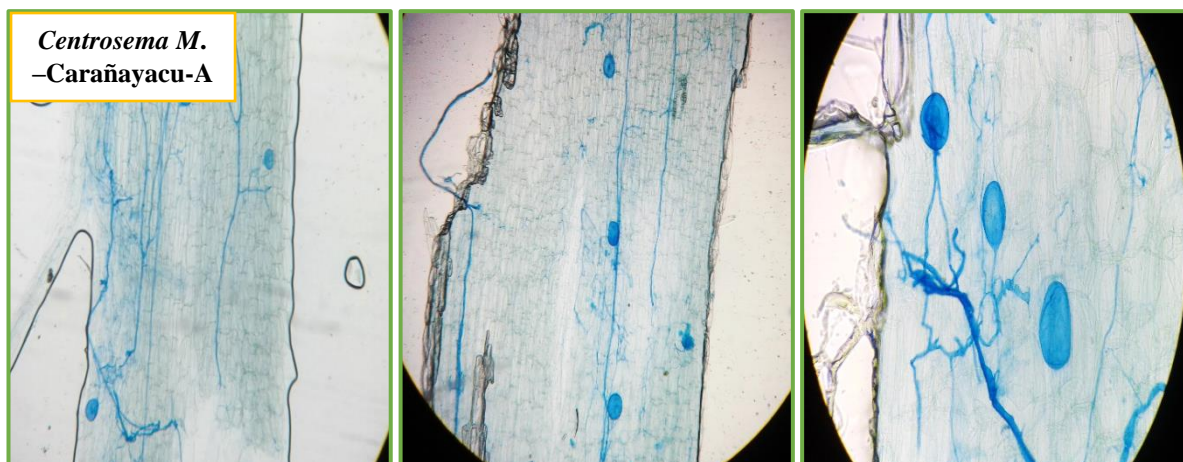
- Suárez, J. J. (1994). Banco proteico de leucaena forrajera. Asociación Cubana de Producción Animal 2: 28-33.
- Symanczik, S., Al-Yahya'ei, M. N., Kozłowska, A., Ryska, P., y Błaszowski, J. (2018). A new genus, *Desertispora*, and a new species, *Diversispora sabulosa*, in the family Diversisporaceae (order Diversisporales, subphylum Glomeromycotina). *Mycological Progress*. Doi: 10.1007/s11557-017-1369
- Troeh, Z. I, y Loynachan, T. E. (2009). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungal species in soils of cultivated soybean fields. *Agron J.*; 101:1453-62.
- Vierheilig, H., Coughlan, A. P, Wyss, U., y Piché, Y. (1998). La tinta y el vinagre, una técnica de tinción simple para los hongos micorrízicos arbusculares-. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (12), desde 5004 hasta 5007.
- Walker, C., Mike, C. W., McNabb, J. H. (1982). Populations of endogonaceous fungi at two locations in central Iowa. *Canadian Journal of Botany* 60, 2518-2529.
- Wencomo, H. B., y Ortíz, R. (2011). Capacidad de recuperación de 23 accesiones de *Leucaena* spp. Después de la poda. *Pastos y Forrajes*. 34:53.
- Yu L. X. (2017). Identificación de loci polimórficos de un solo nucleótido asociados con el rendimiento de la biomasa con déficit de agua en leguminosas mediante la secuenciación de genoma completo y el mapeo de asociación. *Frente. Planta sci.* 8: 1152. 10.3389 / fpls.2017.01152 [Artículo libre de PMC] [PubMed] [Referencia cruzada]

ANEXO

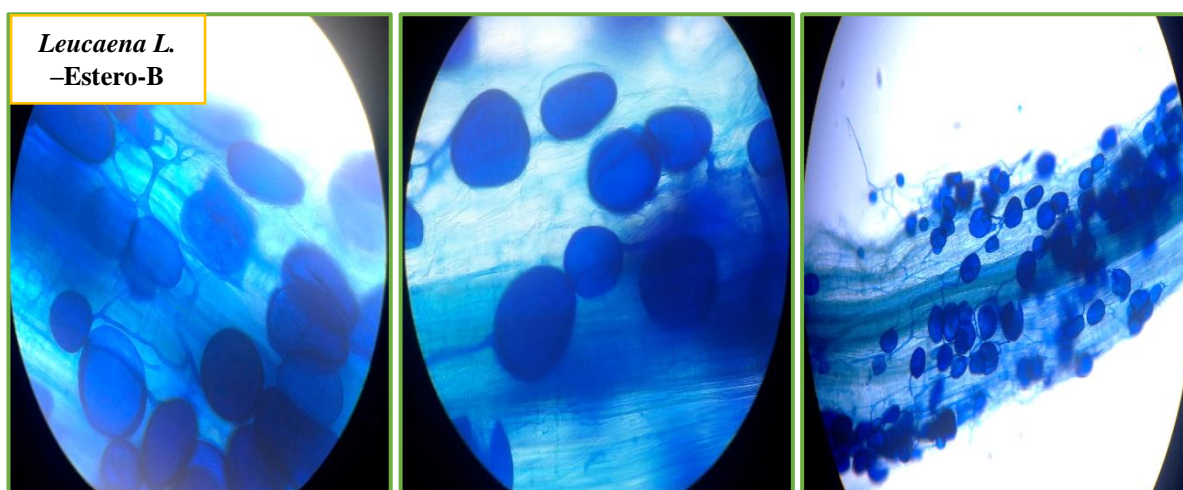
ANEXO 1. Raíces de leguminosas forrajeras colonizadas por HMA.

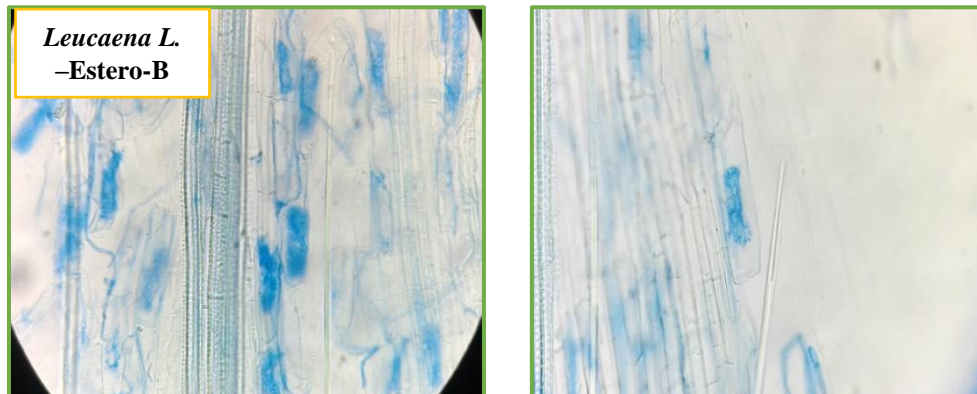
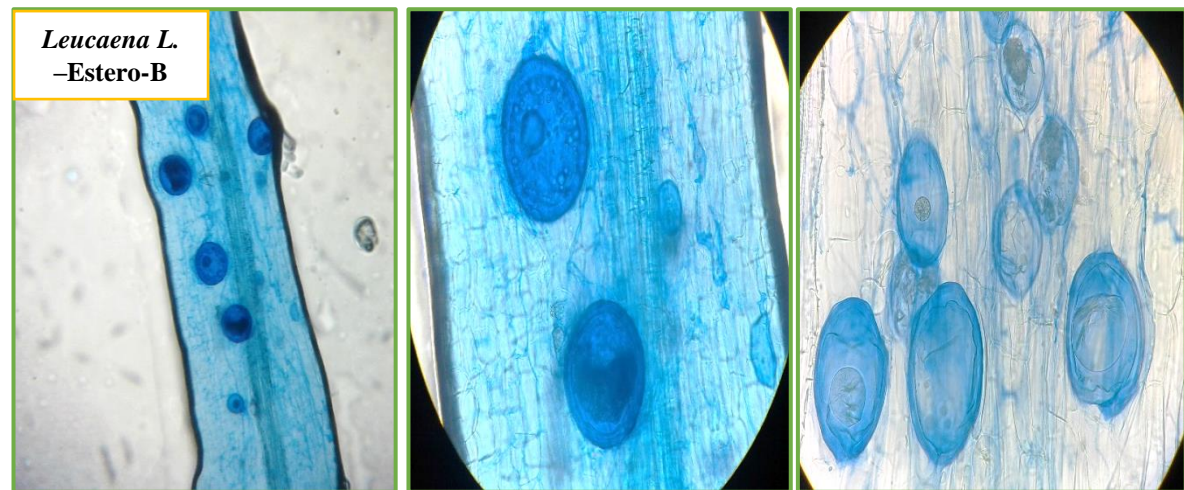
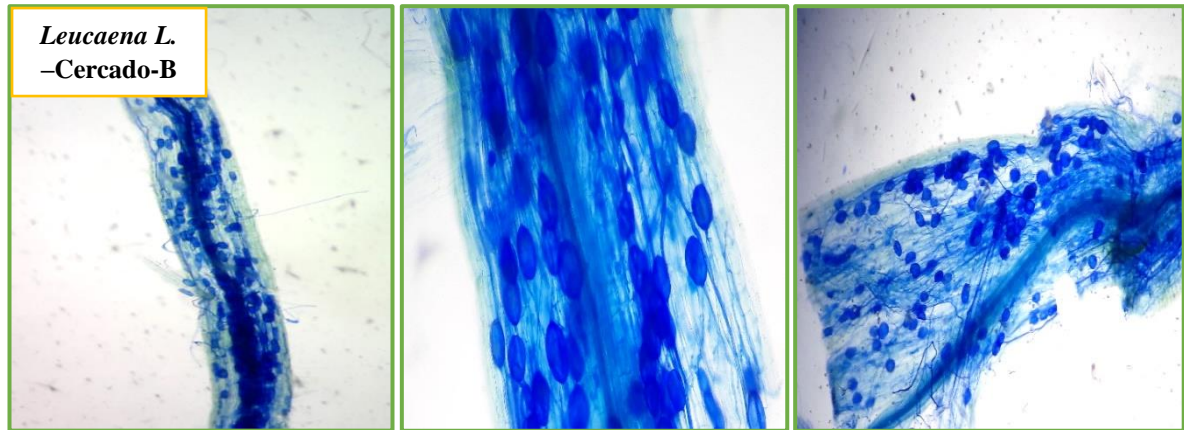
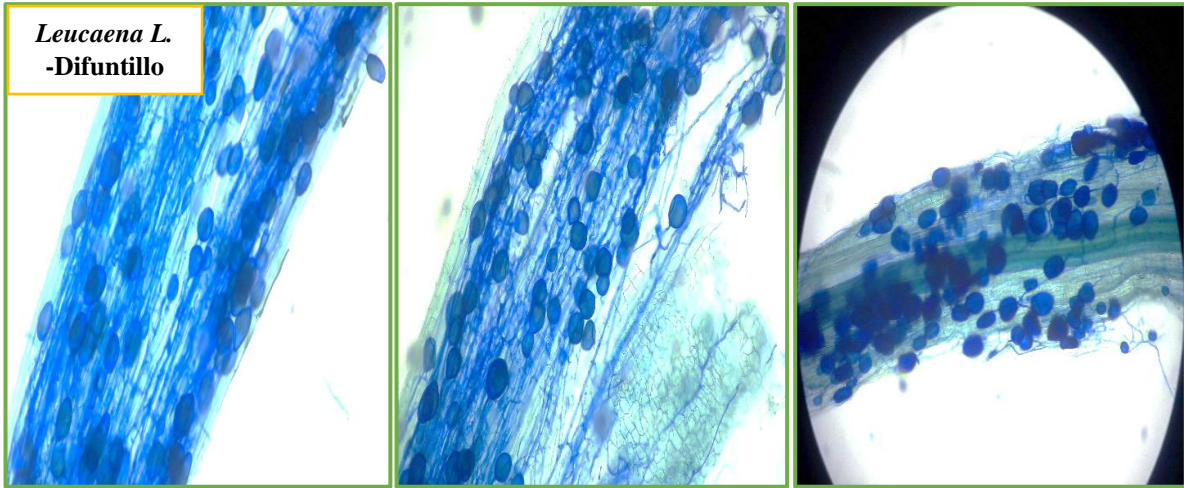
Raíces colonizadas de la leguminosa forrajera *Centrosema macrocarpum*.





Raíces colonizadas de la leguminosa forrajera *Leucaena leucocephala*





ANEXO 2. Condiciones de temperatura y humedad relativa en vivero de las leguminosas forrajeras.

Año	Mes	Temperatura Promedio	Temperatura Máxima	Temperatura Mínima	Humedad Relativa Promedio
2016	Julio	26,6	31,51	21,68	73,85
2016	Agosto	25,98	31,04	20,92	77,8
2016	Setiembre	25,33	30,82	19,85	70,01
2016	Octubre	27,23	33,42	21,03	74,23

Fuente: Proyecto Recuperación de pasturas degradadas empleando microorganismos benéficos y leguminosas asociadas con un sistema silvopastoril en la zona Cuñumbuque – San Martín – Perú. Abril - mayo 2016.

ANEXO 3. Protocolos para los análisis de muestras

Aislamiento de esporas

Método de tamizado húmedo y decantación (Gerdemann y Nicolson, 1963)

1. Pesar 10g de suelo y colocarlo en un vaso de precipitación de 100 ml, añadir 50 ml de agua, que se reemplazó en nuestro estudio por pirofosfato de sodio, porque se trabajó con suelos arcillosos en su mayoría, esto por 30 minutos después agitar con un bastón de vidrio hasta homogenizar la muestra.
2. Proceder a dispensar la solución en el juego de tamices, debidamente colocados de mayor a menor abertura de las mallas, 710 y 53 micras.
3. Con la ayuda de una pizeta con agua colocar el material retenido en el tamiz de 53 micras para los tubos falcón de centrifuga de 50 ml, debidamente identificados, completar el volumen hasta 20 ml y completar con sacarosa al 70% hasta 40 ml (relación 1:1) y centrifugar, por 5 minutos a 3500 RPM. Esta etapa se repetirá dos veces.
4. Dispensar el sobrenadante de cada tubo centrifugado en el tamiz de 53 micras, lavar el material para retirar el exceso de sacarosa y guardar las esporas en tubo falcón y almacenar a 4 °C para su conteo posterior.

Conteo de esporas

Método de conteo de esporas (Schenck y Perez 1990)

De cada muestra procesada por la técnica anterior, se tomará 2 ml de cada uno de ellas, estas se depositarán en una placa concéntrica rayada en cuadrículas 1m^2 para realizar y facilitar el conteo respectivo. Cada conteo se realizará tres veces para obtener un estimativo del número total de esporas /g de suelo. Las esporas se cuentan con la ayuda de un estereoscopio de aumento de 40 veces

Tinción de raíces

Método de clareo y coloración de raíces (Viertheiling *et al.*, 1998)

1. Cortar y seleccionar las raíces más finas.
2. Lavar las raíces con agua corriente y colocarlo en alcohol al 70%, hasta proceder con la tinción de raíces.
3. Colocar las raíces en tubos falcón de 50 ml y agregar solución de KOH al 10% (p/v) donde las raíces permanecerán inmersas por un tiempo 6 horas para clarearlas y eliminar la pigmentación. El tiempo depende de la pigmentación de las raíces.
4. Colocar los tubos falcón en rejillas y poner en baño maría por 30 min a 90 °C constante. El tiempo de calentamiento y de permanencia en KOH al 10% puede variar entre las especies de plantas, en función de las características de las raíces.
5. Añadir peróxido de hidrogeno 10 volúmenes dentro de los tubos falcón. No mantener por mucho tiempo ya que pueden dañar las raíces, mantener hasta un color amarillo palo.
6. Para la coloración las muestras deben estar inmersas en una solución conteniendo coloración de tinta de lapicero al 5%.
7. En seguida, para teñir las raíces colocar en baño maría por 1 min a 90 °C
8. Luego, descartar el tinte (se puede reusar 2-3 veces más) y agregar la solución de lactoglicerina para eliminar el exceso del tinte (esta solución se puede reusar varias veces) y dejar por 3 horas. Las estructuras de los HMA (hifas, vesículas, arbusculos, esporas, células auxiliares, deben quedar teñidas en azul.
9. Distribuir las raicillas en forma aleatoria en una placa Petri, serán evaluadas los fragmentos de raíces conteniendo estructuras fúngicas con la ayuda de un estereoscopio.

Cálculo de porcentaje de colonización de HMA en raíces

Método de intersección de líneas en placa cuadrículada (Giovannetti y Mosse 1980)

Este método puede ser utilizado tanto para estimar la proporción de la longitud de raíces colonizadas, como el total de la longitud de la raíz de la muestra.

1. Las raíces se colocan y se extienden sobre una placa de Petri, que poseen líneas cuadrículadas de 1.27 cm, esta muestra se observa en el estereomicroscopio de 4x de aumento, observándose la presencia y ausencia de colonización en las líneas verticales y horizontales, exactamente en el punto donde las raíces cruzan las líneas. La observación debe darse en el mínimo de 100 intersecciones de raíces con la línea de la cuadrícula para evaluar una muestra y tener seguro los resultados de porcentaje de colonización. Algunas muestras se pueden montar en placas porta cubre objetos para observar con mayor detalle las estructuras del hongo y obtener fotografías. Se empleará la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de colonización} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de segmentos colonizados}}{\text{N}^\circ \text{ total de segmentos evaluados}} \times 100$$

2. Escala de clasificación del porcentaje de colonización según Zangaro, *et al.*, 2002

ESCALA	PORCENTAJE %
Muy bajo	1 - 19
Bajo	20 - 39
Intermedio	40 - 59
Alto	60 - 79
Muy alto	> 80

