



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

Facultad de Ciencias de la Vida

Ingeniería en Biotecnología

Tesis de Pregrado

Identificación morfológica y molecular de hongos micorrízicos arbusculares asociados a las plantas de guayusa (Ilex guayusa Loes.) de la comunidad San Salvador del cantón Tena, Ecuador

Andrés Armando Astudillo Echeverría

25 de agosto de 2021, Ciudad de Tena, Napo, Ecuador

Declaración de derechos de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 25 de agosto de 2021

Yo, Andrés Armando Astudillo Echeverría con documento de identidad N° 0705490654, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título Ingeniera en Biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,

Firma:



Andrés Armando Astudillo Echeverría

Certificado de dirección de trabajo de integración curricular

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Identificación morfológica y molecular de hongos micorrízicos arbusculares asociados a las plantas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes.) de la comunidad San Salvador del cantón Tena, Ecuador”, en la modalidad de: proyecto de integración de investigación en formato tesis, fue realizado por: Andrés Armando Astudillo Echeverría, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 25 de agosto de 2021

Firma:



Firmado electrónicamente por:

**ROLDAN
TORRES**

.....

Roldán Torres Gutiérrez, Ph.D.

C.I: 0151345121

Firma:



Firmado electrónicamente por:

**LEOPOLDO
ANTONIO NARANJO
BRICENO**

.....

Leopoldo Naranjo Briceño, Ph.D.

C.I: 1758579294

Agradecimientos

Todo el agradecimiento a la Universidad Regional Amazónica Ikiam y a sus docentes, quienes enseñan a sus estudiantes a enfrentarse a los desafíos del presente y del futuro, instruyéndolos con un alto nivel académico y profesional.

Al profesor Ph.D. Leopoldo Naranjo Briceño, quien me integró a participar en el proyecto ganador de la convocatoria CEDIA-CEPRA XIII, del cual fue director, y del cual partió el presente trabajo de integración curricular.

A Patricio Andi, quien con su guía permitió que el diseño de muestreo de la presente investigación se lleve a cabo en la comunidad San Salvador. A Borys León, por compartir largas jornadas de campo y por su importante participación en el desarrollo de la parte metodológica de laboratorio del presente trabajo. A Sonia Sislema, Katherine Apunte MsC. y Andrea Carrera MsC. por su contribución, apoyo técnico y logístico en varias fases del proceso de laboratorio. A Wilfredo Franco Ph.D. y Roldán Torres Ph.D. quienes participaron y formaron parte del grupo de investigación del presente trabajo de integración curricular.

Por último, agradezco a mi familia, amigos y a Stefanny Bonilla, por acompañarme a lo largo de la carrera.

Dedicatoria

*A mi madre Maribel, a mi
padre Armando, a mis
hermanos Nicole y Jordi, y
a mis tíos Ronald, Manuel y
Katherine, por su apoyo
incondicional.*

ÍNDICE GENERAL

Declaración de derechos de autor, autenticidad y responsabilidad	v
Certificado de dirección de trabajo de integración curricular	vi
Agradecimientos	vii
Dedicatoria	viii
Resumen	xiii
Abstract	xiv
Lista de abreviaturas	xv
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1 Ciclo biológico y fisiología de los HMA	1
1.1.2 Métodos empleados en la identificación de los HMA	3
1.1.3 Simbiosis de los HMA con la planta huésped	4
1.1.4 Esporas de HMA dominantes en Sur América y en la región Amazónica	5
1.1.4 <i>Ilex guayusa</i> y la región Amazónica ecuatoriana	6
1.1.5 Plantas que son colonizadas por los HMA	8
1.1.6 Colonización de HMA en plantas de la familia Aquifoliaceae	8
1.2 Planteamiento del problema a investigar	9
1.3 Justificación de la investigación	10
1.3.1 Preguntas de investigación	11
1.3.2 Hipótesis	12
1.4 Objetivos de la investigación	12
1.4.1 Objetivo General	12
1.4.2 Objetivos Específicos	12
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	13
2.1 Sitio de estudio	13
2.2 Selección de plantas de guayusa	14
2.3 Muestras de rizósfera y evaluación de propiedades del suelo	14
2.4 Esterilización almacenamiento y preservación de raicillas	15
2.5 Evaluación de colonización de raicillas por HMA	15
2.6 Aislamiento y clasificación taxonómica clásica de esporas de HMA	16
2.7 Extracción de ADN metagenómico de esporas de HMA y raicillas de guayusa	17

2.8 Secuenciación Illumina MiSeq	17
2.9 Análisis bioinformático	18
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS	19
3.1 Características químicas y físicas del suelo	19
3.2 Colonización de HMA en raíces de guayusa	19
3.3 Abundancia de esporas de HMA en la rizósfera de <i>I. guayusa</i>	21
3.4 Identificación morfológica de esporas de HMA	21
3.4 Análisis molecular de la composición de HMA en <i>I. guayusa</i>	28
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN	34
4.1 Esporas de HMA en la rizósfera de <i>I. guayusa</i>	34
4.2 HMA en el interior de las raicillas de <i>I. guayusa</i>	35
4.3 Colonización de HMA en <i>I. guayusa</i>	36
4.4 Perspectivas futuras para el estudio de HMA asociados a <i>I. guayusa</i>	37
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	38
REFERENCIAS	40
ANEXOS	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de los HMA.	2
Figura 2. Mapa del lugar de estudio.....	13
Figura 3. Esquema para el muestreo de suelo y raicillas	15
Figura 4. Colonización de HMA en las raicillas de <i>I. guayusa</i>	20
Figura 5. Abundancia relativa de los A) géneros y B) familias de HMA en <i>I. guayusa</i>	23
Figura 6. Esporas de HMA aisladas de la rizósfera de la planta de guayusa G1.....	24
Figura 7. Continuación de las esporas de HMA aisladas de la rizósfera de la planta de guayusa G1.	25
Figura 8. Esporas de HMA aisladas de la rizósfera de la planta de guayusa G2.....	26
Figura 9. Esporas de HMA aisladas de la rizósfera de la planta de guayusa G3.....	27
Figura 10. Esporas de HMA aisladas de la rizósfera de la planta de guayusa G4.....	28
Figura 11. Abundancia relativa de los OTUs de HMA identificados en <i>I. guayusa</i>	29
Figura 12. Curva de rarefacción.....	30
Figura 13. Abundancia relativa de los A) géneros y B) familias de HMA en <i>I. guayusa</i> a nivel molecular.	31
Figura 14. Árbol filogenético de los OTUs de HMA identificados en <i>I. guayusa</i>	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Colonización de hifas, vesículas y arbusculos de HMA en <i>I. guayusa</i>	20
-------------------------------------------------------------------------------------------	----

Resumen

Los productos derivados de la planta de guayusa (*Ilex guayusa* Loes.) experimentan una creciente demanda en el mercado debido a los compuestos bioactivos que albergan sus hojas. Tomando en cuenta la baja fertilidad natural de los suelos amazónicos, uno de los grandes desafíos es explorar nuevas alternativas agroecológicas que busquen mejorar la nutrición y el rendimiento de los cultivos de guayusa, manteniendo los criterios agroecológicos que actualmente se aplican en los sistemas agroforestales en donde la guayusa es cultivada. En este sentido, los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) cumplen un rol preponderante en la funcionalidad de los ecosistemas ya que mejoran la nutrición de las plantas que colonizan a cambio de carbohidratos y lípidos. En el presente trabajo, se describe por primera vez la colonización de los HMA en *I. guayusa*. Se identificó el morfotipo de colonización intermedio y la frecuente presencia de arbusculos (>45%), mientras que la identificación taxonómica clásica de esporas y la secuenciación NGS de la región ITS-2 revelaron que sólo los HMA de la familia Glomeraceae estuvieron presentes en la rizósfera (70.4%) y en el interior de las raíces de la guayusa (97.6%). Probablemente, todas las familias de HMA que habitan en la rizósfera de *I. guayusa* no siempre colonizan el interior de sus raicillas, a pesar de las limitaciones en la identificación taxonómica clásica y el potencial sesgo de la secuenciación ITS-2 hacia la familia Glomearceae. En conjunto, estos resultados constituyen el primer paso hacia la producción de biofertilizantes basados en propágulos autóctonos de HMA para *I. guayusa*.

Palabras claves: *I. guayusa*, hongos micorrízicos arbusculares Amazonía, abundancia relativa, Glomeraceae.

Abstract

Guayusa plants (*Ilex guayusa* Loes.) based-products have a continuous growing demand on markets due to the several bioactive compounds found in its leaves. Considering the low natural fertility in Amazonian soils, one of the great challenges is to explore new agroecological alternatives that seek to improve the nutrition and yield of guayusa crops while preserving agroecological practices that are currently applied in agroforestry systems where guayusa is cropped. In this sense, Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) play main roles in ecosystems functionality due to improve host plant nutrition in exchange for carbohydrates and lipids. In this research, AMF colonization of *I. guayusa* is described for the first time. The intermediate-type colonization and frequent arbuscular occurrence (>45%) were identified, while classical taxonomic identification of spores and the Next Generation Sequencing (NGS) of ITS-2 region revealed that AMF Glomeraceae family were found at rhizosphere (70.4%) and inside of guayusa roots (97.6%). Probably, all AMF families that inhabit the rhizosphere of *I. guayusa* do not always colonize their roots, despite limitations of classical taxonomic identification and potential bias of the ITS-2 sequencing towards the Glomeraceae family. Altogether, these results are the first steps towards native HMA-based biofertilizer production for *I. guayusa* plants.

Key words: *I. guayusa*, Arbuscular Mycorrhizal Fungi, relative abundance, Amazonía Glomeraceae.

Lista de abreviaturas

HMA: Hongos Micorrízicos Arbusculares

MAR: Micorrizas Arbusculares Rudimentarias

NGS: Next Generation Sequencing

ITS-2: Internal Transcribed Spacer 2

NCBI: National Center of Biotechnology Information

OTUs: Operational Taxonomy Units

INVAM: International Culture Collection of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Antecedentes

Los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) pertenecen al Phylum Glomeromycota [1] y son endosimbiontes obligados debido a que requieren de una fuente de carbono de la planta huésped para completar su ciclo de vida. La simbiosis entre los HMA y las raíces de las plantas se originó hace aproximadamente 460 millones de años [2] y constituyó un evento fundamental en la vida sobre el planeta, ya que permitieron la transición y adaptación del agua al medio terrestre de las primeras plantas que colonizaron la tierra [3,4]. Actualmente, el Phylum *Glomeromycota* está conformado por 4 órdenes, 12 familias, 43 géneros y 342 especies de HMA (<http://www.amf-phylogeny.com/>).

Los HMA colonizan las raíces del 78% de las plantas y destacan por su amplio dominio de colonización en comparación con las micorrizas orquídeas (10%), ectomicorrizas (2%), y micorrizas ericoides (1.4%). Los HMA son reconocidos por su rol protagónico en el contexto de una agricultura sostenible, principalmente por dos aspectos: por su capacidad de mejorar la productividad de las plantas [5] y por su potencial participación en la resiliencia y mitigación de los cultivos al cambio climático [6–8].

1.1.1 Ciclo biológico y fisiología de los HMA

El desarrollo de los HMA se completa en 5 etapas de acuerdo con los autores Harrier & Watson (Figura 1) [9], de las cuales, las tres primeras se originan en la rizósfera (fase de pre-simbiosis) mientras que las dos últimas ocurren al interior de la raíz de la planta (fase de simbiosis). Estas etapas son: (1) germinación de esporas en la rizósfera, (2) germinación de las hifas con dirección a la raíz de la planta, (3) formación de una estructura aplanada sobre la raíz de la planta huésped (hifopodium), (4) ingreso y crecimiento de las hifas y,

finalmente, (5) la formación de vesículas y arbusculos en el interior de las células corticales de la raíz de la planta huésped.

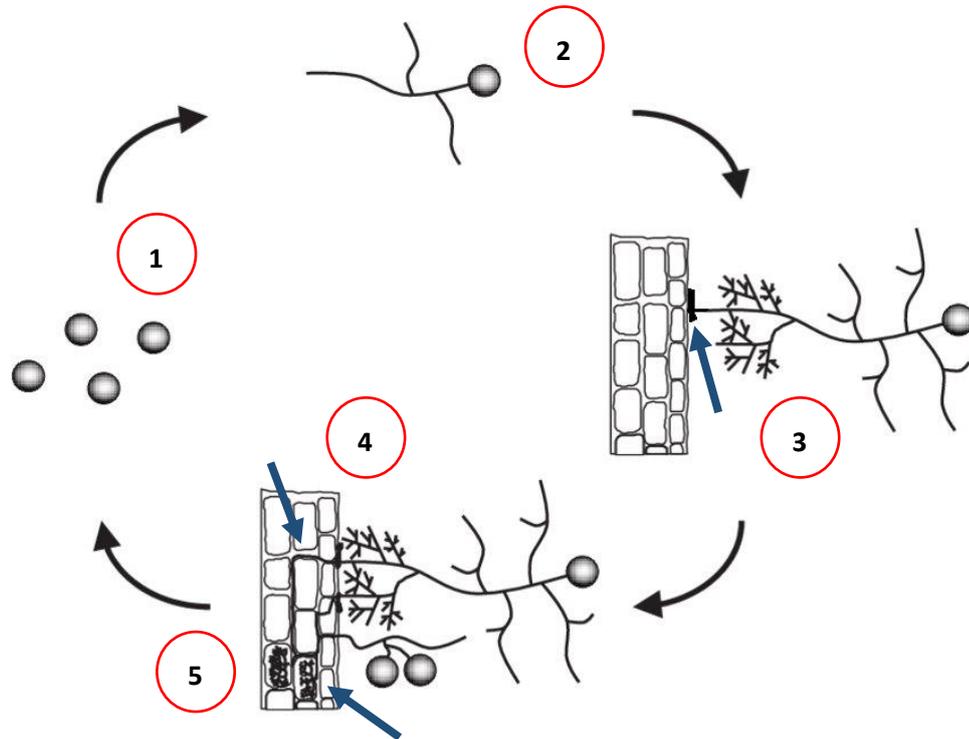


Figura 1. Ciclo de vida de los HMA. Las flechas señalan la formación de hifopodium, hifas y arbusculos en las etapas 3, 4 y 5, respectivamente. Modificado de Akiyama [10].

Para que la germinación de esporas de HMA ocurra, se requiere de una compleja interacción de condiciones bióticas y abióticas entre ellas el pH, temperatura, humedad, nutrientes orgánicos y minerales, la planta huésped y los microorganismos asociados a su rizósfera [11]. Durante esta compleja interacción, las estrigolactonas (fitohormonas) exudadas por la raíz de la planta inducen la germinación de las esporas de HMA [12] y además estimulan el crecimiento de las hifas de HMA hacia la raíz de la planta [13]. Posteriormente, las hifas forman un hifopodium como paso previo del ingreso al interior de la raíz. Después de esta primera interacción, los HMA secretan lipoquitosacáridos que activan en la planta una señal de transducción, conocida como vía de señalización

simbiótica común [14] que permite el ingreso de las hifas y el crecimiento de hifas intrarradicales.

Finalmente, el desarrollo de vesículas y de estructuras altamente ramificadas y específicas de los HMA, denominadas arbuscúlos, se lleva a cabo en el interior de las células corticales de la raíz de la planta huésped. Los arbuscúlos son estructuras claves en la simbiosis porque incrementan el área de contacto simbiótico y permiten el intercambio de metabolitos entre la planta huésped y los HMA [15]. En esta última etapa de crecimiento también ocurre la salida de las hifas desarrolladas en el interior de la raíz de la planta huésped, con el objetivo de formar hifas ramificadas y absorbentes, y además generar esporas [9], que permitirán mejorar la nutrición de la planta y empezar el ciclo de vida del hongo, respectivamente.

En el interior de la planta colonizada por los HMA, las redes hifales pueden disponerse en tres morfotipos: *Paris*, *Arum* y un tipo intermedio. El morfotipo *Paris* se caracteriza por el crecimiento intracelular de hifas y por la formación de espirales de hifas y arbuscúlos, mientras que, en el tipo *Arum*, el crecimiento de las hifas principalmente ocurre de forma intercelular, sin la formación de espirales. El tipo intermedio consiste en la mezcla gradual de ambos tipos [16,17]. En la rizósfera, la red micelial de los HMA asociado a la planta huésped permite interconectar de manera directa a la planta con el sistema de raíces que una variedad de plantas. Esta interconexión puede ocurrir también de manera indirecta, a través de la fusión de hifas de HMA (anastomosis) [18], generando una sorprendente y extensa conexión biológica bajo el suelo de los ecosistemas terrestres.

1.1.2 Métodos empleados en la identificación de los HMA

Las estructuras que forman los HMA durante su ciclo de vida proporcionan evidencia de su

colonización con la planta huésped. Las hifas, vesículas y arbuscúlos han sido identificados tradicionalmente en las raicillas de la planta huésped por métodos de tinción que usan principalmente el azul de tripano como reactivo [19]. A partir de esta tinción es posible cuantificar la frecuencia de endomicorrización de la planta huésped [20]. El método de decantación húmeda en cambio se enfoca en extraer esporas de HMA que están suspendidas en la rizósfera de las plantas huésped [21].

La secuenciación de alto rendimiento (NGS, Next Generation Sequencing) se ha convertido en una poderosa herramienta por su capacidad de identificar la composición de las comunidades de microorganismos en muestras ambientales [22]. Esta secuenciación ha sido utilizada recientemente para describir la composición de comunidades de los HMA [23].

1.1.3 Simbiosis de los HMA con la planta huésped

El intercambio de estrigolactonas exudadas por las raíces de las plantas [12] y lipoquitosacáridos, secretados por las hifas de las HMA [14], permite que los HMA puedan colonizar el interior de las células corticales de la planta huésped. Como resultado, la asociación simbiótica mutualista generada permite que la planta huésped adquiera nutrientes de poca movilidad en el suelo, así como la translocación de micro (Ca, Cu, Fe, Zn, Fe, y Mn) y macronutrientes (P, N, K y S) [15] a través de transportadores específicos expresados por la planta como respuesta a la colonización por los HMA. A cambio, la demanda nutricional de los HMA es satisfecha por la planta huésped a través de la difusión de lípidos y carbohidratos que son indispensables para que los HMA puedan completar su ciclo de vida [24].

Además de la nutrición a las plantas, los HMA ofrecen más funciones ecológicas, como el incremento de la absorción de agua, resistencia contra el estrés abiótico causado por las sequías prolongadas [25,26], a altos niveles de salinidad [27] o por la exposición a metales pesados [28]. También, los HMA promueven la resistencia al estrés biótico causado por patógenos [29] y el incremento tanto de la actividad fotosintética como del crecimiento de la planta huésped [26]. Además, los HMA contribuyen al secuestro de carbono atmosférico [12], transformando el carbono adicional fijado por la planta en hifas extrarradicales y glicoproteínas. Los beneficios de la simbiosis mutualista entre los HMA y las raíces de las plantas se extienden al suelo porque mejora su estructura a través de la estabilización de macro-agregados, optimizando el secuestro de carbono, la resistencia a la erosión, el intercambio gaseoso y la infiltración de agua [30].

La versatilidad de la simbiosis HMA-planta ha despertado un gran interés por la fabricación de biofertilizantes, bioestimulantes y bioprotectores basados en propágulos de HMA [6,31]. Tal es el impacto, que el diseño, fabricación y comercialización de estos bioproductos ha incrementado vertiginosamente en el mercado norteamericano y europeo [31].

1.1.4 Esporas de HMA dominantes en Sur América y en la región Amazónica

Las esporas de los HMA de la familia Glomeraceae y Acaulosporaceae son dominantes en Sur América, de acuerdo a los autores Cofré y colaboradores [32]. En la región Amazónica, se ha reportado la dominancia de las familias Glomeraceae-Acaulosporaceae al oeste de la Amazonía brasileña [33] y al sur de la Amazonía colombiana [34], con dominancia de los géneros *Glomus* y *Acaulospora* (único género de la familia Acaulosporaceae). Esta dominancia se invierte en la región de la Patagonia Argentina, en donde la familia

Acaulosporaceae es dominante sobre la familia Glomeraceae [35,36].

El cambio en la dominancia Glomeraceae-Acaulosporaceae en la región tropical de Sur América por la dominancia Acaulosporaceae-Glomeraceae en la región fría de la Patagonia Argentina podría ser explicado por las diferencias en las condiciones ambientales que gobiernan en cada región. La encuesta global de diversidad de HMA señala que los factores ambientales (como las precipitaciones, la temperatura y el suelo) tienen una fuerte influencia en formar las comunidades de HMA que habitan en un determinado lugar [37], más influencia inclusive que la especie a la que pertenece la planta huésped [37,38].

Recientemente, Davison y colaboradores [39] identificaron que la temperatura y el pH son los factores abióticos más influyentes en la abundancia relativa de los HMA a nivel mundial. Estos autores identificaron que la familia Acaulosporaceae presentan un nicho óptimo a pH y temperaturas bajas, con media de 4 y <10 °C, respectivamente, mientras que la familia Glomeraceae presenta diferentes nichos óptimos.

1.1.4 *Ilex guayusa* y la región Amazónica ecuatoriana

En relación a la planta de guayusa (*Ilex guayusa* Loes.), ésta pertenece al único género remanente de la familia Aquifoliaceae, denominado *Ilex*. El género *Ilex*, comprende cerca de 600 especies de plantas, de las cuales, alrededor de 300 se encuentran en el Neotrópico [40]. Su distribución abarca desde la cuenca alta de la Amazonía de Perú, pasando por Ecuador, Colombia, hasta Bolivia [41,42]. Así mismo, se han registrado plantas de *I. guayusa* en altitudes que van desde los 200 hasta los 2000 metros sobre el nivel de mar [42].

I. guayusa es una planta nativa de la región Amazónica [41,42] y, según registros históricos y arqueológicos, ha sido empleada ancestralmente como planta medicinal desde aproximadamente 500 A.C. [41]. En la región Amazónica ecuatoriana, las comunidades

kichwas cultivan la guayusa en sus sistemas agroforestales de cultivos simultáneos denominados chakra [43]. Para consumirla, preparan una infusión a partir de hojas frescas o secas denominada bebida de guayusa que es frecuentemente utilizada por las comunidades kichwa por sus propiedades estimulantes, medicinales y en rituales mágicos. Además, la guayusa es usada como diurético, tónico estomacal y remedio para la gripe por sus propiedades expectorantes [42], en combinación con gengibre, jugo de lima, chuchuwasu, y/o licor de caña de azúcar [41]. El uso de la guayusa también está asociado al incremento de la fertilidad, como analgésico [41,42], como repelente de insectos y contra mordeduras de serpientes [41].

La bebida de guayusa desempeña un rol esencial en promover la convivencia diaria en las comunidades kichwas porque promueven la afectividad y las relaciones entre parientes. El consumo de esta bebida en la comunidad kichwa, en ocasiones, es acompañado por rituales mágico ancestrales que tienen como finalidad reorientar la vida y fortalecer los cuerpos de los niños [41].

El cultivo de la guayusa en las chakras con fines comerciales surgió hace más de 10 años, producto de la sinergia del conocimiento etnobotánico, saberes ancestrales, y el interés empresarial [44]. De acuerdo con Wise & Santander [45], las exportaciones de guayusa han crecido, desde el 2007, a 100 toneladas por año, concentrando el 95% de la producción mundial de guayusa en las Provincias Amazónicas ecuatorianas de Napo, Orellana y Pastaza [46], siendo la Provincia de Napo la principal productora y exportadora mundial de guayusa [45]. Actualmente, el mercado de Estados Unidos es el principal importador de guayusa del Ecuador, agrupando el 97% (80 toneladas) de las importaciones a nivel mundial [46]. La exportación de la guayusa genera ingresos a las comunidades

Kichwas por 700.000 dólares [43]. Visto de diferentes perspectivas, la guayusa cumple un importante rol cultural, etnomedicinal, social y económico en la región Amazónica de Ecuador, especialmente para la Provincia de Napo.

1.1.5 Plantas que son colonizadas por los HMA

De esta amplia distribución dominante que tiene los HMA en las plantas terrestres, estos endosimbiontes colonizan alrededor del 71% de las especies de plantas vasculares [47], incluyendo plantas empleadas en los cultivos alimenticios, como árboles frutales, cereales, leguminosas y vegetales [5]. El 29% restante de plantas vasculares no forman endomicorrizas arbusculares, y se agrupan en las familias de las Proteaceae, Chenopodiaceae, Caryophyllaceae, y Brassicaceae [47]: en estas familias también encontramos plantas importantes en la agricultura, como el rábano, la caña de azúcar, la canola, y la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

No obstante, la colonización de HMA en este grupo de plantas suele ocurrir cuando co-existen con una red de HMA establecida en una planta micorrizable [48], formando Micorrizas Arbusculares Rudimentarias (MAR): estas estructuras se forman con baja frecuencia (<15%) en comparación con la planta micorrizable, y raramente hay presencia de arbusculos (<5%) [48]. *A. thaliana*, *Dianthus deltoides* (Caryophyllaceae) y *Salsola kali* (Chenopodiaceae) son ejemplos puntuales de plantas que forman MAR cuando coexisten con plantas micorrizables [49].

1.1.6 Colonización de HMA en plantas de la familia Aquifoliaceae

En Asia, se ha identificado que tres plantas de la familia Aquifoliaceae, *I. integra*, *I. crenata* [50–52], e *I. pedunculosa* [52], son colonizadas por los HMA. Mientras que, en Suramérica, *I. paraguariensis* (yerba mate) es la única planta reportada de la familia Aquifoliaceae que

alberga HMA [53,54]. En todas estas plantas de la familia Aquifoliaceae se han identificado arbusculos, hifas y el morfotipo de colonización *Paris* [50–53]. No obstante, hasta la presente fecha, no existe en la literatura científica ningún reporte sobre la identificación morfológica o molecular de HMA asociados a la planta *I. guayusa*.

1.2 Planteamiento del problema a investigar

Debido al constante crecimiento en la demanda nacional e internacional por la guayusa [43], en las chakras de la Provincia de Napo ha iniciado recientemente la siembra masiva de esta planta bajo un esquema que evita recurrir a prácticas de cultivo de alto rendimiento, caracterizados por el uso indiscriminado de maquinarias agrícolas, fertilizantes químicos y pesticidas [55]. El mercado de Estados Unidos es el principal destino de las hojas de guayusa y es el mercado que genera la mayor demanda. De acuerdo con Krause & Ness [43], el incremento por la demanda de la guayusa en el mercado de Estados Unidos continúa porque está acoplada con la oferta en exceso que se produce por las plantas maduras de guayusa, pero según los autores se desconoce hasta qué punto esta demanda seguirá igualando la oferta bajo el uso de los actuales criterios agroecológicos de producción.

Satisfacer la alta demanda del mercado de la guayusa producida bajo criterios agroecológicos, y en regiones prístinas y de alta diversidad biológica como la Amazonía, representa un enorme desafío en los procesos de domesticación de esta planta como cultivo con bajo o nulo impacto tanto a nivel local como global, y que permita brindar soluciones sostenibles [44]. Por lo tanto, el uso de herramientas agrícolas tradicionales como los fertilizantes inorgánicos no representa una opción a pesar de haber permitido de manera histórica suplir la demanda de los alimentos a nivel mundial.

El uso indiscriminado de fertilizantes inorgánicos tiene graves implicaciones para los recursos del planeta debido a que deterioran la calidad y la salud de los suelos, contaminan las aguas superficiales y subterráneas [56] y, además, reducen la biodiversidad de los ecosistemas terrestres [57]. Los fertilizantes químicos provocan desde desnitrificación, lixiviación, acidificación, volatilización, hasta la inserción de trazas de metales contaminantes, como Cadmio, Plomo y Arsénico, lo que pone en riesgo a la salud humana [56]. Por ello, es indispensable ofrecer estrategias biotecnológicas que permitan garantizar la producción de guayusa con altos criterios de calidad y que sean amigables con el ambiente, sobre todo, en regiones de alta fragilidad ecológica como son los ecosistemas Amazónicos.

1.3 Justificación de la investigación

Los HMA son reconocidos a nivel mundial por su protagónico rol en impulsar una agricultura sostenible, principalmente por dos aspectos: i) por su capacidad de mejorar la productividad de las plantas [5], y ii) por su potencial participación en la resiliencia y mitigación de los cultivos al cambio climático [6–8]. La inoculación por HMA, tanto en condiciones controladas como en el campo, mejora significativamente la biomasa de las plantas colonizadas, a partir de un incremento significativo en la nutrición [58]. Además, los HMA tienen la capacidad de incrementar la producción de los metabolitos secundarios, como los compuestos fenólicos y flavonoides [59]. Esto es de particular interés ya que se conoce que la guayusa produce importantes metabolitos secundarios, entre ellos la cafeína, flavonoides y antioxidantes [55] que pudieran ser incrementados como consecuencia de la simbiosis HMA-raíces de guayusa.

En relación al cambio climático, los HMA tienen la capacidad de incrementar el secuestro de carbono atmosférico de los ecosistemas [7,8], depositándolo en el suelo para conformar entre el 20-30% del total de la biomasa microbiana y para contribuir entre un 4-5% del total del carbono fijado en el suelo de los bosques tropicales [12].

La importancia del estudio de la posible colonización de raíces de la guayusa por HMA radica en que permitiría establecer las bases fundamentales para generar potenciales herramientas biotecnológicas basadas en biofertilizantes orientados a: i) mejorar la productividad de las plantas de guayusa sin necesidad de emplear fertilizantes químicos, ii) incrementar el secuestro de carbono atmosférico en la chakra amazónica y, iii) aumentar la resistencia al estrés abiótico causado por sequías o inundaciones debido al cambio climático.

En este sentido, también resulta pertinente evaluar la diversidad de los HMA asociados a las raíces de guayusa, ya que ayudaría a determinar las funciones ecológicas que desempeñan los HMA en las plantas como resultado de la simbiosis [60,61]. Se espera que mientras más diversos sean estos microorganismos, más beneficios ecológicos proveerán a las plantas y a los ecosistemas [61]. Los resultados de este primer estudio abrirán un abanico de conocimientos y tecnologías para futuros desarrollos agroecológicos en la Amazonía ecuatoriana basados en novedosas aplicaciones biotecnológicas.

1.3.1 Preguntas de investigación

¿Las familias de HMA que están presentes en la rizósfera de las plantas de *I. guayusa* también colonizan el interior de sus raicillas?

¿Las plantas de guayusa presentan una colonización por MAR (frecuencia de colonización <15% y con escasa o nula presencia de arbusculos (<5%)) o presentan una colonización

característica de las plantas consideradas como hospedantes de HMA (morfotipos *Arum*, *Paris* o Intermedio, con frecuente colonización de arbusculos)?

1.3.2 Hipótesis

Los HMA de las familias Glomeraceae y Acaulosporaceae son dominantes en los suelos de la región Amazónica, por lo tanto, se espera que al menos las esporas de estas dos familias estén presentes en la rizósfera y en el interior de las raicillas de las plantas de guayusa de la comunidad San Salvador (Tena).

Todas las plantas de la familia Aquifoliaceae que albergan HMA poseen el morfotipo de colonización *Paris*. Debido a que *I. guayusa* pertenece a esta familia de plantas, se descarta que presente MAR y se espera que alberguen el morfotipo de colonización *Paris*.

1.4 Objetivos de la investigación

1.4.1 Objetivo General

Identificar morfológica y molecularmente los HMA asociados a la rizósfera y a las raicillas de las plantas de guayusa establecidas en la comunidad San Salvador del cantón Tena.

1.4.2 Objetivos Específicos

1. Identificar, mediante taxonomía clásica, la abundancia relativa de los géneros y las familias de esporas de los HMA asociados a la rizósfera de las plantas de guayusa de la comunidad San Salvador.
2. Determinar la riqueza y la abundancia relativa de HMA de las plantas de guayusa de la comunidad San Salvador a través de la secuenciación de la región universal de hongos ITS2.

3. Identificar, en las raicillas de las plantas de guayusa de la comunidad San Salvador, la frecuencia y el morfotipo de colonización de HMA.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1 Sitio de estudio

El área de estudio se localizó en la comunidad San Salvador ($0^{\circ}56'14.1''S$ $77^{\circ}51'03.2''W$), parroquia rural San Juan de Muyuna del cantón Tena, capital de la provincia de Napo (Figura 2). La región del área de estudio cuenta con las siguientes características: precipitaciones anuales entre 3500 a 4000 mm, temperatura promedio de $25^{\circ}C$, humedad relativa de 80-90 %, y altitud de 520 msnm. Los suelos de esta región son principalmente inceptisoles, y se caracterizan por la presencia de limos, retención de humedad 100% y pH ácidos [62].

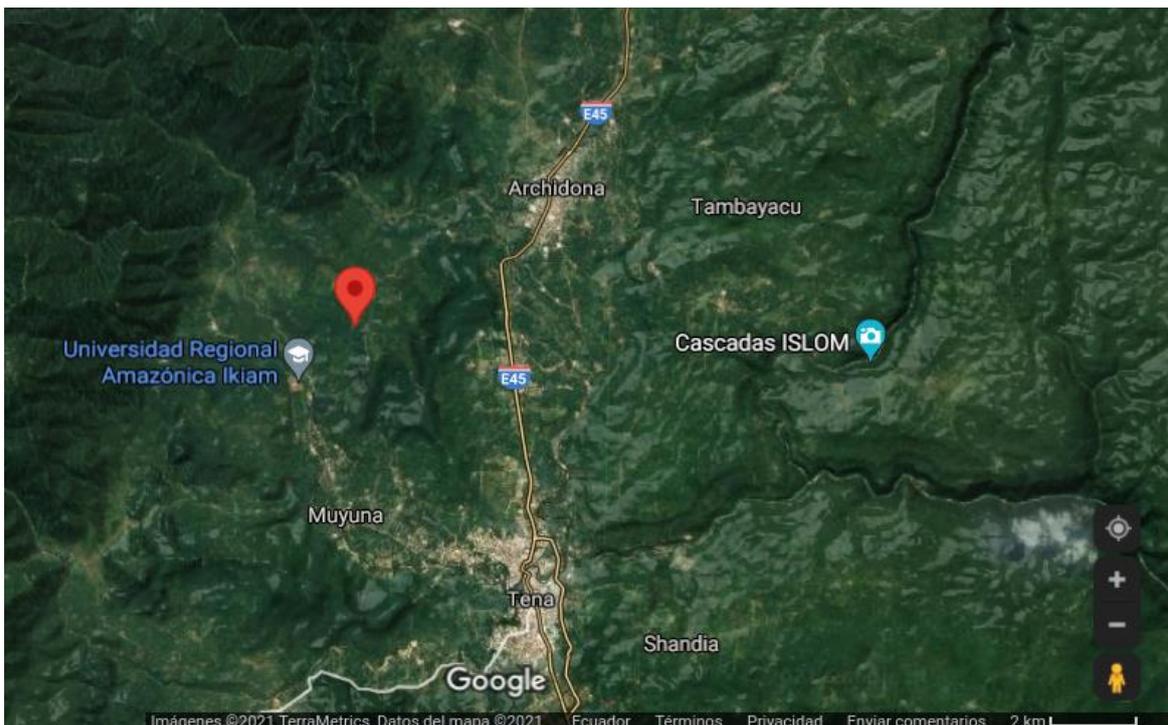


Figura 2. Mapa del lugar de estudio. En rojo se marca el punto de muestreo de las plantas de guayusa. Distancia mínima 2 km (Google Maps).

2.2 Selección de plantas de guayusa

Se seleccionaron aleatoriamente cuatro individuos de guayusa de un sistema de cultivo tipo chakra. Las plantas seleccionadas estuvieron distanciadas por al menos 10 metros (Anexo 1) para evitar la contaminación cruzada de las raíces o raicillas de otras especies vegetales. Esta distancia fue considerada de acuerdo con el método de muestreo de Souza et al. [63], en el cual se empleó una distancia mínima de 3 metros entre las plantas muestreadas. Las plantas de guayusa fueron etiquetadas como G1, G2, G3 y G4. La colección de las muestras en campo fue autorizada por el Ministerio del Ambiente, de acuerdo con la “*Autorización de Investigación Científica N° 023-2019-IC-FLO-DBN/MA*” (Anexo 13).

2.3 Muestras de rizósfera y evaluación de propiedades del suelo

Por cada planta de guayusa se tomaron tres muestras de rizósfera (suelo + raicillas) de tres puntos equidistantes (3X) desde el tronco del individuo hasta aproximadamente 100 cm a la redonda (Figura 3), a una profundidad de suelo aproximada de 20 cm [64]. Estas muestras fueron homogeneizadas para obtener una muestra compuesta de más de 2 kg por cada planta de guayusa. Se obtuvieron un total de 4 muestras compuestas que fueron preservadas a 4°C y recolectadas en el mes de septiembre del 2019 y en febrero del 2020.

Se tomaron 50 gramos de suelo, por triplicado, por cada muestra de guayusa para determinar el porcentaje de humedad y se envió un 1 kg de suelo en peso seco al Laboratorio de Suelos y Aguas de la Universidad Politécnica Salesiana para analizar el pH, conductividad eléctrica, materia orgánica, concentración de: nitratos; Ca; Mg; Na; P; N total; Mn; Cu; Zn; Cd; S; B, capacidad de intercambio catiónico, Al intercambiable, y para analizar la textura del suelo.

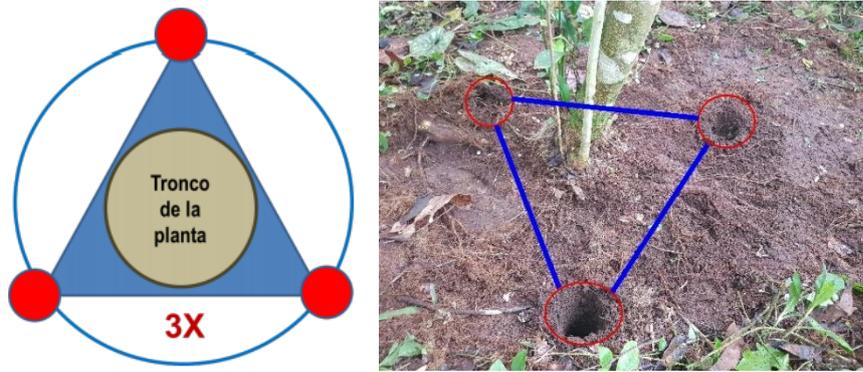


Figura 3. Esquema para el muestreo de suelo y raicillas [64] aplicado a la planta *I. guayusa*.

2.4 Esterilización almacenamiento y preservación de raicillas

Las raicillas de cada muestra de guayusa fueron esterilizadas con hipoclorito de sodio y alcohol al 70%. Aproximadamente la mitad de cada muestra fue preservada en alcohol al 70% a 4°C para posterior análisis de colonización de HMA, mientras que la parte restante fue almacenada en tubos eppendorf y preservadas con alcohol absoluto (96 % v/v) a -20°C para la posterior extracción de ADN metagenómico.

2.5 Evaluación de colonización de raicillas por HMA

Todas las raicillas (~1 g por muestra) fueron cortadas en fragmentos de aproximadamente 1 cm de largo, luego fueron sumergidos en KOH al 10% y colocados en el autoclave durante 15 minutos a 121°C. Después de descartar el KOH y enjuagar con agua destilada, las raicillas fueron sumergidas en HCl al 1% (v/v) durante 3 minutos para retirar la materia orgánica. Finalmente, las raicillas fueron teñidas con azul de tripano disuelto en glicerol al 0.05% [19].

Luego, se colocaron al azar 10 raicillas por cada portaobjeto para visualizarlas bajo un microscopio óptico (40x), este proceso se lo hizo por triplicado para cada muestra. Se empleó la fórmula propuesta por McGonigle [20] para evaluar la colonización endomicorrízica de las plantas de guayusa. Las raicillas fueron divididas en tres campos ópticos observables, cada campo fue evaluado como una colonización positiva si al menos

tenía la presencia de vesículas, arbuscúlos o hifas, de acuerdo con el método aplicado por los autores Naranjo-Morán [65] y Moina-Quimí [66]. Un total de 30 campos fueron observados por cada muestra de guayusa. Este proceso se realizó por triplicado, por lo cual 90 campos fueron visualizados por cada planta de guayusa.

2.6 Aislamiento y clasificación taxonómica clásica de esporas de HMA

Se usó la técnica de tamizado y decantación húmeda de Gerdemann & Nicolson [21] para aislar las esporas de HMA, partiendo de 100 gramos de peso seco de suelo por cada muestra. Se implementó un sistema continuo de tamices de 400, 125, 106 y 38 μm para coleccionar la solución de suelo procedente de los tamices de 106 y 38 μm , de acuerdo con la metodología de Naranjo [67]. Este proceso se lo realizó por triplicado para cada planta de guayusa. Se generó un gradiente de sacarosa [19,67] de cada solución tamizada y se agregó tween 20 al 2%, la solución fue centrifugada a 2500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante de los tubos fue filtrado con papel filtro (\varnothing 0.15 mm) para retener las esporas y para posteriormente observarlas y contabilizarlas en un estereoscopio a 4x. Las esporas de cada planta de guayusa fueron agrupadas por morfotipos [68] de acuerdo a color, tamaño y forma. Tanto las esporas viables (vivas) como las no viables (muertas) fueron contabilizadas.

El 10% de cada morfotipo de esporas fue visualizado en un microscopio óptico a 40x [68]. Las esporas de los HMA recibieron una clasificación taxonómica hasta nivel de género, empleando como referencia el manual de Méndez-Cortés [69] y la base de datos del INVAM [70]. La abundancia relativa de géneros de HMA fue obtenida a partir del número de esporas de cada género dividido para el total de esporas. El 90% restante de esporas fue preservado en glicerol al 50% a -80°C para la extracción de ADN fúngico.

2.7 Extracción de ADN metagenómico de esporas de HMA y raicillas de guayusa

Para la extracción de ADN metagenómico se usó el kit comercial Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA), con modificaciones para favorecer la degradación de la pared celular de los hongos. Se usó un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc.), acorde con las especificaciones de la casa comercial, para determinar la cantidad y calidad de ADN metagenómico extraído.

2.8 Secuenciación Illumina MiSeq

Para general los amplicones de los HMA se enviaron 21.7-28.6 ng/ μ l de ADN metagenómico a GENEWIZ[®] para la secuenciación y la preparación de bibliotecas de NGS. Genewiz empleó los primers forward F: 5'-GTGAATCATCGARTC-3', y reverse R: 5'-TCCTCCGCTTATTGAT-3' (GENEWIZ, Inc., South Plainfield, NJ, USA), para amplificar la región universal ITS2 (barcoding universal de hongos), añadiendo adaptadores a los primers para amplificar uniformemente las librerías. La validación de las librerías de ADN fue realizada en el Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) y cuantificadas con el fluorómetro Qubit 2.0. Estas librerías fueron multiplexadas y cargadas en el secuenciador MiSeq de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial (Illumina, San Diego, CA, USA).

La secuenciación tuvo una configuración de extremos emparejados 2x300/250; y el análisis de imágenes y llamado de bases fueron realizados con el software de control MiSeq (MCS) acoplado al instrumento MiSeq. Se secuenciaron por duplicado cada muestra de raicillas de guayusa y una muestra de esporas de HMA para generar un total de 9 muestras secuenciadas.

2.9 Análisis bioinformático

La calidad de las secuencias (fastq) demultiplexadas fue verificada con el software FastQC versión 0.11.5 [46]. Las secuencias fastq fueron importadas en QIIME 2 (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2*) versión 2020-11 [47], y fueron procesadas de acuerdo a uno de los flujos de trabajo establecido en la página web de QIIME: los primers fueron removidos, las secuencias fueron ensambladas si cumplían con mínimo de 20 pares de base de solapamiento, y se estableció un mínimo de calidad por base de Q=20. Luego, estas secuencias fueron dereplicadas, agrupadas *de novo* para formar OTUs (Operational Taxonomic Units) con un 97% de similitud. Todas las secuencias quimeras fueron removidas [71].

Los dos productos generados en el QIIME 2 (matriz de observación biológica (tabla biom) y las secuencias de hongos (formato fastq)) fueron exportados para posteriores análisis. Se usó el clasificador taxonómico RDP (Ribosomal Data Project) [72] versión 2.13 (Julio 2020) para asignar taxonómicamente las secuencias de HMA exportadas de QIIME 2. Se utilizó un umbral de confianza del 70% de acuerdo con la metodología usada por Shi et al [73] y se seleccionó la base de datos Warcup training set V2 [74].

Las secuencias que no recibieron asignación taxonómica hasta nivel de géneros de HMA fueron alineadas usando BLAST(nt) del NCBI (National Center of Biotechnology Information) [75], excluyendo del análisis a las muestras ambientales. Las secuencias recibieron la clasificación taxonómica de acuerdo a los resultados con mayor puntaje producido luego del alineamiento [76].

Luego de la clasificación taxonómica, la tabla biom y las secuencias fastq fueron importadas al programa estadístico R (versión 4.1.0) [77] para analizar la composición de

los hongos asociados a *I. guayusa*. Las muestras réplica fueron agrupadas para formar 1 muestra por cada planta de guayusa y 1 de esporas de HMA. La composición de OTUs de HMA fue evaluado a través del paquete “phyloseq” [78] luego de extraer todas las secuencias de HMA del total de las secuencias ITS2 de hongos.

Se seleccionó el método de unión de vecinos para generar el árbol filogenético con las secuencias ITS2 de HMA. El árbol filogenético fue construido con el programa MEGA versión 10.2.5, empleando 1000 réplicas para generar valores de bootstrap, de acuerdo con la metodología de Yang y colaboradores [79]. La taxa central de HMA de *I. guayusa* fue filtrada de la taxa original con la condición de que cada OTU tenga al menos 5 secuencias asignadas [80], y que esté presente en al menos una planta de guayusa.

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1 Características químicas y físicas del suelo

El análisis físico y químico de las muestras de suelo determinó que el sitio de estudio posee un pH ácido (4.7 ± 0.1), textura de arena franca, y posee bajas concentraciones en la mayoría de los nutrientes primarios y secundarios (Anexo 2), entre ellos el P (< 2.0 ppm), K (0.8 ± 0.1) meq/100 g y S (< 5.0 ppm).

3.2 Colonización de HMA en raíces de guayusa

Las plantas de guayusa presentaron las estructuras características de la colonización por HMA, incluyendo hifas, esporas, vesículas, y arbusculos (Figura 4), y una frecuencia de colonización total mínima de 44.5 ± 9.1 (Anexo 3). Los arbusculos fueron observados en las 4 plantas de guayusa, con una frecuencia de colonización superior al 45% (Tabla 1). Tomando como referencia los porcentajes mínimos de la frecuencia de colonización total

y el de arbuscúlos (<15% y <5%, respectivamente) reportados en la literatura [48], y la escasa o nula presencia de arbuscúlos en las plantas no hospedadoras de HMA [49], se descartó que las plantas de guayusa posean una colonización rudimentaria (MAR). El morfotipo de colonización observado en las raicillas de guayusa correspondió al tipo intermedio [17] (Figura 4) que es característico en plantas hospedadoras de HMA [49], aunque dicho morfotipo difiere del morfotipo *Paris* que coloniza el resto de plantas pertenecientes a la familia Aquifoliaceae [50–53].

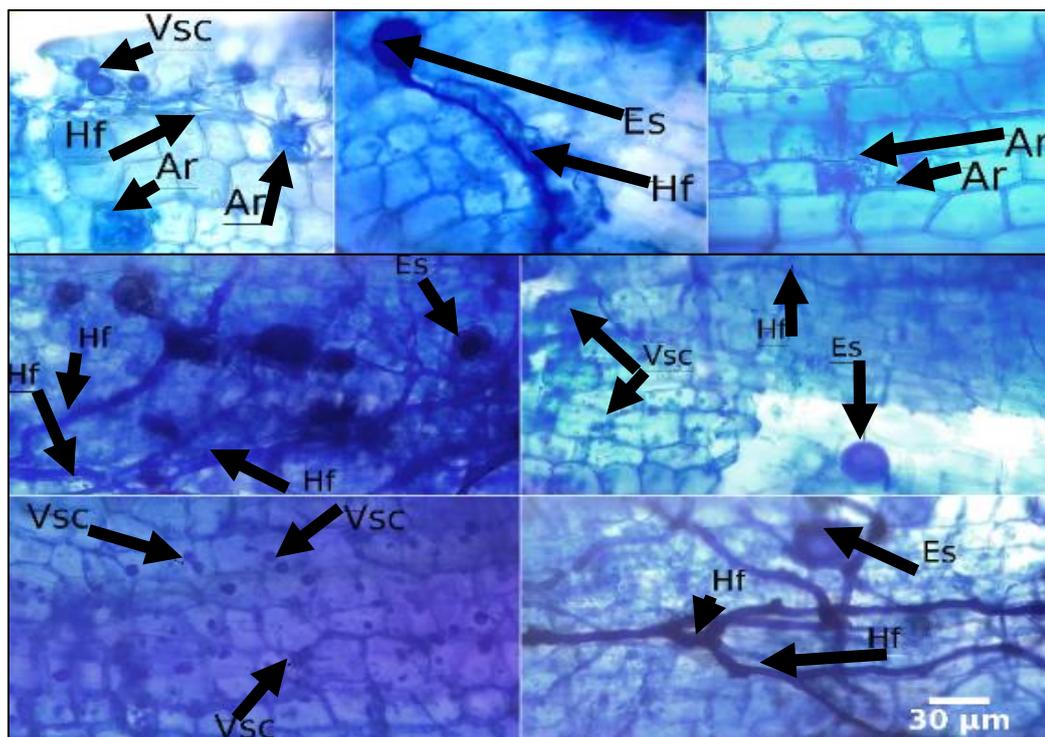


Figura 4. Colonización de HMA en las raicillas de *I. guayusa*. Las flechas señalan hifas (Hf), esporas (Es), vesículas (Vsc), y arbuscúlos (Ar). Las hifas y las esporas colonizaron el exterior de las células corticales, mientras que los arbuscúlos y vesículas colonizaron el interior (morfotipo intermedio [17]). No se observó las espirales de hifas y arbuscúlos características del morfotipo *Paris* [17].

Tabla 1. Colonización de hifas, vesículas y arbuscúlos de HMA en *I. guayusa*.

Plantas	Hifas (n=3)	Vesículas (n=3)	Arbuscúlos (n=3)
---------	-------------	-----------------	------------------

G1	77.8 ± 6.9	35.6 ± 5.1	52.2 ± 8.4
G2	84.6 ± 13.5	37.8 ± 6.9	51.1 ± 23.4
G3	53.3 ± 10.0	50.0 ± 8.8	30.0 ± 12.0
G4	75.6 ± 6.9	56.7 ± 8.8	54.4 ± 17.1
Total	72.8 ± 14.8	45.0 ± 11.2	46.9 ± 17.3

3.3 Abundancia de esporas de HMA en la rizósfera de *I. guayusa*

Se aislaron exitosamente un total de 1278 esporas de HMA de la rizósfera de las plantas de guayusa. A partir de las 709 esporas viables, 71 (10%) (Anexos 4-6) fueron montadas en los portaobjetos para identificar su taxón hasta nivel de género (Figuras 5-10). La densidad de las esporas de HMA (59.0 ± 27.0 esporas/100 g de suelo) identificado en la rizósfera de *I. guayusa* fue comparable con la densidad de esporas identificada en los bosques prístinos de Brasil (<50 esporas/100 g de suelo) [33] y de dos sitios de bosque de la Amazonía de Colombia [34] (46 y 55 esporas/100 g de suelo).

3.4 Identificación morfológica de esporas de HMA

Un total de 6 géneros de HMA fueron identificados en *I. guayusa* (Figura 5), de los cuales, el género *Glomus* (62.0%) y la familia Glomeracea (70.4%) presentaron la mayor abundancia relativa. Los géneros *Glomus* y *Acaulospora* fueron observados en las 4 plantas de guayusa muestreadas (Figuras 6-10). La superioridad en la abundancia relativa de las

esporas de familia Glomeraceae sobre las demás familias de HMA, seguida de la familia Acaulosporaceae, ha sido reportada también en bosques prístinos, secundarios, y en sistemas agroforestales en la región Amazónica del oeste de Brasil [33].

Entre los morfotipos de esporas que no pudieron ser clasificadas taxonómicamente (~10%), destaca el grupo de esporas de color púrpura (Anexo 7) debido a que el color característico que poseen no fue encontrado en los registros taxonómicos del INVAM [70].

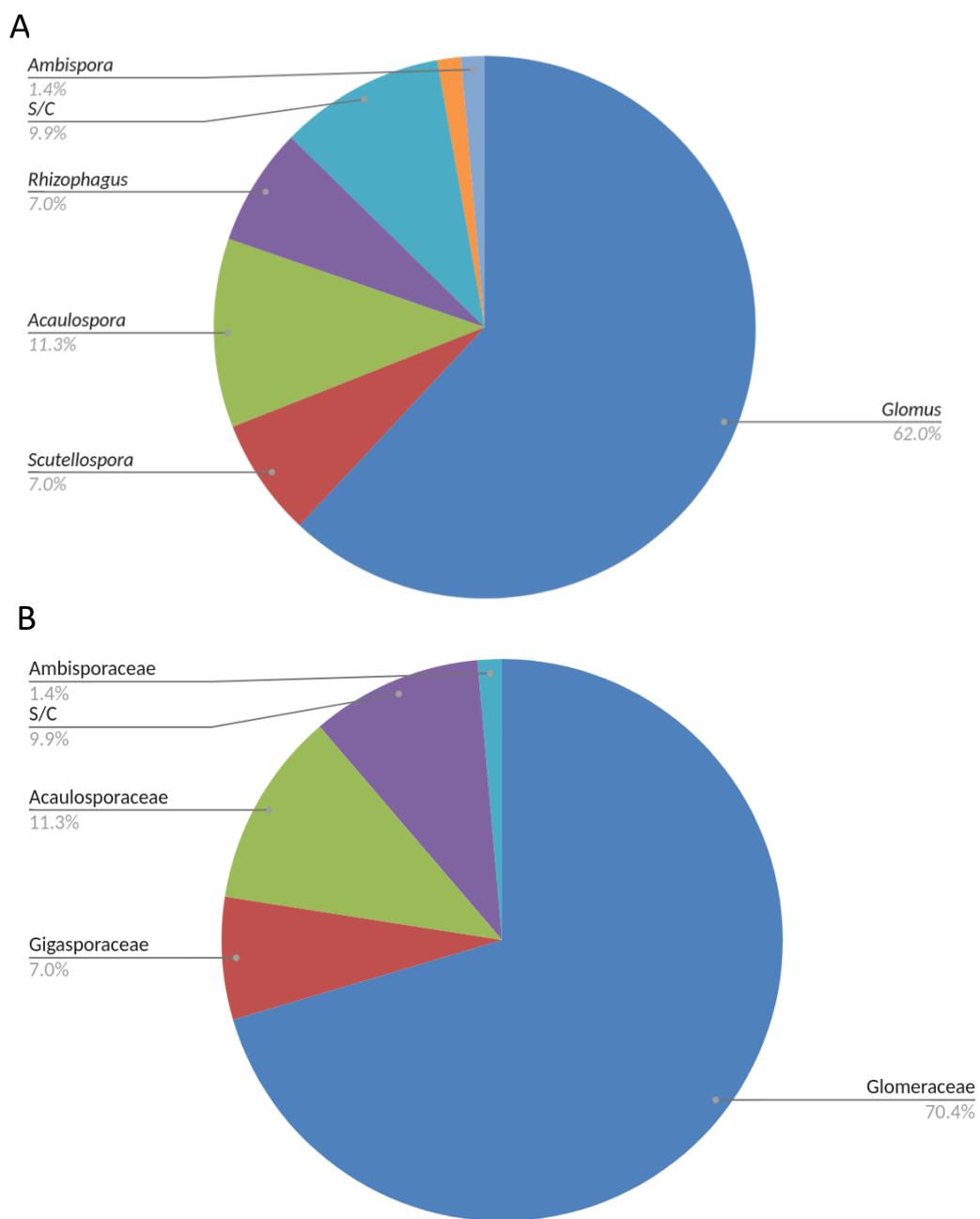


Figura 5. Abundancia relativa de los A) géneros y B) familias de HMA en *I. guayusa*.



Figura 6. Esporas de HMA aisladas de la rizósfera de la planta de guayusa G1. Microscopio óptico 40X. Géneros *Septoglonus* sp. (A), *Scutellospora* sp. (B), *Rhizophagus* sp. (C), *Glomus* spp. (D-F,H,K-M), *Acaulospora* spp (E,G,I).

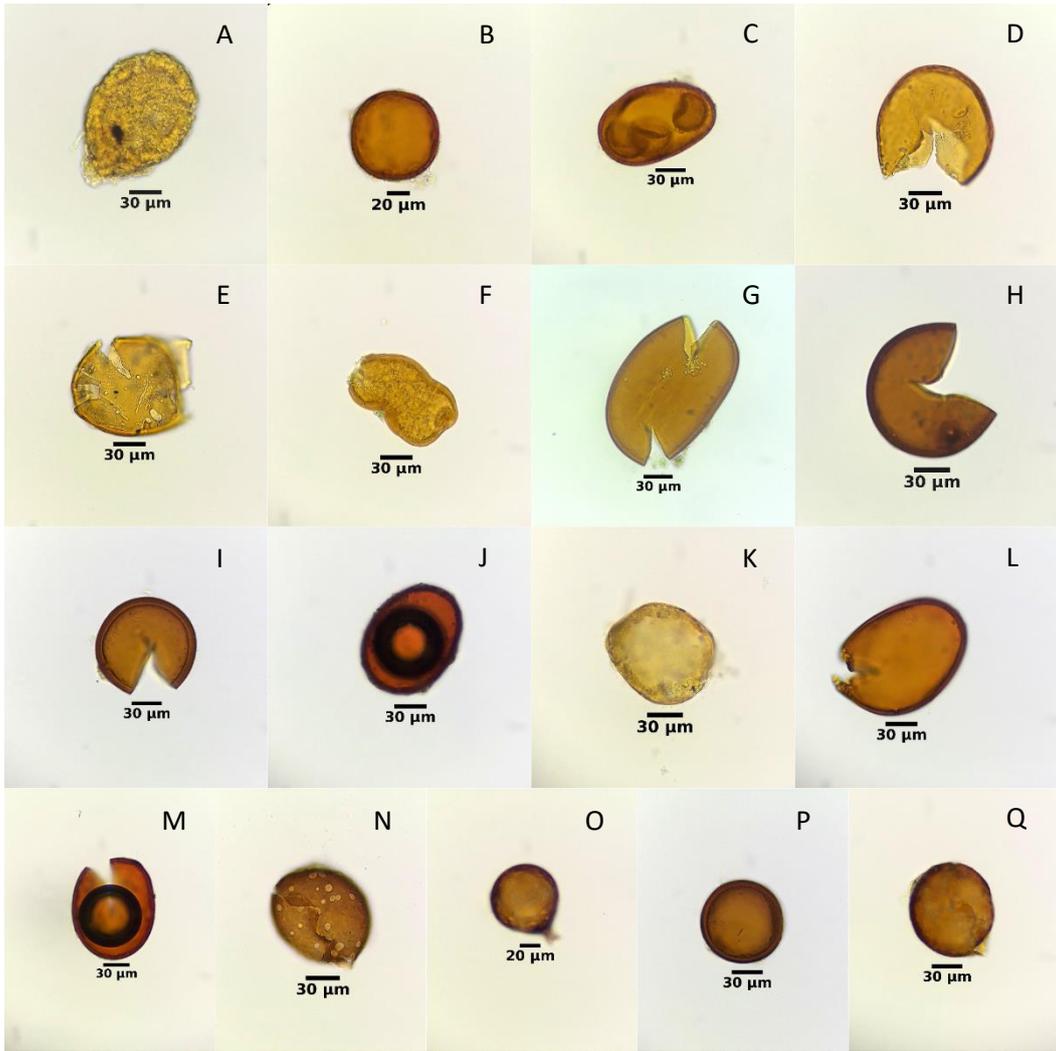


Figura 7. Continuación de las esporas de HMA aisladas de la rizósfera de la planta de guayusa G1. Microscopio óptico 40X. Géneros *Ambispora* sp. (A), *Glomus* spp. (B-C, I-J, L-Q), *Acaulospora* sp. (F), *Rhizophagus* spp (D-E).

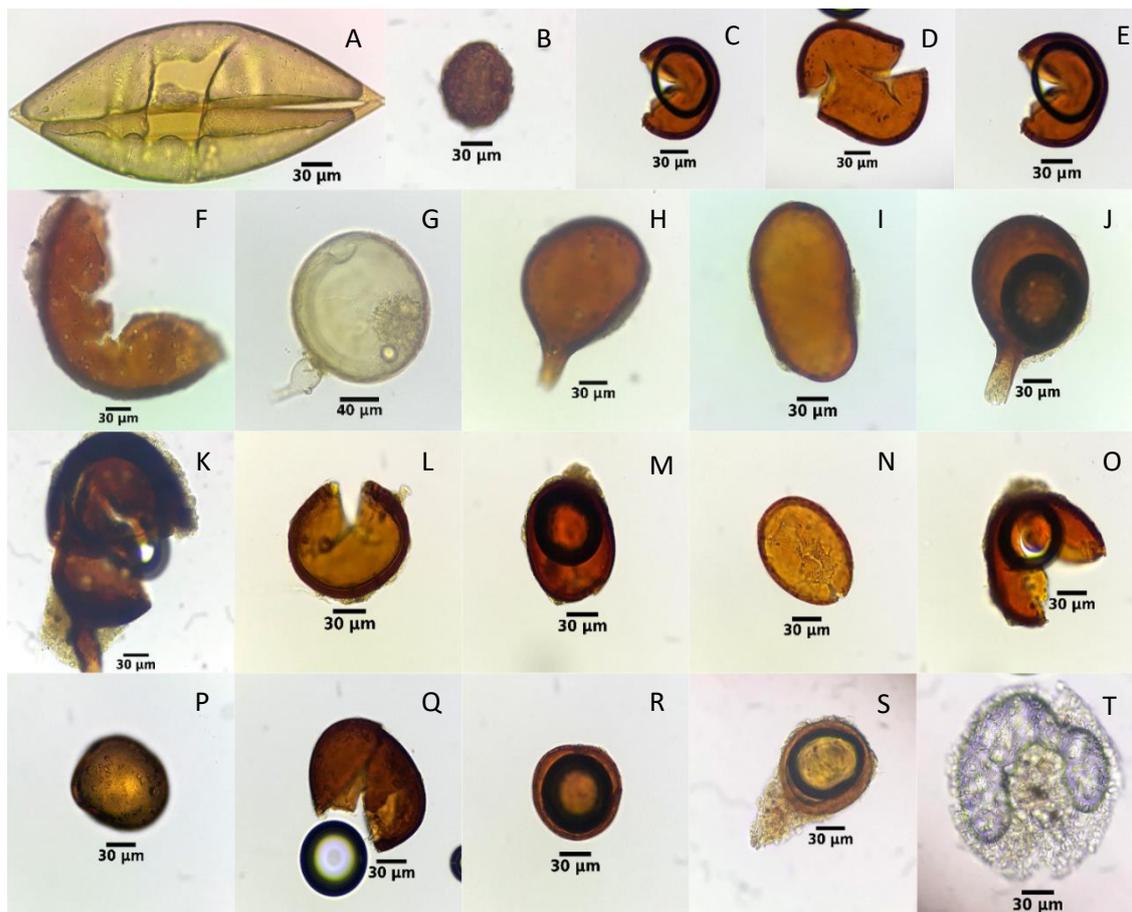


Figura 8. Esporas de HMA aisladas de la rizósfera de la planta de guayusa G2. Microscopio óptico 40X. Géneros *Scutellospora* spp. (A y G), sin clasificación (B), *Glomus* spp. (C-F,H,J-M,O,Q-S), *Rhizophagus* spp. (N y T).

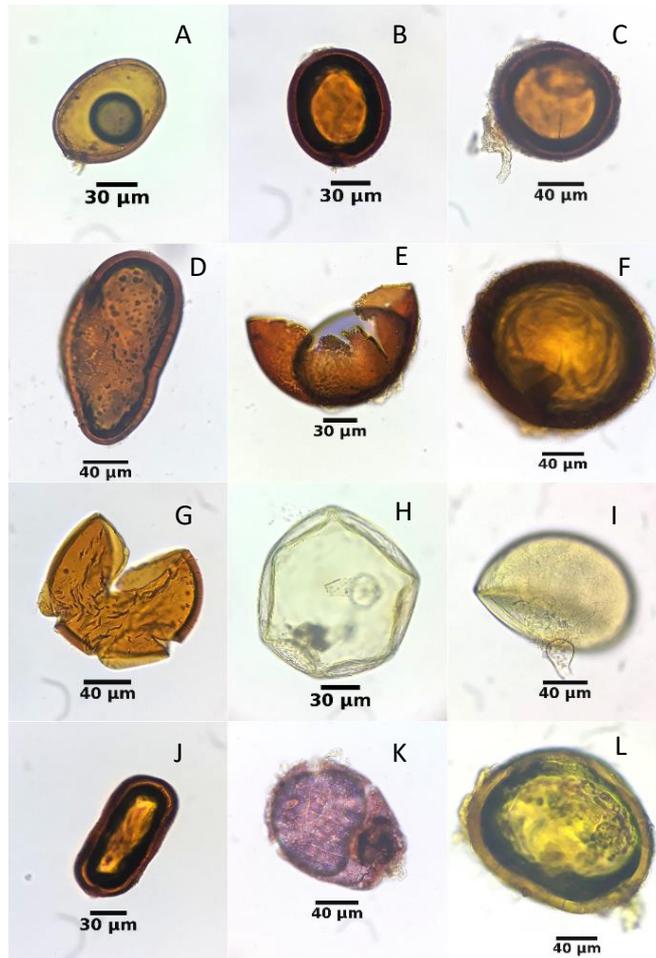


Figura 9. Esporas de HMA aisladas de la rizósfera de la planta de guayusa G3. Microscopio óptico 40X. Géneros *Glomus* spp. (A-C, E-G y J), *Acaulospora* sp. (H), *Scutellospora* sp. (I), sin clasificación (F, K y L).

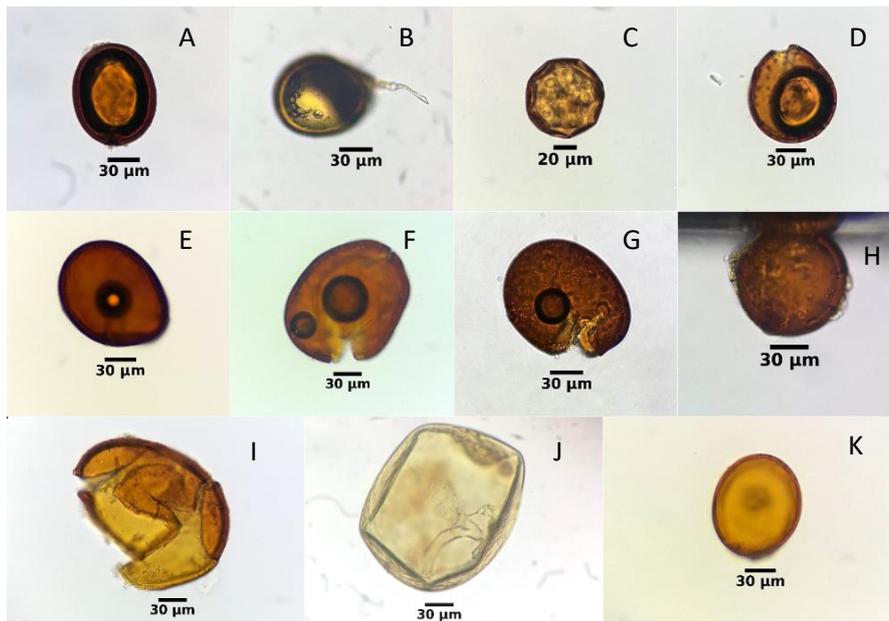


Figura 10. Esporas de HMA aisladas de la rizósfera de la planta de guayusa G4. Microscopio óptico 40X. Géneros *Glomus* spp. (A,D-I), *Acualospora* sp. (J), *Rhizophagus* sp. (K), sin clasificación (B y C).

3.4 Análisis molecular de la composición de HMA en *I. guayusa*

1.553.902 secuencias nucleotídicas ITS-2 permanecieron posterior al proceso de limpieza y ensamblaje realizado en QIIME2 (Anexos 8-10). 697.385 secuencias fueron asignadas al dominio de los hongos, de las cuales 9.389 (1.4 %) fueron clasificadas como secuencias del Phylum *Glomeromycota* (Anexo 11). La escasa abundancia relativa de secuencias ITS-2 de HMA obtenida en el presente estudio, en comparación con el total de secuencia de hongos, ha sido reportado previamente por los autores Tedersso et al. [81] (0.2 % en muestras de suelo) y Bergottini et al. [23] (0.1-33.8 % en muestras de raíces de *I. paraguariensis*).

De los 49 OTUs de HMA identificados en muestras de raicillas de guayusa (Figura 11), 36 fueron catalogados como taxas centrales (Anexo 12). 3 de las 5 curvas de rarefacción alcanzaron el nivel de saturación (Figura 12), indicando que estas muestras capturaron toda la riqueza de especies de HMA (número de OTUs), mientras que las 2

curvas restantes estuvieron próximas para alcanzar sus asíntotas.

A nivel molecular no se identificó ninguna taxa de la familia Acaulosporaceae identificada previamente en las esporas, mientras que en las esporas no se identificó ninguna taxa de la familia Diversisporaceae identificada a nivel molecular (Figuras 13 y 5). La abundancia relativa de los únicos géneros identificados en esporas y a nivel molecular varió ampliamente (Figuras 13 y 5). El género *Rhizophagus* tuvo una abundancia relativa 6 veces mayor en comparación con la abundancia relativa en esporas (44.0 vs 7.0 %), mientras que el género *Glomus* presentó abundancia relativa 9 veces menor en comparación con las esporas (6.8 % vs 62.0 %).

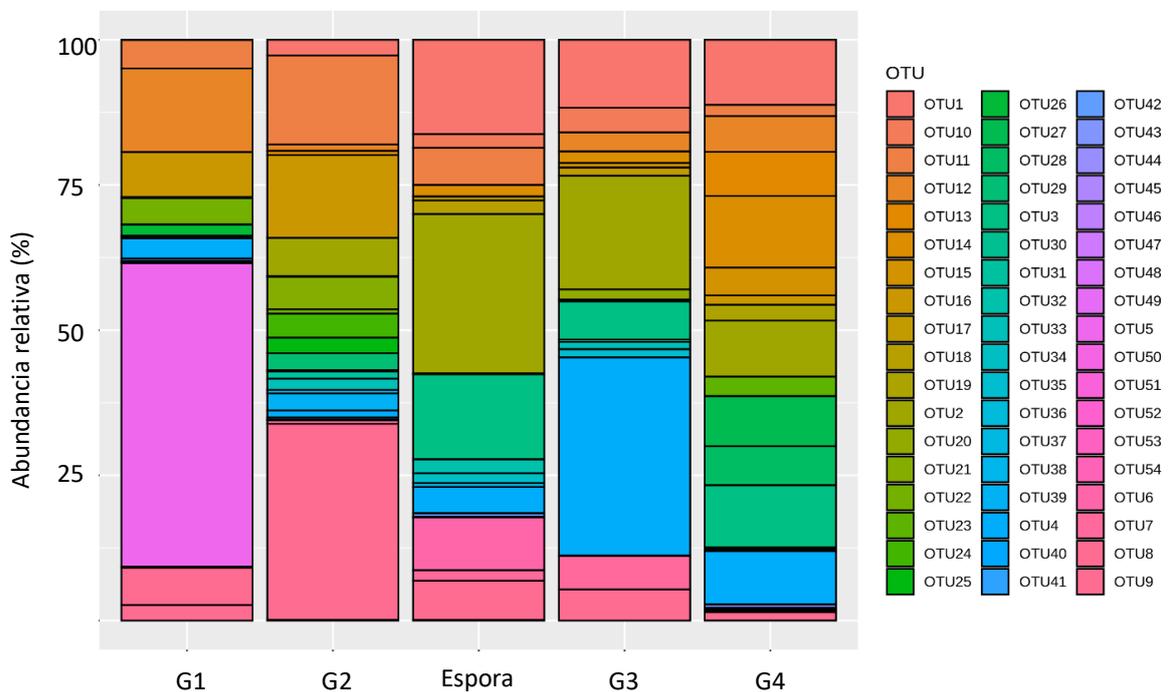


Figura 11. Abundancia relativa de los OTUs de HMA identificados en *I. guayusa*.

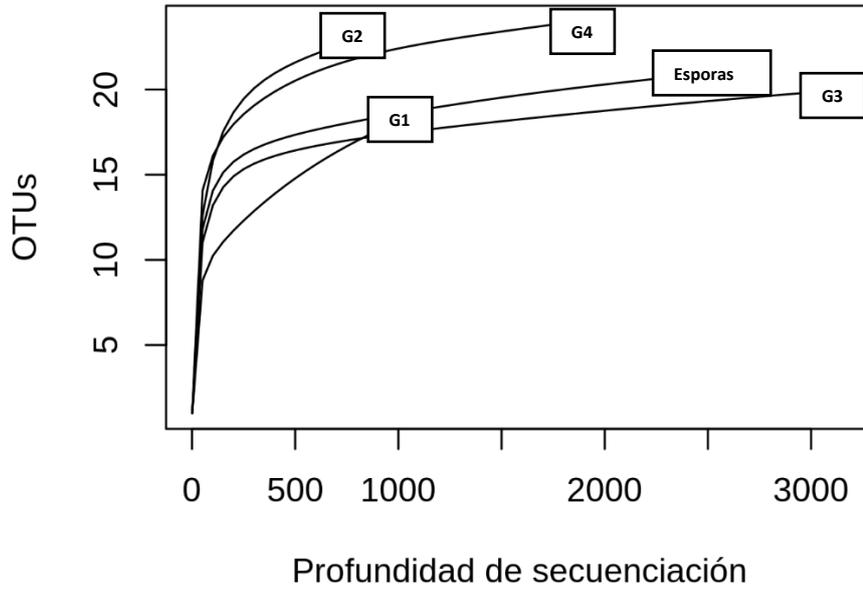


Figura 12. Curva de rarefacción de la riqueza de especies de HMA (números de OTUs) en función al número de secuencias (profundidad de secuenciación).

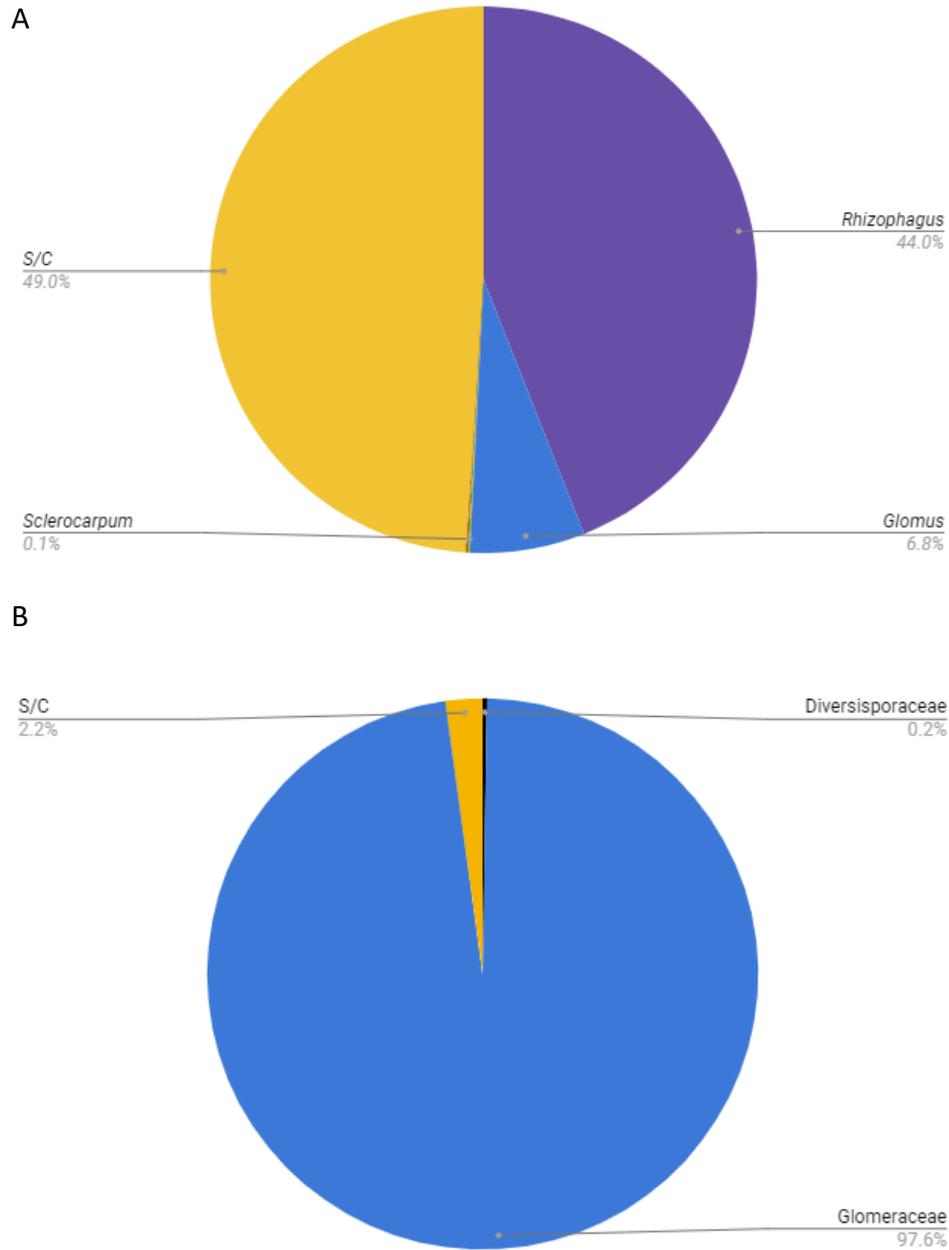


Figura 13. Abundancia relativa de los A) géneros y B) familias de HMA en *I. guayusa* a nivel molecular. Solo los géneros con abundancia relativa $\geq 0.1\%$ fueron graficados (*Silvaspora* y *Redeckera* $<0.1\%$).

Los clados de la familia Glomeraceae y Diversisporaceae (en color azul y rojo, respectivamente) fueron formados a partir del análisis filogenético (Figura 14). Las secuencias utilizadas como referencia en el árbol filogenético fueron etiquetadas por el código de identificación proporcionado por el NCBI (The National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), seguido del nombre de la especie, mientras

que las secuencias obtenidas en este estudio están etiquetadas por la numeración de los OTUs.

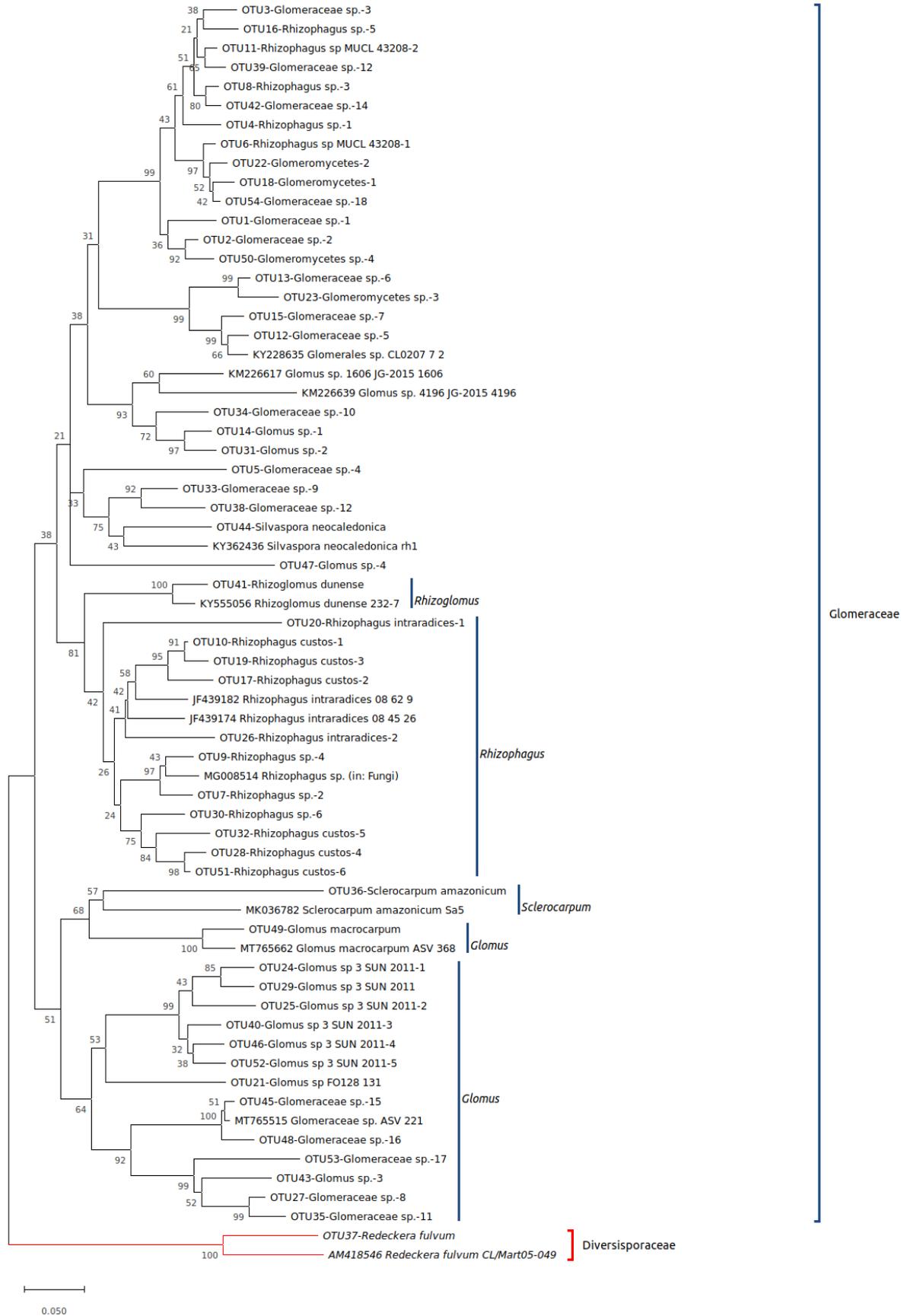


Figura 14. Árbol filogenético de los OTUs de HMA identificados en *I. guayusa*.

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

Los resultados presentados en este estudio son los primeros en acoplar la frecuencia y el morfotipo de colonización endomicorrízica, con la identificación de los HMA presentes en la rizósfera y en las raicillas de las plantas de guayusa. De esta manera, la colonización de HMA en *I. guayusa* queda documentada por primera vez a través de los resultados moleculares y morfológicos proporcionados en esta investigación.

4.1 Esporas de HMA en la rizósfera de *I. guayusa*

La capacidad de las esporas de la familia Glomeraceae por tolerar disturbios ecosistémicos, como los generados por prácticas agrícolas u otras actividades antropogénicas, y por adaptarse a una amplia gama de condiciones edafoclimáticas y ambientales [33,54,82], pueden constituirse como las principales razones por las cuales ésta familia presentó la mayor abundancia relativa en la rizósfera de las planta de guayusa (Figura 5). La superior abundancia relativa de esta familia es reportada no sólo en varios biomas de Sur América [32] y en la región Amazónica [33,34], sino también en las regiones paleárticas [83] y en bosques subtropicales de China [84]. Otra razón que sustenta la superior abundancia relativa de esta familia en las plantas de guayusa se debe a que sus esporas tienen la habilidad de esporular rápidamente, y la colonización de nuevas plantas huéspedes también ocurre a través de fragmentos de raíces micorrizadas o por la anastomosis de sus hifas [18]. Todos estos aspectos generan que los HMA de esta familia presenten una variedad de nichos óptimos [39].

A diferencia de los HMA de la familia Glomeraceae, los HMA de la familia Acaulosporaceae tienen una distribución limitada y ocurre principalmente en áreas protegidas y en ambientes naturales, reportándose que tiene dominancia sobre la familia

Glomeraceae sólo en las regiones naturales protegidas [85] o en regiones frías de Sur América [35,36]. Esto ocurre probablemente porque la colonización de los HMA de la familia Acaulosporaceae ocurre únicamente a través de la germinación de las esporas y no por fragmentos de raíces micorrizadas [18] y porque esta familia presentan un nicho óptimo que presenta una temperatura <10 °C [39]. Estos factores quizás hayan limitado a que las esporas de esta familia hayan presentado una abundancia relativa menor en la rizósfera de las plantas de guayusa en comparación con la familia Glomeraceae (Figura 5).

4.2 HMA en el interior de las raicillas de *I. guayusa*

La inconsistencia para corresponder las taxas de HMA identificadas en la rizósfera de las plantas de guayusa (Figura 5) con las taxas identificadas en sus raíces (Figura 13) ha sido señalado en previos estudios que han acoplado el análisis morfológico de esporas con el análisis molecular [86,87]. Uno de los aspectos que explican dichas inconsistencias radica en que las esporas de HMA suspendidas en la rizósfera de la planta huésped proporcionan una visión parcial de los HMA que en realidad colonizan el interior de las raíces de la planta huésped [88].

Por otro lado, los autores Chamkhi y colaboradores [87] señalan que la identificación taxonómica puede constituir en un limitante debido a que las esporas de los HMA que corresponden a una misma taxa pueden presentar distintas formas y colores [89]. Además, se requiere de alta experticia para asignar una clasificación taxonómica debido a las escasas estructuras discriminantes que poseen las esporas de los HMA [87]. Estos motivos probablemente hayan limitado la precisión en la clasificación taxonómica que recibieron las esporas de HMA aisladas de la rizósfera de *I. guayusa*. Por lo tanto, es probable que la identificación molecular de los HMA (Figura 13) que colonizan a esta planta

haya representado de mejor manera a la comunidad de HMA asociados a las plantas de guayusa.

Sin embargo, aunque la comunidad de los HMA puede describirse con mayor precisión a través de la secuenciación NGS [87], ningún OTU de la familia Acaulosporaceae fue identificado en las muestras de *I. guayusa*, ni en la muestra de esporas que también fue secuenciada (Anexo 12). Esta limitación ha sido reportada cuando se emplean los marcadores de las regiones ITS-2 o LSU rDNA para describir las comunidades de HMA, identificando que la secuenciación de estas regiones genera un fuerte sesgo hacia la familia Glomeraceae [90,91]. Este aspecto es congruente con la posible sobrerrepresentación de la abundancia relativa de la familia Glomeraceae en las raicillas de guayusa (Figura 13). A pesar del posible sesgo que genera la amplificación de la región ITS-2, la riqueza de OTUs que produce puede ser similar que la obtenida por primers específicos de HMA [91]. Por lo tanto, es probable que la riqueza de OTUs identificada en cada planta de guayusa haya sido correctamente representada.

4.3 Colonización de HMA en *I. guayusa*

La presencia recurrente de los arbusculos en la colonización de los HMA es necesaria para identificar una posible colonización funcional y descartar una colonización MAR debido a que en los arbusculos es en donde se produce el intercambio de metabolitos, carbohidratos y lípidos durante la simbiosis HMA-planta huésped [17,49,92]. El morfotipo de colonización intermedio y la presencia recurrente de arbusculos en las raicillas (>45.0%) de las plantas de guayusa proporcionan dos evidencias a favor de la hipótesis que predice un morfotipo diferente al producido por las MAR.

Sin embargo, el morfotipo de colonización intermedio identificado en las plantas de

guayusa contrasta con el morfotipo de colonización *Paris* que presentan las plantas de la familia Aquifoliaceae [50–53]. Al respecto, Dickson y colaboradores [17] señalan que las plantas de una misma familia pueden reportar morfotipos diferentes de acuerdo a las familias de HMA que colonicen a la planta huésped. Las plantas de la familia Umbelliferae exhiben el morfotipo de colonización *Paris* cuando son colonizadas por HMA de la familia Gigasporaceae o pueden exhibir el morfotipo intermedio cuando son colonizadas por HMA de la familia Glomeraceae. El morfotipo de colonización de HMA depende no sólo de la identidad de la planta huésped sino también depende de la identidad de los HMA que la colonizan.

Se tomó en cuenta este último aspecto para extender el análisis de los morfotipos de HMA que colonizan a la familia Aquifoliaceae, pero no fue posible comparar entre las comunidades de HMA que colonizan a las plantas de esta familia porque los registros del morfotipo de colonización no han sido complementados con estudios de taxonomía morfológica o molecular de HMA.

4.4 Perspectivas futuras para el estudio de HMA asociados a *I. guayusa*

A partir de las esporas aisladas de la rizósfera de *I. guayusa* se podrían desarrollar futuros cultivos axénicos y establecer el primer banco de HMA autóctonos asociados a *I. guayusa*, bajo el respaldo del Grupo de Microbiología Aplicada de la Universidad Regional Amazónica Ikiám. La identificación morfológica y molecular de los HMA en las plantas de guayusa constituye el punto de partida para explorar la posible funcionalidad de estos endosimbiontes en la relación simbiótica mutualista con estas plantas. En un reciente estudio [93], inóculos de la especie *Rhizophagus intraradices* (presente en las raíces de *I. guayusa* (OTUs 20 y 26) (Anexo 13)) han incrementado significativamente el crecimiento

de la planta huésped. Esto abre la posibilidad de emplear esta especie de HMA como una pieza clave para mejorar el rendimiento de los cultivos de guayusa a través de la fabricación de biofertilizantes basados en HMA.

Los siguientes estudios podrían estar enfocados en fabricar propágulos infectivos (inóculos) que difieran en diversidad de especies, géneros y familias de HMA con el objetivo de identificar a qué grado taxonómico la diversidad podría influir sobre la biomasa, los procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas de *I. guayusa*. Además, los resultados presentados en esta investigación promueven el estudio de los microorganismos presentes en la rizósfera de *I. guayusa* y en otras plantas amazónicas de interés. Los siguientes pasos podrían estar orientados a estudiar las interacciones de los HMA con los microorganismos benéficos del suelo, como las bacterias promotoras de crecimiento vegetal, fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fósforo.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A pesar que la clasificación taxonómica clásica y la detección molecular, a partir de la secuenciación NGS de la región ITS-2, probablemente limitaron la correspondencia entre las tasas de HMA que habitan fuera y dentro de las plantas de guayusa, es probable que no todas las tasas de los HMA que habitan en la rizósfera de *I. guayusa* colonicen el interior de sus raicillas. La clasificación taxonómica clásica de esporas debería reemplazarse por técnicas de secuenciación que se apliquen individualmente a cada espora para mejorar la precisión en la clasificación. Además, se desaconseja la secuenciación NGS de la región ITS-2 en los estudios que prioricen la identificación de HMA a nivel de géneros y familias debido al posible sesgo hacia la familia Glomeraceae.

La predicción del morfotipo de colonización diferente al producido por MAR resultó

congruente en *I. guayusa*. Las plantas de guayusa probablemente presentan una simbiosis mutualista con los HMA debido a la frecuente colonización de los arbusculos (>45%) y a la detección molecular de taxas de HMA en sus raicillas. Sin embargo, para confirmar una colonización endomicorrízica funcional en las plantas de guayusa se requiere de un análisis molecular más exhaustivo que vaya más allá del análisis de ausencia y presencia de estos endosimbiontes.

Finalmente, es posible que el sitio de muestreo de la comunidad San Salvador haya presentado las condiciones abióticas ideales para establecer, principalmente, a las esporas de la familia Glomeraceae y Acaulosporaceae. Sin embargo, el limitado número de individuos de guayusa que se empleó en este estudio (n=4) y la selección de un solo punto de muestreo restringen las especulaciones que se puedan generar sobre la presencia de estas dos familias de HMA en el resto de las demás plantas de guayusa establecidas en la comunidad muestreada.

REFERENCIAS

1. Schüßler A, Schwarzott D, Walker C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution. *Mycol Res.* 2001;105: 1413–1421. doi:10.1017/S0953756201005196
2. Berbee ML, Taylor JW. *Fungal Molecular Evolution: Gene Trees and Geologic Time. Systematics and Evolution.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2001. pp. 229–245. doi:10.1007/978-3-662-10189-6_10
3. Heckman DS, Geiser DM, Eidell BR, Stauffer RL, Kardos NL, Hedges SB. Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science (80-).* 2001;293. doi:10.1126/science.1061457
4. Rich MK, Vigneron N, Liboure C, Keller J, Xue L, Hajheidari M, et al. Lipid exchanges drove the evolution of mutualism during plant terrestrialization. *Science (80-).* 2021;372: 864–868. doi:10.1126/science.abg0929
5. Genre A, Lanfranco L, Perotto S, Bonfante P. Unique and common traits in mycorrhizal symbioses [Internet]. *Nature Reviews Microbiology. Nature Research;* 2020. pp. 649–660. doi:10.1038/s41579-020-0402-3
6. Igiehon NO, Babalola OO. Biofertilizers and sustainable agriculture: exploring arbuscular mycorrhizal fungi [Internet]. *Applied Microbiology and Biotechnology.* Springer Verlag; 2017. pp. 4871–4881. doi:10.1007/s00253-017-8344-z
7. Wang Z-G, Bi Y-L, Jiang B, Zhakypbek Y, Peng S-P, Liu W-W, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance soil carbon sequestration in the coalfields, northwest China OPEN. *Nat Publ Gr.* 2016; doi:10.1038/srep34336
8. Das S, Baum C, Kremer RJ, Sosa-Hernández MA, Leifheit EF, Ingraffia R, et al. Subsoil Arbuscular Mycorrhizal Fungi for Sustainability and Climate-Smart Agriculture: A Solution Right Under Our Feet? 2019;10: 744. doi:10.3389/fmicb.2019.00744
9. Harrier LA, Watson CA. The role of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable cropping systems. *Adv Agron.* 2003;79: 185–225. doi:10.1016/S0065-2113(02)79004-4
10. Akiyama K. Chemical Identification and Functional Analysis of Apocarotenoids Involved in the Development of Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007;71: 1405–1414. doi:10.1271/BBB.70023
11. Pepe A, Giovannetti M, Sbrana C. Lifespan and functionality of mycorrhizal fungal mycelium are uncoupled from host plant lifespan. *Sci Rep.* 2018;8: 10235. doi:10.1038/s41598-018-28354-5
12. Parihar M, Rakshit A, Meena VS, Gupta VK, Rana K, Choudhary M, et al. The potential of arbuscular mycorrhizal fungi in C cycling: a review [Internet]. *Archives of Microbiology.* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2020. pp. 1581–1596. doi:10.1007/s00203-020-01915-x
13. Kretzschmar T, Kohlen W, Sasse J, Borghi L, Schlegel M, Bachelier JB, et al. A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nat* 2012 4837389. 2012;483: 341–344. doi:10.1038/nature10873

14. Gutjahr C, Parniske M. Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis [Internet]. Annual Review of Cell and Developmental Biology. Annual Reviews ; 2013. pp. 593–617. doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122413
15. Sathiyadash K, Rajendran K, Karthikeyan V, Muthukumar T. Modulation of plant micronutrient uptake by arbuscular mycorrhizal fungi. Probiotics and Plant Health. Singapore: Springer Singapore; 2017. pp. 337–352. doi:10.1007/978-981-10-3473-2_14
16. Willis A, Rodrigues BF, Harris PJC. The Ecology of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. <https://doi.org/10.1080/073526892012683375>. 2012;32: 1–20. doi:10.1080/07352689.2012.683375
17. Dickson S. The Arum-Paris continuum of mycorrhizal symbioses. New Phytol. 2004;163: 187–200. doi:10.1111/J.1469-8137.2004.01095.X
18. Giovannetti M, Avio L, Sbrana C. Fungal spore germination and pre-symbiotic mycelial growth - Physiological and genetic aspects. Arbuscular Mycorrhizas Physiol Funct. 2010; 3–32. doi:10.1007/978-90-481-9489-6_1
19. Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture [Internet]. Canberra; 1995. Available: <https://www.aciar.gov.au/publication/working-mycorrhizas-forestry-and-agriculture>
20. McGonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL, Swan JA. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular—arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol. 1990;115: 495–501. doi:10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x
21. Gerdemann JW, Nicolson TH. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Trans Br Mycol Soc. 1963;46: 235–244. doi:10.1016/s0007-1536(63)80079-0
22. Oulas A, Pavludi C, Polymenakou P, Pavlopoulos GA, Papanikolaou N, Kotoulas G, et al. Metagenomics: Tools and Insights for Analyzing Next-Generation Sequencing Data Derived from Biodiversity Studies: <https://doi.org/10.4137/BBI.S12462>. 2015;9: 75–88. doi:10.4137/BBI.S12462
23. Bergottini VM, Hervé V, Sosa DA, Otegui MB, Zapata PD, Junier P. Exploring the diversity of the root-associated microbiome of *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Yerba Mate). Appl Soil Ecol. 2017;109: 23–31. doi:10.1016/J.APSOIL.2016.09.013
24. Salvioli di Fossalunga A, Novero M. To trade in the field: the molecular determinants of arbuscular mycorrhiza nutrient exchange [Internet]. Chemical and Biological Technologies in Agriculture. Springer International Publishing; 2019. pp. 1–12. doi:10.1186/s40538-019-0150-7
25. Augé RM. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis [Internet]. Mycorrhiza. 2001. pp. 3–42. doi:10.1007/s005720100097
26. Birhane E, Sterck FJ, Fetene M, Bongers F, Kuyper TW. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance photosynthesis, water use efficiency, and growth of frankincense seedlings under pulsed water availability conditions. Oecologia. 2012;169: 895–904.

doi:10.1007/s00442-012-2258-3

27. Evelin H, Kapoor R, Giri B. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: A review [Internet]. *Annals of Botany*. Oxford Academic; 2009. pp. 1263–1280. doi:10.1093/aob/mcp251
28. Turnau K, Ryszka P, Wojtczak G. Metal tolerant mycorrhizal plants: A review from the perspective on industrial waste in temperate region. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Springer Netherlands; 2010. pp. 257–276. doi:10.1007/978-90-481-9489-6_12
29. Sikes BA, Cottenie K, Klironomos JN. Plant and fungal identity determines pathogen protection of plant roots by arbuscular mycorrhizas. *J Ecol*. 2009;97: 1274–1280. doi:10.1111/j.1365-2745.2009.01557.x
30. Morris EK, Morris DJP, Vogt S, Gleber SC, Bigalke M, Wilcke W, et al. Visualizing the dynamics of soil aggregation as affected by arbuscular mycorrhizal fungi. *ISME J*. 2019;13: 1639–1646. doi:10.1038/s41396-019-0369-0
31. Chen M, Arato M, Borghi L, Nouri E, Reinhardt D. Beneficial services of arbuscular mycorrhizal fungi – from ecology to application. *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Media S.A.; 2018. doi:10.3389/fpls.2018.01270
32. Cofré MN, Soteras F, del Rosario Iglesias M, Velázquez MS, Abarca C, Risio L, et al. Biodiversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in South America: A Review. In: Pagano MC, Lugo MA, editors. *Mycorrhizal Fungi in South America*. 1st ed. Springer International Publishing; 2019. pp. 49–72. doi:10.1007/978-3-030-15228-4_3
33. Stürmer SL, Siqueira JO. Species richness and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi across distinct land uses in Western Brazilian Amazon. *Mycorrhiza*. 2011;21: 255–267. doi:10.1007/s00572-010-0330-6
34. Peña-Venega CP, Cardona GI, Arguelles JH, Arcos AL. Micorrizas Arbusculares del Sur de la Amazonia Colombiana y su Relación con Algunos Factores Físicoquímicos y Biológicos del Suelo. 2007;37: 327–326.
35. Velázquez MS, Stürmer SL, Bruzone C, Fontenla S, Barrera M, Cabello M. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in high altitude sites of the Patagonian Altoandina region in Nahuel Huapi National Park (Argentina). *Acta Bot Brasilica*. 2016;30: 521–531. doi:10.1590/0102-33062016abb0223
36. Velázquez M-S, Fabisik J-C, Barrera M, Allegrucci N, Valdés F-E, Abarca C-L, et al. Diversity and abundance of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) associated with *Ilex paraguarensis* in Northeastern Argentina. *Rev Biol Trop*. 2020;68: 1231–1240. doi:10.15517/RBT.V68I4.41543
37. Davison J, Moora M, Öpik M, Adholeya A, Ainsaar L, Bâ A, et al. Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science* (80-). 2015;349: 970–973. doi:10.1126/SCIENCE.AAB1161
38. Lekberg Y, Waller LP. What drives differences in arbuscular mycorrhizal fungal communities among plant species? *Fungal Ecol*. 2016;24: 135–138. doi:10.1016/J.FUNECO.2016.05.012
39. Davison J, Moora M, Semchenko M, Adenan SB, Ahmed T, Akhmetzhanova AA, et al.

- Temperature and pH define the realised niche space of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 2021;231: 763–776. doi:10.1111/NPH.17240
40. Loizeau PA, Barriera G, Manen JF, Broennimann O. Towards an understanding of the distribution of *Ilex* L. (Aquifoliaceae) on a world-wide scale. *Plant Divers Complex patterns local, Reg Glob Dimens Proc an Int Symp held R Danish Acad Sci Lett Copenhagen, Denmark, 25-28 May, 2003.* 2005; 501–520.
 41. Dueñas JF, Jarrett C, Cummins I, Logan–Hines E. Amazonian *Guayusa* (*Ilex guayusa* Loes.): A Historical and Ethnobotanical Overview. *Econ Bot.* 2016;70: 85–91. doi:10.1007/s12231-016-9334-2
 42. Sequeda-Castañeda LG, Modesti Costa G, Celis C, Gamboa F, Gutiérrez S, Luengas P. *Ilex guayusa* Loes. (Aquifoliaceae): Amazon and andean native plant. *Pharmacologyonline.* 2016;3: 193–202.
 43. Krause T, Ness B. Energizing agroforestry: *Ilex guayusa* as an additional commodity to diversify amazonian agroforestry systems. *Int J Biodivers Sci Ecosyst Serv Manag.* 2017;13: 191–203. doi:10.1080/21513732.2017.1303646
 44. Wilfredo F, Aguinaga A, Astudillo D, Rocio A. *Guayusa* , Reto Y Oportunidad [Internet]. Universidad Regional Amazónica Ikiam-AECID; 2019. Available: https://www.researchgate.net/publication/333560733_GUAYUSA_RETO_Y_OPORTUNIDAD
 45. Wise G, E. Santander D. Assessing the History of Safe Use of *Guayusa*. *J Food Nutr Res.* 2018;6: 471–475. doi:10.12691/jfnr-6-7-8
 46. PRO-ECUADOR. Ficha de *Guayusa* – PRO ECUADOR. In: Gobierno del Encuentro [Internet]. 2017 [cited 4 Jul 2021] p. 1. Available: <https://www.proecuador.gob.ec/ficha-de-guayusa/>
 47. Wang B, Qiu YL. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants [Internet]. *Mycorrhiza.* Springer; 2006. pp. 299–363. doi:10.1007/s00572-005-0033-6
 48. Lekberg Y, Rosendahl S, Olsson PA. The fungal perspective of arbuscular mycorrhizal colonization in “nonmycorrhizal” plants. *New Phytol.* 2015;205: 1399–1403. doi:10.1111/NPH.13118
 49. Cosme M, Fernández I, Van der Heijden MGA, Pieterse CMJ. Non-Mycorrhizal Plants: The Exceptions that Prove the Rule. *Trends Plant Sci.* 2018;23: 577–587. doi:10.1016/J.TPLANTS.2018.04.004
 50. Yamato M, Iwasaki M. Morphological types of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of understory plants in Japanese deciduous broadleaved forests. *Mycorrhiza.* 2002;12: 291–296. doi:10.1007/s00572-002-0187-4
 51. Matekwor Ahulu E, Nakata M, Nonaka M. Arum- and Paris-type arbuscular mycorrhizas in a mixed pine forest on sand dune soil in Niigata Prefecture, central Honshu, Japan. *Mycorrhiza.* 2005;15: 129–136. doi:10.1007/S00572-004-0310-9
 52. Yamato M, Iwase K. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi in a warm-temperate deciduous broad-leaved forest and introduction of the fungal community into the seedlings of indigenous woody plants. *Mycoscience.* 2005;46: 334–342.

doi:10.1007/s10267-005-0256-6

53. Andrade ACS, Queiroz MH, Hermes RAL, Oliveira VL. Mycorrhizal status of some plants of the Araucaria forest and the Atlantic rainforest in Santa Catarina, Brazil. *Mycorrhiza*. 2000;10: 131–136. doi:10.1007/s005720000070
54. Velázquez MS, Carlos FJ, Lucía AC, Natalia A, Marta C. Colonization dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in *Ilex paraguariensis*. *J King Saud Univ - Sci*. 2020;32: 183–188. doi:10.1016/j.jksus.2018.03.017
55. Wise G, Negrin A. A critical review of the composition and history of safe use of guayusa: a stimulant and antioxidant novel food. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020;60: 2393–2404. doi:10.1080/10408398.2019.1643286
56. Mobin M, Abbas ZK, Alamri SA. Fertilizers and Their Contaminants in Soils, Surface and Groundwater. 2018;5: 225–240. doi:10.1016/B978-0-12-809665-9.09888-8
57. Aggarwal A, Kadian N, Tanwar A, Yadav A, Gupta KK. Role of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in global sustainable development. *J Appl Nat Sci*. 2011;3: 340–351. doi:10.31018/JANS.V3I2.211
58. Berruti A, Lumini E, Balestrini R, Bianciotto V. Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: Let's benefit from past successes. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2016. doi:10.3389/fmicb.2015.01559
59. Sarmiento-López LG, López-Meyer M, Sepúlveda-Jiménez G, Cárdenas L, Rodríguez-Monroy M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Stevia rebaudiana* increases trichome development, flavonoid and phenolic compound accumulation. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2021;31: 101889. doi:10.1016/j.bcab.2020.101889
60. Powell JR, Rillig MC. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi and ecosystem function [Internet]. *New Phytologist*. Blackwell Publishing Ltd; 2018. pp. 1059–1075. doi:10.1111/nph.15119
61. Yang H, Zhang Q, Koide RT, Hoeksema JD, Tang J, Bian X, et al. Taxonomic resolution is a determinant of biodiversity effects in arbuscular mycorrhizal fungal communities. *J Ecol*. 2017;105: 219–228. doi:10.1111/1365-2745.12655
62. GAD Parroquial Rural “San Juan de Muyuna.” PLAN DE DESARROLLO Y ORDENAMIENTO TERRITORIAL DEL GAD PARROQUIAL DE MUYUNA [Internet]. 2015. Available: <https://odsterritorioecuador.ec/wp-content/uploads/2019/04/PDOT-PARROQUIA-MUYUNA-2014-2019.pdf>
63. de Souza TAF, Rodriguez-Echeverría S, de Andrade LA, Freitas H. Arbuscular mycorrhizal fungi in *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir from Brazilian semi-arid. *Brazilian J Microbiol*. 2016;47: 359–366. doi:10.1016/J.BJM.2016.01.023
64. Naranjo L. Comunicación personal. Tena; 2019.
65. Naranjo Moran JA. Evaluación de un consorcio de hongos micorrícicos arbusculares (hma) en la absorción de sodio y plomo en cucurbitáceas bajo condiciones controladas [Internet]. Espol. 2019. Available: <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/46896>
66. Moina-Quimi E, Oviedo-Anchundia R, Nieto-Barcelona S, Herrera-Samaniego P,

- Barcos-Arias M. Evaluation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi from humid tropical areas of Ecuador. *Rev Bionatura*. 2018;3: 531–536. doi:10.21931/RB/2018.03.01.9
67. Naranjo L, Granadillo E, Diaz M. FERTILIZACIÓN BIOLÓGICA Y ORGÁNICA DEL Agave cocui (Trelease). Inoculación con hongos micorrízicos arbusculares y aplicación de abonos orgánicos fermentados sobre la productividad. Leipzig: Editorial Académica Española; 2012.
 68. Zangaro W, Rostirola LV, de Souza PB, de Almeida Alves R, Lescano LEAM, Rondina ABL, et al. Root colonization and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in distinct successional stages from an Atlantic rainforest biome in southern Brazil. *Mycorrhiza*. 2013;23: 221–233. doi:10.1007/s00572-012-0464-9
 69. Méndez-Cortes, M.C; Olalde-Portugal, Víctor; Marmolejo-Monsivais J. Manual para la identificación de hongos micorrízico arbusculares. Nuevo León, México; 2011.
 70. West Virginia University. Species Descriptions | Davis - INVAM | West Virginia University. In: Species Descriptions from Reference Cultures [Internet]. 2017 [cited 4 Jul 2021]. Available: <http://fungi.invam.wvu.edu/the-fungi/species-descriptions.html>
 71. QIIME 2 development team. Overview of QIIME 2 Plugin Workflows — QIIME 2 2020.11.1 documentation [Internet]. [cited 7 Jul 2021]. Available: <https://docs.qiime2.org/2020.11/tutorials/overview/>
 72. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73: 5261–5267. doi:10.1128/AEM.00062-07
 73. Shi Z, Yin K, Wang F, Mickan BS, Wang X, Zhou W, et al. Alterations of arbuscular mycorrhizal fungal diversity in soil with elevation in tropical forests of China. *Diversity*. 2019;11: 181. doi:10.3390/d11100181
 74. Deshpande V, Wang Q, Greenfield P, Charleston M, Porrás-Alfaro A, Kuske CR, et al. Fungal identification using a Bayesian classifier and the Warcup training set of internal transcribed spacer sequences. *Mycologia*. 2016;108: 1–5. doi:10.3852/14-293
 75. Coordinators NR. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res*. 2016;44: D7. doi:10.1093/NAR/GKV1290
 76. Kryukov AA, Gorbunova AO, Machs EM, Mikhaylova YV, Rodionov AV, Zhurbenko PM, et al. Perspectives of using Illumina MiSeq for identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *Vavilov J Genet Breed*. 2020;24: 158. doi:10.18699/VJ19.38-O
 77. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. In: METHODOLOGY REFERENCE [Internet]. 2020 [cited 4 Jul 2021]. Available: <http://www.r-project.org/index.html>
 78. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One*. 2013;8: e61217. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0061217
 79. Yang Y, Song Y, Scheller H V., Ghosh A, Ban Y, Chen H, et al. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Robinia pseudoacacia* in

- uncontaminated and heavy metal contaminated soils. *Soil Biol Biochem.* 2015;86: 146–158. doi:10.1016/J.SOILBIO.2015.03.018
80. McCoy AG, Roth MG, Shay R, Noel ZA, Jayawardana MA, Longley RW, et al. Identification of Fungal Communities Within the Tar Spot Complex of Corn in Michigan via Next-Generation Sequencing. *Phytobiomes J* •. 2019;3: 235–243. doi:10.1094/PBIOMES-03-19-0017-R
 81. Tedersoo L, Bahram M, Põlme S, Kõljalg U, Yorou NS, Wijesundera R, et al. Global diversity and geography of soil fungi. *Science* (80-). 2014;346. doi:10.1126/SCIENCE.1256688
 82. Higo M, Tatewaki Y, Iida K, Yokota K, Isobe K. Amplicon sequencing analysis of arbuscular mycorrhizal fungal communities colonizing maize roots in different cover cropping and tillage systems. *Sci Reports* 2020 101. 2020;10: 1–13. doi:10.1038/s41598-020-58942-3
 83. Stürmer SL, Oliveira LZ, Morton JB. Gigasporaceae versus Glomeraceae (phylum Glomeromycota): A biogeographic tale of dominance in maritime sand dunes. *Fungal Ecol.* 2018;32: 49–56. doi:10.1016/J.FUNECO.2017.11.008
 84. Zhang Y, Guo L-D, Liu R-J. Survey of arbuscular mycorrhizal fungi in deforested and natural forest land in the subtropical region of Dujiangyan, southwest China. *Plant Soil* 2004 2611. 2004;261: 257–263. doi:10.1023/B:PLSO.0000035572.15098.F6
 85. Turrini A, Giovannetti M. Arbuscular mycorrhizal fungi in national parks, nature reserves and protected areas worldwide: a strategic perspective for their in situ conservation. *Mycorrhiza* 2011 222. 2011;22: 81–97. doi:10.1007/S00572-011-0419-6
 86. Wilde P, Manal A, Stodden M, Sieverding E, Hildebrandt U, Bothe H. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in roots and soils of two salt marshes. *Environ Microbiol.* 2009;11: 1548–1561. doi:10.1111/J.1462-2920.2009.01882.X
 87. Chamkhi I, Abbas Y, Tarmoun K, Aurag J, Sbabou L. Morphological and molecular characterization of arbuscular mycorrhizal fungal communities inhabiting the roots and the soil of saffron (*Crocus sativus* L.) under different agricultural management practices. <https://doi.org/10.1080/0365034020181548012>. 2018;65: 1035–1048. doi:10.1080/03650340.2018.1548012
 88. MERRYWEATHER J, FITTER A. The arbuscular mycorrhizal fungi of *Hyacinthoides non-scripta* L. Diversity of fungal taxa. *New Phytol.* 1998;138: 117–129. doi:10.1046/J.1469-8137.1998.00888.X
 89. Young JPW. A molecular guide to the taxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 2012;193: 823–826. doi:10.1111/J.1469-8137.2011.04029.X
 90. Kohout P, Sudová R, Janoušková M, Čtvrtlíková M, Hejda M, Pánková H, et al. Comparison of commonly used primer sets for evaluating arbuscular mycorrhizal fungal communities: Is there a universal solution? *Soil Biol Biochem.* 2014;68: 482–493. doi:10.1016/J.SOILBIO.2013.08.027
 91. Lekberg Y, Vasar M, Bullington LS, Sepp SK, Antunes PM, Bunn R, et al. More bang for the buck? Can arbuscular mycorrhizal fungal communities be characterized

- adequately alongside other fungi using general fungal primers? *New Phytol.* 2018;220: 971–976. doi:10.1111/NPH.15035
92. Lekberg Y, Rosendahl S, Olsson PA. The fungal perspective of arbuscular mycorrhizal colonization in ‘nonmycorrhizal’ plants. *New Phytol.* 2015;205: 1399–1403. doi:10.1111/NPH.13118
93. Xie M-M, Chen S-M, Zou Y-N, Srivastava AK, Rahman MM, Wu Q-S, et al. Effects of *Rhizophagus intraradices* and *Rhizobium trifolii* on growth and N assimilation of white clover. *Plant Growth Regul* 2021 933. 2021;93: 311–318. doi:10.1007/S10725-020-00689-Y

ANEXOS

Anexo 1. Puntos de muestreo de cada planta de guayusa (vía San Salvador empleada como referencia). Distancia mínima 50 metros (Google Maps).



Anexo 2. Análisis químico y físico del sitio de muestreo. Cada cantidad es representada como el promedio de 3 mediciones.

Punto de muestreo	pH	Conduc-tividad eléc-trica (mS/cm)	M.O. (%)	NO ₃ -N (mg/mL)	K (meq/100 g)
Comunidad San Salvador	4.7 ± 0.1	0.3 ± 0.0	20.8 ± 3.0	30.8 ± 2.5	0.2 ± 0.0

Punto de muestreo	Ca (meq/100 g)	Mg (meq/100 g)	Na (meq/100 g)	Fe (ppm)	N total (%)
Comunidad San Salvador	0.8 ± 0.1	0.24 ± 0.0	0.9 ± 0.0	288.6 ± 18.6	0.9 ± 0.1

Punto de muestreo	Mn (ppm)	Cu (ppm)	Zn (ppm)	Capacidad de intercambio catiónico (meq/100 g)	Materia orgánica (%)
Comunidad San Salvador	4.0 ± 2.2	10.2 ± 0.5	8.3 ± 1.0	1.4 ± 1.1	39.9 ± 1.9

Punto de muestreo	Cd (mg/kg)	Al intercambiable (meq/100 g)	P (ppm)	S (ppm)	B (ppm)
Comunidad San Salvador	1.9 ± 0.5	0.2 ± 0.0	< 2.0	< 5.0	< 0.0

Anexo 3. Frecuencia de colonización total de HMA en *I. guayusa*. Cada promedio proviene de un triplicado.

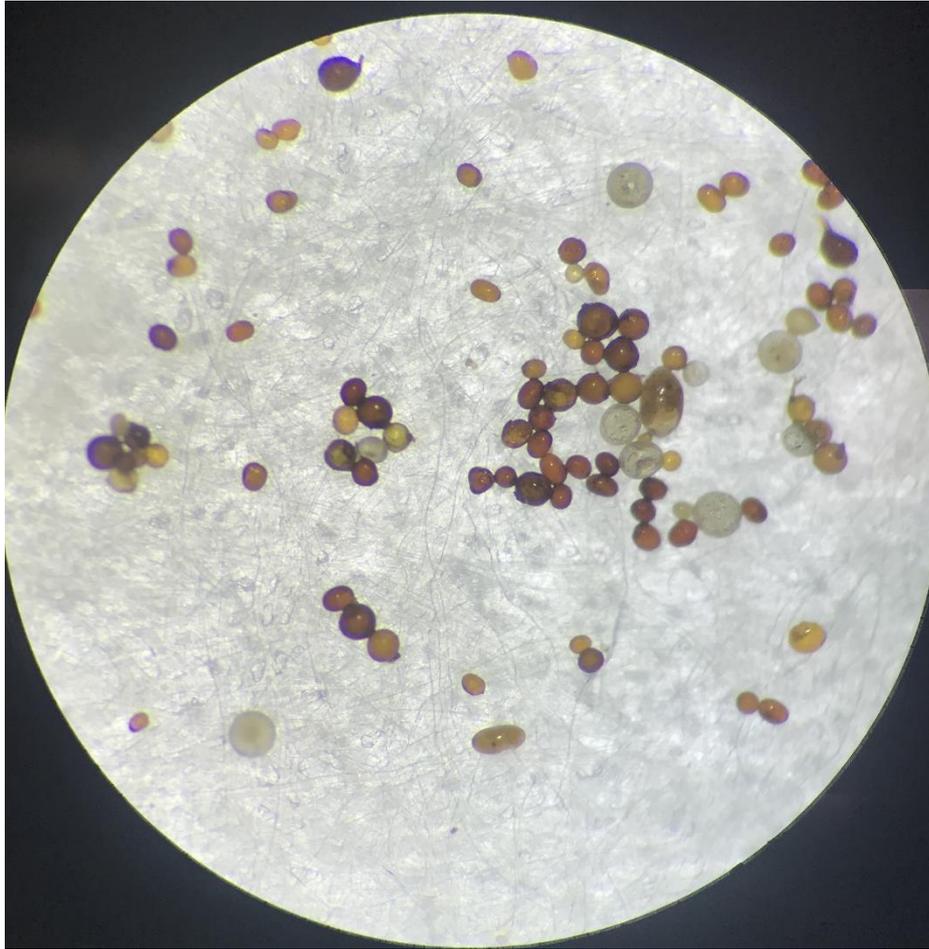
Plantas de guayusa	Frecuencia de colonización total (n=3)
G1	55.2 ± 4.5
G2	57.8 ± 8.7
G3	44.5 ± 9.1
G4	62.2 ± 1.1

Anexo 4. Contabilización de esporas extraídas de la rizósfera de HMA.

Plantas de guayusa	Repeticiones	Número de esporas viables/100 g de suelo	Número de esporas no viables/100 g de suelo	Total esporas por réplica
G1	1.1	94	71	165
	1.2	91	36	127
	1.3	98	53	151
G2	2.1	72	70	142
	2.2	65	62	127
	2.3	61	67	128
G3	3.1	47	19	66
	3.2	35	16	51
	3.3	36	22	58
G4	4.1	41	35	76
	4.2	32	38	70
	4.3	37	17	54
SUMA TOTAL		709	506	1215

Anexo 5. Parte del grupo de esporas viables de HMA obtenidas de la rizósfera de *I. guayusa*

(fondo papel filtro). Estereoscopio 4x.

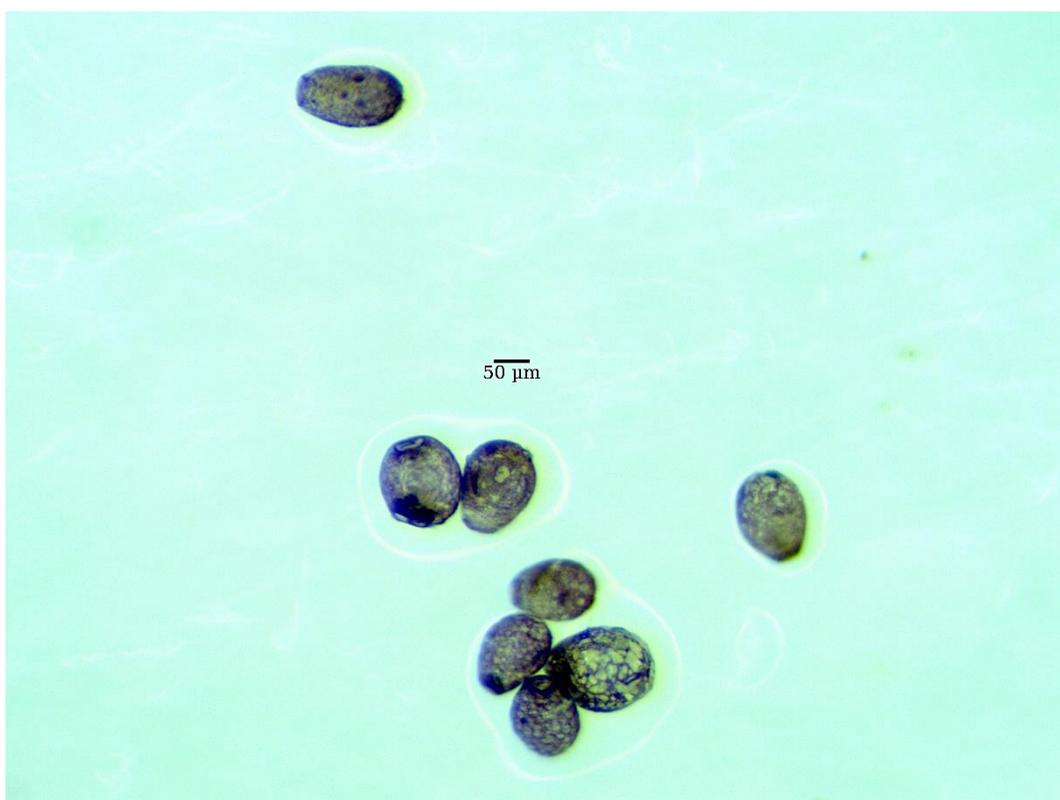


Anexo 6. Abundancia de esporas de HMA extraídas de la rizósfera de *I. guayusa*.

Plantas de guayusa	Total esporas viables	Esporas para observación (10%)	Esporas totales en 100 g de suelo (n=3)	Esporas viables en 100 g de suelo (n=3)
G1	283	28	147.7	94.3
G2	198	20	132.3	66.0
G3	118	12	58.3	39.3

G4	110	11	66.67	36.7
SUMA TOTAL	709	71	405	236.3
Promedio total			101.3 ± 45.3	59.1 ± 27.0

Anexo 7. Grupo de esporas no clasificadas taxonómicamente que presentan un color púrpura característico.



Anexo 8. Número de secuencias por cada una de las 9 muestras secuenciadas luego del proceso de remoción de primers y ensamblaje de los reads. G1= planta de guayusa 1, G1-R= Réplica G1, G2= planta de guayusa 2, G2-R= Réplica G2, etc. Las muestras están ordenadas descendentemente de acuerdo a las secuencias de las columnas iniciales.

ID muestras	Secuencias forward (F)	Secuencias reverse (R)	Secuencias (F) luego de remoción de primers	Secuencias (R) luego de remoción de primers	Total de secuencias ensambladas	Total de secuencias ensambladas (%)
G1-R	671981	671981	667682	667682	253877	38.02
Esporas	409319	409319	405367	405367	152602	37.65
G2	306472	306472	305922	305922	259898	84.96
G3	294524	294524	294141	294141	253531	86.19
G4	257697	257697	257109	257109	216765	84.31
G4-R	242176	242176	238043	238043	104416	43.86
G3-R	204706	204706	200638	200638	97737	48.71
G2-R	201338	201338	200474	200474	70081	34.96
G1	199007	199007	197989	197989	169604	85.66
TOTAL	2787220	2787220	2767365	2767365	1578511	57.04
%	100	100	99.29	99.29	57.04	57.04

Anexo 9. Número de secuencias por muestra que permanecieron luego del filtro $Q \geq 20$.

Las muestras siguen las etiquetas y el orden del Anexo 8.

ID muestras	Secuencias ingresadas	Secuencias cortadas	Secuencias eliminadas	Total de secuencias retenidas
G1-R	253877	270	167	253710
Esporas	152602	221	143	152459
G2	259898	186	119	259779
G3	253531	189	134	253397

G4	216765	108	64	216701
G4-R	104416	95	49	104340
G3-R	97737	105	94	97643
G2-R	70081	83	76	70032
G1	169604	202	161	169443
TOTAL	1578511	1459	1007	1577504
%	100	0.09	0.06	99.94

Anexo 10. Número de secuencias y OTUs por muestra que permanecieron luego de filtrar las secuencias quimeras. Las muestras siguen las etiquetas y el orden del Anexo 6.

ID muestras	OTUs	Secuencias	OTUs no quiméricos	Secuencias No-quimeras
G1-R	14882	253710	13019	249971
Esporas	15053	152459	13147	148755
G2	6220	259779	5369	257982
G3	7678	253397	6630	251027
G4	3654	216701	3267	215998
G4-R	14464	104340	12655	100690
G3-R	14246	97643	12461	94167
G2-R	4620	70032	4150	69302
G1	10322	169443	8855	166010
Total (los OTUs no son aditivos)	61921	1577504	52.783	1553902

Anexo 11. Secuencias de cada planta de guayusa y de la muestra de esporas asignadas al reino de los hongos y al Phylum *Glomeromycota* (HMA).

ID muestras	Secuencias totales	Secuencias de hongos	Secuencias HMA
G1	415981	172190	978
G2	327284	183462	821
G3	345194	123357	3174
G4	316688	163886	1866
Esporas	148755	54490	2550
TOTAL	1553902	697385	9389
%	100	44.9	1.4

Anexo 12. OTUs asociados taxonómicamente a los HMA. La cantidad de secuencias por cada OTUs se visualiza para cada una de las muestras de guayusa (G1-G4) y de esporas. Los OTUs identificados como taxas centrales (al menos 5 secuencias) de guayusa están marcados con color verde.

	G1	G2	Esporas	G3	G4	Familia	Género	Especie
OTU1	0	22	414	371	209	Glomeraceae	Glomeraceae sp.-1	Glomeraceae sp.-1
OTU2	0	54	700	621	180	Glomeraceae	Glomeraceae sp.-2	Glomeraceae sp.-2
OTU3	2	2	374	209	200	Glomeraceae	Glomeraceae sp.-3	Glomeraceae sp.-3
OTU4	34	10	116	1085	171	Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i>	<i>Rhizophagus</i> sp.-1
OTU5	511	0	0	0	0	Glomeraceae	Glomeraceae sp.-4	Glomeraceae sp.-4
OTU6	0	1	232	0	0	Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i>	<i>Rhizophagus</i> sp MUCL 43208-1

OTU7	2	5	46	182	0	Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i>	<i>Rhizophagus sp.-2</i>
OTU8	63	277	172	0	27	Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i>	<i>Rhizophagus sp.-3</i>
OTU9	26	1	3	170	0	Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i>	<i>Rhizophagus sp.-4</i>
OTU10	0	0	60	135	0	Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i>	<i>Rhizophagus custos-1</i>
OTU11	48	126	163	0	36	Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i>	<i>Rhizophagus sp MUCL 43208-2</i>
OTU12	141	9	0	104	115	Glomeraceae	Glomeraceae sp.-5	Glomeraceae sp.-5
OTU13	0	0	0	0	142	Glomeraceae	Glomeraceae sp.-6	Glomeraceae sp.-6
OTU14	0	6	51	63	230	Glomeraceae	<i>Glomus</i>	<i>Glomus sp.-1</i>
OTU15	0	0	0	25	89	Glomeraceae	Glomeraceae sp.-7	Glomeraceae sp.-7
OTU16	76	117	0	1	30	Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i>	<i>Rhizophagus sp.-5</i>
OTU17	1	0	17	44	0	Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i>	<i>Rhizophagus custos-2</i>
OTU18	0	0	60	0	0	<i>Glomeromyces sp.-1</i>	<i>Glomeromyces sp.-1</i>	<i>Glomeromyces sp.-1</i>
OTU19	0	0	0	0	51	Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i>	<i>Rhizophagus custos-3</i>
OTU20	0	1	0	56	0	Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i>	<i>Rhizophagus intraradices-1</i>
OTU21	0	46	0	0	0	Glomeraceae	<i>Glomus</i>	<i>Glomus sp FO128_13</i>

								1
OTU22	45	6	0	0	0	<i>Glomeromyces sp.-2</i>	<i>Glomeromyces sp.-2</i>	<i>Glomeromyces sp.-2</i>
OTU23	0	0	0	0	63	<i>Glomeromyces sp.-3</i>	<i>Glomeromyces sp.-3</i>	<i>Glomeromyces sp.-3</i>
OTU24	0	34	0	0	0	Glomeraceae	<i>Glomus</i>	<i>Glomus sp 3 SUN_2011-1</i>
OTU25	0	22	1	0	0	Glomeraceae	<i>Glomus</i>	<i>Glomus sp 3 SUN_2011-2</i>
OTU26	19	0	0	0	0	Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i>	<i>Rhizophagus intraradices-2</i>
OTU27	0	0	0	0	161	Glomeraceae	Glomeraceae sp.-8	Glomeraceae sp.-8
OTU28	0	0	2	9	125	Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i>	<i>Rhizophagus custos-4</i>
OTU29	0	24	0	0	0	Glomeraceae	<i>Glomus</i>	<i>Glomus sp 3 SUN_2011</i>
OTU30	0	0	0	13	0	Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i>	<i>Rhizophagus sp.-6</i>
OTU31	2	10	0	0	0	Glomeraceae	<i>Glomus</i>	<i>Glomus sp.-2</i>
OTU32	0	0	61	0	0	Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i>	<i>Rhizophagus custos-5</i>
OTU33	0	16	0	39	0	Glomeraceae	Glomeraceae sp.-9	Glomeraceae sp.-9
OTU34	0	0	43	2	0	Glomeraceae	Glomeraceae sp.-10	Glomeraceae sp.-10

OTU35	0	0	0	43	1	Glomeraceae	Glomeraceae sp.-11	Glomeraceae sp.-11
OTU36	0	0	0	0	6	Glomeraceae	<i>Sclerocarpum</i>	<i>Sclerocarpum amazonicum</i>
OTU37	0	5	0	0	0	Diversisporaceae	<i>Redeckera</i>	<i>Redeckera fulvum</i>
OTU38	0	0	17	0	0	Glomeraceae	Glomeraceae sp.-12	Glomeraceae sp.-12
OTU39	0	24	0	0	5	Glomeraceae	Glomeraceae sp.-13	Glomeraceae sp.-13
OTU40	0	3	0	0	0	Glomeraceae	<i>Glomus</i>	<i>Glomus sp 3 SUN_2011-3</i>
OTU41	4	0	0	0	0	Glomeraceae	<i>Rhizoglosum</i>	<i>Rhizoglosum dunense</i>
OTU42	0	0	16	0	0	Glomeraceae	Glomeraceae sp.-14	Glomeraceae sp.-14
OTU43	0	0	0	0	11	Glomeraceae	<i>Glomus</i>	<i>Glomus sp.-3</i>
OTU44	0	0	0	0	5	Glomeraceae	<i>Silvaspora</i>	<i>Silvaspora neocaledonica</i>
OTU45	1	0	0	0	0	Glomeraceae	Glomeraceae sp.-15	Glomeraceae sp.-15
OTU46	1	0	0	0	0	Glomeraceae	<i>Glomus</i>	<i>Glomus sp 3 SUN_2011-4</i>
OTU47	1	0	0	0	0	Glomeraceae	<i>Glomus</i>	<i>Glomus sp.-4</i>
OTU48	1	0	0	1	0	Glomeraceae	Glomeraceae sp.-16	Glomeraceae sp.-16

OTU49	0	0	1	0	0	Glomeraceae	<i>Glomus</i>	<i>Glomus macrocarpum</i>
OTU50	0	0	1	0	1	<i>Glomeromyces</i> sp.-4	<i>Glomeromyces</i> sp.-4	<i>Glomeromyces</i> sp.-4
OTU51	0	0	0	1	0	Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i>	<i>Rhizophagus custos</i> -6
OTU52	0	0	0	0	1	Glomeraceae	<i>Glomus</i>	<i>Glomus</i> sp 3 SUN_2011-5
OTU53	0	0	0	0	4	Glomeraceae	Glomeraceae sp.-17	Glomeraceae sp.-17
OTU54	0	0	0	0	3	Glomeraceae	Glomeraceae sp.-18	Glomeraceae sp.-18
Total secuencias	978	821	2550	3174	1866			

Anexo 13. Autorización de Investigación Científica (Nº 023-2019-IC-FLO-DBN/MA) para realizar la metodología planteada en el presente trabajo de investigación:



El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere el acuerdo interinstitucional Nro. SENESCYT-MAE-2018-001 autoriza a:

Nombre	Nacionalidad	# Cédula	Función
Andrea Carrera	Ecuatoriana	1718343435	Investigadora
Verónica Sandoya	Ecuatoriana	1712756970	Investigadora
Renata Montero	Ecuatoriana	1720769726	Investigadora
Milton Barcos	Ecuatoriana	1204229692	Investigador
Jaime Naranjo	Ecuatoriana	0927155226	Investigador
Ricardo Pacheco	Ecuatoriana	1204913964	Investigador
Leopoldo Naranjo	Venezolana	1758579294	Investigador
Wilfredo Franco	Venezolana	1757359433	Investigador
Roldan Torres	Cubana	0151345121	Investigador
Caroline Bacquet	Chilena	1756516041	Investigador
Spyridon Agathos	Griega	1757278518	Investigador

Para que lleven a cabo la investigación científica "DESCUBRIENDO LA DIVERSIDAD DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES AUTÓCTONOS ASOCIADOS A CACAO (*Theobroma cacao*), CEDRO (*Cedrela Montana*) Y GUAYUSA (*Ilex Guayusa*): UN PRIMER PASO HACIA LA OBTENCIÓN DE BIOFERTILIZANTES Y EL DESARROLLO SUSTENTABLE DE LA AGROFORESTERÍA."

DE ACUERDO A LAS SIGUIENTES ESPECIFICACIONES

- Solicitud de: Verónica Sandoya.
- Contraparte del Ministerio del Ambiente: Dirección Nacional de Biodiversidad.
- Institución científica nacional de apoyo: Yachay Tech
- Entrega de informe final: 19 Julio 2020.
- Inicio de la actividad: 19/07/2019.
- En caso de no llevarse a cabo la investigación se debe informar a la Autoridad Ambiental adjunto un justificativo.
- Valoración técnica del proyecto: Fanny Tello
- Esta Autorización NO HABILITA LA MOVILIZACIÓN DE FLORA / FAUNA O MICROORGANISMOS. Competencia de cada una de las direcciones provinciales del MAE, y que deberá gestionarse en cada dependencia.
- Esta Autorización NO HABILITA EXPORTACIÓN DE FLORA/FAUNA O MICROORGANISMOS, sin la correspondiente autorización de la Dirección Nacional de Biodiversidad
- Las muestras recolectadas no podrán ser utilizadas en actividades de BIOPROSPECCIÓN, NI ACCESO AL RECURSO GENÉTICO, competencia exclusiva se la Unidad de Acceso a Recursos Genéticos, DNB. De los resultados que se desprendan de esta investigación, no podrán ser utilizados para estudios posteriores de Acceso a Recurso Genéticos sin la previa autorización del Ministerio del Ambiente.

SE AUTORIZA LA RECOLECCIÓN DE MUESTRAS EN CAMPO

- Tomar datos de diámetro del fuste, altura, diámetro de la copa y volumen de cada árbol,

La falta de entrega de los resultados finales en los formatos indicados será causa suficiente para que el investigador no pueda continuar con las actividades de investigación en el país.



12. Medir el diámetro del fuste a una altura de 1,30 m mediante cinta diamétrica y la altura total del árbol y del fuste,
13. Estimar el volumen de los individuos, para calcular la biomasa de cada árbol,
14. Tomar tres muestras de rizósfera (suelo + raicillas) de cada uno de los individuos de CCG seleccionados para el presente estudio,
15. Preservar las muestras en fundas con cerradura hermética y codificarlas mediante códigos que incluyan el número de individuo, la especie, localidad y fecha,
16. Toma de muestras de suelos hasta una profundidad de 120 cm mediante barrenamientos,

Obligaciones del investigador

17. Citar en las publicaciones científicas, tesis e informes técnicos científicos el número de Autorización de Investigación Científica otorgada por el Ministerio del Ambiente, con el que se colectó el material biológico,
18. Entregar al Ministerio del Ambiente-Dirección Nacional de Biodiversidad, (02) dos copias del informe final impreso a ambas caras en formato PDF, y una versión digital, de los resultados de la autorización otorgada. (Solicitar formato Informe Final DNB).
19. Entregar al Ministerio del Ambiente-Dirección Nacional de Biodiversidad la información asociada a cada muestra, esta información deberá ser facilitada en formato digital de acuerdo a los estándares establecidos Solicitar formato Informe Final DNB,

Del incumplimiento de las obligaciones dispuestas en los numerales 17, 18 y 19 se responsabiliza a: Andrea Carrera, Verónica Sandoya, Renata Montero, Milton Barcos, Jaime Naranjo, Ricardo Pacheco, Leopoldo Naranjo, Wilfredo Franco, Roldan Torres, Caroline Bacquet y Spyridon Agathos.

SE AUTORIZA LA RECOLECCIÓN CON EL PROPOSITO DE:

20. Evaluar la diversidad de HMA asociados a las especies de interés agroforestal cacao (*Theobroma cacao*), cedro (*Cedrela montana*) y guayusa (*Ilex guayusa*) en tres regiones de Ecuador.
21. Cuantificar la frecuencia e intensidad de infección micorrizica arbuscular en las raíces de las especies agroforestales muestreadas.
22. Aislar e identificar taxonómicamente esporas de hongos micorrizicos arbusculares de autóctonos.
23. Determinar la biodiversidad de hongos micorrizicos arbusculares asociados a las especies de interés agroforestal estudiadas y emitir Informes Técnicos.

SE AUTORIZA LA INVESTIGACIÓN EN LAS PROVINCIAS

Provincia	Localidades
Guayas	Milagro
Manabí	Calceta
Los Ríos	Vinces
Imbabura	Tablachupa (vía Otavalo-Apuela), Shanshipamba (vía Pimampiro), zona limítrofe de la Reserva Cotacachi-Cayapas
Napo	Alto Tena, San Salvador, Chiuta, Pueblo Kichwa Rukullakta, áreas del bosque primario protegido del Pueblo Kichwa Rukullakta
Morona Santiago	Palora

La falta de entrega de los resultados finales en los formatos indicados será causa suficiente para que el investigador no pueda continuar con las actividades de investigación en el país.

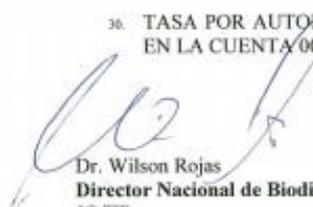


SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE LOS SIGUIENTES MATERIALES Y/O EQUIPOS PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA INVESTIGACIÓN.

Insumos	Equipos	Reactivos
Fundas ziploc	Estufa	Azul de tripano
Palas para recoger la rizosfera	Cooler	Peróxido de hidrógeno
Tamiz de poro 500 µm	Estereoscopio	Agua destilada
Tamiz de poro 150 µm	Centrifuga	Hidróxido de potasio
Tamiz de poro 45 µm	Microscopio	Ácido clorhídrico
Cajas Petri cuadrículadas	Micropipeta	Lactoglicerol
Falcon tubos 50 mL sin base (para centrifuga)	Baño termoregulado	Ácido láctico
Portaobjetos	Cubreobjetos	Glicerol
Reactivo de Melzer ó Hidrato cloral (10 g)	Alcohol polivinílico	Sacarosa

OBLIGACIONES Y CONDICIONES PARA LA VIGENCIA DE ESTA AUTORIZACIÓN:

24. LOS INVESTIGADORES DEBERÁN REALIZAR SUS INTERVENCIONES EN CAMPO BAJO UN MANEJO RESPONSABLE Y ÉTICO CON LOS ESPECÍMENES ASÍ COMO CON LOS EQUIPOS Y MATERIALES UTILIZADOS DURANTE LA INVESTIGACIÓN.
25. PARA EL INGRESO AREAS DE PROPIEDAD PRIVADA LOS INVESTIGADORES DEBERAN CONTAR CON LA AUTORIZACIÓN DEL RESPECTIVO PROPIETARIO.
26. PARA EL INGRESO ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS LOS INVESTIGADORES DEBERAN INFORMAR DE SU INGRESO AL RESPECTIVO JEFE DE ÁREA DEL MAE.
27. SE PROHÍBE EL INGRESO A LAS ÁREAS NATURALES DEL ESTADO ETILICO, PORTANDO ARMAS, EXPLOSIVOS, TÓXICOS, CONTAMINANTES, MATERIAL VEGETATIVO, ESPECIES ANIMALES Y EN GENERAL TODO AQUELLO QUE ATENTE A LA INTEGRIDAD DEL ÁREA.
28. TODO USO INDEBIDO DE ESTA AUTORIZACIÓN, ASÍ COMO EL INCUMPLIMIENTO DE ASPECTOS LEGALES, ADMINISTRATIVOS O TÉCNICOS ESTABLECIDOS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS.
29. EL INCUMPLIMIENTO DE CUALQUIERA DE ESTAS DISPOSICIONES ASÍ COMO EL USO INDEBIDO DE ESTE DOCUMENTO, O EL INCUMPLIMIENTO DE LAS DISPOSICIONES LEGALES, ADMINISTRATIVAS O TÉCNICAS ESTABLECIDAS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS CONFORME CODIGO ORGANICO DEL AMBIENTE Y CODIGO INTEGRAL PENAL Y CON LA SUSPENSIÓN INMEDIATA DE LA PRESENTE AUTORIZACIÓN.
30. TASA POR AUTORIZACIÓN: 20 VEINTE DÓLARES NO REEMBOLSABLES DEPOSITADOS EN LA CUENTA 0010000785, CÓDIGO SUBLÍNEA 190499.


 Dr. Wilson Rojas
Director Nacional de Biodiversidad (E).
 JO/FT
 2019/07/19

La falta de entrega de los resultados finales en los formatos indicados será causa suficiente para que el investigador no pueda continuar con las actividades de investigación en el país.